

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СЕРДЕЦ В ОНТОГЕНЕЗЕ ЛЯГУШЕК *RANA TEMPORARIA*

© М. И. Крылова

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

Электронно-микроскопическое исследование тучных клеток (ТК) в лимфатических сердцах головастика и сеголеток лягушки *Rana temporaria* показало, что ТК присутствуют не только между мышечными волокнами (популяция резидентных ТК), но и в полости лимфатического сердца (популяция циркулирующих ТК). Обнаружены различия в ультраструктуре резидентных ТК на каждой из исследованных стадий развития головастика. На более ранних (39—41-й) стадиях, соответствующих протеметаморфозу, ТК еще слабо дифференцированы. Цитоплазма ТК содержит небольшое количество специфических незрелых гранул, а также многочисленные свободные рибосомы, полисомы и короткие канальцы шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР). Хроматин ядер слабо конденсирован, аппарат Гольджи развит умеренно. На 44—45-й стадиях развития головастика, соответствующих протеметаморфозу, для части ТК характерен все еще активно идущий процесс гранулогенеза. В цитоплазме, плотно упакованной органеллами, выявлена тесная ассоциация незрелых специфических гранул со свободными рибосомами и канальцами ШЭР. В то же время частота встречаемости ТК с признаками прогрессирующей дифференцировки возрастает. В цитоплазме таких более дифференцированных ТК заметны увеличение количества полиморфных и гетерогенных по структуре специфических гранул и уменьшение числа свободных рибосом, полисом и канальцев ШЭР. В вакуолях терминалей цистерн аппарата Гольджи выявлено формирование програнул. Ядра ТК обогащены конденсированным хроматином, а клеточная поверхность образует немногочисленные отростки. На 52—53-й стадиях развития головастика, соответствующих собственно метаморфозу, ТК нередко вступают в прямой контакт с макрофагами. Ультраструктурных признаков апоптоза в ТК не обнаружено. Набухание митохондрий, умеренная вакуолизация цитоплазмы, расширение перинуклеарного пространства, частичное повреждение плазматической мембраны (ПМ) и выброс органелл во внеклеточное пространство свидетельствуют о гибели части ТК, вероятно путем программированного некроза. ТК сеголетки напоминают по своей ультраструктуре дифференцированные ТК головастика. Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия выявила локализацию предсердного натрийуретического пептида (ANP), субстанции Р (SP) и белка теплового шока (Hsp70) в специфических гранулах резидентных и циркулирующих ТК головастика, находящихся на разных стадиях индивидуального развития, и у сеголеток.

Ключевые слова: резидентные и циркулирующие тучные клетки, развитие, ANP, SP, Hsp70, иммунолокализация, лимфатическое сердце, лягушка.

Принятые сокращения: ПМ — плазматическая мембрана, ТК — тучные клетки, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум, ANP — предсердный натрийуретический гормон, Hsp70 — белок теплового шока, SP — субстанция Р.

Тучные клетки, обнаружены во всех классах позвоночных. Благодаря интенсивным и разноплановым исследованиям ТК млекопитающих установлен факт гематогенного происхождения ТК (Kitamura et al., 1979), а также получены данные об участии ТК в качестве разносторонних регуляторов в процессах воспаления, тканевого ремоделирования, врожденного и приобретенного иммунитета, гомеостаза, аллергических реакциях (Metcalf et al., 1997; Malaviya, Georges, 2002; Stelekati et al., 2007). Обосновывается иммуномодулирующая роль ТК в организме (Galli et al., 2008). Много внимания уделено изучению роли цитокинов в рекрутировании, развитии и функции ТК (Tsai et al., 1991; Metcalfe et al., 1995; Shelburne, Ryan, 2001; Shiohara, Koike, 2005). Интенсивно исследуют также молекулярные механизмы миграции, активации и де-

грануляции ТК (Lindstedt, Kovanen, 2006; Rivera, Gilfillan, 2006; Shimizu et al., 2009). Продолжается идентификация продуцируемых ТК биологически активных молекул. Сравнительно недавно было показано, что кардиальные ТК у крыс синтезируют, запасают и секретируют ренин (Silver et al., 2004) и адреномедуллин (Belloni et al., 2006). В ТК перитонеальной полости крысы обнаружено наличие и установлена внутриклеточная локализация ANP (Martynova et al., 2005).

Изучению биологии ТК низших позвоночных уделено заметно меньше внимания. Поэтому до сих пор отсутствуют данные о происхождении ТК у амфибий, и мы крайне мало знаем о функции их ТК как в условиях нормы, так и при выраженной патологии. Тем не менее у лягушек с использованием методов гистохимии идентифи-

цированы два главных подтипа ТК, так называемые соединительнотканые ТК и мукозные ТК (Chieffi Vaccari et al., 1998); исследована ультраструктура ТК и дано подробное субмикроскопическое описание их уникальных по структуре цитоплазматических гранул (Csaba et al., 1970; Chieffi Vaccari et al., 1998). На светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях в крови и лимфе взрослых лягушек идентифицирована популяция циркулирующих ТК (Csaba et al., 1970; Крылова, 2009). Биохимически оценено содержание, а иммуноцитохимически установлена локализация гистамина в гранулах ТК (Chieffi Vaccari et al., 1998). Методом иммуноэлектронной микроскопии в гранулах ТК выявлена локализация ANP-иммунореактивного материала (Крылова, 2006). Данные о наличии тесной анатомической связи ТК и нервных волокон у лягушки инициировали ряд экспериментальных исследований. Так, было показано, что электрическая стимуляция холинергических нервных волокон способствует дегрануляции ТК в языке лягушки (Monteforte et al., 2001). Активное участие ТК было обнаружено при дегенеративных и регенераторных процессах, происходящих в перерезанном нервном волокне (Esposito et al., 2002). Установлено, что под действием фактора роста нервов (NGF) происходит ускорение дифференцировки предшественников ТК и созревания малодифференцированных ТК в языке у головастика лягушки, находящихся на разных стадиях индивидуального развития (Chieffi Vaccari et al., 2003).

Ранее на ультраструктурном уровне были охарактеризованы резидентные и циркулирующие ТК в пропульсаторных органах (лимфатическое и «кровеное» сердца) взрослой лягушки (Крылова, 2009). В онтогенезе лягушки ТК этих органов не исследованы. В связи с этим цель настоящей работы заключалась в изучении ультраструктуры дифференцирующихся ТК в лимфатических сердцах развивающихся лягушек *Rana temporaria*. Метод иммуноэлектронной цитохимии был использован для выявления наличия и локализации в ТК ANP-, SP- и Hsp70- иммунореактивного материала.

Материал и методика

Исследовали задние лимфатические сердца головастика и сеголеток лягушки *R. temporaria*. Головастики, выловленные в водоемах Ленинградской обл. в сезон размножения травяной лягушки, содержали при комнатной температуре (18–20 °C), регулярно кормили и меняли им воду. В эксперименте использовали материал, полученный от головастика, находящихся на стадиях развития 39–43 (преметаморфоз), 44–45 (прометаморфоз), 51–53 (метаморфоз), и от сеголеток (постметаморфозные лягушки). Классификация стадий дана по номенклатуре, предложенной Дабегян и Слепцовой (1975). Задние лимфатические сердца у головастика расположены с каждой стороны основания хвоста вдоль хвостовой вены и имеют вид небольших пульсирующих пузырьков. У сеголеток задние лимфатические сердца расположены по обе стороны копчика. Материал брали от 3–5 головастика на каждый срок исследования и от 5 сеголеток.

Электронная микроскопия. Кусочки основания хвоста у головастика, содержащие лимфатические сердца, и задние лимфатические сердца у сеголеток фиксировали в течение 2 ч 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. У некоторых головастика фиксировали и обрабатывали схожим образом желудочки «кровеное» сердца. На ультратоме LKB-III изготавливали тонкие срезы и окрашивали их цитратом свинца. Материал просматривали в электронном микроскопе JEM-7A при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия. Лимфатические сердца головастика и сеголеток фиксировали в течение 2 ч в растворе, содержащем 4 % параформальдегида и 0.5 % глутаральдегида на 1×PBS (pH 7.4). После этого кусочки отмывали в растворе 1×PBS, содержащем 0.5 M NH₄Cl, дегидратировали их в этаноле возрастающей концентрации и заключали в смолу LR-White (Polyscience, США). В качестве первых антител использовали поликлональные антитела против ANP крысы — анти-r-ANF (1—28) (Peninsula Lab., Inc., Bachem), поликлональные антитела против SP (Peninsula Lab., Inc., Bachem) и моноклональные антитела против Hsp70 — 3B5 (Lasunskaja et al., 1997). Конечное разведение антител к ANP — 1 : 2000, антител к SP — 1 : 1000 и антител к Hsp70 — 1 : 2000. Вместо вторых антител при работе с антителами против ANP использовали белок А (Sigma, США, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов), конъюгированный с коллоидным золотом (диаметр гранул 10 нм), при рабочем разведении антител 1 : 20. При работе с антителами против SP в качестве вторых антител использовали козы антитела против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные с коллоидным золотом (диаметр частиц 10 нм) (Sigma, США) при разведении 1 : 20. Ультратонкие срезы, инкубированные в растворе моноклональных антител к Hsp70, затем обрабатывали козыми антителами против мышинных иммуноглобулинов, конъюгированными с коллоидным золотом (диаметр частиц 10 нм) (Amersham, США), при разведении 1 : 10. Контролем служили срезы, прошедшие обработку без применения первых антител.

Для иммуноэлектронного мечения ультратонких срезов использовали также материал, обработанный по стандартной методике, применяемой для электронно-микроскопических исследований, и заключенный в смесь смол Эпон—Аралдит. В этом случае до иммуноцитохимической обработки для увеличения гидрофильности смолы срезы выдерживали в течение 20 мин в 3%-ном растворе перекиси водорода. Материал просматривали в электронном микроскопе JEM-7A при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты

Задние лимфатические сердца морфологически впервые можно идентифицировать у головастика, находящихся на 39–40-й стадиях развития. На ультраструктурном уровне в основании хвоста головастика в пространстве между наружным покровом и миотомиями в небольшом скоплении клеток мезенхимного типа можно обнаружить одиночные одноядерные клетки, содержащие в цитоплазме небольшие пучки миофиламентов. На данной стадии развития головастика найти ТК среди клеток лимфатического сердца не удалось. Отдельные безъядерные фрагменты ТК встречались только в соединительной

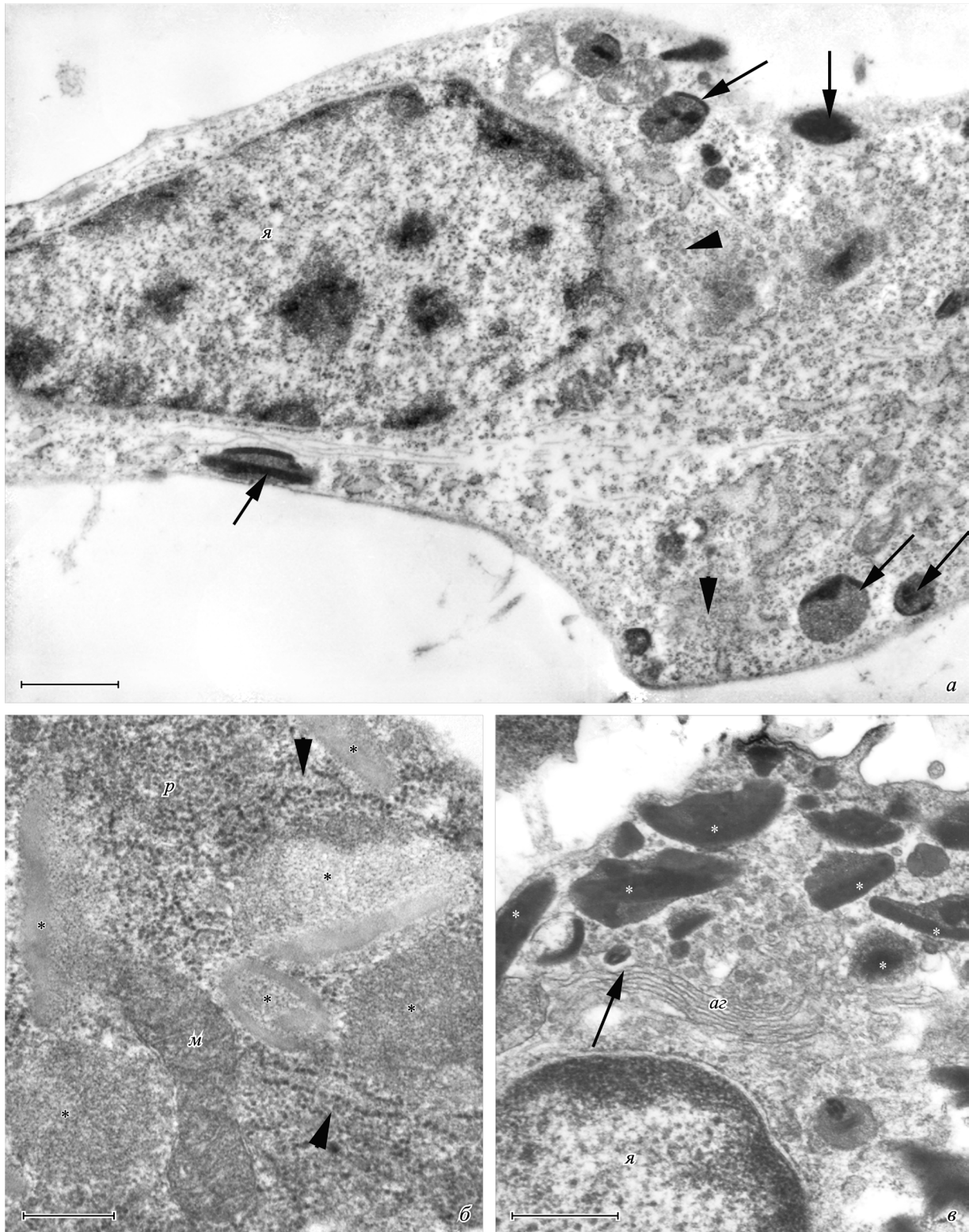


Рис. 1. Ультраструктура ТК головастика, находящихся на стадиях развития, соответствующих пре- и прометаморфозу. *а* — ультратонкий срез малодифференцированной ТК головастика 41-й стадии. В обильной недифференцированной цитоплазме присутствуют одиночные специфические гранулы (*стрелки*), тангенциально перерезанные каналцы ШЭР (*головки стрелок*) и свободные рибосомы. Хроматин ядра в основном диспергирован. *б* — ультратонкий срез умеренно дифференцированной ТК головастика 44—45-й стадий. Цитоплазматические гранулы (*звездочки*) тесно контактируют с каналцами ШЭР (*головки стрелок*) и свободными рибосомами. *в* — ультратонкий срез дифференцированной ТК головастика 44—45-й стадий. Повышенная осмиофильность плотного компонента гранул (*звездочки*), хорошо развитый аппарат Гольджи и наличие програнулы в терминальной части его цистерны (*стрелка*). *аг* — аппарат Гольджи, *м* — митохондрия, *р* — рибосомы, *я* — ядро ТК. Масштабные отрезки — 1 (*а*) или 0.5 (*б*, *в*) мкм.

ткани, окружающей лимфатическое сердце. На следующей, 41-й стадии, развития головастиков под клетками эпидермиса недалеко от лимфатического сердца были обнаружены также одиночные, но уже содержащие ядро малодифференцированные ТК. Это небольшие, несколько удлиненной формы одноядерные клетки. Хроматин в ядрах ТК в основном слабо конденсирован, небольшие глыбки гетерохроматина свободно расположены в нуклеоплазме, иногда ассоциированы с внутренней ядерной мембраной. Наружная ядерная мембрана покрыта рибосомами. Обилие в цитоплазме свободных рибосом, полисом и небольших канальцев ШЭР свидетельствует о высоком уровне биосинтетических процессов, идущих на этой стадии дифференцировки ТК (рис. 1, *а*). Специфических гранул немного, и, как правило, они хаотично распределены по недифференцированной цитоплазме ТК. Однако некоторый полиморфизм и гетерогенность гранул уже присутствуют. Гранулы различаются не только по форме и величине, но и по структуре, а именно по наличию и соотношению мелкогранулярного матрикса и плотного компонента (рис. 1, *а*). Следует подчеркнуть, что упомянутые различия еще не имеют ярко выраженного характера. Среди других органелл можно отметить умеренно развитый аппарат Гольджи, одиночные округлые митохондрии и микротрубочки. Микрофиламенты расположены, как правило, под ПМ. Поверхность ТК образует лишь одиночные отростки; гликолема (базальная пластинка) не развита.

У головастиков 44—45-й стадий развития лимфатическое сердце уже имеет вид пузырька с полостью, выстланной сплошным слоем эндотелиальных клеток. Стенка лимфатического сердца в основном состоит из тоненьких мышечных волокон с хорошо развитым миофибриллярным аппаратом. Увеличение размера лимфатического сердца, по-видимому, происходит как за счет образования новых, так и за счет гипертрофии существующих мышечных волокон, а также за счет увеличения числа одноядерных клеток миогенной и немиогенной природы. Среди последних можно отметить и ТК. На данном этапе развития головастиков обнаружены ТК, различающиеся по уровню дифференцировки. Встречающиеся на 44—45-й стадиях развития головастиков умеренно дифференцированные ТК можно охарактеризовать как клетки, в цитоплазме которых идет активный процесс гранулогенеза (рис. 1, *б*). Многочисленные гранулы, находящиеся на разных стадиях созревания, отличаются друг от друга по величине, форме и структуре. Незрелые гранулы, как правило, имеют округлую форму и состоят целиком из мелкогранулярного матрикса. В дальнейшем по центру или с периферии гранул начинает появляться более плотный компонент, нередко представленный паракристаллиновыми структурами. При этом многие гранулы приобретают овальную или веретеновидную форму. Мембрана вокруг гранул либо вообще не просматривается, либо присутствует фрагментарно. Отсутствие перигранулярной мембраны можно объяснить тангенциальным срезом, прошедшим через гранулы, или артефактом фиксации. В любом случае факт очень тесного контакта всех гранул со свободными рибосомами и канальцами ШЭР остается неоспоримым. Полости канальцев ШЭР, как правило, заполнены умеренно электронно-плотным мелкогранулярным материалом. По мере созревания гранулы приобретают уникальную, свойственную только ТК лягушки структуру (рис. 1, *в*; 2, *а*, *б*; 3, *а*).

Для ТК с признаками прогрессирующей дифференцировки характерны заметное увеличение количества цито-

плазматических гранул и усложнение их структуры, а также большая развитость аппарата Гольджи. В вакуолях, образованных в терминальных участках цистерн аппарата Гольджи, нередко можно увидеть формирование програнул (рис. 1, *в*). С другой стороны, характерно уменьшение числа свободных рибосом, полисом и канальцев ШЭР. В ядре возрастает количество гетерохроматина. Присутствие рибосом на наружной ядерной мембране сохранено. В цитоплазме ТК замечены парные центриоли и отдельные липидные капли. На поверхности ТК присутствуют одиночные небольшие отростки, гликолема еще не развита. Следует отметить, что ТК описанной ультраструктуры характерны для головастиков более поздних (52—53-й) стадий развития и для сеголеток (рис. 3, *а*).

Как в полости лимфатического сердца (рис. 2, *а*), так и в просвете кровеносных сосудов были обнаружены одиночные циркулирующие ТК. Идентификация ТК основывалась главным образом на субмикроскопической морфологии их цитоплазматических гранул. Для того чтобы понять, попадают ли циркулирующие ТК в магистральный кровоток, исследовали ультраструктуру «кровеносного» сердца головастиков разных стадий развития. Одиночные циркулирующие ТК были обнаружены и в полости желудочка сердца (рис. 2, *б*). Таким образом, следует заключить, что в крови и лимфе головастиков лягушки присутствует популяция циркулирующих ТК. Ни на одной из исследованных стадий развития головастиков, делящихся митозом, ТК обнаружено не было. Картин дегрануляции ТК с выходом лишенных мембраны гранул в межклеточное пространство также не выявлено.

У головастиков, находящихся в разгаре метаморфоза (52—53-я стадии), ТК часто тесно, «мембрана к мембране», контактируют с макрофагами. Однако ТК в состоянии апоптоза не обнаружены. Следует отметить, что мышечные волокна лимфатического сердца также не гибнут путем апоптоза. Отдельные ТК, макрофаги, фибробласты и некоторые мышечные волокна лимфатического сердца имеют морфологию, напоминающую программированный некроз (рис. 3, *б*). К ультраструктурным изменениям цитоплазмы таких гибнущих ТК следует отнести набухание митохондрий, образование вакуолей, появление свободных рибосом и небольших раздутых канальцев ШЭР, расширение перинуклеарного пространства. Разрыв ПМ приводит к выбросу органелл и цитоплазматических гранул в экстраклеточное пространство (рис. 3, *б*). Пикнотических изменений в ядрах гибнущих ТК не обнаружено.

Проведенное ультраиммуноцитохимическое исследование выявило наличие ANP-иммунореактивного материала в гранулах ТК. Мы обнаружили частицы золота, идентифицирующие ANP, над гранулами ТК, различающихся по уровню дифференцировки (рис. 4, *а*, *б*). Иммуноцитохимическое окрашивание ТК головастиков и сеголеток антителами к SP и Hsp70 дало схожие результаты: частицы золота были обнаружены над гранулами как малодифференцированных, так и более дифференцированных ТК (рис. 4, *в*—*д*). Особенно интенсивно гранулы ТК окрасились антителами к SP (рис. 4, *з*) у сеголеток. Наличие серийных срезов позволило установить совместную локализацию ANP- и Hsp70-иммунореактивного материала в гранулах ТК. В ряде случаев во внеклеточном пространстве были обнаружены гранулы, содержащие Hsp70-иммунореактивный материал. Источником иммуноокрашенных гранул были некротические ТК. Во всех случаях отрицательным контролем служили срезы, не подвергшиеся обработке первыми антителами.

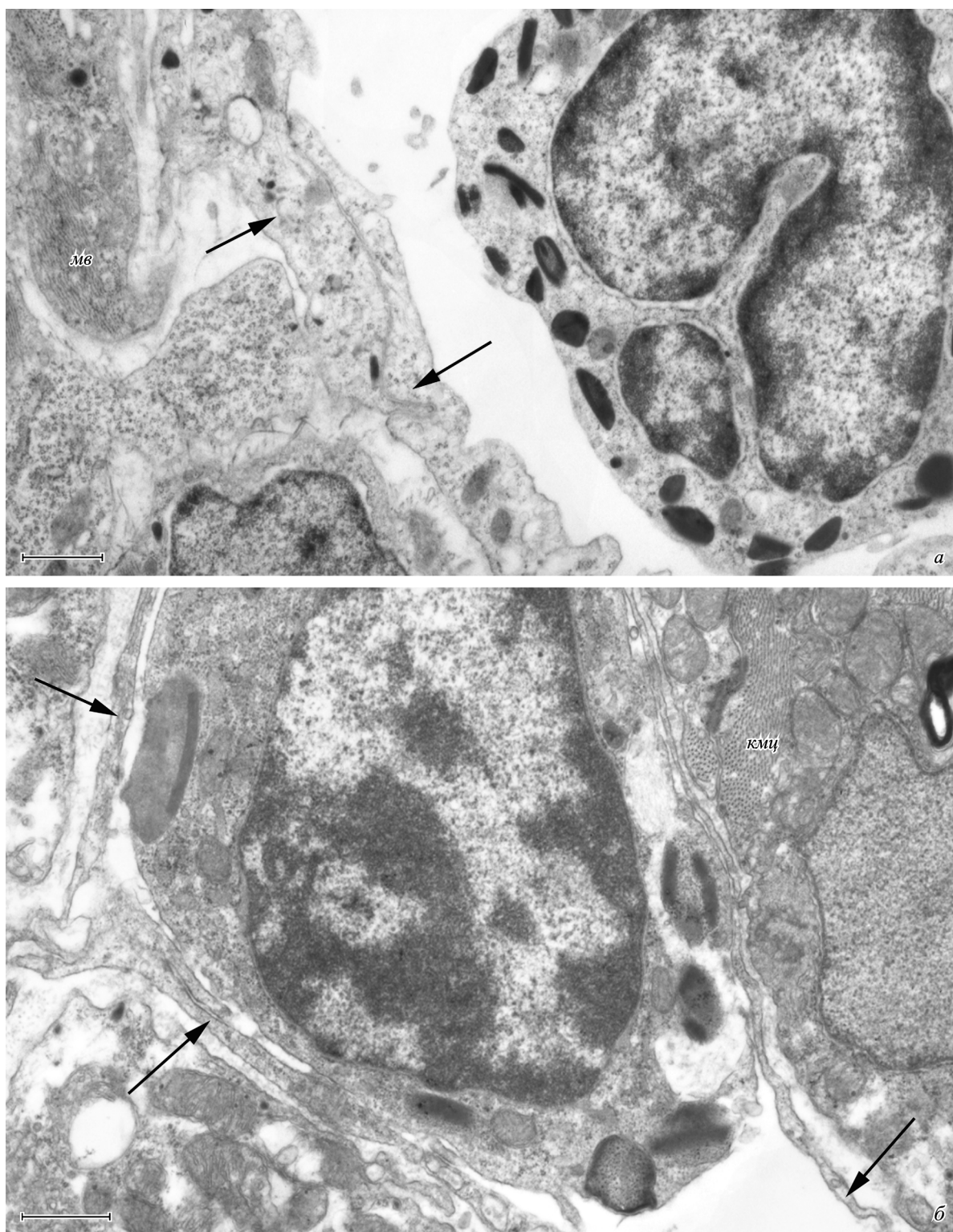


Рис. 2. Ультраструктура циркулирующих ТК головастика 52—53-й стадий.

а — циркулирующая ТК в полости лимфатического сердца; *стрелки* указывают на эндотелиальные клетки, которые выстилают полость сердца. *б* — циркулирующая ТК в полости желудочка «кровавого» сердца; *стрелки* указывают на эндотелиальные клетки эндокарда сердца. *кми* — кардиоцит желудочка «кровавого» сердца, *мв* — мышечное волокно лимфатического сердца. Масштабные отрезки — 0.5 мкм.

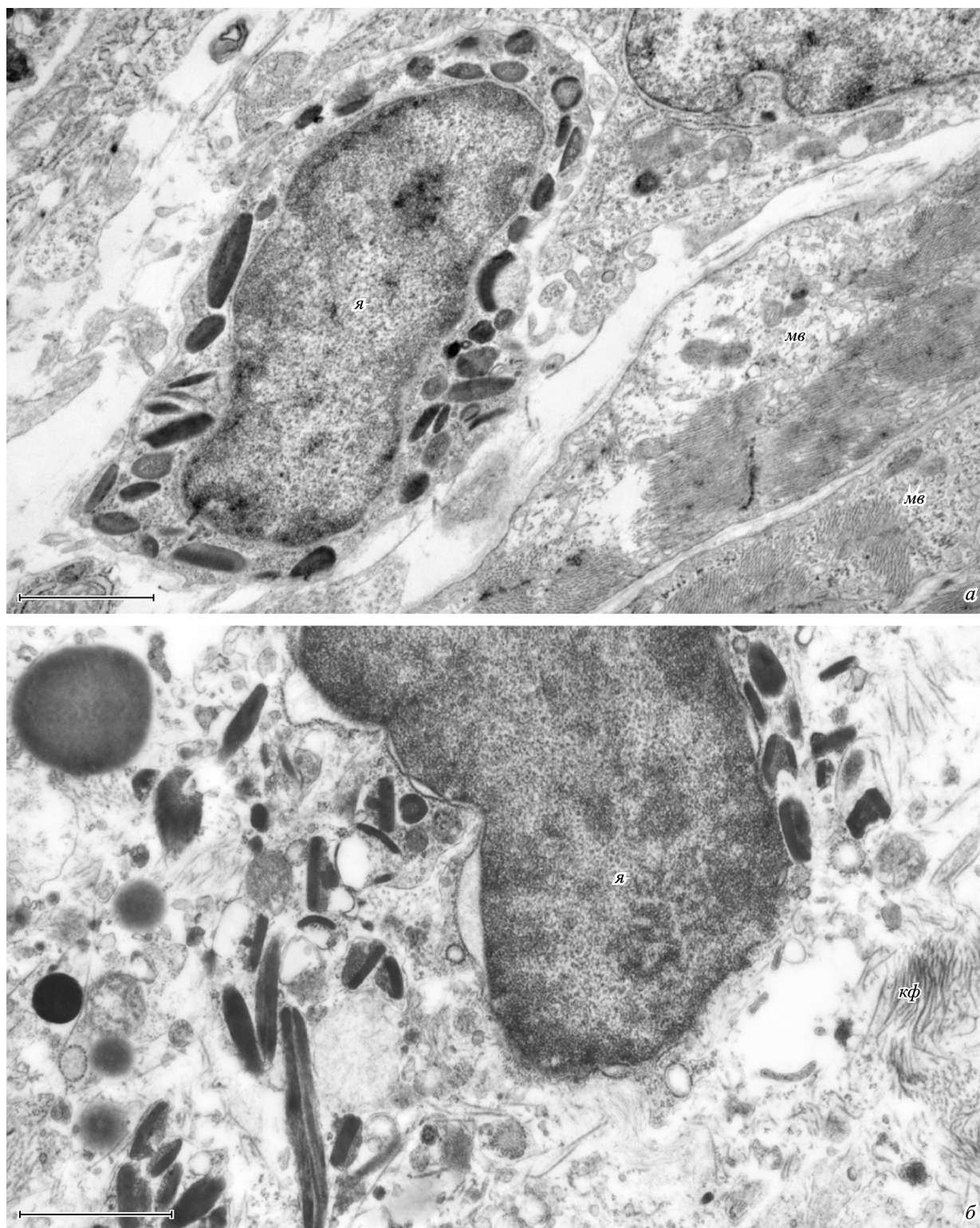


Рис. 3. Ультраструктура ТК головастика 53-й стадии и сеголетки.

а — ультратонкий срез ТК, расположенной между мышечными волокнами, в стенке лимфатического сердца сеголетки. *б* — ультратонкий срез ТК, подвергшейся некрозоподобной смерти; гранулы и другие цитоплазматические органеллы в результате повреждения ПМ ТК оказались в межклеточном пространстве в окружении коллагеновых фибрилл. *кф* — коллагеновые фибриллы, *мв* — мышечные волокна лимфатического сердца, *я* — ядро ТК. Масштабные отрезки — 1 мкм.

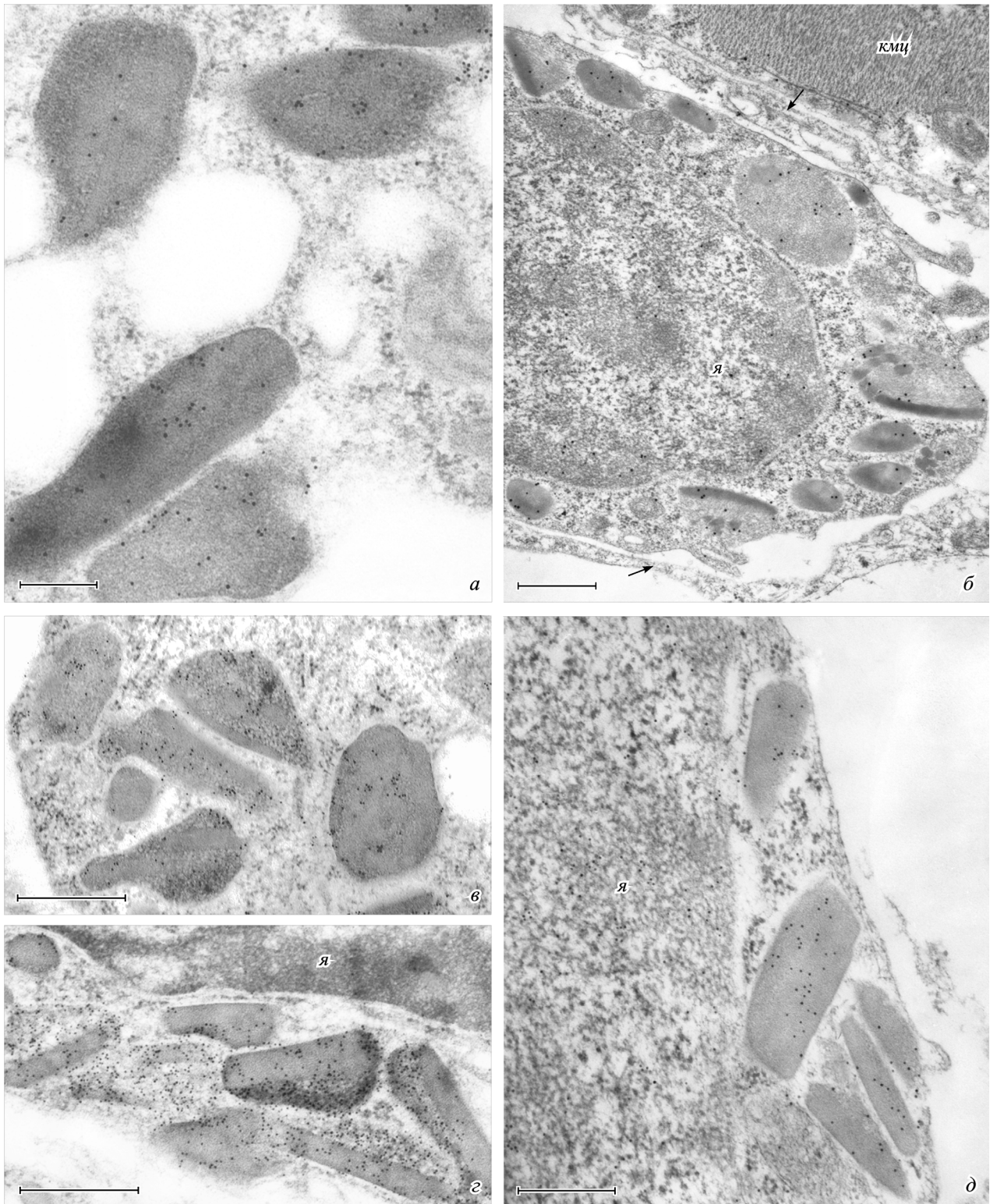


Рис. 4. Локализация ANP-, SP- и Hsp70-иммунореактивного материала в гранулах ТК головастиков разных стадий развития и сеголеток.

a — ультратонкий срез ТК лимфатического сердца головастика 39—40-й стадий после обработки антителами к ANP; материал залит в смолу LR-White; частицы золота, идентифицирующие ANP, расположены над гранулами. *б* — ультратонкий срез циркулирующей ТК, расположенной в полости желудочка «кровенного» сердца головастика 43-й стадии; цитоплазматические гранулы ТК иммуноокрашены антителами против ANP; материал залит в смесь смол Эпон—Аралдит; стрелки указывают на эндотелий эндокарда. *в* — тонкий срез ТК лимфатического сердца головастика 39—40-й стадий, обработанный антителами к SP; материал залит в смолу LR-White. *г* — гранулы ТК сеголетки иммуноокрашены антителами против SP; материал залит в смолу LR-White. *д* — фрагмент цитоплазмы ТК головастика 53-й стадии; специфическое Hsp70-иммунореактивное окрашивание гранул ТК; материал залит в смесь смол Эпон—Аралдит. *кмц* — кардиомиоцит, *я* — ядро ТК. Масштабные отрезки — 0.2 (*a*) или 0.5 (*б—д*) мкм.

Обсуждение

В настоящей работе на ультраструктурном уровне изучали прогрессирующую дифференцировку ТК лимфатических сердец у головастика разных стадий развития и сеголеток лягушки *R. temporaria*. К морфологическим критериям незрелости развивающихся ТК млекопитающих относят высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, небольшой размер клеток, выраженную развитость аппарата Гольджи, немногочисленность специфических гранул в цитоплазме и отсутствие признаков активации ТК (Combs, 1966; Gaytan et al., 1990). Исходя из вышесказанного ультраструктура немногочисленных ТК, обнаруженных у головастика 39—41-й стадий развития, свидетельствует об их явно слабой дифференцировке. Однако в отличие от незрелых ТК эмбрионов и новорожденных млекопитающих у головастика в ранних ТК преобладает недифференцированная цитоплазма, обогащенная свободными рибосомами, полисомами и небольшими канальцами ШЭР, в то время как аппарат Гольджи развит еще слабо. Немногочисленные специфические гранулы преимущественно округлой формы, как правило, имеют мелкозернистую структуру. Однако некоторые из них помимо материала матрикса содержат характерные для гранул более зрелых ТК электронно-плотные включения, расположенные как по центру, так и по их периферии.

В умеренно дифференцированных ТК процесс гранулогенеза идет особенно активно (44—45-я стадии). Однако в отличие от ТК II—III стадий развития, исследованных в коже и перитонеальной полости новорожденных крысят (Combs, 1966; Yong, 1981), в ТК головастика 44—45-й стадий множественного образования програнул в аппарате Гольджи не обнаружено. Созревающие гранулы в ТК головастика, скорее, тесно связаны со свободными рибосомами и канальцами ШЭР. Источником мелкозернистого материала, составляющего матрикс незрелых гранул ТК, возможно, является тонкогранулярное содержимое полостей канальцев ШЭР. Однако откуда поступает в гранулы электронно-плотный материал? Как происходит формирование характерных для гранул ТК взрослой лягушки паракристаллиновых включений? Проведенное исследование ультраструктуры ТК головастика не позволяет пока ответить на поставленные вопросы.

К признакам прогрессирующей дифференцировки, характерной для другой части ТК головастика 44—45-й стадий развития, следует отнести увеличение количества полиморфных и гетерогенных по структуре гранул, формирование програнул в терминалях канальцев развитого аппарата Гольджи, уменьшение числа свободных рибосом, полисом и канальцев ШЭР, гетерохроматинизацию ядер. ТК описанной ультраструктуры можно встретить у головастика более поздних (52—53-й) стадий развития и у сеголеток.

Подобно взрослым лягушкам (Csaba et al., 1970; Крылова, 2009), у головастика (начиная с 43-й стадии) в крови и лимфе были обнаружены циркулирующие ТК. Идентификация этого типа ТК основывалась главным образом на субмикроскопической морфологии их цитоплазматических гранул. Ядра некоторых циркулирующих ТК головастика, подобно ядрам незрелых ТК мезентерия новорожденных крысят, имели неровные очертания, иногда с глубокими инвагинациями ядерной мембраны (Jamur et al., 1997). Функция как резидентных, так и циркулирующих ТК головастика и сеголеток пока не исследована.

Хорошо известно, что иммунная система головастика компетентна для борьбы с потенциальными патогенами, присутствующими в окружающей их среде (Rollins-Smith, 1998). Однако Т-клеточная функция у головастика, особенно на стадии метаморфоза, ослаблена (Ruben et al., 1992). У млекопитающих ТК участвуют в различных процессах врожденного и адаптивного иммунитета (Marshall, Jawdat, 2004; Dawicki, Marshall, 2007). Существенными компонентами врожденной иммунной системы признаны образраспознающие рецепторы (Toll-like-рецепторы). Полагают, что они играют центральную роль не только в процессе узнавания патогена, но и в активации адаптивного иммунитета (Fleer, Krediet, 2007). Недавно Toll-like-рецепторы были найдены и охарактеризованы у головастика и взрослой лягушки *Xenopus laevis* (Ishii et al., 2007). Ранее Toll-like-рецепторы были обнаружены в ТК млекопитающих (Supajatura et al., 2001; Applequis et al., 2002). Показано, что разнообразие пути активации ТК патогенами включают в себя и Toll-like-рецепторы (Supajatura et al., 2002; Dawicki, Marshall, 2007). Исходя из вышесказанного кажется вероятным, что ТК головастика наряду с эффекторными клетками врожденной иммунной системы могут участвовать в защите организма от инфекции. Однако картин дегрануляции ТК в настоящей работе выявлено не было. Возможно, высокую активность ТК следовало бы ожидать в пограничных органах, таких как жабры, кишечник и кожный покров.

Значительное увеличение числа ТК и повышение их функциональной активности были обнаружены в зараженных паразитами жабрах и кишечнике у рыб (Dezfuli, Giari, 2008). При этом многочисленные ТК были выявлены не только в соединительной ткани около кровеносных сосудов, но и в просветах кровеносных сосудов этих органов. Было сделано предположение о том, что у рыб существуют популяции резидентных ТК и популяция циркулирующих ТК и что присутствие паразитов индуцирует рекрутирование ТК к местам заражения (Dezfuli, Giari, 2008). Данные по антимикробной активности ТК у млекопитающих свидетельствуют о решающей роли этих клеток в защите организма от патогенов (Von Kockritz-Blickwede et al., 2008).

В процессе разгара метаморфоза у головастика происходит резорбция хвоста. При этом в апоптоз вовлекаются многие клеточные типы, включая эпидермальные клетки, фибробласты, нервные клетки и мышцы. В настоящей работе было обнаружено, что некоторые ТК, макрофаги и мышечные волокна лимфатического сердца гибнут, но не путем апоптоза. В составе запрограммированной клеточной гибели обычно выделяют несколько морфологических типов: I тип — апоптоз, II тип — аутофагическая гибель, III тип — цитоплазматическая нелизосомная вакуолярная гибель (программированный некроз, некроптоз и онкозис) (Clarke, 1990; Bras et al., 2005). Выявленные в настоящем исследовании ультраструктурные изменения в гибнущих ТК включали в себя набухание митохондрий и канальцев ШЭР, расширение перинуклеарного пространства, частичное разрушение ПМ и выход гранул и других цитоплазматических органелл в экстрацеллюлярное пространство. Перечисленные морфологические признаки соответствуют III типу клеточной гибели — программированному некрозу.

Данных по субмикроскопической морфологии гибнущих апоптозом ТК крайне мало (Kawamoto et al., 1995), и не всегда они убедительны. Эксперименты, проведенные

in vitro, показали, что депривация IL-3 индуцирует апоптоз у мышинных ТК костномозгового происхождения (ВММС). Однако согласно данным электронно-микроскопического исследования, большая часть ВММС при этом имеет морфологию, типичную для онкозиса, и только небольшая часть — морфологию апоптоза (Park et al., 2000). В настоящее время разделяют некроз, вызванный экстремальными условиями, и некроз как форму гибели, которая может быть нормальным физиологическим и запрограммированным событием (Proskuryakov et al., 2003). При этом апоптоз и программированный некроз могут иметь одни и те же стимулы и сигнальные пути. Отмечают существование физиологического противоборства между апоптозом и программированным некрозом, наличие своеобразного «переключателя». В отличие от апоптоза распад клеток при программированном некрозе приводит к воспалительной реакции, которая в свою очередь может способствовать активации иммунного ответа. Полученные в настоящем исследовании ультраструктурные данные свидетельствуют об одном из возможных путей попадания содержимого гранул ТК и макрофагов в экстрацеллюлярное пространство, а именно через некрозоподобную смерть клеток.

Ранее иммунолокализация ANP в гранулах резидентных ТК была выявлена в языке, предсердии и лимфатическом сердце взрослой лягушки (Крылова, 2006). В настоящем исследовании впервые с помощью метода ультраиммуноцитохимии показано наличие ANP-иммунореактивного материала не только в гранулах резидентных ТК, но и в гранулах циркулирующих ТК головастика разных стадий развития. Известно, что ANP принадлежит к системе натрийуретических пептидов. Одна из основных физиологических функций ANP, синтезируемого и секретируемого кардиомиоцитами предсердия и желудочка лягушки, — поддержание водно-солевого баланса в организме (Casco et al., 1992). Экстракардиальная экспрессия ANP у лягушки позволяет рассматривать этот гормон в качестве регионального регулятора, действующего как аутокринный и (или) паракринный регуляторный пептид (Крылова, 2006). Предполагают, что на личиночной стадии развития жабы кардиальный ANP функционально еще не активен. Увеличение количества предсердных гранул, запасающих ANP, и повышение интенсивности их иммуноочечения антителами к ANP наблюдали в критический период, связанный с переходом развивающихся жаб из водной среды на сушу (Casco et al., 1992). Степень функциональной активности и роль ANP, локализованного в гранулах резидентных и циркулирующих ТК головастика и сеголеток лягушки *R. temporaria*, еще неясна.

Субстанция P (SP) является нейропептидом, принадлежащим к семейству тахикининов. Экспрессию SP можно наблюдать как в нервных, так и в других клетках. Например, в костном мозге млекопитающих источником SP являются и нервные волокна, и клетки стромы. Основные функции SP — синаптическая передача, ноцицепция и нейроиммунотомодуляция. Было показано, что SP через рецептор нейрокинина (NK)-1 стимулирует пролиферацию гемопоэтических прогениторных клеток (Rameshwar et al., 2001). Следует отметить, что NK-рецепторы локализованы на многих иммунокомпетентных клетках, включая и ТК. Недавно иммунолокализация SP была выявлена в гранулах ТК кожи человека (Toyoda et al., 2000), а в экспериментах in vitro установлено, что SP в качестве медиатора передает сигнал от нервов к ТК, вызывая дегрануляцию последних (Suzuki et al., 1999).

Более 30 тахикининов было изолировано у амфибий (Li et al., 2006); исследованы структура, фармакология и тканевое распределение множественных изоформ NK1-подобных рецепторов (Liu, Burcher, 2005). Впервые SP-подобная иммунореактивность была обнаружена в ТК восьмого симпатического ганглия у жабы (Montoya et al., 1989). В настоящей работе SP-подобный иммунореактивный материал был обнаружен в гранулах ТК разного уровня дифференцировки у головастика и сеголеток. Сильное иммуномечение гранул антителами к SP было зафиксировано у резидентных и циркулирующих ТК сеголеток. На основе полученных ультраструктурных данных можно лишь косвенно судить о функциональной значимости SP в качестве аутокринного и (или) паракринного регуляторного пептида для этой стадии развития лягушки.

Семейство Hsp70 объединяет белки теплового шока, которые являются внутриклеточными молекулярными шаперонами и в стрессовых условиях играют важную роль в обеспечении выживания клетки. Помимо внутриклеточной формы существует экстрацеллюлярная форма Hsp70. Обнаружено, что экстрацеллюлярный Hsp70 взаимодействует с клетками иммунной системы и может оказывать иммунорегуляторные эффекты (Multhoff, 2006; Asea, 2008). Иммунологические свойства экстрацеллюлярного Hsp70 обнаружены не только у млекопитающих, но и у холоднокровных позвоночных, например у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Robert, 2003).

Внутриклеточный Hsp70 был выявлен в гранулах мышинных ТК костномозгового происхождения (Skokos et al., 2003) и в клетках базофильной лейкемии (RBL-клетки, гомологи мукозных ТК) у крысы (Bachelet et al., 2002). В настоящей работе показана иммунолокализация Hsp70 в гранулах резидентных и циркулирующих ТК головастика разных стадий развития и у сеголеток. Обнаруженные картины выброса из некротических ТК в экстрацеллюлярное пространство меченных антителами к Hsp70 гранул у метаморфизирующих головастика свидетельствуют о неспецифическом, пассивном механизме выброса Hsp70. Роль экстрацеллюлярного Hsp70 в онтогенезе лягушки еще предстоит установить.

Настоящее исследование, естественно, не охватывает всей совокупности событий, происходящих в период дифференцировки ТК в онтогенезе лягушек. Особое внимание следует обратить на то обстоятельство, что в ТК одновременно с морфологической дифференцировкой гранул протекают не менее сложные внутригранулярные биохимические изменения, связанные с накоплением в гранулах разнообразных биоактивных молекул. Полученные данные по иммунолокализации ANP, SP и Hsp70 в гранулах малодифференцированных ТК свидетельствуют о том, что перечисленные пептиды, по-видимому, не определяют степени зрелости ТК. Невьясненной остается на сегодняшний день и функциональная активность этих пептидов на разных стадиях индивидуального развития лягушек. Надеемся, что будущие ультраструктурные и функциональные исследования помогут найти ответы как на поставленные, так и на неохваченные настоящей работой вопросы, касающиеся биологии ТК в онтогенезе лягушек.

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

Список литературы

- Дабаян Н. В., Слепцова Л. А. 1975. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. в кн.: Объекты биологии развития. М.: Наука. С. 442—462.
- Крылова М. И. 2006. Иммуноцитохимическая локализация предсердного натрийуретического пептида в тучных клетках взрослой травяной лягушки *Rana temporaria*. Докл. РАН. 406 (3) : 425—427.
- Крылова М. И. 2009. Резидентные и циркулирующие тучные клетки в пропульсаторных органах лягушки *Rana temporaria*. Цитология. 51 (10) : 838—848.
- Applequist S. E., Wallin R., Ljunggren H. G. 2002. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. Intern. Immunol. 14 : 1065—1074.
- Asea A. 2008. Heat shock proteins and toll-like receptors. Handb. Exp. Pharmacol. 183 : 111—127.
- Bachelet M., Marchad F., Souil E., Francois D., Marethoz E., Weyer A., Polla B. S. 2002. Expression and localization of heat shock proteins in rat basophilic leukemia cells: differential modulation by degranulation, thermal or oxidative stress. Allergy. 57 : 791—797.
- Belloni A. S., Petrelli L., Guidolin D., De Toni R., Bova S., Spinazzi R., Gerosa G., Rossi G. P., Nussdorfer G. G. 2006. Identification and localization of adrenomedullin-storing cardiac mast cells. Int. J. Mol. Med. 17 : 709—713.
- Bras M., Queenan B., Susin S. A. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochemistry (Mosc.). 70 : 231—239.
- Casco V. H., Paz D., Ruiz G., Maldonado C., Pisano A., Aoki A. 1992. Differentiation of endocrine myocardiocytes in the developing heart of the toad (*Bufo arenarum* Hensel). Int. J. Develop. Biol. 36 : 537—542.
- 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., Raucci 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.
- Clarke P. G. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat. Embryol. (Berl.). 181 : 195—213.
- Combs J. W. 1966. Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. J. Cell Biol. 31 : 563—575.
- Csaba G., Olah I., Kapa E. 1970. Phylogenesis of mast cells. II. Ultrastructure of mast cells in the frog. Acta biol. 21 : 255—264.
- Dawicki W., Marshall J. S. 2007. New and emerging roles for mast cells in host defence. Curr. Opin. Immunol. 19 : 31—38.
- Dezfuli B. S., Giari L. 2008. Mast cells in the gills and intestines of naturally infected fish: evidence of migration and degranulation. J. Fish Diseases. 31 : 845—852.
- Esposito B., De Santis A., Monteforte R., Chiaffino Baccari G. 2002. Mast cells in Wallerian degeneration: morphologic and ultrastructural changes. J. Comp. Neurol. 445 : 199—210.
- Fleer A., Krediet T. G. 2007. Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn. Neonatology. 92 : 145—157.
- Galli S. J., Grimaldeston M., Tsai M. 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. Nat. Rev. Immunol. 8 : 478—486.
- 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.
- Ishii A., Kawasaki M., Matsumoto M., Tochinai S., Seya T. 2007. Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* Toll-like receptors. Immunogenetics. 59 : 281—293.
- Jamur M. C., Lunardi L. O., Vugman I. 1997. Mast cell maturation in young rats: a histofluorescence and cytochemical study. Acta histochem. 99 : 379—389.
- Kawamoto K., Okada T., Kannan Y., Ushio H., Matsumoto M., Matsuda H. 1995. Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. Blood. 86 : 4638—4644.
- 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.
- Lasunskaja E. B., Fridlianskaia I. I., Guzova I. V., Bozhkov V. M., Margulis B. A. 1997. Accumulation of major stress protein 70 kDa protects myeloid and lymphoid cells from death by apoptosis. Apoptosis. 2 : 156—163.
- Li J., Liu T., Xu X., Wu M., Yang H., Lai R. 2006. Amphibian tachykinin precursor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 350 : 983—986.
- Lindstedt K. A., Kovanen P. T. 2006. Isolation of mast cell granules. Curr. Protoc. Cell Biol. Chapter 3 : Unit 3.16.
- Liu L., Burcher E. 2005. Tachykinin peptides and receptors: putting amphibians into perspective. Peptides. 26 : 1369—1382.
- Malaviya R., Georges A. 2002. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. Clin. Rev. Allergy Immunol. 22 : 189—204.
- Marshall J. S., Jawdat D. M. 2004. Mast cells in innate immunity. J. Allergy Clin. Immunol. 114 : 21—27.
- Martynova M. G., Bystrova O. A., Moiseeva O. M., Evdounin A. L., Kondratov K. A., Medvedeva N. D. 2005. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. Cell Res. 15 : 811—816.
- Metcalf D. D., Baram D., Mekori Y. A. 1997. Mast cells. Physiol. Rev. 77 : 1033—1079.
- Metcalf D. D., Mekori J. A., Rottem M. 1995. Mast cell ontogeny and apoptosis. Exp. Dermatol. 4 : 227—230.
- 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.
- Montoya G. F., Villena F., Pezo A. A. 1989. Substance P-like immunoreactivity in sympathetic ganglion from toad. Cell Mol. Biol. 35 : 325—331.
- Multhoff G. 2006. Heat shock proteins in immunity. Handb. Exp. Pharmacol. 172 : 279—304.
- 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. Immunol. Invest. 29 : 51—60.
- Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Exp. Cell Res. 283 : 1—16.
- Rameshwar P., Zhu G., Donnelly R. J., Qian J., Ge H., Goldstein K. R., Denny T. N., Gascon P. 2001. The dynamics of bone marrow stromal cells in the proliferation of multipotent hematopoietic progenitors by substance P: an understanding of the effects of a neurotransmitter on the differentiating hematopoietic stem cell. J. Neuroimmunol. 121 : 22—31.
- Rivera J., Gilfillan A. M. 2006. Molecular regulation of mast cell activation. J. Allergy Clin. Immunol. 117 : 1214—1225.
- Robert J. 2003. Evolution of heat shock protein in immunity. Develop. Comp. Immunol. 27 : 449—464.
- Rollins-Smith L. A. 1998. Metamorphosis and the amphibian immune system. Immunol. Rev. 166 : 221—230.
- Ruben L. N., Scheinman M. A., Johnson R. O., Shiigi S., Clothier R. H., Balls M. 1992. Impaired T cell function during amphibian metamorphosis: IL-2 receptor expression and endogenous ligand production. Mech. Develop. 37 : 167—172.
- Shelburne C. P., Ryan J. J. 2001. The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis. Immunol. Rev. 179 : 82—93.
- Shimizu T., Owsianik G., Freichel M., Flockerzi V., Nilius B., Vennekens R. 2009. TRPM4 regulates migration of mast cells in mice. Cell Calcium. 45 : 226—232.
- Shiohara M., Koike K. 2005. Regulation of mast cell development. Chem. Immunol. Allergy. 87 : 1—21.
- Silver R. B., Reid A. C., Mackins C. J., Askwith T., Schaefer U., Herzlinger D., Levi R. 2004. Mast cells: a unique source of renin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 : 13 607—13 612.
- Skokos D., Botros H. G., Demeure C., Morin J., Peronet R., Birkenmeier G., Boudaly S., Mecheri S. 2003. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic

cells and elicit specific immune responses *in vivo*. J. Immunol. 170 : 3037—3045.

Stelekati E., Orinska Z., Bulfone-Paus S. 2007. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. Immunobiology. 212 : 505—519.

Supajatura V., Ushio H., Nakao A., Arira S., Okumura K., Ra C., Ogawa H. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. J. Clin. Invest. 109 : 1351—1359.

Supajatura V., Ushio H., Nakao A., Okumura K., Ra C., Ogawa H. 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. J. Immunol. 167 : 2250—2256.

Suzuki R., Furuno T., McKay D. M., Wolvers D., Teshima R., Nakanishi M., Bienenstock J. 1999. Direct neirite-mast cell communication *in vitro* occurs via the neuropeptides substance P. J. Immunol. 163 : 2410—2415.

Toyoda M., Makino T., Kagoura M., Morohashi M. 2000. Immunolocalization of substance P in human skin mast cells. Arch. Dermatol. Res. 292 : 418—421.

Tsai M., Takeishi T., Thompson H., Langley K. E., Zsebo K. M., Metcalfe D. D., Geissler E. N., Galli S. J. 1991. Induction of mast cell proliferation, maturation, and synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 6382—6386.

Von Kockritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P., Heinemann K., Norrby-Teglund A., Rohde M., Medina E. 2008. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Blood. 111 : 3070—3080.

Yong J. L. 1981. The mast cell: IV. An ultrastructural and autoradiographic study of the distribution and maturation of peritoneal mast cells in the rat. Pathology. 13 : 497—515.

Поступила 24 II 2010

MAST CELLS OF LYMPH HEARTS DURING ONTOGENESIS OF FROGS *RANA TEMPORARIA*

M. I. Krylova

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

Electron microscopic observations of the lymph hearts of tadpoles and yearling frogs of *Rana temporaria* showed that mast cells (MCs) were present not only between muscle fibers (population of resident MCs), but in the cavities of lymph heart (population of circulating MCs), too. There were some differences in the ultrastructure of the resident MCs at each studied stage of larval development. The first recognizable MCs were revealed in the lymph hearts at premetamorphosis (stages 39—41). MCs presented as mononuclear relatively small and slightly elongated cells with a few immature secretory granules and numerous free ribosomes, polysomes and short cisternae of rough endoplasmic reticulum (RER) in the cytoplasm. Chromatin of their nuclei was poorly condensed; the Golgi apparatus was moderately developed. At pro-metamorphosis (stages 44—45), we revealed MCs at different levels of their differentiation. Some MCs demonstrated an active process of granulogenesis in their cytoplasm. Among densely packed cytoplasmic organelles, immature secretory granules were closely associated with cisternae of RER and free ribosomes. Other MCs appeared as more differentiated cells. They were characterized by a predominantly heterochromatic nuclei and cytoplasm filled with polymorphic and heterogeneous granules. MCs also showed a reduction in the number of free ribosomes and cisternae of RER in the cytoplasm. On the contrary, the Golgi apparatus was well developed. Stacks of Golgi cisternae, detaching vacuoles, and progranules occupied the perinuclear region. The majority of the outlines above ultrastructural features of differentiated MCs were typical for MCs of yearling frogs. At metamorphic climax (stages 52—53), MCs often tightly contacted with macrophages. We did not reveal apoptotic MCs. However, some MCs exhibited morphological features typical for programmed necrosis-like death, which was characterized by mitochondria swelling, dilatation of cisternae of RER and nuclear envelope, plasma membrane rupture and subsequent loss of intracellular contents. Electron microscopical immunocytochemistry revealed the localization of atrial natriuretic peptide (ANP), substance S (SP) and heat shock protein (Hsp70) in the secretory granules of the resident and circulating MCs at different stages of tadpole development and in yearling frogs.

Key words: resident and circulating mast cells, development, ANP, SP, Hsp70, immunolocalization, lymph heart, frog.