

СИСТЕМНЫЙ МАСТОЦИТОЗ: ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕАЗНОГО ПРОФИЛЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

**Атякшин Д.А.¹, Приходько А.Т.¹, Костин А.А.¹, Алехнович А.В.^{1,2},
Бухвалов И.Б.^{1,3}, Тиманн М.³**

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ, Москва, Россия

³ Институт Гематопатологии, Гамбург, Германия

Аннотация

Тучные клетки (ТК) – клетки миелоидного ряда, участвующие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета. ТК секретируют широкий спектр медиаторов, в том числе протеазы, профиль которых во многом определяет биологические функции органоспецифичной популяции ТК. Классификация ТК человека по профилю специфических протеаз определяет триптаза-позитивные ТК, химаза-позитивные ТК и ТК, экспрессирующие обе протеазы. Триптаза и химаза наиболее значимы с точки зрения влияния их регуляторных функций на формирование фенотипа тканевого микроокружения. Увеличение количества ТК в красном костном мозге, органе происхождения клеток миелоидного ряда, является одним из объективных и общепринятых признаков мастоцитоза, однако детальной оценки биогенеза протеаз и механизмов их секреции в микроокружении костного мозга до сих пор не проводилось. В данной работе представлен анализ экспрессии протеаз ТК у пациентов с различными формами системного мастоцитоза. Образцы биопсии костного мозга были получены из заднего гребня подвздошной кости, прошли необходимую пробоподготовку для реализации протоколов светлопольного моноплексного и флуоресцентного мультиплексного иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания. Кроме того, был проведен сравнительный анализ с контрольными образцами костного мозга человека для подтверждения корректной визуализации ИГХ окрашивания. Системный мастоцитоз, в зависимости от течения, характеризуется образованием определенных профилей специфических протеаз в различных формах атипичных тучных клеток. В результате гистологического исследования микропрепаратов с высоким разрешением были получены данные о локализации внутриклеточных протеаз (триптазы, химазы и карбоксипептидаз A1, A2 и B) в следующих типах ТК: бластоподобных ТК, атипичных ТК первого и второго типа, а также типичных (зрелых) ТК. Охарактеризовано внутригранулярное накопление триптазы, химазы и карбоксипептидаз при гипохромном фенотипе атипичных тучных клеток. На основании результатов проведенного анализа данных был сделан вывод о взаимосвязи протеазного профиля популяции тучных клеток костного мозга с развитием заболевания и тяжестью его течения. Детальная характеристика экспрессии протеаз ТК при мастоцитозе может быть использована для более подробной классификации ТК, уточнения прогноза и повышения эффективности таргетной терапии при необходимости.

Ключевые слова:

тучные клетки, костный мозг, системный мастоцитоз, протеазы тучных клеток, триптаза, химаза, карбоксипептидазы.

MODERN VIEWS ON DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF RECTAL WOUNDS (LITERATURE REVIEW)

**Atiakshin D.A.¹, Prikhodko A.T.¹, Kostin A.A.¹, Alekhnovich A.V.^{1,2},
Buchwalow I.B.^{1,3}, Tiemann M.³**

¹ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia

² The Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia

³ Institute of Hematopathology, Hamburg, Germany

Abstract

Mast cells (MCs) are myeloid cells involved in the reactions of innate and adaptive immunity. MCs secrete a wide range of mediators, including proteases, which profile largely determines the biological functions of the MCs' population specific for a particular organ. Classification of human MCs according to the profile of specific proteases defines tryptase-positive MCs, chymase-positive MCs, and MCs expressing both proteases. Thus, tryptase and chymase are the most significant in terms of the influence of their regulatory functions on the formation of tissue microenvironment phenotype. An increased number of MCs in red bone marrow, the myeloid cells' organ of origin, is one of the objective and generally accepted signs of mastocytosis; however, a detailed evaluation of protease biogenesis and mechanisms of their excretion in the bone marrow tissue has

not yet been performed. This paper presents an analysis of MCs' protease expression in patients with different forms of systemic mastocytosis. Trephine core bone marrow biopsy samples were obtained from the posterior crest of the iliac bone, underwent the necessary sample preparation to implement the protocols of bright-field monoplex and fluorescent multiplex immunohistochemical (IHC) staining. In addition, comparative analysis was performed with control human bone marrow samples to confirm correct visualization of IHC staining. Systemic mastocytosis, depending on its course, is characterized by the formation of certain profiles of specific proteases in different forms of atypical mast cells. High-resolution optical examination of samples provided data on the co-localization of intracellular proteases (tryptase, chymase, and carboxypeptidases A1, A2, and B) in the following types of MCs: metachromatic granular blast-like MCs, atypical MCs of the first and second types, and typical (mature) MCs. The intragranular accumulation of tryptase, chymase, and carboxypeptidases in hypochromic phenotype of atypical mast cells was characterized. Based on the results of the data analysis, it was concluded that the protease profile is likely to be associated with disease progression and severity of its course. Detailed characterization of MCs protease expression in mastocytosis is necessary for detailed MCs' classification, prognosis clarification, and effectiveness improvement of targeted therapy.

Keywords:

mast cells, bone marrow, systemic mastocytosis, mast cells' proteases, tryptase, chymase, carboxypeptidases

Введение

Мастоцитоз - разновидность заболевания ТК, вызванная накоплением функционально неполноценных ТК и предшественников ТК в костном мозге и коже с дальнейшей инвазией в ткани других органов. Когда ТК подвергаются дегрануляции, высвобождающиеся активные вещества могут вызывать ряд симптомов, варьирующиеся по интенсивности от легких до тяжелых. Гистохимические особенности продуктов биосинтеза ТК позволили Паулю Эрлиху определить ТК на микропрепаратах более 130 лет назад [19, 20]. Арсенал синтезируемых продуктов в ТК очень разнообразен и включает в себя гликозаминогликаны, специфические и неспецифические протеазы, лизосомальные ферменты, биогенные амины, митогены, факторы роста, цитокины, хемокины и т.д. [21, 28, 47]. Особенностью биологии ТК является высокое присутствие протеаз по сравнению с другими иммунокомпетентными клетками [1, 41].

В зависимости от профиля экспрессии специфических протеаз ТК человека делятся на триптаза-положительные, химаза-положительные и ТК, экспрессирующие обе протеазы [31, 32, 47]. Специфические протеазы составляют до 25 % белков секрета и формируют характерный фенотип ТК в зависимости от их организации и накопления в цитоплазме. Оказывая биологическое воздействие на структуры соединительной ткани [8], триптаза и химаза являются наиболее значимыми протеазами ТК, которые входят в число ключевых факторов, влияющих на формирование фенотипа тканевого микроокружения [18, 23, 29]. Это позволяет рассматривать специфические протеазы ТК как актуальные объекты исследования в морфологической практике, не только в качестве диагностических маркеров, но

и как перспективную фармакологическую мишень для терапии [2, 17, 37, 46]. Биологические эффекты триптазы и химазы зависят от механизма секреции и оказывают избирательное действие на специфические молекулярные мишени микроокружения, модулируя аллергические и воспалительные реакции, ангиогенез, онкогенез, вызывая ремоделирование внеклеточного матрикса соединительной ткани [5, 7, 8].

Благодаря открытию гена карбоксипептидазы гемопоэтических клеток, было показано, что карбоксипептидаза А3 является важным маркером секреторных гранул, дифференцировки и фенотипа ТК [4, 22, 33, 35, 39]. В то же время выявление неспецифических карбоксипептидаз А1, А2 и В проводилось в основном для изучения функции поджелудочной железы, поэтому особенности их распределения в ТК остаются неизученными [36, 40].

Цитоморфологическое исследование костного мозга является важным диагностическим подходом и неотъемлемой частью определения стадии при мастоцитозе. Особенности ТК с точки зрения их морфологии в мазках красного костного мозга при системном мастоцитозе весьма показательны для выявления заболевания, имеют прогностическое значение и являются важными критериями для классификации заболевания, не уступая по эффективности молекулярно-генетическим исследованиям, в частности мутации KITD816V [26, 27, 30, 38, 43, 44].

Изучение ТК посредством ИГХ значительно расширило информационное наполнение проводимых исследований по определению их функционального состояния [25, 26, 42, 44]. ИГХ анализ экспрессии триптазы, химазы и карбоксипептидазы позволяет лучше понять развитие мастоци-

тоза и может быть использован как для диагностики данного заболевания, так и в качестве перспективной фармакологической мишени. Целью настоящего исследования является характеристика протеазного профиля ТК красного костного мозга при мастоцитозе.

Материалы и Методы

Информация о пациентах

В исследование было включено 8 пациентов с мастоцитозом. Четыре пациента были с диагнозом индолентного системного мастоцитоза, два пациента - с тлеющим системным мастоцитозом и два пациента - с агрессивным системным мастоцитозом. От всех пациентов было получено информированное согласие. Образцы были получены из архива Института гематопатологии Гамбурга и Института патологии Университета Людвига Максимилиана, Мюнхен, Германия, представляли собой избыточный клинический биоматериал, который был деидентифицирован и не связан с информацией о пациенте. Гистологические диагнозы устанавливались в соответствии с классификацией ВОЗ [3, 24, 45]. Данное исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека» и одобрено Советом по институциональному надзору Института гематопатологии, Гамбург, Германия.

Окрашивание образцов костного мозга

Образцы трепанобиопсии костного мозга были получены из задней части подвздошной кости. Обработанные стандартным способом трепанобиоптаты костного мозга подвергались мягкой декальцинации в 0,07% этилендиаминтетрауксусной кислоте (ЭДТА) не менее 8 ч и заливались

в парафин. Депарафинизированные и регидратированные срезы (толщиной 2 мкм) подвергали демаскировке антигена путем нагревания в водяной бане с цитратным буфером натрия, pH 6,0, при 95 °C в течение 30 мин. Ранее нами сообщалось, что эндогенные Fc-рецепторы в рутинно фиксированных клетках и образцах ткани не сохраняют способность связываться с Fc-фрагментами антител [16], поэтому блокирование эндогенных Fc-рецепторов перед инкубацией с первичными антителами не проводилось. После извлечения антигена срезы подвергались реакции с первичными антителами к триптазе, химазе и карбоксипептидазам (таблица 1).

Иммуногистохимическое окрашивание проводили в соответствии со стандартными протоколами, описанными ранее [13-15]. Для светлой микроскопии связанные первичные антитела выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) AmpliStain™ (SDT GmbH, Baesweiler, Германия) в соответствии с инструкциями производителей [12]. Для визуализации HRP-метки использовали набор субстратов 3,3'-диаминобензидина (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Ядра окрашивали гематоксилином. Для флуоресцентной детекции связанные первичные антитела визуализировали с помощью вторичных антител (приобретенных у AbCam, Великобритания), конъюгированных с Cy3 или Alexa Fluor-488. Ядра окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 5 мкг/мл в PBS) в течение 15 с, после чего срезы заключали с помощью VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, США). Список вторичных антител и других реагентов, использованных в данном исследовании, представлен в Таблице 2.

Таблица 1

Первичные антитела, использовавшиеся в данной работе

Антитела	Характеристика	Артикул	Разведение	Производитель
Триптаза	Мышиные, моноклональные	#ab2378	1:3000	AbCam, Великобритания
Триптаза	Кроличьи, моноклональные	#ab151757	1:2000	AbCam, Великобритания
Химаза	Мышиные, моноклональные	#ab2377	1:2000	AbCam, Великобритания
Карбоксипептидазы A1, A2 и B	Кроличьи, моноклональные	#ab181,146	1:500	AbCam, Великобритания

Таблица 2

Вторичные антитела и другие реагенты

Антитела и реагенты	Производитель	Разведение	Метка
Goat anti-mouse IgG Ab (#ab97035)	AbCam, Великобритания	1/500	Cy3
Goat anti-rabbit IgG Ab (#ab150077)	AbCam, Великобритания	1/500	Alexa Fluor 488
AmpliStain™ anti-Mouse 1-Step HRP (#AS-M1-HRP)	SDT GmbH, Германия	Ready-to-use	HRP
AmpliStain™ anti-Rabbit 1-Step HRP (#AS-R1-HRP)	SDT GmbH, Германия	Ready-to-use	HRP
4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, #D9542-5MG)	Sigma, Германия	5 µg/ml	-
VECTASHIELD® среда для заключения (#H-1000)	Vector Laboratories, США	Ready-to-use	-
DAB Набор субстратов пероксидазы (#SK-4100)	Vector Laboratories, США	Ready-to-use	DAB
Гематоксилин Майера (#MHS128)	Sigma-Aldrich	Ready-to-use	-

Получение изображений

Участки гистологических образцов с позитивным окрашиванием наблюдали на моторизованном исследовательском микроскопе ZEISS Axio Imager.Z2, оснащённом объективом Zeiss alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 Oil DIC (UV) VIS-IR и камерами цифрового микроскопа AxioCam (цветная AxioCam 712 и монохромная AxioCam 712 CCD). Полученные изображения обрабатывали с помощью программы ZEN 3.0 (Carl Zeiss Vision, Германия) и представляли вместе с окончательной редакцией рукописи в разрешении 300 DPI (рисунки 1, 2, 3, 4, 5).

Контрольные образцы

Контрольными инкубациями были: исключение первичных антител из протокола или замена первичных антител на те же виды IgG (Dianova, Гамбург, Германия) в той же конечной концентрации, что и первичные антитела. Исключение первичного или вторичного антитела из иммуногистохимической реакции, замена первичных антител на соответствующие IgG в той же конечной концентрации приводили к отсутствию окрашивания. Результаты и Обсуждение

В текущей работе оценивалась экспрессия протеаз в различных типах ТК: метахроматически

гранулированных бластоподобных ТК, атипичных ТК 2-го типа, атипичных ТК 1-го типа и типичных (зрелых) ТК [38, 43]. Тип 1 был дифференцирован на более зрелые ТК (тип 1a) и менее зрелые ТК (тип 1b) [38]. В зависимости от особенностей структурного состава, размера и степени зрелости секреторные гранулы классифицируют на три типа [10, 11, 31, 47]. За отсутствием возможности идентифицировать наименее зрелые секреторные гранулы I типа, напоминающие эндосомы или лизосомы с люминальными везикулами, в обсуждении преимущественно описываются секреторные гранулы II и III типов. Формируясь в ходе гомотипических и гетеротипических слияний, гранулы II и III типов отражают последовательные этапы избирательного накопления компонентов секретома вместе с увеличением размера до 1 мкм и более [9, 10, 34].

Бластоподобные клетки с метахроматической зернистостью

Бластоподобные формы ТК представляли собой мелкие округлые клетки размером 5-7 мкм с преобладающим объемом ядра. Цитоплазма содержала триптаза-положительные и химаза-положительные гранулы II и III типа и составляла узкий ободок вокруг ядра (рис. 1). На самых ранних стадиях дифференцировки бластоподобных

ТК можно было увидеть протеазно-положительные програнулярные образования или секреторные гранулы I типа в тесном контакте с ядерной мембраной (рис. 1 г, ж). На последующих стадиях созревания формировались единичные протеазо-содержащие гранулы II или III типа (рис. 1 д, ж, з).

Флуоресцентное ИГХ окрашивание продемонстрировало существующую идентичность синтеза триптазы и химазы в бластоподобных формах ТК (рис. 1а, б). При этом наличие специфических протеаз можно было обнаружить, начиная с секреторных гранул II типа. Солокализация трип-

тазы и химазы часто детектировалась в гранулах бластоподобных ТК. Формирование секреторных гранул III типа сопровождалось особой упаковкой специфических протеаз по периферии содержимого гранул (рис. 1а). По мере созревания, бластоподобные формы ТК проявляют особенности протеазного фенотипа, которые могут выражаться как в пространственно-количественном соотношении триптазы и химазы в одной грануле, так и в общем количестве секреторных гранул. Таким образом, формирование ТК на ранних стадиях развития определяется не только фенотипом, но

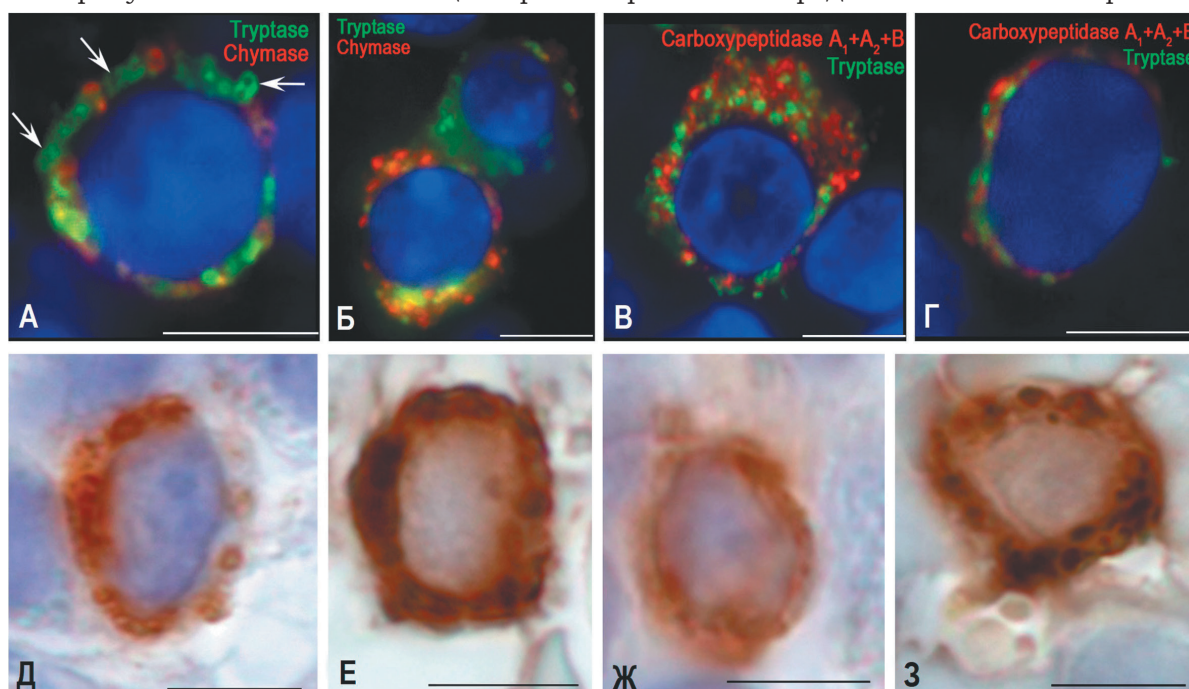


Рис. 1. Цитологическая характеристика протеаз в бластных формах тучных клеток красного костного мозга при мастоцитозе. Триптазу выявляли мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab2378, разведение 1:3000) (в, г, е, ж) или кроличьими моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (#ab151757, разведение 1:2000) (а, б), химазу выявляли мышиными моноклональными антителами к химазе тучных клеток (AbCam, #ab2377, разведение 1:2000) (а, б, д), карбоксипептидазы выявляли с помощью кроличьих антител к карбоксипептидазе A1+A2+B [EPR12087(B)] (AbCam, #ab 181146, разведение 1:500) (в, г); визуализация реализовывалась с помощью флуорохрома Alexa Fluor 488 и Cy3 (а-г) и DAB-хромогена (д-з). Масштабная линейка 5 мкм для всего макета.

А – этап оформления специфических протеаз в гранулы II и III типов. Преимущественно идентифицируются гранулы с одновременным содержанием триптазы и химазы, меньшее количество составляют гранулы, содержащие только триптазу (отмечены стрелкой)

Б – накопление секреторных гранул в бластных формах ТК. Очевидно формирование ТК с различным содержанием химазы – более высоким (внизу) и более низким (вверху). Идентифицируются гранулы, содержащие исключительно химазу (отмечены стрелкой).

В – бластная форма тучной клетки на этапе дифференцировки в более зрелое состояние. Цитоплазма заполнена преимущественно карбоксипептидазами, локализованными экстрагранулярно; триптаза занимает меньший объем и визуализируется частично в гранулах.

Г – тучная клетка на начальных этапах формирования секреторного материала на стадии програнул и гранул I типа, в которых триптаза частично солокализирована с карбоксипептидазами.

Д – многочисленные химаза-позитивные гранулы в цитоплазме тучных клеток с хорошо заметными ядрышками.

Е – цитоплазма бластной формы тучной клетки заполнена крупными триптаза-позитивными гранулами III типа.

Ж – хромогенная детекция начальных этапов синтеза триптазы в цитоплазме бластной формы тучной клетки

З – неравномерное накопление триптаза-содержащих гранул в цитоплазме бластной формы тучной клетки с сохранением области перинуклеарной зоны, свободной от протеазы.

и характерной упаковкой специфических протеаз внутри секреторных гранул. Тканевое микроокружение красного костного мозга является ключевым фактором экспрессии протеаз ТК и определяет соотношение бластоподобных ТК с различным фенотипом специфических протеаз (рис. 1б).

Интересные результаты были получены при диплексном ИГХ окрашивании триптазы и карбоксипептидаз. Оказалось, что экспрессия карбоксипептидаз обнаружена во всех бластоподобных формах, причем чаще всего они занимают большую площадь в цитоплазме по сравнению со специфическими протеазами (рис. 1г). При формировании секреторных гранул II типа, а затем и III типа не всегда наблюдалась интрагранулярная солокализация триптазы и карбоксипептидаз. На рис. 1в хорошо видно, что во время дифференцировки бластоподобной ТК, основная доля карбоксипептидаз располагалась вне позитивных на триптазу гранул. Эти факты свидетельствуют о том, что на стадии бластоподобных форм ТК основные этапы процессинга специфических протеаз осуществляются экстрагранулярно и отражают уровень активности ТК по посттрансляционной модификации белков для различных целей. Менее зрелые секреторные гранулы II типа не имеют такого уровня интрагранулярного процессинга триптазы и химазы, который характерен для зрелых гранул III типа.

Таким образом, экспрессия специфических протеаз на начальных стадиях дифференцировки ТК весьма вариабельна и тесно связана с конкретным состоянием тканевого микроокружения красного костного мозга.

Атипичные ТК типа 1a

ТК типа 1a являются морфологическим эквивалентом наиболее дифференцированного атипичного варианта ТК красного костного мозга при мастоцитозе. Они приобретают вытянутую форму и обладают выраженными цитоплазматическими выростами, которые могут распространяться на значительные расстояния (рис. 2). В перинуклеарной зоне цитоплазмы таких ТК в зрелых секреторных гранулах III типа могут появляться специфические протеазы (рис. 2а, ж, з).

В случае завершения внутриклеточной организации протеаз на уровне секреторных гранул I или II типа, формируется фенотип гипогранулированной ТК (рис. 2в, г, и, к). Зрелые или незрелые секреторные гранулы со специфическими протеазами относительно ядра видны дистально, распределяются вдоль выростов цитоплазмы, занимая периферическое положение и фактиче-

ски прилегая к плазмалемме (рис. 2а, б, в, г). На рис. 2б показан поперечный срез цитоплазматического выроста, характеризующего цитопографию специфических протеаз в атипичных ТК типа 1a. Определяется центральная область, свободная от секреторного материала. Секретом может быть триптаза-положительным или содержать обе специфические протеазы ТК (рис. 2б).

В атипичных ТК типа 1a гранулы формируются в перинуклеарной области, а затем транспортируются на довольно значительные расстояния по цитоплазме с помощью соответствующих внутриклеточных транспортных систем. Морфологическим подтверждением этого процесса может служить рисунок 2и, где хорошо визуализируется направленный транспорт триптазы в периферическую область цитоплазматического выроста ТК. Протеазы, содержащиеся в гранулах различных стадий зрелости и програнулярных образований, могут транспортироваться в локусах, расположенных близко к плазматической мембране (рис. 2ж, е, з). По-видимому, гранулы занимают определенную локацию по всему цитоплазматическому выросту и секретируют во внеклеточный матрикс протеазы по механизму «kiss and run». Интересно, что в некоторых случаях цитоплазматические выросты могут иметь значительную длину (рис. 2д). Это может быть проявлением механизма, определяющего влияние ТК на функциональную активность эндотелия, а также на поступление протеаз в кровоток. Присутствие карбоксипептидаз в цитоплазме выростов атипичных ТК типа 1a свидетельствует об универсальном механизме работы этих протеаз, независимо от их расположения в клетке и процессинге белков секретома на значительном расстоянии от ядра.

Локализация карбоксипептидаз непосредственно в гранулах может свидетельствовать о частичном прекращении посттрансляционной модификации белков в цитоплазме после их поступления в гранулы. Примечательно, что высокое содержание карбоксипептидаз в цитоплазме указывает на активный уровень экспрессии этих ферментов в ТК. Однако в случае гипогранулированных ТК высокое содержание карбоксипептидаз может свидетельствовать об активной модификации ферментов с приобретением биологической активности и быстрым выведением из клетки. Очевидно, что снижение объема и интенсивности сигнала, получаемого от карбоксипептидаз, свидетельствует о снижении уровня экспрессии компонентов секретома, в том числе специфических протеаз, и отражает формирование состо-

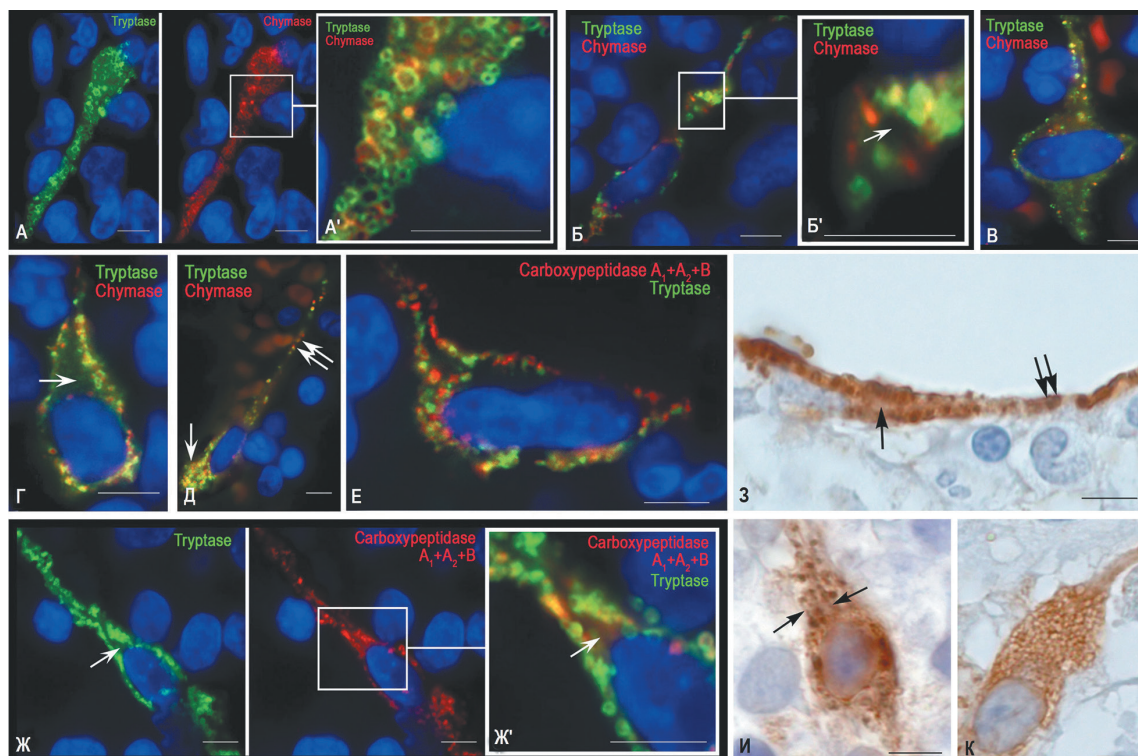


Рис. 2. Специфические протеазы в тучных клетках 1а типа красного костного мозга при мастоцитозе.

Триптазу выявляли мышинными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab2378, разведение 1:3000) (е, ж, и) или кроличьими моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab151757, разведение 1:2000) (а-д), химазу выявляли мышинными моноклональными антителами к химазе тучных клеток (AbCam, #ab2377, разведение 1:2000) (а-д, з, к), карбоксипептидазы выявляли с помощью кроличьих антител к карбоксипептидазе A1+A2+B [EPR12087(B)] (AbCam, #ab 181146, разведение 1:500) (е, ж); визуализация реализовывалась с помощью флуорохрома Alexa Fluor 488 и Cy3 (а-ж) и хромогена DAB (з-к). Масштабная линейка 5 мкм для всего макета.

А – вытянутая тучная клетка с эксцентричным положением ядра и хорошо выраженными секреторными гранулами II и III типов, периферическая кольцевая часть триптаза- и/или химаза-позитивна.

Б – веретенообразная тучная клетка с формированием цитоплазматических выростов на значительные расстояния от ядро-содержащей области клетки. Б' – поперечный срез цитоплазматического выроста. Идентифицируется гранулосодержащая периферическая область и свободная от протеаз центральная часть (обозначена стрелкой).

В – вариант гипогранулированных тучных клеток с цитоплазматическими выростами, в которых визуализируются триптаза- и химаза-позитивный секреторный материал.

Г – гипогранулированная тучная клетка с цитоплазматическим выростом, в котором протеазы локализованы по периферической области, и свободной от протеаз центральной области (обозначено стрелкой).

Д – гипогранулированная тучная клетка с формированием двух морфологически различных полюсов. Широкий полюс (обозначен стрелкой) заполнен гранулами с одновременной экспрессией триптазы и химазы. Узкий цитоплазматический вырост (обозначен двойной стрелкой) содержит меньшее количество специфических протеаз и на значительном расстоянии сопровождает сосуд микроциркуляторного русла.

Е – солокализация триптазы и карбоксипептидаз в тучной клетке, обладающей вытянутым ядром, цитоплазматическими выростами и периферическим расположением секреторных гранул в них. Видны как гранулы триптаза- или карбоксипептидаза-позитивные, так и с одновременным содержанием протеаз.

Ж – тучная клетка вытянутой формы с развитием цитоплазматическим выростом, продолжающимся на значительное расстояние. Периферическая область отростка содержит протеазы, тогда как центральная свободна от гранулярного секреторного материала (указано стрелкой)

З – расположенная вдоль адипоцита тучная клетка веретеновидной формы, заполненная большим количеством химаза-позитивных тучных гранул. В перинуклеарной цитоплазме визуализируется свободная от гранул центральная область (указана стрелкой), тогда как по удалении от ядра размер гранул фактически соизмерим с объемом цитоплазмы (указано двойной стрелкой).

И – гипогранулированная тучная клетка. В цитоплазме очевидны единичные секреторные гранулы и продольно-направленные мелкие структурные образования, обладающие иммунопозитивностью к триптазе (обозначены стрелкой).

К – гипогранулированная химаза-позитивная тучная клетка с формированием узкого цитоплазматического выроста (образования) на периферии.

яния относительного покоя в биосинтетических процессах.

Следует отметить, что в гипогранулярных формах ТК часто встречается различная цитотопографическая локализация триптазы и карбоксипептидаз. Существенные различия в содержании протеаз присутствуют у ТК гипогранулярной и гранулярной форм. Вероятно, гипогранулярные формы являются более неблагоприятными с точки зрения течения мастоцитоза из-за достаточно высокой интенсивности выделения протеаз во внеклеточный матрикс путем фрагментарной секреции. В этом случае протеазы не формируются в классические зрелые гранулы и не накапливаются в цитоплазме ТК, а подвергаются быстрой секреции.

В то же время при индолентных формах мастоцитоза атипичные ТК типа 1a веретенообразной формы с выростами цитоплазмы содержат зрелые секреторные гранулы III типа (рис. 2а, ж). Это очевидный морфологический признак более благоприятного течения заболевания и более медленного высвобождения протеаз во внеклеточный матрикс.

Атипичные ТК типа 1b

Данный тип клеток менее дифференцирован по сравнению с ТК типа 1a. Можно выделить два типа таких клеток: гранулярные и гипогранулярные. В первом случае, клетки могут напоминать по строению зрелые формы типичных ТК. Однако вытянутая форма ядра и его эксцентричное расположение, а также возможный выраженный полиморфизм гранул указывают на атипичный фенотип ТК (рис. 3). Протеазосодержащие гранулы могут быть различных размеров, даже если они немногочисленны в цитоплазме (рис. 3е, з). Некоторые гранулы имеют аномально большие размеры, что свидетельствует о нарушении механизма секреции и выделения специфических протеаз во внеклеточный матрикс (рис. 3з, и). В то же время наличие обычных гранул в таких клетках компенсирует нарушение регуляторного потенциала ТК специфическими протеазами. В зависимости от течения мастоцитоза соотношение гранулярных и гипогранулярных форм ТК изменяется с увеличением их общего числа и может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе.

В отличие от ТК типа 1a, ТК типа 1b не образуют значительных по длине выростов цитоплазмы, но могут формировать широкие выступы (рис. 3а, к). В то же время наличие перинуклеарной цитоплазматической области во многих гипогранулированных клетках, практически иммунонегативной для специфических протеаз ТК,

свидетельствует об очень активных процессах посттрансляционной модификации специфических протеаз в комплексе Гольджи (рис. 3а, в). Такие клетки могут составлять большинство ТК в популяции красного костного мозга при агрессивных формах мастоцитоза.

В то же время можно предположить секрецию протеаз в гранулярных атипичных ТК типа 1b по механизму «kiss and run», при котором зрелые гранулы выстраиваются вдоль плазматической мембраны, контактируют с ней и формируют селективный транспорт необходимых секреторных компонентов (рис. 3б). Гранулы атипичных ТК типа 1b чаще всего содержат как триптазу, так и химазу. При неагрессивном течении мастоцитоза в цитоплазме ТК 1b типа формируются обширные протеаза-отрицательные зоны, что может свидетельствовать о низкой активности секреции протеаз во внеклеточный матрикс.

В гипогранулированных атипичных ТК типа 1b протеазы диффузно распределены по цитоплазме, что предполагает активную фрагментарную дегрануляцию протеаз во внеклеточный матрикс. Стоит отметить, что иммуногистохимическое подтверждение микровезикулярного транспорта ввиду небольшого размера секреторных образований, выделяемых из клетки, является крайне сложной задачей (рис. 3г). Гипогранулированные клетки достаточно точно дифференцируются на триптаза-положительные ТК и ТК, экспрессирующие как триптазу, так и химазу (рис. 3в, г). В некоторых случаях в гипогранулированных клетках наблюдаются отдельные зрелые гранулы, которые могут содержать обе протеазы.

Примечательно, что протеазный профиль атипичных ТК типа 1b характеризуется высоким содержанием карбоксипептидаз (рис. 3д, ж). Это свидетельствует о высоком уровне процессов посттрансляционной модификации белков для конститутивного экзоцитоза или индуцированной секреции. Можно отметить три варианта цитотопографии карбоксипептидаз: преимущественно вне гранул, в гранулах и комбинированная локализация. Скорее всего, это связано со стадией внутриклеточного процесса в биогенезе специфических протеаз. Наличие небольших програнулярных образований, не содержащих карбоксипептидаз, при их высокой концентрации в цитоплазме свидетельствует об активно протекающем экстрагранулярном этапе процессинга специфических протеаз (рис. 3д). Локализация карбоксипептидаз исключительно в гранулах зрелых ТК может свидетельствовать о приостановке модификации

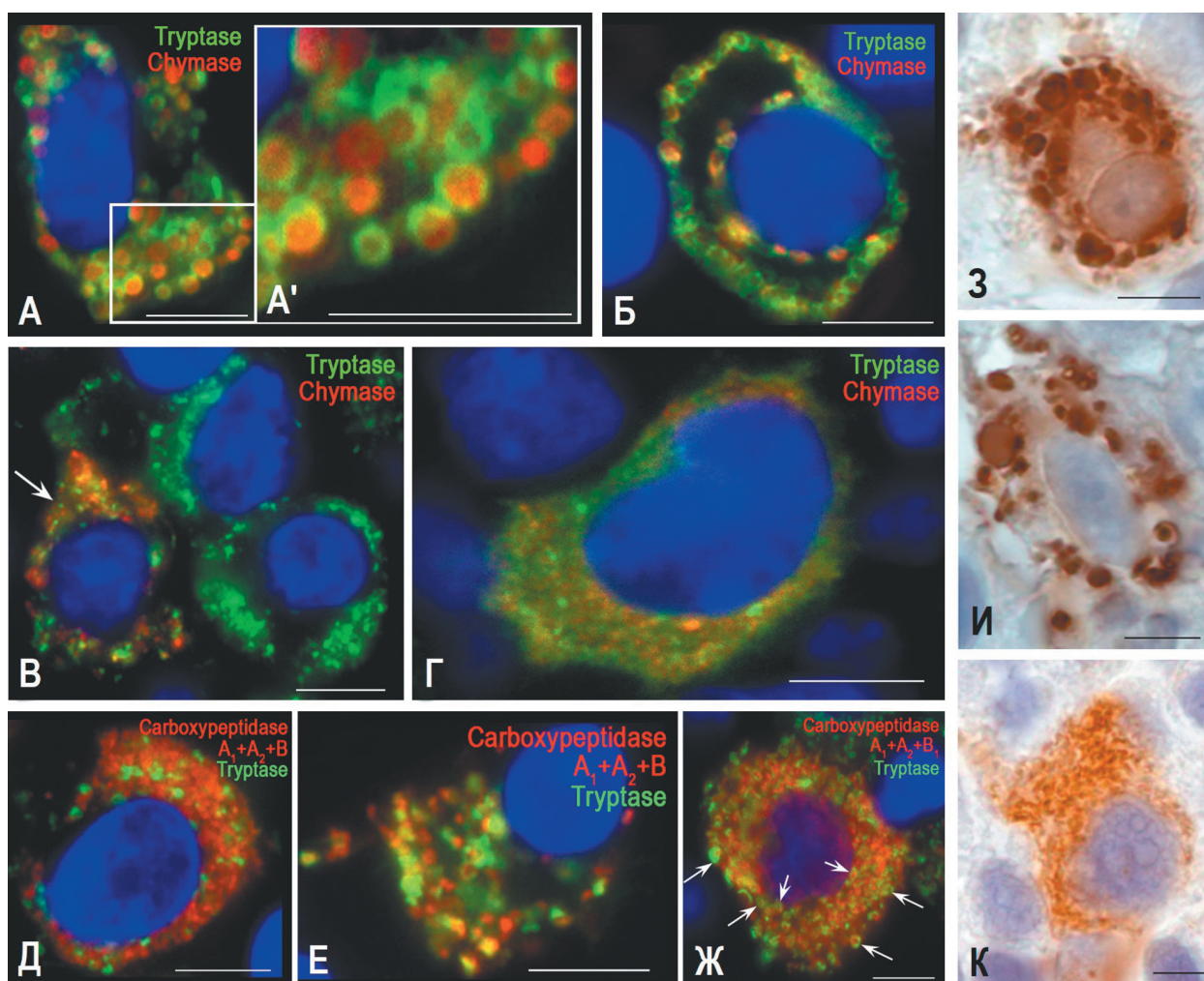


Рис. 3. Цитологические особенности распределения протеаз в тучных клетках 1b типа красного костного мозга при мастоцитозе. Триптазу выявляли мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab2378, разведение 1:3000) (а-г, з, и) или кроличьими моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab151757, разведение 1:2000) (д-ж), химазу выявляли мышиными моноклональными антителами к химазе тучных клеток (AbCam, #ab2377, разведение 1:2000) (а-г, к), карбоксипептидазы выявляли с помощью кроличьих антител к карбоксипептидазе A₁+A₂+B [EPR12087(B)] (AbCam, #ab 181146, разведение 1:500) (д-ж); визуализация реализовывалась с помощью флуорохрома Alexa Fluor 488 и Cy3 (а-ж) и хромогена DAB (з-к). Масштабная линейка 5 мкм для всего макета.

А – большое количество зрелых секреторных гранул в цитоплазме тучной клетки с неравномерной аккумуляцией. Очевидно более высокое накопление химазы в секреторных гранулах тучной клетки с заполнением центральной области.

Б- четкая локализация протеаза-содержащих гранул в периплазмалемной и перинуклеарной областях тучной клетки. Триптаза и химаза расположены по периферии гранул III типа.

В – различное содержание специфических протеаз в гипогранулированных тучных клетках. Тучная клетка с высокой экспрессией химазы (указана стрелкой) солокализирована с двумя триптаза-позитивными ТК.

Г – гипогранулированная тучная клетка с эксцентричным положением ядра, с одновременным содержанием специфических протеаз в цитоплазме.

Д – гипогранулированная тучная клетка с преимущественной локализацией карбоксипептидаз вне триптаза-позитивных гранул и эксцентричным расположением ядра.

Е – солокализация триптазы и карбоксипептидаз в гранулах тучной клетки с периферическим положением ядра.

Ж – триптаза-позитивная ТК с высоким содержанием карбоксипептидаз, локализованных как интрагранулярно вместе с триптазой (указано стрелкой), так и экстрагранулярно в цитоплазме. Наблюдается прилегание к другой триптаза-позитивной ТК.

З – локализация триптазы в различных гранулах, обладающих выраженным полиморфизмом. Около ядра, содержащим хорошо заметное ядрышко, идентифицируется область цитоплазмы, не заполненная гранулами (предположительно занятая комплексом Гольджи).

И – выраженный полиморфизм триптаза-позитивных тучных гранул в ТК с удлинённым ядром.

К – гипогранулированная химаза-позитивная тучная клетка с эксцентричным расположением ядра и отсутствием зрелых протеаза-содержащих гранул III типа.

протеаз в цитоплазме и локальной модификации интрагранулярных протеаз (рис. 3е). Наконец, обнаружение карбоксипептидаз как в цитоплазме, так и внутри зрелых гранул свидетельствует об активно протекающем процессе биогенеза гранул на всех стадиях процессинга протеаз (рис. 3ж).

Атипичные ТК 2 типа

Атипичные ТК 2-го типа являются морфологическим признаком прогрессирования мастоцитоза. Их отличительной особенностью является сегментация ядра (рис. 4). Наблюдалась довольно нетипичная форма ядра или его сегментов, обра-

зующая «зубчатость» контуров (рис. 4и). В некоторых случаях протеазоположительные ТК имели атипичную сегментацию в виде непропорционально маленьких выростов или имели ядерные сегменты разного размера (рис. 4к, л). Размеры таких ТК могут значительно отличаться друг от друга в диапазоне от 10 до 20 мкм. Также может быть различным ядерно-цитоплазматическое соотношение - от высокого до низкого. Имея в некоторых случаях небольшой объем цитоплазмы, атипичные ТК 2-го типа содержат очень мелкие секреторные гранулы (рис. 4б). Мелкие гранулы

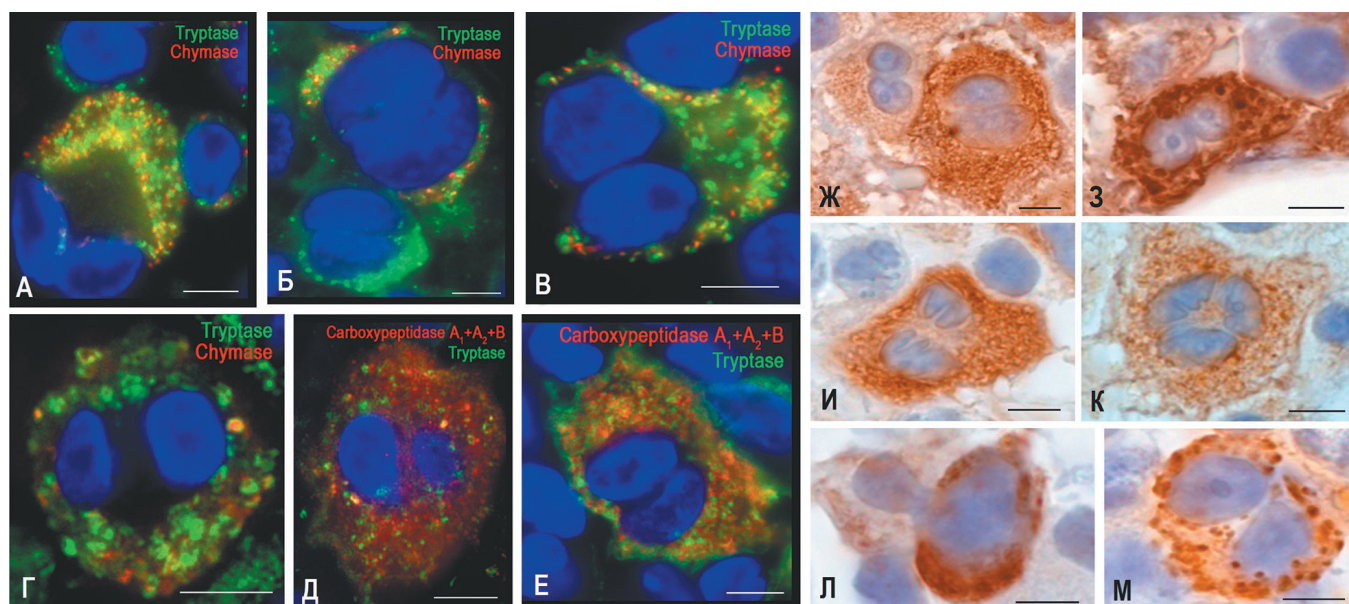


Рис. 4. Цитотопография протеаз в тучных клетках II типа красного костного мозга при мастоцитозе.

Триптазу выявляли мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab2378, разведение 1:3000) (д-и) или кроличьими моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab151757, разведение 1:2000) (а-с), химазу выявляли мышиными моноклональными антителами к химазе тучных клеток (AbCam, #ab2377, разведение 1:2000) (а, б, к-м), карбоксипептидазы выявляли с помощью кроличьих антител к карбоксипептидазе A1+A2+B [EPR12087(B)] (AbCam, #ab 181146, разведение 1:500) (д-е); визуализация реализовывалась с помощью флуорохрома Alexa Fluor 488 и Cy3 (а-е) и хромогена DAB (ж-м). Масштабная линейка 5 мкм для всего макета.

А, Б – различные варианты солокализации гипогранулированных тучных клеток с неодинаковой экспрессией триптазы и химазы.

А – крупная двоядерная ТК с одновременной экспрессией триптазы и химазы контактирует с бластными ТК, одна из которых содержит только триптазу (вверху), а другая обе протеазы (справа).

Б- крупная триптаза+химаза+ ТК и сегментированным ядром (указано стрелкой) контактирует с двоядерной триптаза-положительной тучной клеткой, не экспрессирующей химазы.

В,Г – различные варианты коэкспрессии триптазы и химазы в гипогранулированной (В) и гранулированной (Г) двоядерных тучных клетках.

Д,Е – тучные клетки с высокой (Е) и более низкой (Д) активностью экспрессии триптазы и карбоксипептидаз.

Ж – контактирование гипогранулированных двоядерных ТК с высокой (справа) и умеренной (слева) экспрессией триптазы. Обращают на себя внимание хорошо выраженные ядрышки в ядрах тучной клетки с более низким содержанием протеазы.

З – крупная ТК с хорошо заметными зрелыми триптаза-положительными гранулами III типа, в ядрах которой находятся крупные ядрышки.

И – гипогранулированная триптаза-положительная ТК с аномальной формой ядер.

К – гипогранулированная химаза-положительная тучная клетка с ядрышками в ядрах.

Л – аномальная форма ядра в химаза-положительной тучной клетке с небольшим содержанием крупных секреторных гранул.

М – двоядерная тучная клетка с экспрессией химазы, оформленной в крупные секреторные гранулы. В одном из ядер хорошо заметно крупное ядрышко.

равномерно распределены в цитоплазме, без образования локальных скоплений. Цитоплазма ТК может быть иммунопозитивной к триптазе и химазе не только внутри гранулярных образований или гранул, но и между ними. Часто отличающиеся по размеру ТК 2-го типа тесно прилегают друг

к другу (рис. 4а, б). Более того, соседние ТК могут отличаться друг от друга по экспрессии специфических протеаз. Например, ТК 2-го типа с одновременной экспрессией триптазы и химазы могут контактировать с ТК, позитивной исключительно к триптазе (рис. 4б).

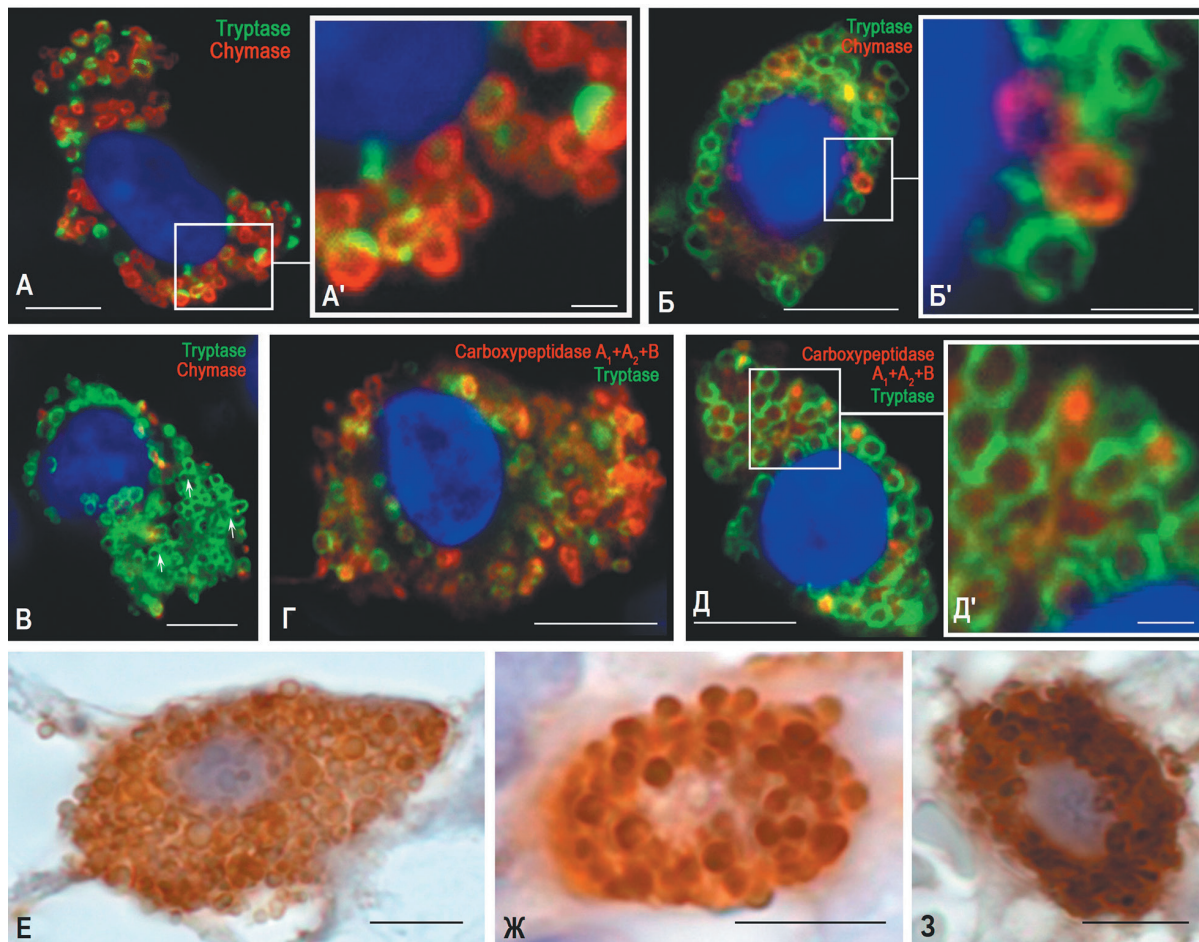


Рис. 5. Протеазы в зрелых тучных клетках красного костного мозга у пациентов с мастоцитозом.

Триптазу выявляли мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab2378, разведение 1:3000) (г, д, з) или кроличьими моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (AbCam, #ab151757, разведение 1:2000) (а-в), химазу выявляли мышиными моноклональными антителами к химазе тучных клеток (AbCam, #ab2377, разведение 1:2000) (а-в, е, ж), карбоксипептидазы выявляли с помощью кроличьих антител к карбоксипептидазе A1+A2+B [EPR12087(B)] (AbCam, #ab 181146, разведение 1:500) (г, д); визуализация реализовывалась с помощью флуорохрома Alexa Fluor 488 и Cy3 (а-д) и хромогена DAB (е-з). Масштабная линейка 5 мкм для всего макета.

А – тучная клетка с высоким уровнем экспрессии химазы. Химаза преобладает как по количеству гранул в цитоплазме тучной клетки, так и по интрагранулярному содержанию. В гранулах химаза сконцентрирована по периферии (А').

Б – тучная клетка с примерно равным содержанием триптазы и химазы. Выявляются гранулы с содержанием исключительно химазы или триптазы, а также с одновременным содержанием протеаз (Б'). Протеазы локализованы по периферии зрелых гранул III типа.

В – тучная клетка с преобладанием триптаза-позитивных гранул, часть из которых подвержена слиянию друг с другом (отмечено стрелкой).

Г – триптаза-позитивная тучная клетка с интра- и экстрагранулярным содержанием карбоксипептидаз. Триптаза локализована исключительно по периферии гранул.

Д – триптаза-позитивная тучная клетка с преимущественной интрагранулярной локализацией карбоксипептидаз в центральной области гранул (Д').

Е, Ж – цитоплазма тучной клетки заполнена крупными химаза-позитивными гранулами, часть из которых секретируется механизмом экзоцитоза. Видны единичные свободно лежащие секреторные гранулы во внеклеточном матриксе (Е).

З – триптаза-позитивная тучная клетка с низкой секреторной активностью.

Кроме того, крупные ТК типа 2 могут воздействовать и на другие типы ТК, очевидно влияя на дальнейшую дифференцировку, экспрессию протеаз и секреторную активность (рис. 4а).

Внутрицитоплазматическое распределение протеаз может быть практически равномерным. Однако незрелые гранулы типа 2 могут быть трех вариантов: триптазоположительные, химазоположительные, а также с одновременным содержанием обеих протеаз (рис. 4в). Двухядерные ТК иногда гранулярны и имеют зрелые секреторные гранулы с характерной периферической локализацией триптазы и химазы в виде кольца, однако их количество может зависеть от специфики заболевания (рис. 4г, з, м). Крупные зрелые гранулы могут быть представлены в различном количестве, от единичных (рис. 4м) до практически полного заполнения цитоплазмы (рис. 4з). Несмотря на общую высокую экспрессию специфических протеаз в гипогранулированных ТК 2-го типа, она может варьировать от умеренной до высокой (рис. 4ж).

Бинуклеарные клетки, как правило, характеризовались высоким уровнем карбоксипептидаз (рис. 4д, е).

Типичные ТК

Типичные зрелые ТК красного костного мозга представляли собой хорошо гранулированные, крупные клетки, достигавшие размера 15 мкм и более. Их ядра, как правило, имели округлую форму и располагались в центре клетки. Специфические протеазы формировались в хорошо различимые гранулы размером около 1 мкм, их количество было значительно большим, и они могли заполнять практически всю цитоплазму (рис. 5).

В зрелых клетках преобладающая интрагранулярная локализация специфических протеаз становилась очевидной. Как правило, и триптаза, и химаза располагались по периферии гранулы, что ранее было продемонстрировано нами на примере ТК других органов (рис. 5 а', б') [5, 6]. В то же время в красном костном мозге отмечено существование отдельных фенотипов зрелых ТК трех вариантов: с преобладанием химазы, преобладанием триптазы или одновременным содержанием специфических протеаз в относительно равных количествах (рис. 5 а, б, в). Обращает на себя внимание характер интрагранулярного распределения протеаз. В частности, при эпифлуоресцентной микроскопии создается впечатление о большей площади, занимаемой химазой, по сравнению с триптаза-положительным материалом (рис. 5 а, б). Карбоксипептидазы были обнаружены как

внутри гранул, так и вне гранул в цитоплазме типичных тканевых ТК (рис. 5 г, д).

Иногда протеаза-положительные гранулы визуализировались опосредованно в специфическом тканевом микроокружении красного костного мозга. Это указывает на возможность их автономного существования во внеклеточном матриксе после секреции, что позволяет реализовать отсроченные регуляторные функции триптазы и химазы.

Заключение

Протеазы ТК являются удобной мишенью для молекулярно-морфологического анализа. Выявление неспецифических протеаз, участвующих в процессинге белков ТК, предназначенных для секреции, позволяет интерпретировать активность и особенности внутриклеточного биогенеза триптазы и химазы. Внутригранулярная локализация и секреторные пути специфических протеаз ТК зависят от стадии зрелости секреторных гранул. Участие специфических протеаз ТК в патогенезе мастоцитоза делает целесообразным дальнейшее изучение экспрессии триптазы и химазы в зависимости от формы заболевания. Для диагностики мастоцитоза необходимо определить профиль протеаз ТК красного костного мозга с учетом соотношения триптаза-положительных и химаза-положительных клеток, а также клеток с одновременной экспрессией обеих протеаз.

Каждый тип атипичных ТК при мастоцитозе имеет свои цитологические особенности экспрессии конкретной протеазы и, соответственно, объем ее пула может вносить соразмерный вклад в течение заболевания. Солокализация ТК с другими клетками красного костного мозга важна для миелопоеза в красном костном мозге и может объяснять биологические эффекты протеаз в регуляции локального гомеостаза и селективных морфогенетических процессов. Динамические характеристики ТК красного костного мозга являются дополнительной задачей морфологического анализа в патологии. Однократная биопсия дает представление о выраженности протеаз только на определенном этапе развития мастоцитоза: в момент взятия биоматериала. Понимание роли протеаз на каждом этапе развития заболевания расширит диагностические и терапевтические возможности не только в отношении основного заболевания, но и сопутствующих заболеваний. Таким образом, изучение биологических эффектов протеаз в иммуноморфологических исследованиях расширяет современные представления о функциональном потенциале ТК, открывая но-

вые возможности в диагностике мастоцитоза и мониторинге терапии. Экспрессия и секреторные механизмы ТК-протеаз могут представлять собой перспективную фармакологическую мишень в лечении мастоцитоза.

Информация о финансовой поддержке

Инициативная тема: «Молекулярные механизмы участия тучных клеток в формировании иммунного и стромального ландшафта специфического тканевого микроокружения в норме и патологии (онкогенезе, воспалении, фиброзе)».

Литература

1. Akula S. et al. Quantitative in-depth analysis of the mouse mast cell transcriptome reveals organ-specific mast cell heterogeneity // *Cells*. – 2020. – Т. 9. – №. 1. – С. 211.
2. Ammendola M. et al. Mast cell-targeted strategies in cancer therapy // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2016. – Т. 43. – №. 2. – С. 109-113.
3. Arber D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia // *Blood, the journal of the american society of hematology*. – 2016. – Т. 127. – №. 20. – С. 2391-2405.
4. Atiakshin D. et al. Carboxypeptidase A3—a key component of the protease phenotype of mast cells // *Cells*. – 2022. – Т. 11. – №. 3. – С. 570.
5. Atiakshin D. et al. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells // *Histochemistry and cell biology*. – 2018. – Т. 149. – №. 5. – С. 461-477.
6. Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2019. – Т. 152. – №. 4. – С. 253-269.
7. Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. Mast cell proteases in formation of the specific tissue microenvironment: pathogenic and diagnostic aspects // *Therapy*. – 2018. – Т. 6. – С. 128-140.
8. Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis // *Histochemistry and cell biology*. – 2020. – Т. 154. – №. 1. – С. 21-40.
9. Azouz N. P., Hammel I., Sagi-Eisenberg R. Characterization of mast cell secretory granules and their cell biology // *DNA and cell biology*. – 2014. – Т. 33. – №. 10. – С. 647-651.
10. Blank U. et al. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells // *Frontiers in immunology*. – 2014. – Т. 5. – С. 453.
11. Blank U. The mechanisms of exocytosis in mast cells // *Mast Cell Biology: Contemporary and Emerging Topics*. – 2011. – С. 107-122.
12. Boecker W. et al. K5/K14-positive cells contribute to salivary gland-like breast tumors with myoepithelial differentiation // *Modern Pathology*. – 2013. – Т. 26. – №. 8. – С. 1086-1100.
13. Buchwalow I. B., Böcker W. Immunohistochemistry: basics and methods. – Springer Science & Business Media, 2010.
14. Buchwalow I. B., Minin E. A., Boecker W. A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting // *Acta histochemica*. – 2005. – Т. 107. – №. 2. – С. 143-148.
15. Buchwalow I. et al. Identification of autofluorescent cells in human angioimmunoblastic T-cell lymphoma // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2018. – Т. 149. – №. 2. – С. 169-177.
16. Buchwalow I. et al. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: Fakes and facts // *Nature Precedings*. – 2011. – С. 1-1.
17. Caughey G. H. Mast cell proteases as pharmacological targets // *European journal of pharmacology*. – 2016. – Т. 778. – С. 44-55.
18. Dell'Italia L. J., Collawn J. F., Ferrario C. M. Multifunctional role of chymase in acute and chronic tissue injury and remodeling // *Circulation research*. – 2018. – Т. 122. – №. 2. – С. 319-336.
19. Ehrlich P. Beiträge für Theorie und Praxis der histologischen Färbung. vol Doktor // *Leipzig University, Leipzig*. – 1878. – Т. 65.
20. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik // *Archiv für mikroskopische Anatomie*. – 1877. – Т. 13. – №. 1. – С. 263-277.
21. Galli S. J. et al. Approaches for analyzing the roles of mast cells and their proteases in vivo // *Advances in immunology*. – 2015. – Т. 126. – С. 45-127.
22. Goldstein S. M. et al. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization // *The Journal of clinical investigation*. – 1989. – Т. 83. – №. 5. – С. 1630-1636.
23. Hernández-Hernández L. et al. Tryptase: genetic and functional considerations // *Allergologia et immunopathologia*. – 2012. – Т. 40. – №. 6. – С. 385-389.
24. Horny H. P. et al. Mastocytosis: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al // *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press. – 2016.
25. Horny H. P. et al. The tryptase positive compact round cell infiltrate of the bone marrow (TROCI-BM): a novel histopathological finding requiring the application of lineage specific markers // *Journal of clinical pathology*. – 2006. – Т. 59. – №. 3. – С. 298-302.
26. Horny H. P., Sotlar K., Valent P. Mastocytosis: immunophenotypical features of the transformed mast cells are unique among hematopoietic cells // *Immunology and Allergy Clinics*. – 2014. – Т. 34. – №. 2. – С. 315-321.
27. Horny H. P., Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings // *Leukemia research*. – 2001. – Т. 25. – №. 7. – С. 543-551.
28. Mukai K. et al. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors // *Immunological reviews*. – 2018. – Т. 282. – №. 1. – С. 121-150.

29. Mulloy B., Lever R., Page C. P. Mast cell glycosaminoglycans //Glycoconjugate journal. – 2017. – Т. 34. – №. 3. – С. 351-361.
30. Pardanani A. Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management //Am J Hematol. – 2019. – Т. 94. – С. 363-377.
31. Pejler G. et al. Mast cell proteases. 636 //Adv. Immunol. – 2007. – Т. 95. – №. 167-255. – С. 637.
32. Pejler G. et al. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – Т. 115. – №. 24. – С. 4981-4990.
33. Pejler G. et al. Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A //Trends in immunology. – 2009. – Т. 30. – №. 8. – С. 401-408.
34. Raposo G. et al. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation //Molecular biology of the cell. – 1997. – Т. 8. – №. 12. – С. 2631-2645.
35. Reynolds D. S. et al. Cloning and characterization of the novel gene for mast cell carboxypeptidase A //The Journal of clinical investigation. – 1992. – Т. 89. – №. 1. – С. 273-282.
36. Reznik S. E., Fricker L. D. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding //Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 2001. – Т. 58. – №. 12. – С. 1790-1804.
37. Singh J., Shah R., Singh D. Targeting mast cells: Uncovering prolific therapeutic role in myriad diseases //International immunopharmacology. – 2016. – Т. 40. – С. 362-384.
38. Sperr W. R. et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis //Leukemia research. – 2001. – Т. 25. – №. 7. – С. 529-536.
39. Springman E. B., Dikov M. M., Serafin W. E. Mast cell procarboxypeptidase A: Molecular modeling and biochemical characterization of its processing within secretory granules //Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Т. 270. – №. 3. – С. 1300-1307.
40. Tamura K. et al. Mutations in the pancreatic secretory enzymes CPA1 and CPB1 are associated with pancreatic cancer //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Т. 115. – №. 18. – С. 4767-4772.
41. Trivedi N. N., Caughey G. H. Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense //American journal of respiratory cell and molecular biology. – 2010. – Т. 42. – №. 3. – С. 257-267.
42. Valent P. et al. Chronic mast cell leukemia: a novel leukemia-variant with distinct morphological and clinical features //Leukemia Research. – 2015. – Т. 39. – №. 1. – С. 1-5.
43. Valent P. et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal //Leukemia research. – 2001. – Т. 25. – №. 7. – С. 603-625.
44. Valent P. et al. Phenotypic heterogeneity, novel diagnostic markers, and target expression profiles in normal and neoplastic human mast cells //Best Practice & Research Clinical Haematology. – 2010. – Т. 23. – №. 3. – С. 369-378.
45. Valent P., Akin C., Metcalfe D. D. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2017. – Т. 129. – №. 11. – С. 1420-1427.
46. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine //Molecular immunology. – 2015. – Т. 63. – №. 1. – С. 18-24.
47. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle //Nature Reviews Immunology. – 2014. – Т. 14. – №. 7. – С. 478-494.

Контакты авторов:

Атякишин Д.А.

e-mail: atyakshin_da@pfur.ru

Конфликт интересов: отсутствует