

РЕЗИДЕНТНЫЕ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ В ПРОПУЛЬСАТОРНЫХ ОРГАНАХ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*

© М. И. Крылова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес:
heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

В результате гистохимического и электронно-микроскопического исследования тучных клеток (ТК) «кровенного» и лимфатического сердец взрослой лягушки обнаружены две популяции ТК: популяция резидентных ТК и популяция циркулирующих ТК. Кардиальные резидентные ТК обладают овальной или удлинённой формой и присутствуют в миокарде предсердия, желудочка и соединительной ткани эпикарда сердца. Циркулирующие ТК обнаружены в просвете сердца в лакунах и узких щелях, образованных трабекулярным миокардом желудочка, а также в крови, заполняющей центральные полости предсердия и желудочка. Благодаря небольшим размерам и округлой форме циркулирующие ТК напоминают лимфоциты. В их цитоплазме обнаружены гранулы, по своей ультраструктуре аналогичные гранулам резидентных ТК сердца лягушки. В лимфатическом сердце резидентные ТК удлинённой формы расположены в стенке сердца между поперечнополосатыми мышечными волокнами, а также гладкомышечными клетками афферентных и эфферентных клапанов сердца. Изредка циркулирующие ТК округлой формы можно увидеть в просвете лимфатического сердца. В полости лимфатических синусов, расположенных в непосредственной близости от лимфатического сердца, циркулирующие ТК встречаются регулярно и нередко образуют кластеры в пристеночных районах, плотно контактируя с мезотелиальными клетками, выстилающими полость синуса. Проведённое гистохимическое исследование показало, что резидентные и циркулирующие ТК пропульсаторных органов имеют ярко выраженную альциан-положительную реакцию, но обладают слабой сафранинофилией и метакромазией. Наличие популяции циркулирующих ТК у взрослых лягушек свидетельствует о существовании различий в биологии ТК у низших и высших позвоночных.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тучные клетки, «кровенное» сердце, лимфатическое сердце, гистохимия, электронная микроскопия, лягушка *Rana temporaria*.

П р и н я т ы е с о к р а щ е н и я: ТК — тучные клетки, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум.

Согласно современным представлениям, тучные клетки (ТК) млекопитающих принадлежат к резидентным тканевым клеткам и играют ключевую роль в аллергических реакциях и воспалительных процессах. Присутствие в их цитоплазме специфических секреторных гранул, обогащенных биоактивными молекулами, является одним из основных морфологических критериев для идентификации ТК в тканях. Активированные ТК выделяют разнообразные медиаторы, включая гистамин, лейкотриены, простагландины, сериновые протеазы, а также различные цитокины, хемокины и ростовые факторы (Metcalf et al., 1997).

Показано, что плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки костного мозга дают начало коммитированным предшественникам ТК. Кровь разносит клетки-предшественники ТК по всему организму, и последние, проникая в различные органы и ткани, завершают там свою дифференцировку (Kitamura et al., 1977). Обнаружены фенотипические различия между коммитированными предшественниками ТК у эмбрионов и взрослых мышей. Так, в позднем эмбриональном развитии мыши циркулирующие предшественники ТК определены фе-

нотипом Thy-1(lo)c-Kit(hi)FcεRIα(-) и содержат в цитоплазме небольшое количество базофильных гранул. Обнаружить подобные циркулирующие предшественники ТК в крови у взрослых мышей не удалось (Rodewald et al., 1996). Однако коммитированные предшественники ТК у взрослых мышей идентифицированы в костном мозге, имеют фенотип Lin(-)c-Kit(+)Sca-1(-)Ly6c(-)FcεRIα(-) CD27(-)beta7(+)T1/ST2(+) и не содержат в цитоплазме базофильных гранул. Установлено, что в костном мозге предшественники ТК берут начало непосредственно от мультипотентных предшественников (Chen et al., 2005). Факторы, влияющие на выброс предшественников ТК из костного мозга в кровь и их рекрутирование в ткани, исследованы еще недостаточно (Weller et al., 2005; Okayama, Kawakami, 2006).

Разноплановые и интенсивные исследования ТК млекопитающих сфокусированы на поиске коммитированных предшественников ТК, выявлении молекулярных механизмов активации ТК, определении цитокиновых регуляторов их роста и функции, установлении роли ТК в разнообразных физиологических и патофизиологических процессах.

У амфибий данные о биологии ТК достаточно скудны и фрагментарны. Получены ультраструктурные характеристики ТК тритонов и лягушек в условиях как нормы (Setoguti, 1969; Csaba et al., 1970; Kara et al., 1970; Chiaffi Vaccari et al., 1998), так и эксперимента (Monteforte et al., 2001; Esposito et al., 2002; Chiaffi Vaccari et al., 2003). С помощью гистохимических и иммуногистохимических методов в гранулах ТК лягушки выявлены гепарин, N-ацетил-β-глюкозаминидаза, неспецифическая эстераза (Chiu, Lagunoff, 1971), серотонин (Csaba et al., 1970; Bigaj et al., 1991), гистамин (Chiaffi Vaccari et al., 1998) и натрийуретический пептид (Крылова, 2003, 2006).

Как у грызунов (Bienenstock, 1988), так и у лягушек идентифицированы два подтипа ТК — соединительнотканые ТК и слизистые ТК (Chiaffi Vaccari et al., 1998). Эти два подтипа различают по их анатомическому расположению, морфофункциональным и биохимическим свойствам. У амфибий гистохимические, ультраструктурные и иммуногистохимические свойства ТК соединительнотканного типа исследованы в языке, почке и сердце лягушки *Rana esculenta*. Последовательное гистохимическое окрашивание срезов этих органов альциановым голубым и сафранином выявило ТК, содержащие в цитоплазме либо смесь альциан- и сафранин-положительных гранул, либо только сафранин-положительные гранулы. Исследование ультраструктуры округлых, овальных и иногда веретенновидных цитоплазматических гранул ТК лягушки показало, что они, как правило, состоят из двух частей: электронно-светлого матрикса, представленного тонкогранулярным или сетчатым материалом, и электронно-плотного компонента, представленного преимущественно ламеллярными паракристаллиновыми структурами разнообразных величины и формы. Эти интрагранулярные включения делают ультраструктуру цитоплазматических гранул ТК лягушки уникальной, непохожей на таковую гранул ТК млекопитающих и человека (Chiaffi Vaccari et al., 1998). Кроме того, в отличие от млекопитающих в крови у взрослых лягушек на светооптическом и ультраструктурном уровнях были обнаружены клетки лимфоидного типа, содержащие характерные для ТК лягушек цитоплазматические гранулы (Csaba et al., 1970; Kara et al., 1970).

Отсутствие в литературе данных о морфологической идентификации популяции циркулирующих ТК в пропульсаторных органах лягушки побудило нас к выполнению данной работы. Целью настоящего исследования является изучение ТК в «кровенном» и лимфатическом сердцах взрослой травяной лягушки методами светооптической гистохимии и электронной микроскопии.

Материал и методика

Объектом исследования служили предсердия и желудочки «кровенных» сердец, а также задние лимфатические сердца 10 взрослых самцов лягушки *Rana temporaria* массой 30—40 г. Работу проводили в зимнее время на лягушках, адаптированных к комнатным условиям содержания.

Р е а к т и в ы: альциановый голубой 8G (Fluka, Швейцария), сафранин O (Fisher Science E., США), толуидиновый синий (Sigma) и ацетат свинца (Serva).

С в е т о о п т и ч е с к а я м и к р о с к о п и я. Кусочки сердец фиксировали в жидкости Карнуа и 1%-ном подкисленном спиртовом растворе ацетата свинца. Материал заливали в парафин и готовили срезы толщиной 6 мкм.

Для изучения гистохимических свойств ТК парафиновые срезы окрашивали последовательно 1%-ным раствором альцианового голубого в 3%-ной уксусной кислоте (pH 3.2) и раствором 0.5%-ного сафранина в 0.1 N соляной кислоте (pH 1.5). Для выявления метахромазии срезы окрашивали раствором 1%-ного подкисленного толуидинового синего в 70%-ном этаноле. Некоторые срезы, окрашенные 1%-ным альциановым голубым, подкрашивали гематоксилином Майера и эозином. Срезы просматривали в микроскопе Микмед (ЛОМО) и фотографировали цветной CCD-камерой MX13C (Baumer, Germany). ТК подсчитывали в миокарде и эпикарде «кровенного» сердца, а также в миокарде лимфатического сердца. Определяли плотность ТК на 1 мм² площади среза. Из периферической крови делали мазки, которые фиксировали в растворе 1%-ного ацетата свинца и окрашивали теми же красителями, что и парафиновые срезы.

Э л е к т р о н н а я м и к р о с к о п и я. Кусочки «кровенного» и лимфатического сердец фиксировали в течение 2 ч при 4 °C в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере (pH 7.4). Затем кусочки при 4 °C постфиксировали в течение 1 ч в 1%-ном OsO₄, дегидратировали в этаноле возрастающей концентрации, проводили через ацетон и заключали в смесь смол Эпон—Аралдит. На ультратоме LKB-III изготавливали тонкие срезы и окрашивали их цитратом свинца. Материал просматривали в электронном микроскопе JEM-7A при ускоряющем напряжении 80 кВ. Полутонкие срезы, изготовленные для светооптической микроскопии, окрашивали раствором 1%-ного толуидинового синего на буре.

Результаты

О б щ а я м о р ф о л о г и я и г и с т о х и м и я. ТК в «кровенном» сердце лягушки после окраски парафиновых срезов 1%-ным раствором альцианового голубого (pH 3.2) легко идентифицировать по интенсивно голубому цвету их цитоплазмы (рис. 1, а, б, в). Плотность резидентных ТК в эпикарде предсердия (висцеральном листке перикарда) составляет в среднем 150 кл./мм², в предсердии — 25, а в желудочке — 3 кл./мм². В эпикарде местобитанием ТК является субэпикардальная область, содержащая большое количество коллагеновых и эластических волокон (рис. 1, б). Цитоплазма эпикардальных ТК нередко выглядит вакуолизированной, возможно, в результате частичной дегрануляции клеток. В миокарде предсердия и желудочка ТК расположены между кардиомиоцитами и под эндотелием эндокарда. Кардиальные ТК имеют овальную или удлинненную форму. При этом средний размер ТК предсердия — 11.4×5.7 мкм, ТК желудочка — 9.8×4.8, а ТК эпикарда — 12.6×7.5 мкм. При окраске полутонких срезов сердца раствором толуидинового синего в ТК хорошо видна зернистость цитоплазмы (рис. 1, в).

Циркулирующие ТК, как правило, локализованы в полости сердца в своеобразных лакунах и в узких щелях, образованных трабекулами губчатого миокарда желудочка. Это небольшие округлые клетки лимфоидного типа со средним размером 6.1×4.9 мкм. Плотность циркулирующих ТК составляет около 2 клеток на 1 мм² площади среза. Альциановый голубой окрашивает цитоплазму циркулирующих ТК, так же как и цитоплазму резидентных кардиальных ТК, в ярко-голубой цвет (рис. 1, в). Однако после фиксации материала в жидкости Карнуа и окраши-

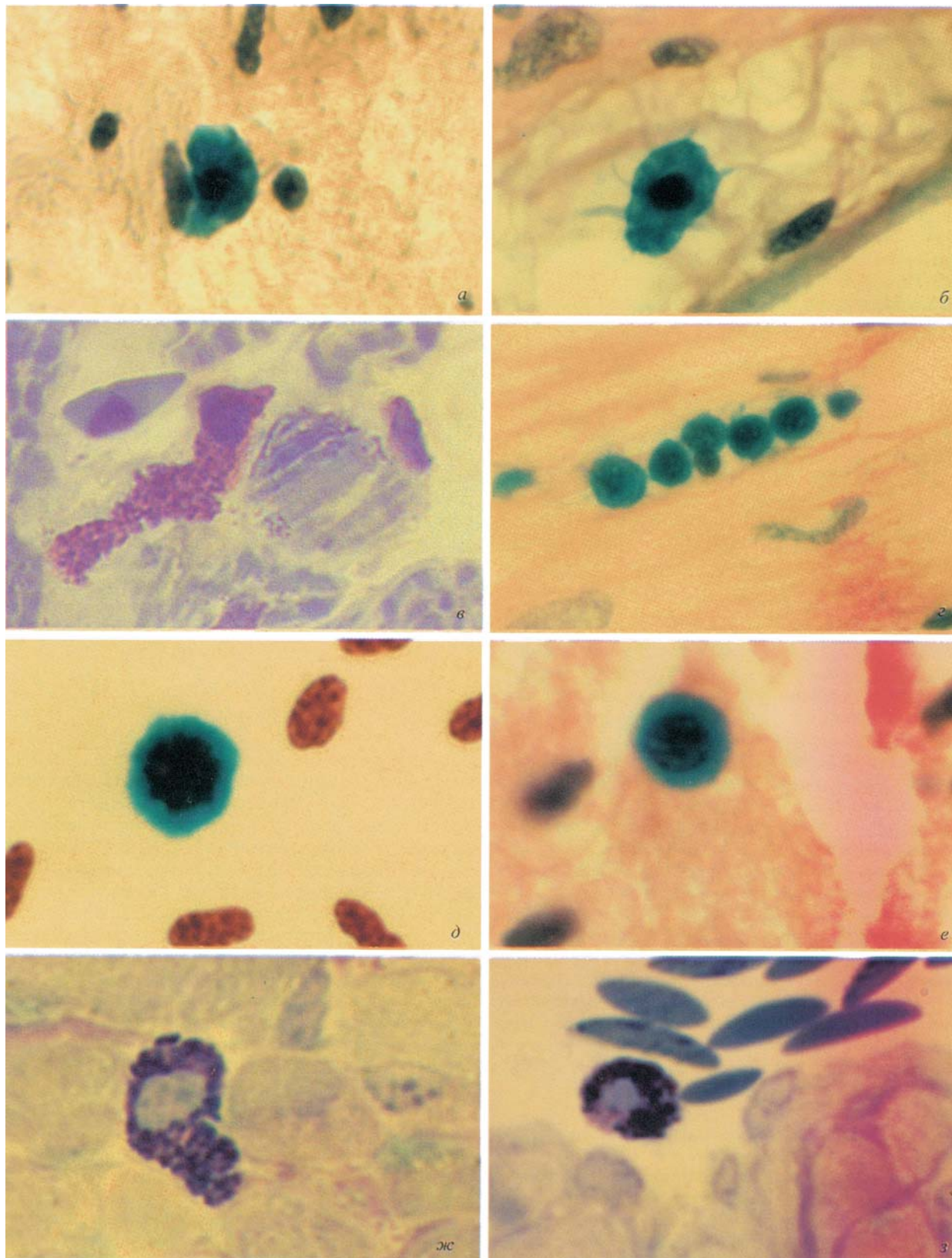


Рис. 1. Световые микрофотографии резидентных и циркулирующих тучных клеток (ТК) лягушки.

a — альциан-положительная резидентная ТК расположена в предсердии; *б* — альциан-положительная резидентная ТК расположена в эпикарде желудочка; *в* — резидентная ТК удлиненной формы расположена между кардиомиоцитами предсердия; *г* — цепочка альциан-положительных циркулирующих ТК расположена в желудочке сердца; *д* — циркулирующая ТК лимфоидного типа в мазке крови; *е* — циркулирующая альциан-положительная ТК расположена в полости предсердия среди эритроцитов; *ж* — резидентная ТК расположена между мышечными волокнами в стенке лимфатического сердца; *з* — циркулирующая ТК расположена в полости лимфатического сердца в окружении эритроцитов. *a, б, г, е* — парафиновые срезы; окраска альциановым голубым гематоксилином и эозином; *в, ж, з* — полутонкие срезы, окраска толуидиновым синим на буре; *д* — мазок крови, окраска альциановым голубым и сафранином. Увел.: *a, г* — об. 20×; *б, д, е, з* — об. 40×; *в, ж* — об. 100×.

вания парафиновых срезов сердец альциановым голубым зернистость цитоплазмы как циркулирующих, так и резидентных ТК не видна. Других альциан-положительных клеток на срезе сердца мы не обнаружили. Ядро циркулирующей ТК, как правило, расположено в центре клетки и имеет округлую форму. Нуклеоплазма обогащена скоплениями гетерохроматина. В лакунах и щелях, образованных трабекулами губчатого миокарда желудочка, в непосредственной близости могут соседствовать описанные выше ТК лимфоидного типа, эритроциты, собственно лимфоциты и, возможно, тромбоциты. Выявить базофилы на светооптическом уровне нам не удалось. Более четкая идентификация природы клеток, нередко образующих цепочки и кластеры в лакунах, требует исследования их ультраструктуры.

ТК лимфоидного типа можно обнаружить на мазках периферической крови (рис. 1, *д*), а также на парафиновых срезах сердца в крови, заполняющей центральные полости предсердия и желудочка (рис. 1, *е*).

В лимфатическом сердце лягушки резидентные ТК встречаются в интерстициальном пространстве между поперечнополосатыми мышечными волокнами стенки органа (рис. 1, *ж*) и среди гладкомышечных клеток афферентных и эфферентных трубчатых клапанов. Циркулирующие ТК изредка можно обнаружить в полости сердца (рис. 1, *з*). Плотность резидентных ТК в лимфатическом сердце составляет в среднем 40 кл./мм², а размер — около 10,4×5,5 мкм. ТК постоянно присутствуют и в соединительной ткани, окружающей лимфатическое сердце. ТК соединительной ткани после фиксации материала 1%-ным раствором ацетата свинца и окрашивания парафиновых срезов сафранином приобретают красно-кирпичный цвет. Метахроматическое окрашивание гранул этих клеток (в различные оттенки лилового цвета) можно получить при той же фиксации материала и окрашивании срезов спиртовым раствором толудинового синего при низких значениях pH. Следует особо подчеркнуть, что ТК лимфатического и «кровенного» сердец при вышеупомянутых способах фиксации материала и окрашивания срезов выявляют лишь слабую сафранинофилию и слабо выраженную метахромазию. В результате последовательного окрашивания срезов альциановым голубым и сафранином резидентные и циркулирующие ТК пропульсаторных органов приобретают смешанную окраску с преобладанием голубого цвета.

В копчиковом районе в местах локализации задних лимфатических сердец расположены небольшие лимфатические синусы. ТК, как правило, прилегают к образующим выстилку синуса мезотелиальным клеткам как снаружи, со стороны соединительной ткани, так и изнутри, со стороны полости синуса. В последнем случае циркулирующие ТК нередко образуют кластеры. В полости синуса можно обнаружить и одиночные свободно плавающие в лимфе ТК. Представляется вероятным, что циркулирующие ТК попадают в полость лимфатического сердца с потоком лимфы, идущим из лимфатического синуса через афферентный трубчатый клапан.

Д а н н ы е э л е к т р о н н о й м и к р о с к о п и и. Ультраструктурное исследование показало, что резидентные ТК «кровенного» сердца расположены между кардиомиоцитами (рис. 2, *а*), под эндотелием эндокарда (рис. 2, *б*) и в эпикарде (рис. 2, *в*). Как правило, клетки имеют удлинненную или отрогчатую форму. Обогащенное гетерохроматином ядро расположено по центру клетки. Цитоплазма ТК заполнена гетерогенными и полиморфными

секреторными гранулами с характерными для ТК лягушки интрагранулярными электронно-плотными структурами. Размер гранул, как правило, колеблется от 0,2 до 0,9 мкм. Среди других цитоплазматических органелл можно обнаружить каналцы аппарата Гольджи, центриоли (рис. 2, *в*), редкие митохондрии и свободные рибосомы. Картины дегрануляции с выбросом гранул в межклеточное пространство мы не наблюдали. Кардиальные ТК нередко расположены вблизи от нервных волокон (рис. 2, *б*). Однако непосредственных тесных контактов «мембрана к мембране» между ними мы не обнаружили. Базальная пластинка (гликолемма) у ТК сердца выражена слабо либо отсутствует.

ТК в лимфатическом сердце также имеют удлинненную форму, но в отличие от ТК «кровенного» сердца обладают хорошо выраженной гликолеммой (рис. 2, *з*). Центральное расположенное ядро обогащено гетерохроматином. Размер, форма и структура цитоплазматических гранул напоминают гранулы кардиальных ТК. Обращает на себя внимание повышенная осмиофильность ламеллярных паракристаллиновых структур в гранулах. В свободной от гранул цитоплазме расположены небольшие митохондрии, свободные рибосомы, аппарат Гольджи и редкие каналцы шероховатого эндоплазматического ретикулаума (ШЭР). Цитоплазматические поверхностные отростки у ТК лимфатического сердца выражены ярче, чем у ТК «кровенного» сердца.

Ультраструктурное исследование показало, что в полости «кровенного» сердца в межтрабекулярных лакунах и щелях желудочка присутствуют клетки крови. Помимо многочисленных эритроцитов мы обнаружили гранулярные и агранулярные клетки. Среди последних на основе ультраструктуры их ядер и цитоплазматических органелл мы идентифицировали малые лимфоциты (рис. 3, *б*), моноциты (рис. 3, *в*), клетки бластного типа (рис. 3, *г*) и тромбоциты (рис. 4, *б*).

Наше особое внимание привлекли гранулярные клетки, которые оказались двух типов. К первому довольно редко встречаемому клеточному типу мы отнесли базофилы. Ядро этой гранулярной клетки слабо сегментировано и в плоскость среза, как правило, попадают два сегмента ядра (рис. 4, *а*). Хроматин в ядре умеренно конденсирован. Овальные (мелкие) и округлые (крупные) по форме цитоплазматические гранулы обладают гомогенным содержанием различной электронной плотности. Внутри гранул наличия ламеллярных паракристаллиновых структур не обнаружено. Цитоплазма базофила содержит небольшие митохондрии, многочисленные свободные рибосомы и отдельные каналцы ШЭР. Если в периферической крови базофилы, как правило, округлые, то в узких лакунах сердца они приобретают нередко вытянутую форму. Как у любой циркулирующей клетки, гликолемма у базофила отсутствует. Ко второму клеточному типу мы отнесли циркулирующие ТК (рис. 3, *а*). Гранулярная клетка этого типа привлекает к себе внимание обилием цитоплазматических гранул, своей ультраструктурой напоминающих гранулы резидентных ТК: тот же полиморфизм и гетерогенность. Циркулирующие ТК могут быть округлой (тогда они очень похожи на лимфоциты) или несколько вытянутой формы (рис. 3, *а*; 4, *в*, *з*). Округлое или овальное ядро расположено по центру клетки; хроматин ядра сильно конденсирован. На внешней ядерной мембране обнаружены рибосомы. Многочисленные гранулы нередко бывают так плотно упакованы в цитоплазме, что выявить какие-либо другие органеллы на

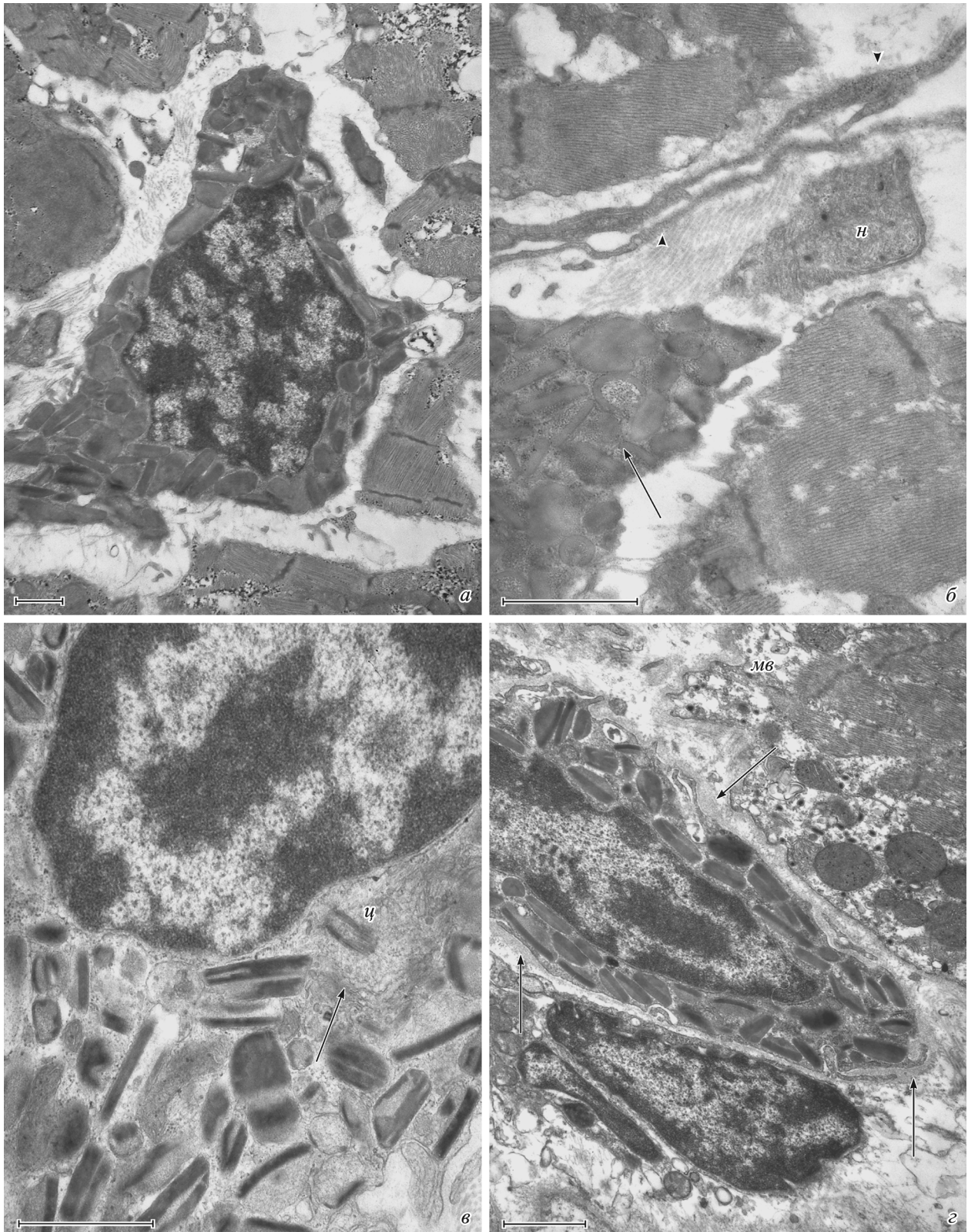


Рис. 2. Ультраструктура резидентных ТК в пропульсаторных органах лягушки.

а — отростчатая ТК расположена между кардиомиоцитами в желудочке «кровяного» сердца. *б* — фрагмент ТК (стрелка), расположенной под эндотелием эндокарда (головки стрелок) желудочка; обратите внимание на близость нервного волокна (*н*) к ТК. *в* — фрагмент ТК, расположенной в субэпикардиальной области; в перинуклеарном районе ТК, свободном от цитоплазматических гранул, хорошо видна центриоль (*ц*) и цистерны аппарата Гольджи (стрелка). *г* — удлиненной формы ТК расположена в стенке лимфатического сердца рядом с мышечным волокном (*мв*); обратите внимание на высокую осмиофильность электронно-плотных структур в гранулах, а также на хорошо выраженную гликолемму (стрелки). Масштабная линейка — 1 мкм.

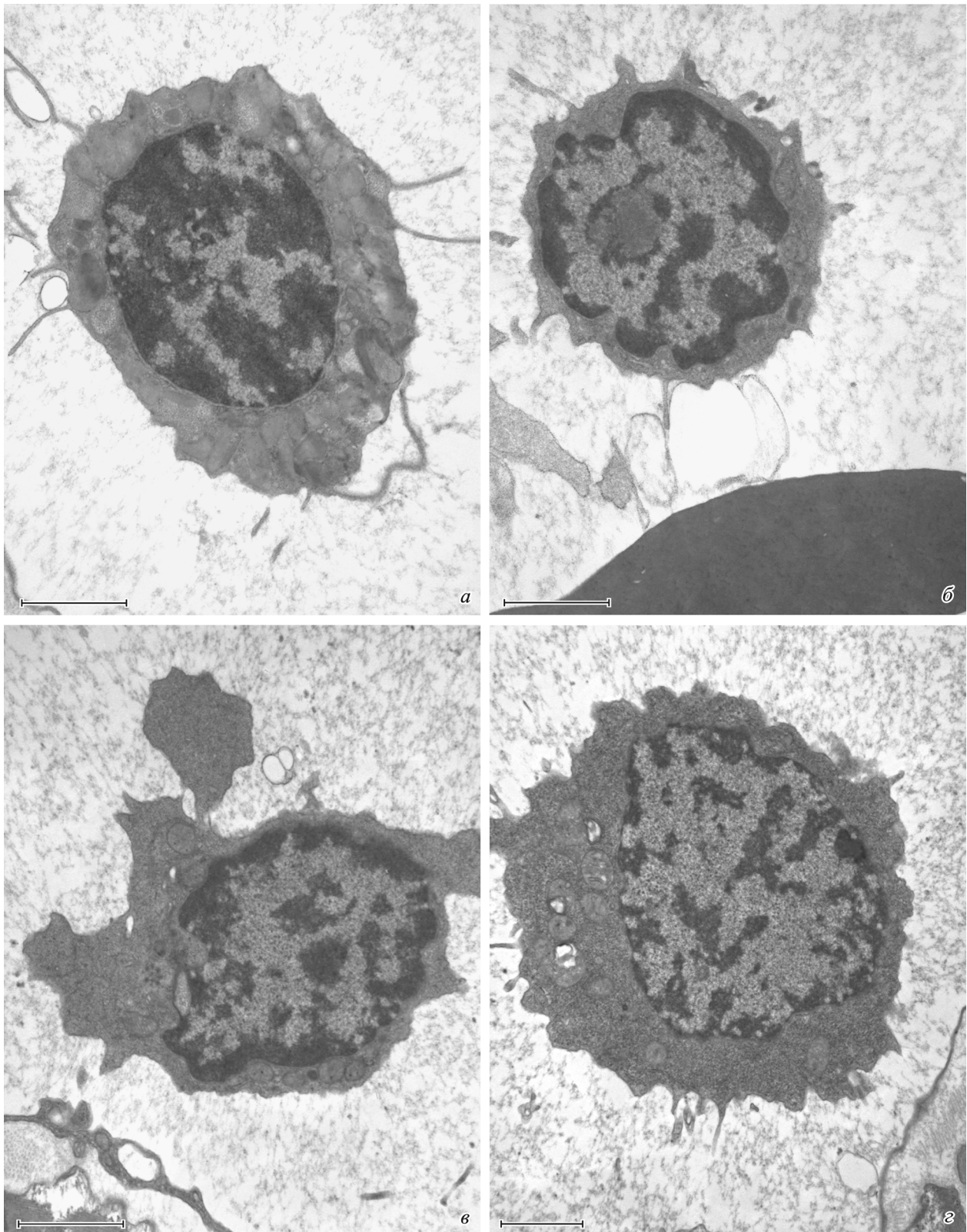


Рис. 3. Электронограммы клеток крови и циркулирующей ТК, расположенных в межтрабекулярных лакунах желудка лягушки.

а — циркулирующая ТК лимфоидного типа; обратите внимание на округлое, богатое гетерохроматином ядро и многочисленные гетерогенные цитоплазматические гранулы; плазматическая мембрана продуцирует тонкие неправильной формы длинные отростки. *б* — малый лимфоцит и фрагмент цитоплазмы эритроцита; ядро лимфоцита занимает почти весь объем клетки, гетерохроматин ассоциирован в основном с ядерной мембраной и ядерным рибосомным аппаратом; скудная по объему цитоплазма содержит небольшое количество свободных рибосом, одиночные каналцы шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР) и редкие митохондрии; поверхность лимфоцита образует короткие отростки. *в* — моноцит; к заметным цитоплазматическим включениям следует отнести митохондрии, каналцы ШЭР и свободные рибосомы; широкие цитоплазматические отростки напоминают псевдоподии. *г* — бластоподобная клетка; в широком ободке цитоплазмы многочисленны свободные рибосомы; среди других цитоплазматических органелл следует отметить митохондрии и редкие каналцы ШЭР. Масштабная линейка — 1 мкм.

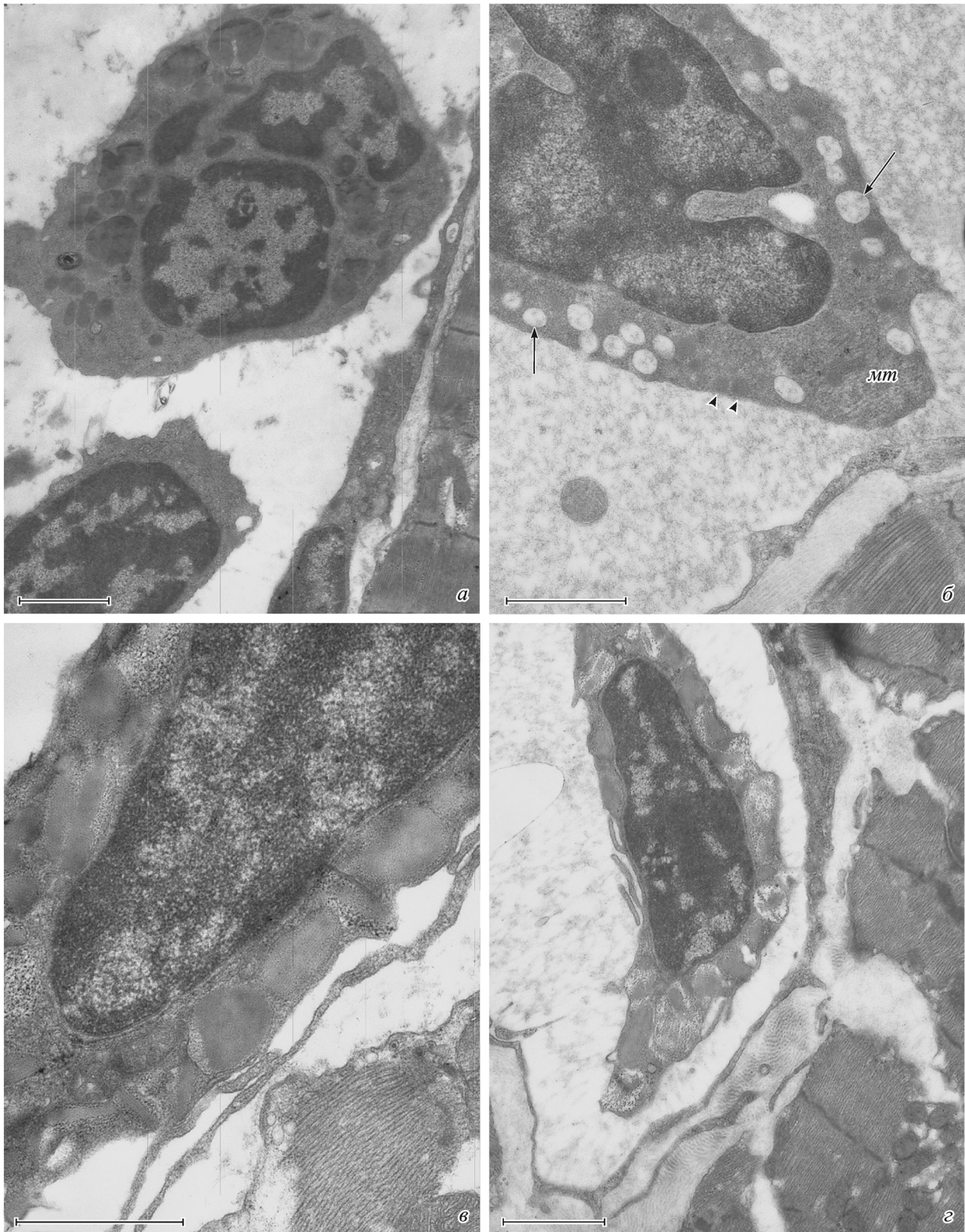


Рис. 4. Ультраструктура клеток крови и циркулирующих ТК, расположенных в межтрабекулярных лакунах в непосредственной близости от эндотелия эндокарда желудочка.

а — базофил; хорошо видны два сегмента ядра; округлые и овальные цитоплазматические гранулы заполнены гомогенным плотным содержимым и не содержат ламеллярных паракристаллиновых структур. *б* — тромбоцит; клетка имеет дисковидную форму и лишена отростков на своей поверхности; цитоплазма содержит большое количество агранулярных везикул (*стрелка*), а также небольшие везикулы с электронно-плотным содержимым (*головки стрелок*); обращают на себя внимание расположенные кортикально пучки микротрубочек (*mt*). *в* — фрагмент циркулирующей ТК; хорошо видна гетерогенность цитоплазматических гранул; обращает на себя внимание слабая осmioфильность электронно-плотных структур внутри гранул. *г* — циркулирующая ТК расположена в терминальной части лакуны, образованной миокардиальными трабекулами; обращают на себя внимание удлиненная форма ТК и «сложенные» цитоплазматические отростки; ядро клетки овальной формы и содержит большое количество гетерохроматина; в некоторых цитоплазматических гранулах хорошо виден мелкозернистый матрикс. Масштабные линейки — 1 мкм.

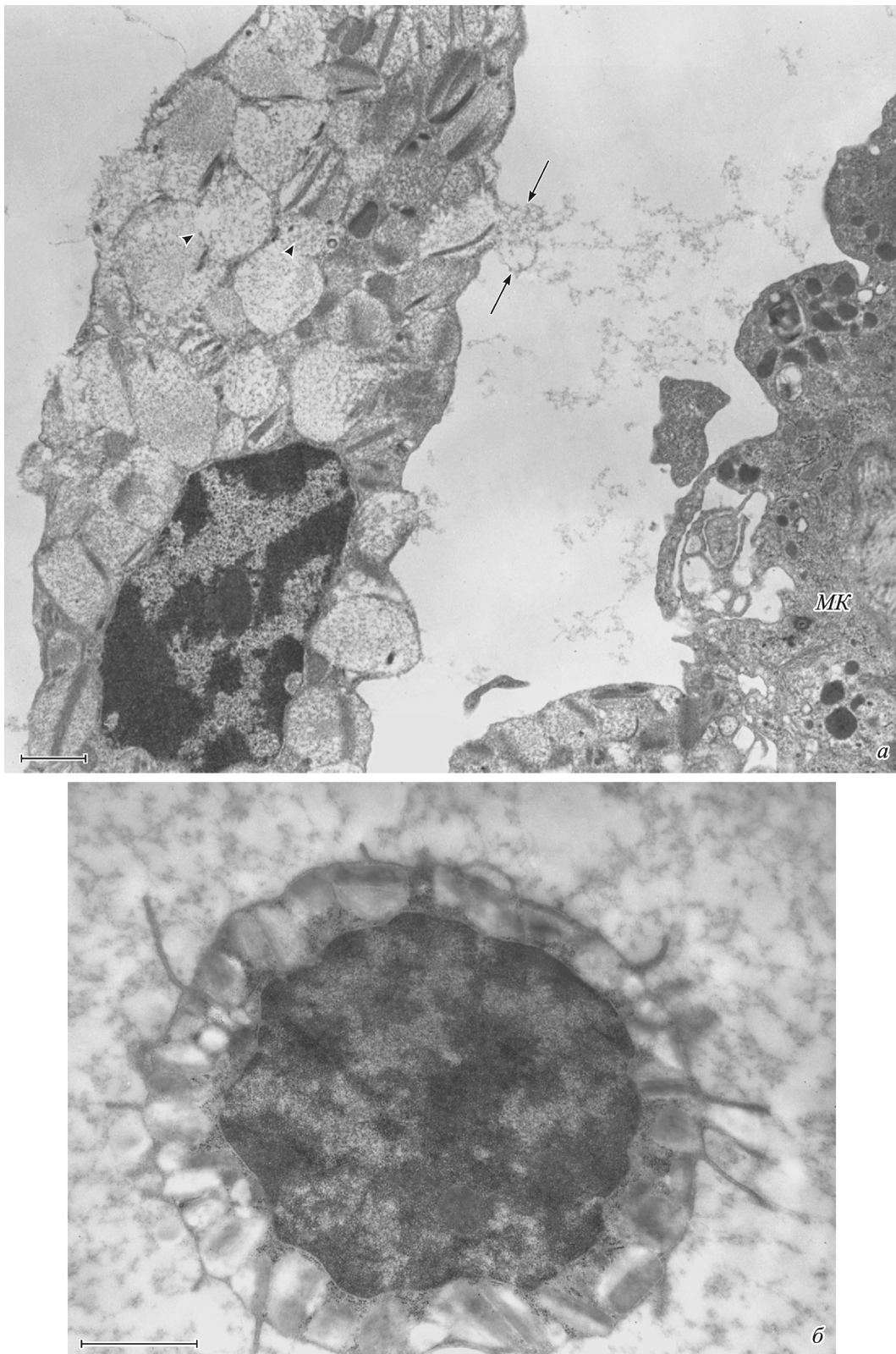


Рис. 5. Ультраструктура циркулирующих ТК, расположенных в просвете лимфатического синуса (а) и кровеносного сосуда (б) лягушки.

а — активированная циркулирующая ТК выделяет содержимое своих гранул (стрелка) в полость лимфатического синуса по направлению к мезотелиальным клеткам (МК); обращают на себя внимание картины слияния цитоплазматических гранул (головки стрелок) и измененный характер их структуры. б — циркулирующая ТК лимфоидного типа в просвете кровеносного сосуда; округлое, обогатненное гетерохроматином ядро расположено по центру клетки; узкий ободок цитоплазмы заполнен в основном овальной формы гетерогенными гранулами; на поверхности циркулирующей ТК видны тонкие короткие цитоплазматические отростки. Масштабные линейки — 1 мкм.

срезах часто не представляется возможным (рис. 4, в). В гранулах циркулирующих ТК матрикс, как правило, представлен тонкогранулярным материалом, а электронно-плотный компонент — слабоосmioфильными ламеллярными паракристаллиновыми структурами (рис. 3, а; 4, в, з). Поверхность циркулирующих ТК образует немногочисленные тонкие цитоплазматические отростки (рис. 3, а), которые по своей длине часто превышают длину отростков клеток крови. Гликолемма вокруг циркулирующих ТК отсутствует.

В лимфатическом синусе, расположенном рядом с лимфатическим сердцем, удалось обнаружить циркулирующие ТК в состоянии активации (рис. 5, а). При световой микроскопии полутонких срезов, окрашенных раствором толудинового синего, циркулирующие ТК в состоянии активации имеют розовато-лиловый цвет. Ультраструктурные изменения в активированной ТК связаны с набуханием гранул, прогрессивным увеличением их размера и уменьшением электронной плотности их содержимого. В результате описываемых изменений происходит увеличение размеров и самой активированной ТК (рис. 5, а). Иногда мембраны индивидуальных гранул сливаются, возникают небольшие цепочки, состоящие из связанных друг с другом гранул. Мембрана гранулы, расположенной на периферии клетки, сливается с плазматической мембраной. Наличие материала гранул в окружающей ТК лимфе свидетельствует о дегрануляции, осуществленной путем экзоцитоза (рис. 5, а).

Через афферентные клапаны лимфатического сердца циркулирующие ТК из лимфатических синусов вместе с лимфой могут попасть в полость лимфатического сердца. В кровеносных сосудах, расположенных вблизи от лимфатического сердца, среди других клеток крови обнаружены циркулирующие ТК лимфоидного типа (рис. 5, б).

Обсуждение

Согласно полученным в настоящей работе данным, в пропульсаторных органах лягушки присутствуют две популяции ТК: популяция резидентных ТК и популяция циркулирующих ТК. Обнаружены незначительные структурные различия, которые в основном касаются формы и величины ТК, принадлежащих к разным популяциям. Однако такие значимые для морфологической идентификации ТК критерии, как ультраструктура цитоплазматических гранул и тонкое строение ядер, убедительно свидетельствуют в пользу единой природы обсуждаемых клеток. Весомым дополнением к вышесказанному служат данные проведенного гистохимического исследования, которые позволили после фиксации материала 1%-ным раствором ацетата свинца выявить не только выраженную альбиан-положительную окрашиваемость цитоплазмы резидентных и циркулирующих ТК, но и слабую сафранинофилию и метакромазию материала их гранул. Известно, что тинкториальные свойства ТК соединительнотканного типа обусловлены степенью зрелости этих клеток (Combs et al., 1965; Gaultan et al., 1990). У грызунов для ТК соединительнотканного типа окрашивание зрелых гранул сафранином в красный цвет связано с присутствием в них высоко-N-сульфатированных гликозамингликанов, таких как гепарин (Eneback, 1986). Учитывая этот факт, можно заключить, что у лягушки в зимний период времени ТК пропульсаторных органов не достигают высокой степени зрелости. Интересно, что после фиксации

материала жидкостью Карнуа только у весенних лягушек удалось выявить сафранин-положительные гранулы в ТК (Кара, Csaba, 1972). Согласно мнению авторов цитируемой работы, достижение уровня полного созревания ТК может быть связано с весенним повышением гормональной активности у лягушек.

Поскольку гистохимия и ультраструктура резидентных ТК были исследованы в более ранних работах (Chieffi Vaccari et al., 1998; Monteforte et al., 2001; Esposito et al., 2002), в обсуждении особое внимание мы уделили циркулирующим ТК.

На светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях циркулирующие ТК впервые были описаны в селезенке и крови лягушки (Кара et al., 1970). Местом образования ТК лимфоидного типа рассматривали селезенку, а отростчатых (ретикулярных) ТК — тимус (Csaba et al., 1970). Позднее было установлено гемопоэтическое происхождение ТК млекопитающих (Kitamura et al., 1977, 1979). Однако современных данных о происхождении ТК лягушек мы не нашли. Можно только предположить, что по аналогии с млекопитающими у взрослых лягушек местом образования коммитированных предшественников ТК также является костный мозг, из которого эти крайне незрелые клетки поступают в кровь, мигрируют из кровяного русла в селезенку, тимус и другие органы и ткани, где дифференцируются и созревают. Однако наличие в крови и лимфе лягушки дифференцированных циркулирующих ТК свидетельствует о том, что современные представления о биологии ТК, сложившиеся в основном при изучении ТК млекопитающих, не являются всеобщими.

В отношении природы базофильных гранулоцитов в крови лягушек и жаб долгое время не было единого мнения. Так, некоторые исследователи (Csaba et al., 1970), идентифицировав ТК лимфоидного типа в крови лягушки, полностью отрицали наличие базофилов в крови этих земноводных. Другие исследователи в качестве базофилов описывали именно циркулирующие ТК, обращая внимание на особенности ультраструктуры этих клеток (Хамидов и др., 1978). Как известно, гранулоциты принято разделять на типы согласно морфологии их ядер и гранул. Согласно нашим наблюдениям, электронная микроскопия позволяет надежно идентифицировать как базофилы, так и циркулирующие ТК в крови лягушки. О функциональной роли циркулирующих ТК пока ничего не известно. Гистохимические данные настоящей работы свидетельствуют в пользу содержания в гранулах циркулирующих ТК некоторого количества гепарина. Можно предположить, что гепарин циркулирующих ТК участвует в предотвращении тромбоза крови в сердечно-сосудистой системе лягушек, находящихся в зимнее время в состоянии оцепенения, когда скорость течения крови заметно редуцирована.

Предсердия лягушки имеют строение тонкостенных мышечных мешочков, полости которых ритмично заполняются кровью, среди форменных элементов которой мы обнаружили незначительное количество циркулирующих ТК. В более мощно развитом аваскулярном миокарде желудочка взаимодействие между кровью и клетками сердца происходит за счет циркуляции крови в межтрабекулярных пространствах губчатого миокарда. Локализация одиночных и крайне редко встречающихся небольших групп циркулирующих ТК наряду с другими клетками крови в лакунах и узких щелях, образованных трабекулярным миокардом желудочка сердца, кажется поэтому закономерной. Учитывая тот факт, что тонкая стенка эн-

докарда желудочка сердца лягушки состоит всего лишь из одного слоя эндотелиальных клеток, нередко разделенных щелями, и подлежащей прерывистой базальной мембраны (Stehbens, Meyer, 1965), можно предположить трансэндотелиальную миграцию части циркулирующих ТК в миокард желудочка. Частая субэндокардиальная локализация резидентных ТК и их ультраструктура, схожая с ультраструктурой циркулирующих ТК, служат косвенным подтверждением этой возможности диапедеза.

Существуют ли условия перехода резидентных ТК в циркулирующие? Известны данные о внутрисосудистых пристеночных скоплениях ТК в лимфатических синусах языка лягушки (Fujita, Takaya, 1966). Показано, что в некоторых участках стенки синуса округлые ТК либо плотно прилипают к эндотелиальным клеткам, выстилающим полость синуса, либо контактируют с ними лишь с помощью узких цитоплазматических отростков. При этом в пробе лимфы, взятой из синуса, обилия ТК не обнаружено. Проникли ли ТК в полость синуса со стороны соединительной ткани или изначально принадлежали лимфе и уже вторично прикрепилась к стенке синуса? Какова их функция? Эти вопросы до сих пор не нашли ответа. Возможно, изменение проницаемости стенки кровеносных капилляров приводит к диапедезу с переходом форменных элементов крови и циркулирующих ТК сначала в ткани, а затем в просвет лимфатических капилляров и далее в лимфатические синусы? В нашей работе мы также наблюдали тесный контакт ТК с мезотелиальными клетками выстилки лимфатических синусов. При этом многие ТК находились в состоянии активации, выделяя в полость синуса содержимое гранул.

В последнее время много внимания уделяют участию эндотелиальных клеток как в регуляции процесса рекрутирования предшественников ТК из кровяного русла, так и в регуляции плотности ТК в тканях через влияние на жизнеспособность и пролиферативную активность ТК (Weller et al., 2005; Gurish, Boyce, 2006). Во взаимоотношениях ТК и эндотелиальных клеток важную роль отводят цитокинам и взаимодействию интегринов и адгезивных молекул васкулярных клеток (Mierke et al., 2000). Получены экспериментальные данные, подтверждающие способность зрелых ТК преодолевать гематоэнцефалический барьер в таламусе нормальной взрослой крысы (Silverman et al., 2000). Однако молекулярные механизмы, вовлеченные в процесс перехода ТК через эндотелий и базальную пластинку капилляров мозга, до конца еще не исследованы (Zhuang et al., 1996). В печени собаки выявлены картины перемещения ТК из субэндотелиального слоя в полость вены (Yamamoto, 2000). Автором цитируемой статьи высказано предположение о том, что таким образом ТК, увлекаемые потоком крови, мигрируют в другие места. Установление контакта циркулирующих ТК с эндотелиальными клетками эндокарда в сердце лягушки можно рассматривать в качестве одной из первых фаз предполагаемой миграции этих клеток в миокард желудочка.

Ранее у млекопитающих незначительное количество циркулирующих ТК было обнаружено в периферической крови взрослой крысы (Csaba et al., 1969). Позднее в периферической крови эмбрионов мышей на поздних стадиях их развития были выявлены незрелые формы ТК, содержащие цитоплазматические гранулы (Rodewald et al., 1996). Метахроматические клетки с признаками базофилов и ТК были обнаружены в периферической крови людей, больных астмой, аллергией или с аллергической ре-

акцией на прием лекарств (Li, Krilis, 1999). Возможно, у высших позвоночных в особые моменты их эмбрионального развития или при определенных патологических состояниях у взрослых особей возникают физиологические условия, благоприятствующие появлению в периферической крови незрелых, но морфологически идентифицируемых форм ТК? Наличие популяции циркулирующих ТК в периферической крови у представителя низших позвоночных делает это предположение вполне вероятным. В свете вышесказанного присутствие ТК в крови поздних эмбрионов мыши может являться отражением в онтогенезе млекопитающих биологии ТК в филогенезе. Очевидна необходимость дальнейших гистохимических, ультраструктурных, иммуноцитохимических и функциональных исследований для более полного понимания биологии ТК не только высших, но и низших позвоночных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00528).

Список литературы

- Крылова М. И. 2003. Иммуноцитохимическая локализация ANP в гранулах тучных клеток лимфатического сердца взрослой травяной лягушки. Цитология. 45 (9) : 891.
- Крылова М. И. 2006. Иммуноцитохимическая локализация предсердного натрийуретического пептида в тучных клетках взрослой травяной лягушки *Rana temporaria*. Докл. РАН. 406 (3) : 425—427.
- Хамидов Д. Х., Акилов А. Т., Турдыев А. А. 1978. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. Ташкент: ФАН. 168 с.
- Bienenstock J. 1988. An update on mast cell heterogeneity. J. Allergy Clin. Immunol. 81 : 763—769.
- Bigaj J., Urbanka-Stopa M., Plytycz B. 1991. Argentaffin mast cells in the thymus of the frog. Folia Histochem. Cytobiol. 29 : 45—47.
- Chen C. C., Grimbaldeston M.A., Tsai M., Weissman I.L., Galli S.J. 2005. Identification of mast cell progenitors in adult mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 11408—11413.
- 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.
- Chieffi Baccari G., Raucchi F., Di Fiore M., Monteforte R. 2003. Induced maturation of frog mast cells by nerve growth factor during ontogenesis. Microsc. Res. Tech. 62 : 439—450.
- Chiu H., Lagunoff D. 1971. Histochemical comparison of frog and rat mast cells. J. Histochem. Cytochem. 19 : 369—375.
- Combs J., Lagunoff D., Benditt E. 1965. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. J. Cell Biol. 25 : 577—592.
- Csaba G., Hodinka L., Surjan L. 1969. Transport of mast cells by the blood circulation. Experientia. 25 : 735—736.
- Csaba G., Olah I., Kapa E. 1970. Phylogenesis of mast cells. II. Ultrastructure of mast cells in the frog. Acta biol. Acad. Sci. hung. 21 : 255—264.
- Enerbäck L. 1986. Mast cell heterogeneity: the evaluation of the concept of a specific mucosal mast cell. In: Mast cell differentiation and heterogeneity. New York: Raven Press. 1—16.
- Esposito B., De Santis A., Monteforte R., Chaffino Baccari G. 2002. Mast cells in wallerian degeneration: morphologic and ultrastructural changes. J. Comp. Neurol. 445 : 199—210.
- Fujita T., Takaya K. 1966. Mast cells in the lymphatics of the frog tongue. Z. Zellforsch. 75 : 160—165.
- Gaytan F., Bellido C., Carrera G., Aguilar E. 1990. Differentiation of mast cells during postnatal development of neonatally estrogen-treated rats. Cell Tissue Res. 259 : 25—31.
- Gurish M., Boyce J. 2006. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. J. Allergy Clin. Immunol. 117 : 1285—1291.

- Kapa E., Csaba G. 1972. Phylogenesis of mast cells. III. Effect of hormonal induction on the maturation of mast cells in the frog. *Acta biol. Acad. Sci. hung.* 23 : 47—54.
- Kapa E., Szigeti M., Juhasz A., Csaba G. 1970. Phylogenesis of mast cells. I. Mast cells of the frog *Rana esculenta*. *Acta biol. Acad. Sci. hung.* 21 : 141—147.
- Kitamura Y., Shimada M., Go S., Matsuda H., Hatanaka K., Seki M. 1979. Distribution of mast-cell precursors in hematopoietic and lymphopoietic tissues of mice. *J. Exp. Med.* 150 : 482—490.
- Kitamura Y., Shimada M., Hatanaka K., Miyano Y. 1977. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature.* 268 : 442—443.
- Li L., Krilis S.A. 1999. Mast-cell growth and differentiation. *Allergy.* 54 : 306—312.
- Metcalf D. D., Baram D., Mekori Y. A. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77 : 1033—1079.
- Mierke C. T., Ballmaier M., Werner U., Manns M. P., Wente K., Bischoff S. C. 2000. Human endothelial cells regulate survival and proliferation of human mast cells. *J. Exp. Med.* 192 : 801—811.
- 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.
- Okayama Y., Kawakami T. 2006. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol. Res.* 34 : 97—115.
- Rodewald H. R., Dessing M., Dvorak A. M., Galli S. J. 1996. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science.* 271 : 818—821.
- Setoguti T. 1969. Electron microscopic study on the newt mast cell, especially its granule-extrusion mechanism. *J. Ultrastruct. Res.* 27 : 377—395.
- Silverman A. J., Sutherland A. K., Wilhelm M., Silver R. 2000. Mast cells migrate from blood to brain. *J. Neurosci.* 20 : 401—408.
- Stehbens W. E., Meyer E. 1965. Ultrastructure of endothelium of the frog heart. *J. Anat.* 99 : 127—134.
- Weller C. L., Collington S. J., Brown J. K., Miller H. R., Al-Kashi A., Clark P., Jose P. J., Hatnell A., Williams T. J. 2005. Leukotriene B₄, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J. Exp. Med.* 201 : 1961—1971.
- Yamamoto K. 2000. Electron microscopy of mast cells in the venous wall of canine liver. *J. Vet. Med. Sci.* 62 : 1183—1188.
- Zhuang X., Silverman A., Silver R. 1996. Brain mast cell degradation regulates blood-brain barrier. *J. Neurobiol.* 31 : 393—403.

Поступила 19 III 2009

RESIDENT AND CIRCULATING MAST CELLS IN PROPULSATIVE ORGANS OF THE FROG *RANA TEMPORARIA*

M. I. Krylova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Mast cells (MCs) of the «blood» and lymph hearts of the adult frog *Rana temporaria* were investigated at histochemical and ultrastructural levels. Two populations of MCs were revealed in these propulsive organs: population of resident MCs and population of circulating MCs. It has been shown that the resident cardiac MCs have an oval or elongated form and are located between atrial or ventricular myocytes and under endocardial endothelium. The resident cardiac MCs are situated in connective tissue of epicardium, too. Avascular myocardium of the frog ventricle consists of a spongy network of muscle trabeculae. We revealed circulating MCs in intertrabecular spaces and clefts of the spongy myocardium and in the blood of the main central cavity. Circulating MCs are round in shape and contain a large central nucleus enriched with condensed chromatin. They resemble the lymphocytes, but show cytoplasm filled with granules. These granules ultrastructure is much like that of the granules of the cardiac resident MCs. In the lymph heart, oval and somewhat elongated resident MCs are located in the interstitial space among cross-striated muscle fibers and among smooth muscle cells of tubular (afferent and efferent) valves. Sometimes lymphocyte-like circulating MCs are revealed in the cavity of lymph heart. Circulating MCs are also present in the lymphatics located adjacent to the lymph hearts. In certain parts of the lymphatic walls MCs are in close adhesion to the mesothelial cells lining the lymphatic cavity. Our histochemical investigation revealed that both the resident and circulating MCs of the propulsive organs give a strongly positive reaction with alcian blue, but weakly red with safranin and weakly metachromatic with toluidine blue. The presence of population of circulating MCs in the frog suggests that there are differences in biology of MCs between lower and higher vertebrates.

Key words: mast cells, «blood» heart, lymph heart, histochemistry, electron microscopy, frog *Rana temporaria*.