

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ В ПОВРЕЖДЕННОЙ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ МЫШЦЕ ЛИМФАТИЧЕСКОГО СЕРДЦА ВЗРОСЛОЙ ЛЯГУШКИ: УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ, ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ И АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© М. И. Крылова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;
электронный адрес: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

В настоящей работе на ультраструктурном уровне исследовали признаки активации тучных клеток (ТК) приранево́й зоны механически поврежденной мышечной ткани лимфатического сердца лягушки *Rana temporaria* в течение 1-й нед после операции. Через 24 ч после повреждения в цитоплазме части резидентных и циркулирующих ТК обнаружены пустые дегрануляционные каналы, свидетельствующие о произошедшем ранее выделении материала секреторных гранул путем составного (comround) экзоцитоза. Выявлены редкие случаи выброса одиночных, лишенных мембраны гранул с измененным содержанием в пространство, ограниченное плазматической мембраной резидентных ТК и окружающих их базальной пластинкой. В течение 1-й нед после операции изменения в ультраструктуре многих секреторных гранул активированных ТК связаны с набуханием гранул, уменьшением количества электронно-плотного компонента в гранулах и выраженным разрыхлением их матрикса. Обращает на себя внимание близость расположения неизменных и измененных гранул к пустым открытым дегрануляционным каналам, нередко пронизывающим цитоплазму активированной тучной клетки от ее поверхности до центрально расположенного ядра. Иммуноцитохимическое мечение ТК с помощью антител к гистамину выявило локализацию частиц золота как над неизменными гранулами, так и над измененными. В измененных гранулах частицы золота располагались над сохранившейся электронно-плотной частью, в то время как разрыхленный матрикс, как правило, метки не содержал. Ультраструктурные признаки формирования секреторных гранул в цитоплазме некоторых ТК были выявлены к концу 1-й нед после операции. Данные электронно-микроскопической автордиографии показали, что репликативная и транскрипционная активность ТК приранево́й зоны на исследованных сроках после операции не выражена. Митозов в ТК не обнаружено. Изредка встречались ТК, гибнущие путем некроза. Согласно полученным результатам, ТК, простимулированные механическим повреждением лимфатического сердца, секретируют разнообразные преформированные медиаторы, включая гистамин. Выявленная ранняя реакция ТК приранево́й зоны может свидетельствовать о ключевой роли активированных ТК в инициации воспалительного процесса в поврежденной поперечно-полосатой мышечной ткани лимфатического сердца.

Ключевые слова: поврежденная поперечно-полосатая мышца лимфатического сердца, секреторные гранулы тучных клеток, частичная дегрануляция, иммунолокализация гистамина, синтез ДНК и РНК, лягушка.

Принятые сокращения: БП — базальная пластинка, ПМ — плазматическая мембрана, ТК — тучные клетки, $^3\text{H-T}$ — ^3H -тимидин, $^3\text{H-U}$ — ^3H -уридин, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум, ЭМА — электронно-микроскопическая автордиография.

В настоящее время тучные клетки (ТК) млекопитающих рассматривают как многофункциональные тканевые клетки гематогенного происхождения. Многофункциональность ТК подтверждена их участием в аллергических и анафилактических реакциях (Metcalf et al., 1997; Gotwald et al., 1998; Galli et al., 2008), в механизмах адаптивного и врожденного иммунитета (Galli, 2000; Galli, Tsai, 2008), а также в воспалительных заболеваниях (Theoharides et al., 2007, 2012). Накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о важной роли ТК в процессе заживления ран (Reich et al., 1991; Noli, Miolo, 2001; Egozi et al., 2003; Wulf, Wilgus, 2013).

ТК обнаружены во всех васкуляризованных тканях позвоночных, где они часто расположены в непосредственной близости к сосудам и нервам. О вовлеченности ТК в различные адаптивные и патологические процессы, как правило, судят по морфологическим, в том числе ультраструктурным, признакам их активации, а также по изменению их числа и фенотипа (Dvorak et al., 1994; Zweifel et al., 2002; Ерохина и др., 2008). ТК могут быть активированы многими иммунологическими и неиммунологическими стимулами. К последним следует отнести разнообразные физические, химические и механические факторы.

Изучению количества ТК, их ультраструктурных и функциональных особенностей в скелетных мышцах млекопитающих, в том числе регенерирующих после повреждения и генетически дистрофических, уделено немало внимания (Majeed, 1994; Lefaucheur et al., 1996; Nahirney et al., 1997; Radley, Grounds, 2006). Исследованию специфического вклада ТК в процесс регенерации поврежденных скелетных мышц крысы посвящен ряд опубликованных ранее статей (Côte et al., 2008; Duchesne et al., 2011, 2013).

Известно, что любое повреждение васкуляризованных тканей и органов вызывает воспалительную реакцию. Показано, что многофункциональные медиаторы и цитокины ТК принимают активное участие в запуске воспалительного процесса, вызывая вазодилатацию, повышение проницаемости капилляров, а также рекрутирование из кровеносного русла к месту повреждения лейкоцитов и лимфоцитов (Theoharides et al., 2007). Позднее активированные травмой ТК синтезируют и выделяют цитокины, хемокины и ростовые факторы, которые поддерживают пролиферацию и миграцию различных клеточных типов (Gottwald et al., 1998). Воспалительный процесс принято рассматривать как неспецифическую местную реакцию ткани на повреждение, способствующую восстановлению ее целостности.

У бесхвостых амфибий ТК исследовали в поперечно-полосатой мышечной ткани таких органов, как язык, «кровеное» сердце (Chieffi Vaccari et al., 1998, 2003; Monteforte et al., 2001; Крылова, 2003, 2006, 2009), а также лимфатическое сердце развивающихся и взрослых лягушек (Крылова, 2009, 2010). Изучение ранней посттравматической реакции поперечно-полосатых мышц механически поврежденного лимфатического сердца лягушки выявило признаки некроза мышечных волокон, воспаления и активации клеток-сателлитов (Krylova, Bogolyubov, 2015). Данные о роли ТК в процессе регенерации поперечно-полосатых мышц лягушки в известной нам литературе отсутствуют.

Задача настоящей работы заключалась в исследовании ранней (1-я нед после операции) реакции ТК прираневой зоны как вероятных инициаторов воспалительного процесса в механически поврежденном лимфатическом сердце. Работу проводили с использованием методов электронной микроскопии, ЭМА и иммуноцитохимии.

Материал и методика

Объектом исследования служили задние лимфатические сердца взрослых самцов лягушки *Rana temporaria* массой 30—40 г. Задние лимфатические сердца лягушки — это небольшие парные мышечные органы (1—2 мм в диаметре), расположенные под кожей в небольших углублениях по обе стороны копчика. Лимфатические сердца повреждали путем надрезания передней стенки органа тонкими браншами глазных ножниц. Контролем служили лимфатические сердца неоперированных животных. В качестве условного контроля использовали зону в сердце, удаленную от места повреждения. 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 24 ч, а также на 3, 5 и 7-е сут после повреждения органа. Нормальные и оперирован-

ные лимфатические сердца фиксировали в течение 2 ч при 4 °С в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере (рН 7.4). Затем образцы постфиксировали в 1%-ном OsO₄ при 4 °С в течение 1 ч, дегидратировали в этаноле возрастающей концентрации, проводили через ацетон и заключали в эпоксидную смолу Аралдит. На ультратоме LKB-III изготавливали тонкие срезы и окрашивали их цитратом свинца. Материал просматривали в электронном микроскопе LIBRA-120 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Электронно-микроскопическая автордиография. Через 24 ч, а также на 3, 5 и 7-е сут после операции лягушкам вводили ³H-тимидин (³H-Т) в дозе 110 · 10⁴ Бк/г (уд. акт. 592 ГБк/ммоль). Материал фиксировали через 4 ч после однократного введения изотопа. На 5-е сут после операции некоторым лягушкам вводили ³H-У в той же дозе. Фиксировали лимфатические сердца через 30 мин и 24 ч после введения изотопа. Залитый в эпоксидную смолу Аралдит материал подготавливали для электронно-микроскопической автордиографии по методике, подробно описанной Ларра и Дрозом (Larra, Droz, 1970). Время экспозиции варьировало от 3 до 6 мес.

Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия. Для иммуноэлектронного мечения ультратонких срезов использовали материал, обработанный по стандартной методике, применяемой для электронно-микроскопических исследований, и заключенный в смолу Аралдит. До иммуноцитохимической обработки для увеличения гидрофильности смолы срезы выдерживали в течение 20 мин в 3%-ном растворе перекиси водорода. В качестве первых антител использовали поликлональные антитела против гистамина (АВсам, Великобритания). Конечное разведение антител к гистамину 1 : 100. В качестве вторых антител использовали козы антитела против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные с коллоидным золотом (диаметр частиц 10 нм) (Sigma, США) при разведении 1 : 20. Контролем служили срезы, прошедшие обработку без применения первых антител.

Результаты

Повреждение передней стенки лимфатического сердца приводит к расхождению мышц по линии разреза (образованию раневой зоны). Через 24 ч после операции в зоне дефекта стенки лимфатического сердца можно обнаружить наличие сгустка крови, а в полости органа — клетки крови. Прираневая зона представлена узким поясом мышечных волокон, реагирующих на травму, а зона условного контроля — неизменными и малоизмененными мышечными волокнами, расположенными в отдалении от места повреждения. Через 1 сут после операции в интерстициальном пространстве прираневой зоны среди разрушающихся мышечных волокон можно обнаружить эритроциты, нейтрофилы, ТК и макрофаги. Последние нередко проникают под базальную пластинку (БП) гибнущих мышечных волокон, уже лишенных плазматической мембраны (ПМ), и фагоцитируют остатки сократительного аппарата и разрушенные органеллы. Полости расширенных капилляров плотно забиты эритроцитами.

Ультраструктура неактивированных ТК (рис. 1, а), умеренно активированных ТК (рис. 1, б) и активированных травмой ТК заметно различается (рис. 1, в, г). Неактивированные резидентные ТК в лимфатическом сердце (рис. 1, а) имеют, как правило, удлиненную форму и об-

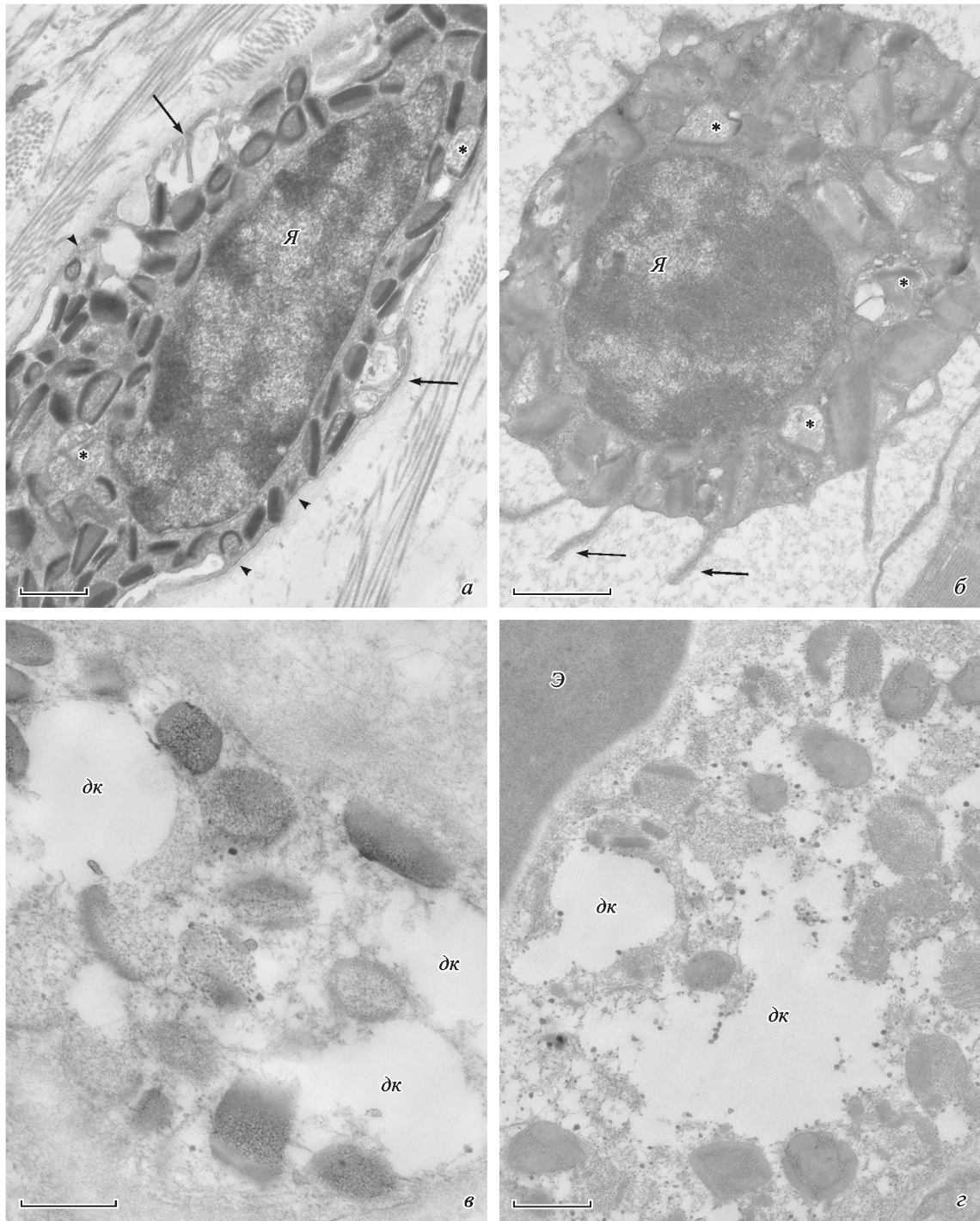


Рис. 1. Ультраструктура резидентных и циркулирующих тучных клеток лягушки *Rana temporaria*.

а — ультратонкий срез неактивированной резидентной тучной клетки, расположенной в соединительной ткани рядом с неоперированным лимфатическим сердцем; гетерогенные и полиморфные гранулы плотно упакованы в цитоплазме: хорошо различим электронно-плотный компонент гранул, а также тонкогранулярный или ячеистый матрикс; овальное ядро обогащено гетерохроматином, *стрелки* указывают на поверхностные лакуны, *головки стрелок* — на БП. *б* — ультратонкий срез умеренно активированной циркулирующей тучной клетки, находящейся в магистральном потоке крови в просвете «кровенного» сердца; *звездочками* отмечены некоторые измененные цитоплазматические гранулы; на поверхности тучной клетки отсутствуют поверхностные лакуны, нет БП, видны небольшие тонкие отростки (*стрелки*). *в* — резидентная активированная тучная клетка в оперированном лимфатическом сердце, 24 ч после повреждения мышечной стенки органа; в цитоплазме тучной клетки присутствуют крупные пустые дегрануляционные каналы (*дж*) и гранулы с измененным содержимым. *г* — циркулирующая тучная клетка в капилляре оперированного лимфатического сердца, 24 ч после повреждения органа; обращают внимание присутствие в цитоплазме клетки пустых дегрануляционных каналов (*дж*) и свободное расположение гранул относительно друг друга. *Э* — эритроцит, *Я* — ядро тучной клетки. *Масштабные отрезки* — 1 (*а, б*) и 0.5 (*в, г*) мкм.

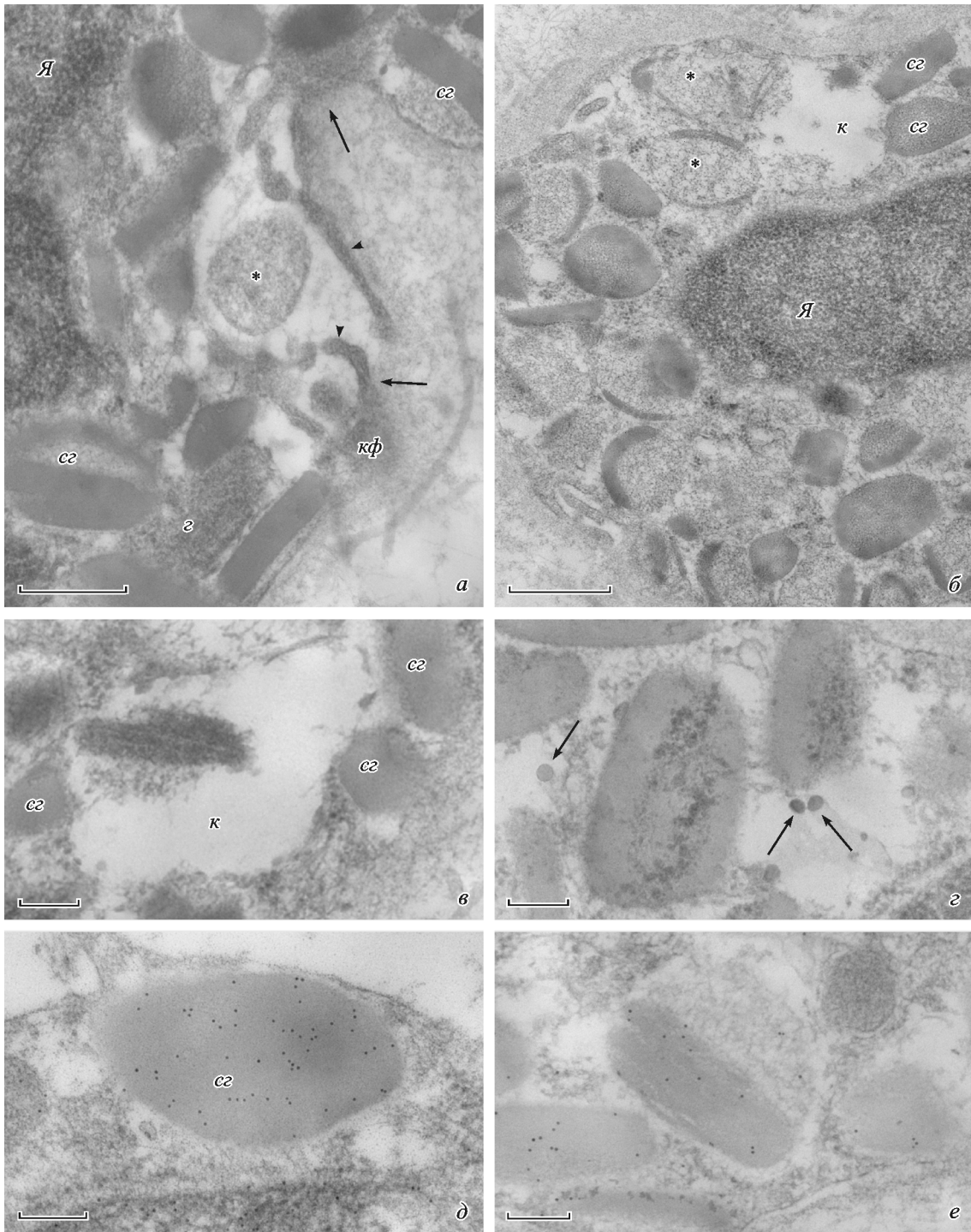


Рис. 2. Активированные резидентные тучные клетки в поврежденном лимфатическом сердце лягушки.

а — выход измененной лишенной мембраны гранулы (звездочка) в поверхностную лакуну активированной тучной клетки, 24 ч после повреждения сердца; головки стрелок указывают на цитоплазматические отростки, стрелки — на БП; *сг* — секреторные гранулы, *кф* — коллагеновая фибрилла, *Я* — ядро тучной клетки. *б* — многочисленные секреторные гранулы с измененным содержимым в цитоплазме тучной клетки, 24 ч после повреждения лимфатического сердца; характерной особенностью является крупная камера (*к*), расположенная на периферии тучной клетки под ПМ; полость камеры содержит остатки секреторного материала; в непосредственном контакте с камерой находятся как гранулы с измененным содержимым (звездочки), так и неизменные секреторные гранулы (*сг*). *в* — фрагмент цитоплазмы активированной тучной клетки, 24 ч после повреждения; в крупной цитоплазматической камере присутствуют остатки электронно-плотного компонента и гранулярного матрикса секреторной гранулы. *г* — фрагмент цитоплазмы активированной тучной клетки, 3-и сут после повреждения лимфатического сердца; в непосредственной близости к малоизмененным секреторным гранулам расположены небольшие пузырьки (тонкие стрелки), возможно содержащие материал гранул. *д* — локализация гистамин-иммунопозитивного материала в неизменной грануле (*сг*) тучной клетки, 5-е сут после повреждения. *е* — измененные секреторные гранулы, иммуномеченные с помощью антител против гистамина; частицы золота, идентифицирующие гистамин, в основном локализованы над электронно-плотным компонентом измененных гранул тучной клетки, 5-е сут после повреждения лимфатического сердца. Масштабные отрезки — 0.5 (*а, б*) и 0.2 (*в—е*) мкм.

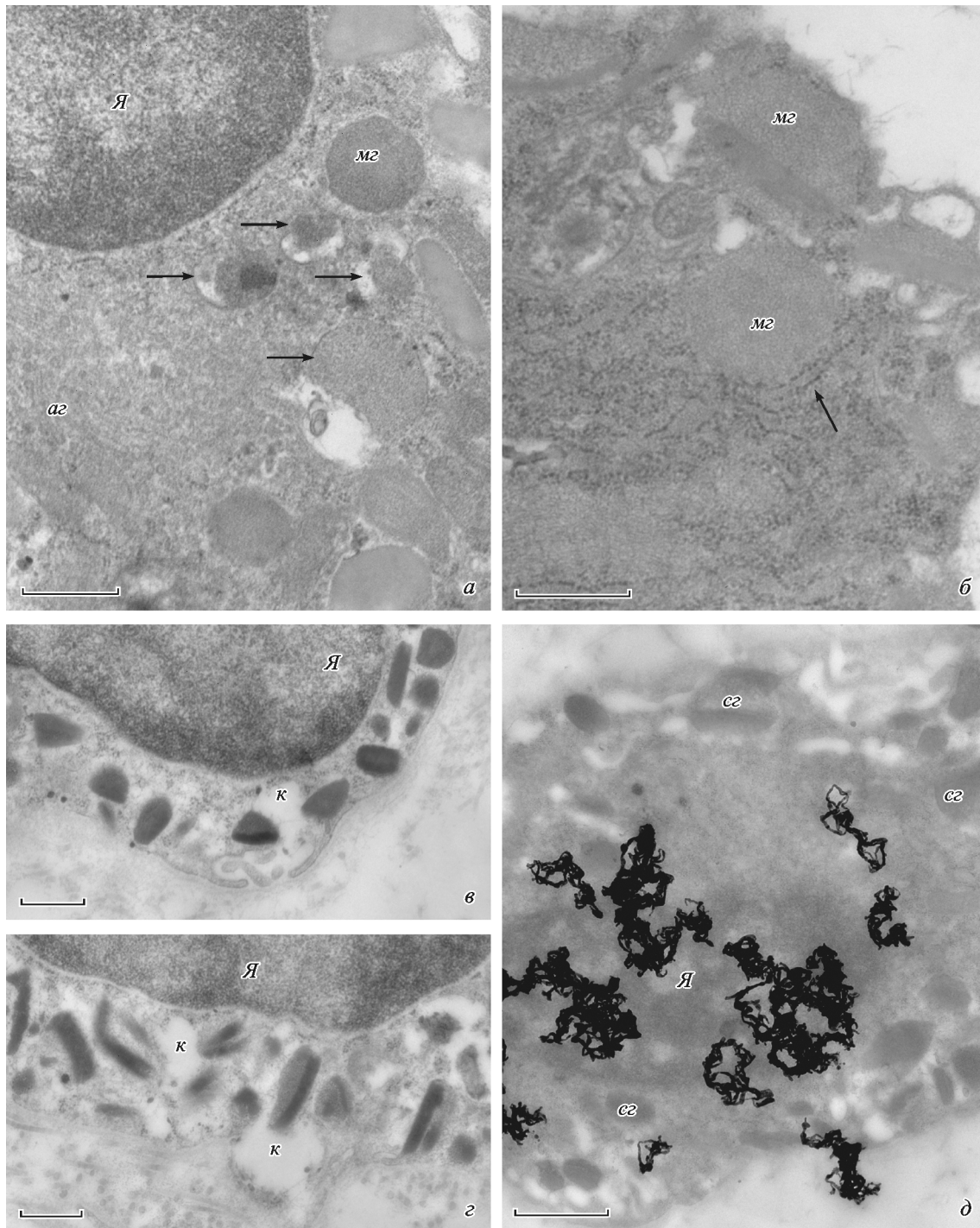


Рис. 3. Тучные клетки в поврежденном лимфатическом сердце.

а — формирование гранул в цитоплазме тучной клетки, 5-е сут после повреждения; *стрелки* указывают на вакуоли, содержащие материал будущих секреторных гранул; *аг* — аппарат Гольджи, *mg* — молодая секреторная гранула, *Я* — ядро тучной клетки. *б* — фрагмент тучной клетки, содержащей в цитоплазме молодые секреторные гранулы (*mg*), 7-е сут после операции; обращает внимание тесный контакт канальца ШЭР (*стрелка*) и молодой гранулы (*mg*) тучной клетки. *в* — ультратонкий срез тучной клетки поврежденного лимфатического сердца, 5-е сут после операции; хорошо видно, что пустая дегрануляционная камера (*к*), расположенная в цитоплазме тучной клетки, имеет открытый выход в поверхностную лауну; в непосредственной близости к камере находятся две неизмененные секреторные гранулы. *г* — фрагмент тучной клетки прираневоы зоны, 6-е сут после повреждения; расположенные в цитоплазме пустые дегрануляционные камеры окружены секреторными гранулами. *д* — ядро тучной клетки, меченное $^3\text{H-T}$, 7-е сут после повреждения лимфатического сердца, 4 ч после однократного введения изотопа; на периферии и около ядра (*Я*) тучной клетки хорошо видны неизмененные секреторные гранулы (*сг*). Масштабные отрезки — 0,5 (*а-г*) и 1 (*д*) мкм.

ладают хорошо выраженной БП. Центральное расположенное ядро обогащено гетерохроматином. Цитоплазма ТК заполнена гетерогенными и полиморфными секреторными гранулами с характерным для ТК лягушек интрагранулярным строением: электронно-плотный компонент нередко представлен паракристаллиновыми структурами, а электронно-светлый матрикс — тонкогранулярным или ячеистым материалом. Поверхность ТК образует своеобразные лакуны, в которых можно обнаружить цитоплазматические отростки, нередко закрывающие собой вход в лакуны. Характерно, что электронная плотность содержимого лакун отличается от электронной плотности межклеточного пространства, окружающего резидентные ТК (рис. 1, а). При открытом входе в лакуны их внутренняя поверхность выстлана материалом, покрывающим ТК со стороны экстрацеллюлярного пространства, а именно материалом БП. Клеточная поверхность ТК при этом приобретает неровные очертания.

У умеренно активированных циркулирующих в кровотоке ТК цитоплазма, как правило, заполнена гранулами с неизменным и измененным содержимым (рис. 1, б). При этом не обнаружено картин слияния цитоплазматических гранул, характерных для составного (compound) экзоцитоза.

Через 24 ч после операции для активированных травмой ТК приранево́й зоны характерны наличие в цитоплазме пустых дегрануляционных каналов, увеличение расстояния между оставшимися в цитоплазме секреторными гранулами и явное уменьшение их количества (рис. 1, в, г). Крайне редко наблюдается выход целой гранулы, лишенной мембраны, в пространство, ограниченное с одной стороны ПМ, а с другой — БП. При этом типе секреции гранулы с измененным содержимым, как правило, попадают в поверхностную лакуну, а не выходят непосредственно в межклеточное пространство (рис. 2, а).

В течение всей 1-й нед после операции тонкое строение секреторных гранул многих ТК приранево́й зоны, а иногда и зоны условного контроля свидетельствует о внутригранулярной активации. К морфологическим признакам этого состояния следует отнести уменьшение количества электронно-плотного компонента в гранулах, их набухание и разрыхление материала матрикса. Величина гранул при этом меняется незначительно (рис. 2, б, е). Определенно судить о способе секреции содержимого таких гранул сложно. Нередко гранулы с неизменной и измененной структурой окружают оставшиеся в цитоплазме ТК пустые открытые дегрануляционные каналы и камеры (рис. 2, б, в; 3, в, г). Иногда удается обнаружить остатки гранулы в таком сохранившемся в цитоплазме дегрануляционном канале (рис. 2, в).

В цитоплазме некоторых активированных ТК (чаще вокруг секреторных гранул) можно обнаружить наличие небольших округлых или овальных пузырьков (40—60 нм в диаметре), явно заполненных материалом (рис. 2, г).

Иммуноцитохимические данные с использованием антител к гистамину показали наличие частиц золота над неизменными гранулами (рис. 2, д) и над плотным компонентом, сохранившимся в измененных гранулах (рис. 2, е).

На 5—7-е сут после повреждения в приранево́й зоне лимфатического сердца можно обнаружить ТК, в цитоплазме которых идет активный процесс формирования новых гранул (рис. 3, а, б). Для одних ТК характерны ги-

перплазия элементов аппарата Гольджи, наличие в околоядерной зоне вакуолей, содержащих электронно-плотный материал програнул, а также присутствие в цитоплазме молодых округлых гранул, лишенных на данных этапах созревания паракристаллинового компонента. Немногочисленные более зрелые гранулы, как правило, оттеснены на периферию ТК (рис. 3, а).

Другие ТК, в цитоплазме которых происходит формирование новых гранул, по своей ультраструктуре напоминают мезенхимные клетки. Для них характерны высокая электронная плотность цитоплазмы, а также наличие в ней большого количества канальцев шероховатого эндоплазматического ретикулаума (ШЭР) и пучков промежуточных филаментов. Немногочисленные молодые округлые крупные гранулы расположены ближе к ПМ ТК. Некоторые гранулы помимо матрикса содержат элементы плотного компонента, представленного паракристаллиновыми структурами (рис. 3, б). Характерен тесный контакт канальцев ШЭР и молодых гранул ТК. Выявить элементы аппарата Гольджи в цитоплазме ТК данного типа не удалось.

Заметных изменений в ультраструктуре ядер активированных ТК не обнаружено. Они, как и ядра интактных ТК, обогащены гетерохроматином, имеют округлую или овальную форму. Наличие рибосом на наружной ядерной мембране характерно для ТК, в цитоплазме которых происходит формирование новых гранул. Отдельные ТК имеют характерные признаки некроза.

По данным электронно-микроскопической автордиографии (ЭМА), через 24 ч после повреждения меченных $^3\text{H-T}$ клеток крайне мало во всех зонах лимфатического сердца и топографически они, как правило, не связаны с мышечными волокнами. Заметное увеличение количества синтезирующих ДНК клеток можно наблюдать к концу 1-й нед после повреждения лимфатического сердца. При однократном введении $^3\text{H-T}$ и фиксации материала через 3—4 ч метятся, как правило, ядра эндотелиальных клеток внутренней выстилки лимфатического сердца и капилляров, ядра фибробластоподобных клеток, клеток blastного типа с множеством свободных рибосом в цитоплазме, которые, возможно, представляют собой миобласты, ядра клеток-сателлитов, а также ядра активированных травмой мышечных волокон приранево́й зоны.

Лишь одна тучная клетка, меченная $^3\text{H-T}$ (рис. 3, г), была выявлена в приранево́й зоне и только на 7-е сут после повреждения. Митотически делящихся ТК не обнаружено. Ядрышки и ядра ТК не включали метку $^3\text{H-U}$ ни через 30 мин, ни через 24 ч после введения изотопа на 5-е сут после повреждения.

Обсуждение

В настоящей работе обнаружены ультраструктурные признаки активации ТК приранево́й зоны механически поврежденной поперечно-полосатой мышцы лимфатического сердца лягушки. Как известно, активация ТК индуцирует выделение преформированных провоспалительных медиаторов, локализованных в специфических гранулах, а также синтез *de novo* и секрецию цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и других регуляторных молекул (Metcalf et al., 1997).

Секреция содержимого специфических гранул ТК происходит путем экзоцитоза. Под экзоцитозом понимается процесс слияния мембран гранул и клетки с формиро-

ванием поверхностных пор, через которые происходит выход содержимого гранул во внеклеточное пространство (Lagunoff, 1973; Burgoyne, Morgan, 2003).

Полученные нами данные позволяют предположить, что выраженная реакция ТК приранево́й зоны, приходится на более ранний (секунды, минуты, часы) послеоперационный период. Наличие в цитоплазме активированных ТК пустых дегрануляционных каналов через 24 ч после операции можно рассматривать в качестве признака прошедшего ранее составного (compound) экзоцитоза. Как известно, при данной форме секреции происходит слияние гранул друг с другом, а также с ПМ. Составной экзоцитоз бывает двух типов. При составном экзоцитозе мультивезикулярного типа цитоплазматические гранулы активированной тучной клетки сливаются друг с другом, формируя дегрануляционные каналы, которые затем сливаются с ПМ, образуя поверхностные поры. При составном экзоцитозе последовательного типа вначале с ПМ сливаются индивидуальные гранулы, что приводит к образованию поверхностных пор, а затем гранулы, расположенные в глубине цитоплазмы, последовательно сливаются с этими уже секреторирующими первичными гранулами. Процессы составного экзоцитоза обоих типов сопряжены с образованием открытых дегрануляционных каналов (Burgoyne, Morgan, 2003; Pickett, Edwardson, 2006). Завершенный экзоцитоз, как правило, приводит к удалению из цитоплазмы активированных ТК всех или части специфических гранул (содержимого гранул и их перигранулярных мембран), т. е. к полной или частичной дегрануляции (Dvorak, 1991; Pickett, Edwardson, 2006). Полученные нами данные свидетельствуют в пользу частичной дегрануляции и незавершенного составного экзоцитоза в активированных ТК.

На исследованных сроках после операции крайне редко можно наблюдать картины выделения во внеклеточное пространство индивидуальных, лишенных мембран гранул ТК. Завершенный экзоцитоз, как правило, приводит к удалению из цитоплазмы активированных ТК всех или части специфических гранул (содержимого гранул и их перигранулярных мембран), т. е. к полной или частичной дегрануляции (Dvorak, 1991; Pickett, Edwardson, 2006).

Как и авторы ранних ультраструктурных исследований процесса дегрануляции в ТК (Combs, 1966; Lagunoff, 1973), мы столкнулись с проблемой сохранности мембран, находящихся в динамичном состоянии в простимулированных ТК. Плохая различимость перигранулярных мембран может зависеть как от плоскости сечения, прошедшего через индивидуальные гранулы, так и от специфических особенностей взаимодействия использованного в работе фиксатора с активированными ТК. Второе предположение подтверждает факт нормальной визуализации мембран в клетках других типов, окружающих активированные ТК приранево́й зоны.

Ранее активация ТК у лягушки была выявлена на двух экспериментальных моделях. Одно экспериментальное исследование было связано с электрической стимуляцией подъязычного нерва (Monteforte et al., 2001), а другое — с повреждением периферического нервного волокна и происходящими в нем дегенеративно-регенераторными процессами (Esposito et al., 2002). В указанных исследованиях был обнаружен как выброс в экстрацеллюлярное пространство индивидуальных, лишенных мембран гранул, так и выделение (экструзия) содержимого гранул путем экзоцитоза. Интересные данные были

получены при стимуляции ТК языка жабы соединением 48/80 (Vugman, 1983). Согласно мнению автора цитируемой работы, он не обнаружил реальных картин ни выброса индивидуальных гранул в межклеточное пространство, ни экструзии материала гранул путем экзоцитоза. Однако представленный в работе ультраструктурный материал определенно свидетельствует в пользу секреции, идущей путем составного (compound) экзоцитоза. На этот тип секреции указывают характер изменения секреторных гранул (растворение внутригранулярного содержимого), появление в цитоплазме вакуолей, содержащих хлопьевидный материал измененных гранул, слияние этих вакуолей с образованием крупных полостей и, наконец, появление характерного хлопьевидного материала во внеклеточной среде вокруг активированных ТК (Vugman, 1983).

Таким образом, для активированных ТК лягушек и жаб характерна секреция, идущая путем составного (compound) экзоцитоза с формированием дегрануляционных каналов, путем выброса во внеклеточную среду индивидуальных гранул, лишенных мембран, а также путем экструзии во внеклеточное пространство измененного содержимого из индивидуальных гранул. Все три приведенных способа выделения секреторного материала из простимулированных ТК представляют варианты классического гранулярного экзоцитоза.

Отсутствие экстериоризации (выхода на поверхность клетки) слившихся перигранулярных мембран может служить причиной сохранения в цитоплазме активированных ТК лягушки пустых дегрануляционных каналов или камер. У млекопитающих в процессе полной дегрануляции с завершенным экзоцитозом (анафилактическая дегрануляция) пустые дегрануляционные каналы, как правило, в цитоплазме не сохраняются, так как их мембраны выходят на поверхность клетки, заметно увеличивая при этом ее площадь (Lagunoff, 1973), и в дальнейшем сбрасываются (Dvorak, 1991).

Изменения в ультраструктурной организации активированных ТК приранево́й зоны, обнаруженные в течение 1-й нед после операции, свидетельствуют в пользу длительного сохранения в их цитоплазме пустых дегрануляционных каналов и камер. Со временем в результате своей перестройки дегрануляционные каналы и камеры могут создать разветвленную сеть взаимосвязанных небольших канальцев и вакуолей, проникающих в более глубокие слои цитоплазмы ТК. Эти канальцы и вакуоли, не потеряв сообщения с клеточной поверхностью, по существу являются ее инвагинациями. Так, по-видимому, формируется своеобразный «эффективный экстрацеллюлярный компартмент в пределах клеточного домена» (Lagunoff, 1972). При этом следует помнить, что у лягушки в отличие от грызунов и человека (Röhlich et al., 1971; Lagunoff, 1972; Dvorak, 1991) полость этих вакуолей и каналов сообщается напрямую не с межклеточным пространством, а со средой, заключенной в пространстве, ограниченном ПМ и БП резидентной зрелой тучной клетки.

Нередко в цитоплазме активированных ТК гранулы с неизменным и измененным содержимым тесно контактируют с такими небольшими округлыми вакуолями или удлиненными канальцами. Можно предположить, что гранулы путем экзоцитоза типа «kiss-and-run», характерного для синаптических пузырьков у млекопитающих (Henkel et al., 2001; Burgoyne, Morgan, 2003), выделяют в полость дегрануляционных вакуолей небольшие порции своего содержимого (незавершенный экзоцитоз). Это

предположение следует рассматривать как одно из возможных объяснений наличия в глубоких слоях цитоплазмы активированных ТК гранул с измененной ультраструктурой, свидетельствующей об их секреторной активности.

Показано, что на некоторые стимулы активированные ТК млекопитающих отвечают секрецией, которая происходит в отсутствие дегрануляции. При этом отпочковывающиеся от секреторных гранул везикулы переносят небольшие порции медиаторов к ПМ ТК (Dvorak, Kisel, 1991; Crivellato et al., 2003). В ряде случаев путем везикулярного транспорта происходит селективное выделение ключевых медиаторов ТК (Theoharides et al., 2007). Так, например, серотонин может выделяться из ТК без гистамина (Kraeuter Kops et al., 1990). Селективная секреция медиаторов характерна для ТК, участвующих в разнообразных воспалительных заболеваниях (Theoharides et al., 2012).

Установить, характерна ли селективная секреция для активированных ТК лягушки, нам пока не удалось, так как морфологических картин, убедительно свидетельствующих о присутствии везикулярного транспорта в цитоплазме ТК, не обнаружено. Имеют ли выявленные в настоящей работе небольшие округлые и овальные пузырьки, присутствующие в цитоплазме некоторых активированных ТК и, возможно, содержащие материал секреторных гранул, какое-либо отношение к дифференциальной секреции медиаторов, покажут будущие исследования.

ТК являются одним из основных продуцентов гистамина у млекопитающих. Проведенные в разное время исследования с использованием автордиографических (Anderson, Uvnäs, 1975), а также иммуноцитохимических подходов (Login et al., 1992) обнаружили локализацию гистамина в секреторных гранулах ТК. Полагают, что запасы тканевого гистамина в гранулах ТК находятся в гистамин-гепариновых комплексах (Rabenstein et al., 1998). На электронно-микроскопическом уровне показано, что под воздействием разнообразных стимулов (соединения 48/80, фактора роста стволовых клеток, антииммуноглобулина Е, повышенной экспрессии интерлейкина 4) активированные ТК выделяют гистамин как путем классического гранулярного экзоцитоза (Dvorak et al., 1996, 1997), так и путем везикулярного транспорта (Dvorak et al., 1994).

В течение длительного времени считали, что в гранулах ТК амфибий гистамин отсутствует (Chiu, Lagunoff, 1971). Позднее с помощью метода ультраструктурной иммуноцитохимии была установлена локализация гистамина и в гранулах ТК лягушки. Флуориметрический метод позволил оценить содержание гистамина в тучной клетке лягушки (~ 0.1 пг на 1 клетку), которое оказалось в 30 раз меньше, чем в изолированной тучной клетке сердца человека (~ 3 пг на 1 клетку) (Patella et al., 1995; Chieffi Vaccari et al., 1998). Однако позднее была опубликована работа, в которой факт наличия гистамина в ТК амфибий опять подвергся сомнению (Mullero et al., 2007).

В настоящей работе на ультраструктурном уровне мы определяли иммунолокализацию гистамина в активированных ТК, простимулированных травмированием лимфатического сердца. Частицы золота были обнаружены над неизменными гранулами, а также над остатками электронно-плотного компонента, сохранившегося в некоторых измененных гранулах. Гистамина в разрыхленном материале матрикса измененных гранул, по-видимому, уже нет, так как частицы золота в нем встречались

крайне редко. Окрашивания не наблюдали при исключении обработки срезов первыми антителами (отрицательный контроль).

Известно, что при повреждении любой васкуляризованной ткани происходит дегрануляция ТК с выбросом преформированных провоспалительных медиаторов, одним из которых является гистамин. К основным эффектам гистамина относят расширение просвета капилляров, повышение проницаемости микрососудов с выходом плазмы и клеток крови из кровеносного русла в межклеточное пространство. В результате возникает как внеклеточный отек, так, возможно, и набухание клеток, расположенных в зоне, прилегающей к месту повреждения. Полученная в настоящем исследовании ультраструктурная характеристика приранево́й зоны поврежденной мышечной ткани лимфатического сердца свидетельствует о начале асептического воспалительного процесса, в инициации которого гистамину, видимо, принадлежит ключевая роль. Согласно существующим представлениям, выделение гистамина из гранул активированных ТК происходит как ионообменный процесс (Anderson, Uvnäs, 1975; Rabenstein et al., 1998).

Ранее было показано, что плотность ТК в мышечной ткани лимфатического сердца лягушки составляет около 40 клеток на 1 мм² (Крылова, 2009). В настоящей работе мы не выявили заметной аккумуляции ТК в приранево́й зоне. Отсутствие активной пролиферации ТК, а также наличие редких картин гибели ТК путем некроза, скорее свидетельствуют в пользу уменьшения их количества.

Предполагаемое участие активированных ТК в процессе регенерации поперечно-полосатой мышечной ткани поврежденного лимфатического сердца лягушки естественно связать с секрецией в окружающую среду ряда важнейших медиаторов, накопленных в специфических цитоплазматических гранулах. К сожалению, данные о природе преформированных медиаторов ТК лягушки крайне скудны (Chiu, Lagunoff, 1971; Крылова, 2003, 2006, 2010; Vaccari et al., 2011).

Возможно, роль гистамина в поврежденной мышечной ткани лимфатического сердца не ограничивается участием его в инициации воспалительного процесса. Данные о митогенных свойствах гистамина, секретируемого ТК, были получены при исследовании пролиферативной активности как нормальных (Norrbj, 1985), так и опухолевых (Dyduch et al., 2012; Pagotto et al., 2012) клеток млекопитающих. Кислые гидролазы, присутствующие в гранулах ТК лягушки (Chiu, Lagunoff, 1971), оказавшись после дегрануляции ТК в экстрацеллюлярном пространстве, могут принять участие в процессе деградации клеточного дегри́са поврежденной мышечной ткани лимфатического сердца. Проявление противовоспалительных свойств гепарина (Young, 2008) и предсердного натрийуретического гормона (ANP) (Kiemer, Vollmar, 2001), скорее всего, следует ожидать во второй, более поздней, фазе воспаления (к концу 1-й и в течение 2—3-й нед после операции). По времени эта фаза совпадает с началом регенераторных процессов в мышечной ткани поврежденного лимфатического сердца (Rumyantsev, Krylova, 1990; Krylova, Bogolyubov, 2015).

Известно, что выделяемая в результате дегрануляции ТК млекопитающих триптаза (трипсиноподобная сериновая протеаза) индуцирует пролиферацию фибробластов в условиях *in vitro* (Ruoss et al., 1991). Предполагается, что в условиях *in vivo* может существовать молекулярная связь между активацией ТК и развитием фиброза. Является ли

триптаза ТК митогеном для миобластов скелетных мышц? Показано, что в условиях *in vitro* триптаза ТК может непосредственно стимулировать пролиферацию одноклеточных миогенных клеток, в то время как в условиях *in vivo* влияние ТК на пролиферацию миобластов регенерирующей скелетной мышцы крысы связано с их влиянием на процесс рекрутирования макрофагов в зону повреждения (Duchesne et al., 2013).

Следует отметить, что сериновых протеаз (химазы и триптазы), характерных для ТК грызунов и человека, в гранулах ТК лягушки еще не обнаружены (Chiu, Lagunoff, 1971; Esposito et al., 2002). Однако проведенный скрининг генома лягушки (Reimer et al., 2010) свидетельствует об идентификации трипсиноподобной протеазы.

Можно надеяться, что расширение списка преформированных медиаторов, присутствующих в гранулах ТК лягушки, и выявление синтезируемых *de novo* биологически активных молекул в простимулированных ТК позволят полнее понять роль этих многофункциональных клеток не только при регенерации поперечно-полосатых мышц, но и в других жизненно важных процессах, протекающих в организме амфибий.

Автор приносит искреннюю благодарность О. И. Емельяновой за техническую помощь при подготовке рукописи к печати.

Список литературы

- Ерохина И. Л., Оковитый С. В., Куликов А. Н., Казаченко А. А., Мартынова М. Г., Моисеева О. М., Шуленин С. Н., Емельянова О. И. 2008. Плотность тучных клеток в миокарде и перикарде крыс при сердечной недостаточности, индуцированной изопроterenолом. Цитология. 50 (2): 113—117. (Erokhina I. L., Okovityy S. V., Kulikov A. N., Kazachenko A. A., Martynova M. G., Moiseeva O. M., Shulenin S. N., Emelyanova O. I. 2008. The density of myocardial and pericardial rat mast cells in isoproterenol-induced heart failure. Cell Tissue Biol. 2 (1): 13—17.)
- Крылова М. И. 2003. Иммуноцитохимическая локализация ANP в гранулах тучных клеток лимфатического сердца взрослой травяной лягушки. Цитология. 45 (9): 891. (Krylova M. I. 2003. Immunocytochemical localization of ANP in mast cell granules of adult brown frog. Tsitologiya. 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. (Krylova M. I. 2006. Immunocytochemical localization of atrial natriuretic peptide in mast cells of adult brown frog *Rana temporaria*. Dokl. 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. 2010. Resident and circulating mast cells in propulsive organs of the frog *Rana temporaria*. Cell Tissue 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 frogs *Rana temporaria*. Tsitologiya. 52 (9): 749—759.)
- Anderson P., Uvnäs B. 1975. Selective localization of histamine to electron dense granules in antigen-challenged sensitized rat mast cells and to similar granules isolated from sonicated mast cells. An electron microscope autoradiographic study. Acta Physiol. Scand. 94: 63—73.
- 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.
- Burgoyne R. D., Morgan A. 2003. Secretory granule exocytosis. Physiol. Rev. 83: 581—632.
- 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.
- Chiu H., Lagunoff D. 1971. Histochemical comparison of frog and rat mast cells. J. Histochem. Cytochem. 19: 369—375.
- Combs J. W. 1966. Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. J. Cell Biol. 31: 563—575.
- Côté C. H., Tremblay M. H., Duchesne E., Lapoite B. M. 2008. Inflammation-induced leukocyte accumulation in injured skeletal muscle: role of mast cells. Muscle Nerve. 37: 754—763.
- Crivellato E., Nico B., Mallardi F., Beltrami C. A., Ribatti D. 2003. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. 274: 778—784.
- Duchesne E., Bouchard P., Roussel M. P., Côté C. H. 2013. Mast cells can regulate skeletal muscle cell proliferation by multiple mechanisms. Muscle Nerve. 48: 403—414.
- Duchesne E., Tremblay M. H., Côté C. 2011. Mast cell tryptase stimulates myoblast proliferation; a mechanism relying on protease-activated receptor-2 and cyclooxygenase-2. BMC Musculoskelet Disord. 12: 235.
- Dvorak A. M. 1991. Blood cell biochemistry. Basophil and mast cell degranulation and recovery. New York: Plenum. 4: 415 p.
- Dvorak A. M., Costa J. J., Morgan E. S., Monahan-Earley R. A., Galli S. J. 1997. Diamine oxidase-gold ultrastructural localization of histamine in human skin biopsies containing mast cells stimulated to degranulate *in vivo* by exposure to recombinant human stem cell factor. Blood. 90: 2893—2900.
- Dvorak A. M., Kissell S. 1991. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing *in situ*. J. Leukoc. Biol. 49: 197—210.
- Dvorak A. M., Morgan E. S., Schleimer R. P., Lichtenstein L. M. 1996. Diamine oxidase-gold ultrastructural localization of histamine in isolated human lung mast cells stimulated to undergo anaphylactic degranulation and recovery *in vitro*. J. Leukoc. Biol. 59: 824—834.
- Dvorak A. M., Tepper R. I., Weller P. F., Morgan E. S., Estrella P., Monahan-Earley R. A., Galli S. J. 1994. Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release *in vivo* by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. Blood. 83: 3600—3612.
- Dyduch G., Kaczmarczyk K., Okon K. 2012. Mast cells and cancer: enemies or allies? Pol. J. Pathol. 63: 1—7.
- Egozi E. I., Ferreira A. M., Burns A. L., Gamelli R. L., Dipietro L. A. 2003. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. Wound Repair Regen. 11: 46—54.
- 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. 2000. Mast cells and basophils. Curr. Opin. Hematol. 7: 32—39.
- Galli S. J., Tsai M. 2008. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. J. Dermatol. Sci. 49: 7—19.
- Galli S., Tsai M., Piliponsky A. M. 2008. The development of allergic inflammation. Nature. 454: 445—454.
- Gottwald T., Coerper S., Schöffner M., Köveker G., Stead R. H. 1998. The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. Wound Repair Regen. 6: 8—20.
- Henkel A. W., Kang G., Kornhuber J. 2001. A common molecular machinery for exocytosis and the «kiss-and-run» mechanism in chromaffin cells is controlled by phosphorylation. J. Cell Sci. 114: 4613—4620.

- Kiemer A. K., Vollmar A. M. 2001. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* 60 : 68—70.
- Kraeuter Kops S., Theoharides T. C., Cronin C. T., Kashgarian M. G., Askenase P. W. 1990. Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. *Cell Tissue Res.* 262 : 415—424.
- Krylova M. I., Bogolyubov D. S. 2015. An early post-traumatic reaction of lymph-heart striated muscle fibers in adult frog *Rana temporaria* during the first postoperative week: an electron microscopic and autoradiographic study. *J. Morphol.* 276 : 1525—1534.
- Lagunoff D. 1972. Vital staining of mast cells with ruthenium red. *J. Histochem. Cytochem.* 20 : 938—944.
- Lagunoff D. 1973. Membrane fusion during mast cell secretion. *J. Cell Biol.* 57 : 252—259.
- Larra F., Droz B. 1970. Techniques radioautographiques et leur application a l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. *J. Microsc.* 9 : 845—880.
- Lefaucher J. P., Gjata B., Sebille A. 1996. Factors inducing mast cell accumulation in skeletal muscle. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22 : 248—255.
- Login G. R., Galli S. J., Dvorak A. M. 1992. Immunocytochemical localization of histamine in secretory granules of rat peritoneal mast cells with conventional or rapid microwave fixation and an ultrastructural post-embedding immunogold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 40 : 1247—1256.
- Majeed S. K. 1994. Mast cell distribution in rats. *Arzneimittelforschung.* 44 : 370—374.
- Metcalfe D. D., Baram D., Mekori Y. A. 1997. Mast cell. *Physiol. Rev.* 77 : 1033—1079.
- 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.
- Mulero I., Sepulcre M. P., Meseguer J., Garcia-Ayala A., Mulero V. 2007. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 19 434—19 439.
- Nahirney P. C., Dow P. R., Ovalle W. K. 1997. Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice. *Anat. Rec.* 247 : 341—349.
- Noli C., Miolo A. 2001. The mast cell in wound healing. *Vet. Dermatol.* 12 : 303—313.
- Norrby K. 1985. Evidence of mast-cell histamine being mitogenic in intact tissue. *Agents Actions.* 16 : 287—290.
- Pagotto R. M., Monzyn C., Moreno M. B., Pignataro O. P., Mondillo C. 2012. Proliferative effect of histamine on MA-10 Leydig tumor cells mediated through HRH2 activation, transient elevation in cAMP production, and increased extracellular signal — regulated kinase phosphorylation levels. *Biol. Reprod.* 87 : 150 : 1—10.
- Patella V., Marino I., Lamparter B., Arbustini E., Adt M., Marone G. 1995. Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J. Immunol.* 154 : 2855—2865.
- Pickett J. A., Edwardson J. M. 2006. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic.* 7 : 109—116.
- Rabenstein D. L., Bratt P., Peng J. 1998. Quantitative characterization of the binding of histamine by heparin. *Biochemistry.* 37 : 14 121—14 127.
- Radley H., Grounds M. D. 2006. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduced necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol. Dis.* 23 : 387—397.
- Reich J. D., Cazzaniga A. L., Metz P. M., Kerdel F. A., Eaglstein W. H. 1991. The effect of electrical stimulation on the number of mast cells in healing wounds. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 25 : 40—46.
- Reimer J. M., Samollow P. B., Hellman L. 2010. High degree of conservation of the multigene tryptase locus over the past 150—200 million years of mammalian evolution. *Immunogenetics.* 62 : 369—382.
- Röhlich P., Anderson P., Uvnäs B. 1971. Electron microscope observations on compounds 48-80-induced degranulation in rat mast cells. Evidence for sequential exocytosis of storage granules. *J. Cell Biol.* 51 : 465—483.
- Rumyantsev P. P., Krylova M. I. 1990. Ultrastructure of myofibers and cells synthesizing DNA in the developing and regenerating lymph-heart muscles. *Int. Rev. Cytol.* 120 : 1—52.
- Ruoss S. J., Hartmann T., Caughey G. H. 1991. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 88 : 493—499.
- Theoharides T. C., Kempuraj D., Tagen M., Conti P., Kalogeromitros D. 2007. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol. Rev.* 217 : 65—78.
- 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. *Biochim. biophys. acta.* 1822 : 21—33.
- Vugman I. 1983. Ultrastructure of toad (*Bufo paracnemius*) mast cells. Their alteration by compound 48/80. *Anat. Anz.* 154 : 425—432.
- Wulff B. C., Wilgus T. A. 2013. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp. Dermatol.* 22 : 507—510.
- Young E. 2008. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb. Res.* 122 : 743—752.
- Zweifel M., Hirsiger H., Matozan K., Welle M., Schaffner T., Mohacsai P. 2002. Mast cells in ongoing acute rejection: increase in number and expression of a different phenotype in rat heart transplants. *Transplantation.* 73 : 1707—1716.

Поступила 21 III 2016

MAST CELLS IN DAMAGED LYMPH-HEART STRIATED MUSCLE OF ADULT FROG:
AN ULTRASTRUCTURAL, IMMUNOCYTOCHEMICAL
AND AUTORADIOGRAPHIC STUDY

M. I. Krylova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;
e-mail: heartdev@mail.cytspb.rsii.ru

Ultrastructural features of mast cell activation were studied in degenerative/reparative experimental model of mechanically damaged lymph-heart striated muscle during the first postoperative week. 24 h after damage, the intracytoplasmic empty degranulation channels were revealed in a certain part of resident and circulating mast cells (MCs) located near the site of injury. These findings are evidence that previously there was activation and secretory response of MCs by a process known as compound exocytosis which involves not only granule-to-plasma membrane fusions and formation of degranulation channels. We have found rare MCs showing re-

lease of single, altered, membrane-free granules into the space restricted by the plasma membrane of mature resident MCs and the basal lamina surrounding them. During the first postoperative week we have more commonly observed activated lymph-heart MCs with prominent intragranular changes characterized by diminishing of electron-dense component of granules and loss of granule matrix. We have also revealed close association of some unaltered and altered secretory granules with completely or partially empty degranulation channels that permeate the mast cell cytoplasm. Some of these channels remained open directly to the exterior of the cells. It is not improbable that these findings provide the ultrastructural basis for potential discharge of small amounts of granule mediators into the open channels (incomplete exocytosis) during partial degranulation of activated *in vivo* frog MCs. Immunocytochemical staining for histamine of activated frog MCs showed the presence of the immunoreactive material both in unaltered and altered cytoplasmic granules. As a rule, gold particles were located over residual electron-dense component of altered granule, whereas little or no gold particles were revealed over the swollen matrix. Ultrastructural features of secretory granule formation in the cytoplasm of some MCs were observed toward the end of the first postoperative week. Electron-microscopic autoradiography has shown that replicative and transcriptional activity of MCs is not observed in the studied postoperative period. No mitoses in MCs have been revealed in this period. A few mast cells were found in necrosis. Taken together, our results indicate that MCs are one of the first cell types that respond to injury of lymph-heart striated muscle and release a variety of preformed mediators, including histamine. These findings suggest that activated MCs play an important role in the initiation of an inflammatory process during repair of damaged lymph-heart striated muscle.

Key words: damaged lymph-heart striated muscle, mast cell secretory granules, partial degranulation, histamine immunolocalization, ^3H -thymidine and ^3H -uridine synthesis, frog.
