

ФИЗИОЛОГИЯ PHYSIOLOGY

DOI 10.22363/2313-0245-2022-26-1-9-33

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ
REVIEW

Карбоксипептидаза АЗ в структуре протеазного фенотипа тучных клеток: цитофизиологические аспекты

Д.А. Атякшин^{1,2}  , А.А. Костин¹ , И.Д. Троценко¹ ,
В.В. Шишкина² , М. Тиманн³ , И.Б. Бухвалов³ 

¹ Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

² Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, г. Воронеж, Российская Федерация

³ Институт гематопатологии, г. Гамбург, Германия

 atyakshin-da@rudn.ru

Аннотация. Карбоксипептидаза АЗ (СРАЗ) является специфической протеазой тучных клеток (ТК) с вариабельной экспрессией и входит в число преформированных компонентов секретома. СРАЗ принимает участие в регуляции состояния специфического тканевого микроокружения и компонентов интегративно-буферной метаболической среды при адаптивных и патологических процессах, затрагивая реализацию врожденного иммунитета, механизмы ангиогенеза, процессы ремоделирования межклеточного матрикса и др. Идентификация СРАЗ с помощью протоколов мультиплексной иммуногистохимии позволяет конкретизировать детали органоспецифических популяционных характеристик тучных клеток, включая протеазный фенотип, механизмы биогенеза с цито- и гистотопографическими критериями, а также особенности секреторных путей. Многочисленные биологические эффекты СРАЗ, включая участие в регуляции состояния легочной паренхимы и системного кровотока, в биогенезе и ремоделировании волокнистого компонента внеклеточного матрикса, в эпигенетическом репрограммировании, определяют важность фундаментальных исследований физиологической активности протеазы и ее вовлеченности в реализацию патологических процессов. Дальнейшие исследования будут способствовать раскрытию трансляционного значения характеристик экспрессии СРАЗ ТК в качестве прогностического фактора и перспективной молекулярной мишени терапии социально значимых заболеваний.

Ключевые слова: карбоксипептидаза АЗ, тучные клетки, секретом, гранулы, секреторные пути, специфическое тканевое микроокружение

Вклад авторов. Атякшин Д.А., Костин А.А., Тиманн М. — концепция и дизайн исследования; Атякшин Д.А., Троценко И.Д., Шишкина В.В. — сбор и обработка материалов; Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б. — анализ полученных данных, написание текста.

© Атякшин Д.А., Костин А.А., Троценко И.Д., Шишкина В.В., Тиманн М., Бухвалов И.Б., 2022



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2021. Принята 17.01.2022.

Для цитирования: Атыакшин Д.А., Костин А.А., Троценко И.Д., Шишкина В.В., Тиманн М., Бухвалов И.Б. Карбокси-пептидаза А3 в структуре протеазного фенотипа тучных клеток: цитофизиологические аспекты // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2022. Т. 26. № 1. С. 9–33. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-1-9-33

Carboxypeptidase A3 in the structure of the protease phenotype of mast cells: cytophysiological aspects

Dmitrii Atiakshin^{1,2}  , Andrey Kostin¹ , Ivan Trotsenko¹ ,
Victoria Shishkina² , Markus Tiemann³ , Igor Buchwalow³ 

¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

²Voronezh N.N. Burdenko State Medical University, Voronezh, Russian Federation

³Institute for Hematopathology, Hamburg, Germany

 atyakshin-da@rudn.ru

Abstract. Carboxypeptidase A3 (CPA3) is a specific protease of mast cells (MC) with variable expression and appears to be one of the preformed components of the secretome. CPA3 is involved in regulation of the state of a specific tissue microenvironment and components of the integrative-buffer metabolic environment in adaptive and pathological processes; it affects implementation of the innate immunity, mechanisms of angiogenesis, processes of the extracellular matrix remodeling, etc. CPA3 identification using protocols of multiplex immunohistochemistry allows specifying details of the organ-specific mast cell population features, including the protease phenotype, mechanisms of biogenesis with cyto- and histotopographic criteria, and features of secretory pathways. Numerous biological effects of CPA3, including participation in the regulation of the pulmonary parenchyma and systemic blood flow, in biogenesis and remodeling of the fibrous component of the extracellular matrix, in epigenetic reprogramming, determine the importance of fundamental investigation of the physiological activity of protease and its involvement in the implementation of pathological processes. Further studies will contribute to the detection of the translational value of the mast cell CPA3 expression features as a prognostic factor and a promising molecular target for treatment of socially significant diseases.

Keywords: carboxypeptidase A3, mast cells, secretome, granules, secretory pathways, specific tissue microenvironment

Author contributions. Atiakshin D.A., Kostin A.A., Timann M. — concept and design of the study; Atiakshin D.A., Trotsenko I.D., Shishkina V.V. — collection and processing of materials; Atiakshin D.A., Buchwalow I.B. — analysis of the received data, writing the text.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Received 15.12.2021. Accepted 17.01.2022.

For citation: Atiakshin DA, Kostin AA, Trotsenko ID, Shishkina VV, Tiemann M, Buchwalow IB. Carboxypeptidase A3 in the structure of the protease phenotype of mast cells: cytophysiological aspects. *RUDN Journal of Medicine*. 2022;26(1):9–33. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-1-9-33

Введение

Тучные клетки (ТК) являются важной частью иммунной системы и находятся в центре внимания многочисленных биомедицинских исследований. После открытия Паулем Эрлихом тучных клеток были получены многочисленные данные об особенностях их функционального потенциала в зависимости от состояния специфического тканевого микроокружения, включая сенсорные и регуляторные свойства к клеткам и неклеточным структурам экстрацеллюлярного матрикса [1–9]. Дифференцируясь от CD34+ клеток красного костного мозга, ТК поступают в кровеносное русло и выборочно заселяют различные ткани и органы, в которых происходит их созревание [10–12]. Регуляторное влияние на дифференцировку ТК оказывают цитокины, хемокины и факторы роста, включая некоторые интерлейкины (ИЛ): ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-33, фактор стволовых клеток, трансформирующий фактор роста бета и др. В итоге ТК приобретают секреторный фенотип, характеризующийся специфическим соотношением преформированных компонентов, включая протеазы, протеогликаны, лизосомальные ферменты, биогенные амины, факторы роста, хемокины, цитокины и др. [1, 13, 14]. Наиболее часто ТК человека классифицируют в соответствии с содержанием специфических протеаз — химазы и триптазы [15, 16]. В то же время наравне с ними карбоксипептидаза А3 (СРА3) является не менее обильным компонентом секрета тучных клеток в количественном отношении [17–21]. Биогенез СРА3 начинается с процессов транскрипции в ядре, продолжаясь в цитоплазме ТК на рибосомах, цистернах эндоплазматической сети и посттрансляционными модификациями в комплексе Гольджи. В ходе дальнейшего процессинга СРА3 становится активным ферментом при созревании гранул и приобретает характерную локализацию, определяя особенности цитологического и ультраструктурного фенотипа ТК. Различные секреторные механизмы

выведения СРА3 во внеклеточный матрикс приводят к формированию биологических эффектов, наиболее значимыми среди которых можно считать реализацию врожденного иммунитета, регуляцию состояния специфического тканевого микроокружения и компонентов интегративно-буферной метаболической среды, участие в механизмах ангиогенеза, процессах ремоделирования межклеточного матрикса и др. Включение СРА3 в формирование ряда биологических эффектов других специфических протеаз ТК расширяет диапазон функционального значения экзопептидазы. В частности, показана вовлеченность СРА3 в патогенез рака, воспалительных заболеваний органов желудочно-кишечного тракта, дыхательной и сердечно-сосудистой систем, нарушений опорно-двигательного аппарата, в том числе благодаря регуляторным эффектам по отношению к состоянию интегративно-буферной метаболической среды специфического тканевого микроокружения и иммуногенезу [18, 22–39]. Кроме того, СРА3 в плазме крови показал себя как объективный биомаркер для выявления пациентов с тяжелым течением COVID-19 [40].

Ключевая работа в области биологии ТК по систематизации морфофункциональных особенностей СРА3 ТК была выполнена в 2009 году, [17] и к настоящему времени назрела необходимость дополнить имеющиеся сведения новыми результатами. Технологии иммуногистохимической визуализации СРА3 раскрывают новые органоспецифические характеристики популяции ТК и предоставляют дополнительную информацию при интерпретации результатов морфологического анализа, важную как для повышения объективности диагностических алгоритмов, так и более точной оценки результатов проводимого лечения, включая протеазный фенотип, механизмы биогенеза с цито- и гистотопографическими критериями, а также особенности секреторных путей. Фундаментальные аспекты процессинга СРА3 тучных клеток имеют важное прикладное

значение в качестве объекта диагностики, фармакологической мишени и критерия эффективности терапии.

Молекулярно-генетические аспекты

Информация о протеазах занимает около 5 % белок-кодирующих последовательностей генома человека, что позволяет уровню общего пула соответствующих мРНК в ТК находиться в сопоставимых величинах с результатами экспрессии генов «домашнего хозяйства». Вследствие высокого уровня экспрессии протеазы могут составлять третью часть от общего количества белков в цитоплазме ТК [16, 41–43]. СРАЗ входит в число специфических протеаз ТК, и в отличие от триптазы или химазы является цинк-содержащей металлопротеиназой с экзопептидазной активностью [21]. Ген СРАЗ человека состоит из 11 экзонов и локализован на 3 хромосоме 3 (3q24), формируя вместе с геном карбоксипептидазы В 1 поджелудочной железы (СРВ 1) обособленный локус «СРВ 1-СРАЗ». Данный локус расположен на границе с областью гена рецептора ангиотензина II типа с одной стороны и, с другой стороны, с генами *GYG1* и *HLTF*. Ген *GYG1* кодирует фермент гликогенин-1, участвующий в синтезе гликогена, а ген *HLTF* кодирует хеликазоподобный фактор транскрипции [21]. В гранулах ТК СРАЗ может составлять от 0,5 до 16 мкг/10⁶ тучных клеток в зависимости в зависимости от органной принадлежности [44]. При этом СРАЗ человека имеет гомологичные признаки СРАЗ грызунов по молекулярной организации и аминокислотным остаткам, участвующих в связывании цинка с субстратом [44, 45]. На сегодняшний день экспрессия гена СРАЗ обнаружена только в ТК, за возможным исключением базофильных лейкоцитов у пациентов с аллергическим анамнезом [41, 45–51]. У крыс до 0,5 % общего пула мРНК в ТК брюшной полости составляет мРНК СРАЗ, превышая экспрессионный уровень транскрипции гена актина [52].

В тоже время, существуют органоспецифические особенности содержания СРАЗ в ТК, поскольку экспрессия гена СРАЗ может характеризоваться

высокой вариабельностью. Например, у грызунов экспрессия СРАЗ выявлялась в субпопуляции соединительнотканых ТК, находящихся в серозной полости, коже и подслизистой оболочки органов пищеварительного тракта, и не обнаруживалась в ТК слизистой оболочки кишечника и дыхательных путей [48, 52, 53–55]. У человека экспрессия карбоксипептидазы АЗ была выявлена в соединительнотканых ТК, обладающих, как правило, одновременным биогенезом триптазы и химазы [17, 56]. В то же время в проведенных исследованиях по выявлению специфических протеаз ТК мы обнаружили, что СРАЗ может экспрессироваться также и в триптаза-позитивных ТК человека с отсутствием химазы, в том числе в слизистой оболочке желудка и тонкой кишки. Аналогичные данные были получены в недавнем исследовании, показавшими различные уровни содержания СРАЗ в тучных клетках кожи, легких и кишечника [20]. ТК с экспрессией обеих специфических протеаз содержали СРАЗ в большем количестве по сравнению с фенотипом ТК «триптаза⁺химаза⁻». В то же время уровень экспрессии мРНК СРАЗ в некоторых ТК был противоположным содержанию специфической протеазы в клетке [20]. Присутствие СРАЗ в триптаза-позитивных ТК существенно дополняет данные о функциональной значимости локализации СРАЗ с химазой [17, 20]. Более того, при некоторых патологических состояниях были обнаружены химаза-негативные тучные клетки с экспрессией СРАЗ [37, 57–59].

Количественные показатели внутриклеточного содержания СРАЗ могут быть использованы в качестве маркера дифференцировки ТК, поскольку содержание протеазы возрастает во время созревания [53, 60, 61]. Известна определенная роль факторов транскрипции GATA в регуляции экспрессии гена СРАЗ [62, 63]. Наоборот, MTF, играющий важную роль в регуляции генов химазы и триптазы ТК, не оказывает влияния на транскрипцию гена СРАЗ [64]. Также было показано, что экспрессия гена СРАЗ существенно возрастает при влиянии глюкокортикоидов [65, 66]. В ТК легких была показана тесная связь экспрессии гена СРАЗ с содержанием мРНК триптазы, а не химазы [20].

Было сделано предположение, что на экспрессию гена СРАЗ влияют стимулы, связанные с врожденным, а не с адаптивным иммунитетом [17].

Биогенез СРАЗ в ТК реализуется в ходе последовательных внутриклеточных этапов синтеза и завершается постепенной укладкой ее в гранулах в комплексе с другими компонентами секретома. На завершающих этапах биогенеза СРАЗ представляет собой форму, обладающую биологической активностью. На предполагаемой структуре молекулы СРАЗ, по аналогии с панкреатической карбоксипептидазой В свиней, была предсказана ее глобулярная структура, представляющая собой трехслойный белок с расположением восьми β -цепей в центре и α -спиралями снаружи, активный локус которого расположен на С-конце β -слоя [17]. При этом в молекуле СРАЗ было предположено преобладание положительно заряженных аминокислотных остатков (Arg, Lys и His), что важно с точки зрения взаимодействия с полианионами секреторных гранул ТК в процессе интрагранулярной укладки, в частности, с гепарином. Секреторные гранулы как источник СРАЗ представляют собой уникальные внутриклеточные структуры с высокоспецифичной регуляцией активности выведения протеазы и других компонентов секретома за пределы материнской гранулы в цитозоль и внеклеточный матрикс [1, 17, 67–70].

Биогенез СРАЗ+ гранул тучных клеток

Начальные этапы формирования предшественников СРАЗ-позитивных гранул ТК происходят в ЭПС в процессе трансляции и транспорта белков, синтеза липидов и других компонентов секретома. В комплексе Гольджи СРАЗ последовательно перемещается от цис-отдела к транс-отделу и в конечном итоге отшнуровывается в составе транспортных везикул, покрытых клатрином [71–73]. Данные оформленные структуры, которые можно назвать «програнулами», могут соединяться друг с другом и ранними эндосомами, постепенно увеличиваясь в объеме [68, 74]. Механизмы слияния «програнул», происходящих с участием секретогранина III, до сих пор неизвестны и находятся в фокусе фундаментальных исследований [1]. Постепенное созревание «програнул» сопровождается выбо-

рочным накоплением в матриксе специфических протеаз, а также других компонентов секретома вместе со снижением рН интрагранулярной среды до 5,5 [61]. Согласно различным предположениям формирование окончательного промежуточного секреторного фенотипа может происходить как за счет селективного включения новых продуктов по мере прохождения в комплексе Гольджи (КГ), так и выборочного удаления некоторых продуктов в процессе созревания гранулы. В частности, с помощью гликозилирования секретом насыщается лизосомальными гидролазами [71, 75]. В механизмах включения СРАЗ в интрагранулярный матрикс принимают участие серглицин и гликозаминогликаны, обеспечивающие как накопление, так и регуляцию активности протеазы [1, 17, 76, 77]. Серглицин необходим для хранения СРАЗ и обладает способностью модулировать активность протеазы после секреции, принимая участие в транспорте, активации и взаимодействия с субстратами или клетками-мишенями. Следует особенно отметить зависимость количественного интрагранулярного распределения СРАЗ от биологических эффектов протеогликанов, принимающих участие в важнейших этапах процессинга и динамической аккумуляции преформированных компонентов секретома [1, 61, 78]. В частности, процессинг про-СРАЗ зависит от гепарина, ассоциированного с серглицином [79]. Данные свойства серглицина проявляются аналогичным образом при биогенезе триптазы и химазы [80–83]. При созревании проСРАЗ в зрелую специфическую протеазу ТК могут принимать участие цистеиновые протеазы, включая лизосомальные катепсины [84]. При этом особое значение принимают локализованные в секреторных гранулах катепсины E, C, S [85, 86]. Возможность окончательного завершения посттрансляционных изменений СРАЗ непосредственно в гранулах рассматривалась в работе Rath-Wolfson L. [87]. Степень процессинга про-СРАЗ в активную протеазу может зависеть как от возраста клеток, так и всего организма [87, 88].

При образовании секреторных лизосом комплекс Гольджи функционирует как сортировщик белков, создавая необходимые условия для селективного

включения и модификации ассоциированных с гранулами протеогликанов, а также сульфатирования углеводных и белковых компонентов, что позволяет осуществлять конститутивные и индуцируемые секреторные механизмы в адекватном объеме [71, 73, 78]. После отшнуровки от КГ секреторные «програнулы» постепенно увеличиваются в размерах и приобретают особенности строения центральной и периферической областей, обусловленные их качественным составом [1]. Высокая аккумуляция лизосомальных гидролаз в составе гранул послужила причиной использования термина «секреторные лизосомы». Созревание гранул сопровождается характерной аккумуляцией определенных компонентов секрета в конкретных областях, при этом формируются качественные особенности центральной и периферической зон, что находит свое отражение на результатах иммуногистохимического и ультраструктурного анализа.

В частности, слияние програнулы с поздней эндосомой приводит к формированию в секреторной лизосоме зоны с высокой плотностью аккумулярованного материала, которая ограничена по периферии люминальными везикулами [89] (рис. 1). Последующие этапы созревания гранул приводят к селективной концентрации регуляторных протеинов в центральной области, большая часть которых состоит из протеогликанов. Сформированное «ядро» гранулы является ареной многочисленных биохимических и пространственных преобразований, координирующих в дальнейшем специализированные ультраструктурные и функциональные события секреторной деятельности ТК. Как правило, центр гранулы насыщается комплексом серглицина с гепарином или хондроитинсульфатом [90]. В предыдущих исследованиях мы получили морфологические подтверждения данной закономерности, в частности, меньшие размеры гранул ТК после окрашивания толуидиновым синим по сравнению с иммуногистохимической идентификацией триптазы ТК [91].

Координирующая роль серглицина для интрагранулярного распределения специфических протеаз и других медиаторов связана с его химической структурой, обеспечивающей формирование

электростатических взаимодействий отрицательно заряженных гликозаминогликанов с участками специфических протеаз, обладающих позитивным зарядом [1].

Важным инструментом ТК для качественного и количественного изменения секрета гранул при их созревании и реализации некоторых механизмов секреторных путей является эндосомальный рециркулирующий компартмент [78] (рис. 1). Гранулы ТК могут стать источником формирования протеаза-содержащих экзосом, при этом не исключается включение в них СРАЗ (рис. 1) [92, 93]. По степени зрелости секреторные гранулы можно отнести к трем основным типам [1, 72, 78]. Гранулами I типа, по сути, являются эндосомы или лизосомы с люминальными везикулами. Ультраструктурный анализ свидетельствует о низкой степени уплотненности в них составных компонентов и преобладающее содержание микровезикул [94]. В механизмах объединения «програнул» с эндосомами, приводящих к формированию более крупной органеллы, принимает участие белок Rab5 [95] (рис. 1). Циклы объединения могут многократно повторяться между секреторными гранулами различной степени зрелости, приводя к формированию гранул II типа и сопровождаясь избирательным накоплением некоторых преформированных компонентов секрета в определенном соотношении [94, 95]. Исследования на ультраструктурном уровне выявили ряд отличий строения секреторных гранул I и II типов, в том числе образование в последних электронноплотного ядра, вокруг которого аккумулируются мультивезикулярные тельца [72, 94]. Среди посредников Rab5-ассоциированного слияния секреторных гранул необходимо учитывать мембранный протеин VAMP8, который принимает участие в определении итоговых размеров гранул [96].

Скорость созревания до формата III типа может существенно различаться [68]. В соответствии с требуемой интенсивностью биогенеза в гранулах с характерной интрагранулярной укладкой аккумулируются протеогликаны, преформированные компоненты секрета и другие медиаторы. Созревшие гранулы III типа обладают наиболее круп-

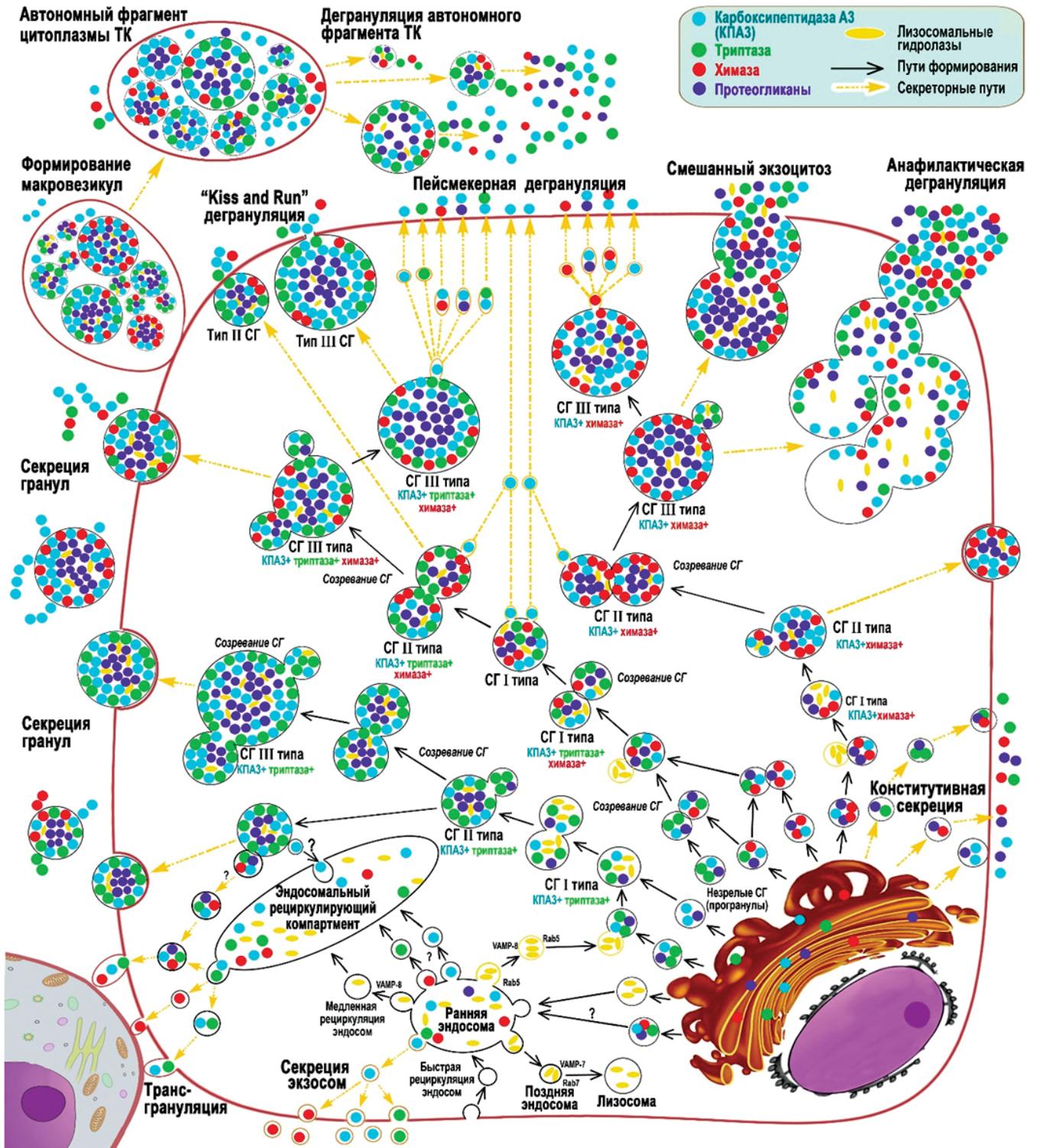


Рис. 1. Основные этапы биогенеза и секреторных путей карбоксипептидазы А3 (CPA3) тучных клеток с учетом цитотопографии, внутригранулярной локализации и секреторных механизмов. (адаптировано по Atiakshin DA с соавт., 2021)

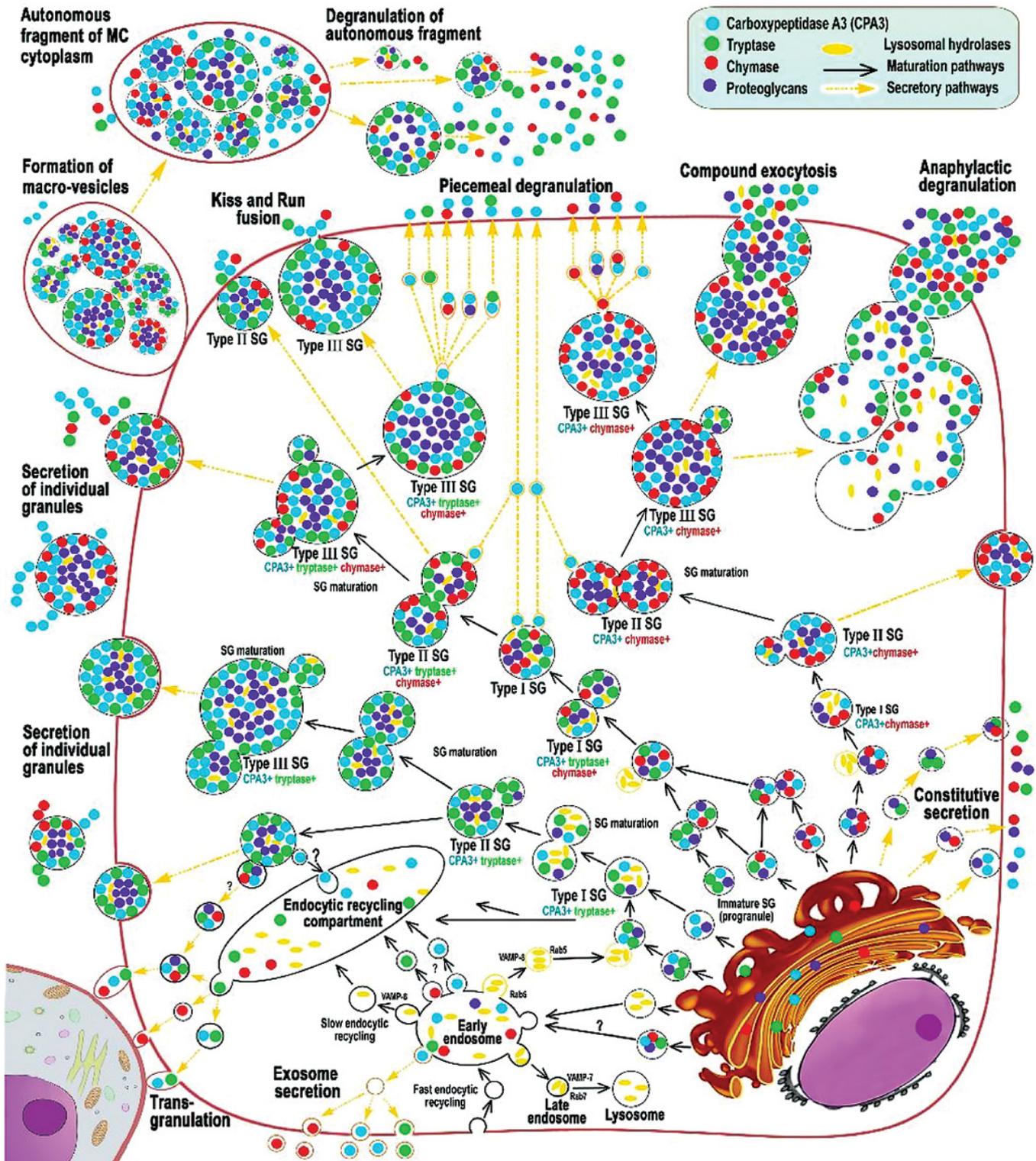


Fig.1. The main stages of biogenesis and secretory pathways of mast cell carboxypeptidase A3 (CPA3) in terms of cytotopography, intragranular localization and secretory SG mechanisms (adapted from Atiakshin DA et al., 2021)

ными размерами, и при некоторых патологических состояниях могут достигать размера 1 мкм и более. Следует учитывать, что общая совокупность гранул с особенностями содержания медиаторов создают в определенном смысле неповторимый индивидуальный секреторный фенотип каждой ТК. Кроме того, зрелые гранулы сохраняют способность к динамичному изменению своего состава и, возможно, объема. В частности, процессы включения ряда медиаторов в состав гранулы или, наоборот, секреции сопряжены друг с другом. В некоторых из них принимает участие протеин синаптотегмин III, опосредующий селективный обмен и направленный транспорт некоторых компонентов секрета между эндосомальным рециркулирующим компартментом и секреторными гранулами [97]. В результате зрелые гранулы ТК могут накапливать арсенал специфических протеаз в тесной взаимосвязи с другими медиаторами (рис. 1). Поступление гистамина и серотонина в гранулы происходит с использованием системы везикулярного транспорта моноаминов. При этом повышение уровня гистамина в гранулах коррелирует с возрастанием концентрации специфических протеаз, что позволяет предположить различные механизмы данного биогенного амина в биогенезе триптазы, химазы и СРАЗ [76, 98]. На конечных этапах созревания секреторных гранул становится различимой преимущественная периферическая локализация СРАЗ, особенно в случае достижения ими крупных размеров гранул (рис. 2, 3).

При этом важной интрагранулярной особенностью СРАЗ по сравнению с другими специфическими протеазами ТК является более центральное расположение, внутри от локусов аккумуляции триптазы и химазы (рис. 3).

Некоторые компоненты секреторных гранул могут поступать в ТК из внеклеточного матрикса, в том числе фактор некроза опухолей, главный щелочной протеин эозинофилов, гистамин и др. [99–101]. При этом дискуссионным остается вопрос о функциональном значении данного явления по отношению к состоянию специфического тканевого микроокружения.

При наличии молекулярных сигналов для активации секреторных путей СРАЗ, особенно, в случае присутствия секреторных стимулов на протяжении длительного времени при хронизации патобиологических процессов, образование гранул интенсифицируется и сопровождается более активным формированием в КГ «програнул» с дальнейшими этапами созревания [13, 61, 74, 102, 103]. Подобно другим специфическим протеазам ТК, СРАЗ хранится в секреторных гранулах в активной форме. Это было показано для зрелых ТК в то время как в менее дифференцированных ТК костного мозга выявляли про-СРАЗ с сохраненным активационным пептидом, которая может доминировать над активной формой фермента [79, 88]. Низкая ферментативная активность время интрагранулярного хранения обеспечивается кислой средой гранул (рН 5,5), в то время как оптимальный рН для деятельности СРАЗ находится в диапазоне рН от 7 до 9.

Локализация карбоксипептидазы АЗ в гранулах отражается на их гомеостазе. Эксперименты на мышках с нокаутированным геном СРАЗ показали изменение гистохимических свойств тучных клеток, снижение эффекта метакромазии при отсутствии ультрамикроскопических изменений, а также тесную взаимосвязь содержания СРАЗ с другой специфической протеазой — Mouse Mast Cell Protease-5 (mMCP-5), являющейся аналогом химазы человека [104, 105]. При этом повышение содержания в тучных клетках СРАЗ сопровождалось возрастанием уровня mMCP-5, а недостаток mMCP-5 приводил к неспособности накопления в гранулах СРАЗ [85].

Фундаментальные исследования Dvorak AM позволили ей и коллегам приблизиться к пониманию физиологического значения локализации РНК в матриксе гранул [67, 106–108]. Благодаря полученным данным функция накопления, хранения и секреции медиаторов секреторных гранул тучных клеток, включая СРАЗ, была дополнена возможностью автономного биогенеза некоторых компонентов секрета. Данные процессы в секреторных гранулах могут происходить как внутриклеточно, так,

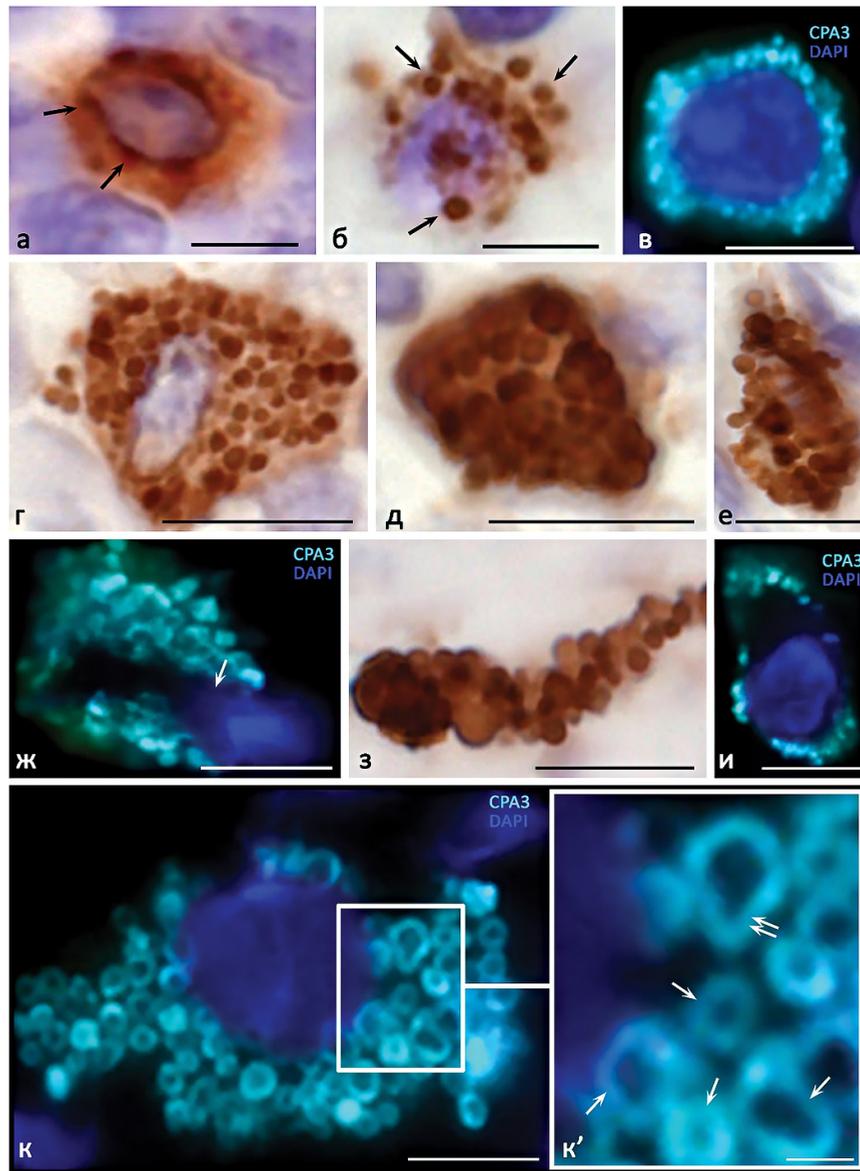


Рис. 2. Цитотопография и морфологические признаки биогенеза CPA3 ТК: (а) – тонзилла, начальные стадии интрагранулярной укладки CPA3 ТК; (б) - желудок, образование нескольких CPA3+гранул в ТК, свободно расположенных в цитоплазме; (в, г, д, е) - меланома кожи, различные варианты расположения CPA3+гранулами в цитоплазме; ж, з - меланома кожи, денуклеация ядра ТК; (з, и) - кожа, преимущественная периферическая локализация секреторных гранул в цитоплазме ТК; (к) - меланома кожи, общий вид тучной клетки, заполненной зрелыми CPA3-позитивными гранулами, протеаза расположена на периферии гранулы (указано стрелкой), происходит процесс гетеротипического слияния гранул, приводящий к увеличению итогового размера формирующейся структуры (двойная стрелка); масштабная шкала: к – 1 мкм; остальные – 5 мкм

Fig. 2. Cytophotography and morphological features of MC CPA3 biogenesis: (a) tonsillar, the initial stages of intragranular stacking of CPA3 MC; (б) stomach, formation of several CPA3+ granules in MC, freely located in the; (в, г, д, е) - skin melanoma, various options for the CPA3+ granules location in the cytoplasm; (ж, з) - skin melanoma; denucleation of the MC nucleus; (и) – skin, preferential peripheral localization of secretory granules in the MC cytoplasm; (к) - skin melanoma, general view of a mast cell filled with mature CPA3+ granules of an approximately equal size, the protease is located at the periphery of the granule (indicated by an arrow), the process of heterotypic fusion of granules occurs, leading to an increase in the final size of the forming structure (a double arrow); scale: к – 1 μm; the rest - 5 μm

очевидно, и продолжаться после секреции в межклеточный матрикс.

Цитотопографические особенности СРАЗ

Содержание СРАЗ в гранулах и количество СРАЗ⁺ гранул в цитоплазме ТК обладает широкой вариабельностью, от отсутствия или малого содержания до полного заполнения объема клетки (рис. 2–5). Локализация карбоксипептидаз в гранулах ТК убедительно показывается иммуногистохимическими протоколами и может быть использована для характеристики структуры популяции ТК (рис. 2–5) [109]. Технологии мультиплексной иммуногистохимии открывают новые особенности клеточной и интрагранулярной локализации СРАЗ в ТК с другими специфическими протеазами (рис. 2), а также характеристику гистотопографического расположения СРАЗ⁺ ТК в органах (рис. 5). Иммуноморфологическая оценка секреции СРАЗ к селективным мишеням специфического тканевого микроокружения способствует раскрытию ранее неизвестных деталей функционального потенциала экзопептидазы.

Закономерности распределения СРАЗ в гранулах до сих пор являются нераскрытым вопросом. Согласно нашим предположениям фермент образует макромолекулярные комплексы с гликозаминогликанами в гранулах в тесной взаимосвязи с триптазой и химазой. В то же время возможно избирательное взаимодействие СРАЗ с определенными протеогликанами гранул. В частности, такое суждение было сделано при анализе секреторных гранул после дегрануляции ТК, в которых обнаруживалась химаза с СРАЗ, либо только триптаза [46, 47, 53]. В то же время мы показали, что после дегрануляции в СРАЗ⁺ гранулах детектируется и триптаза (рис. 3). Таким образом, фенотип специфических протеаз секретиремых гранул может быть существенно вариабельным в зависимости от состояния специфического микроокружения. Это находит свое подтверждение в работах по иммуноморфологическому исследованию ТК, показавших наличие гранул с различным качественным составом [109]. Имеются данные

о необходимости колокализации СРАЗ с химазой для ее депонирования [17].

Наши результаты показывают, что в независимости от наличия триптазы или химазы СРАЗ может содержаться в гранулах тучных клеток в высоком количестве. В зависимости от уровня биогенеза гранул СРАЗ может занимать центральную область гранул, или быть в виде кольца по периферии (рис. 1–3). В любом случае необходимо отметить, что колокализация МС–СРАЗ в гранулах с другими специфическими протеазами происходит с внутренней стороны гранулы, иногда занимая всю площадь при гранулах небольших размеров (рис. 3).

С точки зрения электронной иммуногистохимии проводилась оценка локализации специфических протеаз в гранулах тучных клеток [110, 111]. ТК мукозной субпопуляции (с экспрессией триптазы) обладали гранулами «свиткоподобного ультраструктурного фенотипа» [112]. В этом случае в гранулах идентифицировались похожие на «свитки» однонаправленные концентрические пластины, в некоторых случаях окружающие «ядро» гранулы [110]. В соединительнотканной субпопуляции ТК с одновременной экспрессией триптазы и химазы гранулы имели специфичный ультраструктурный фенотип с малым количеством свитков и аморфной центральной областью, окруженной параллельными пластиноподобными структурами [112]. В зависимости от степени зрелости, центральная зона таких гранул могла содержать электронно-плотный материал в виде решетки, а также одно или несколько аморфных областей с высокой контрастностью [111]. Вместе с этим известны данные о возможности контурирования электронноплотных образований в различных вариантах, включая, помимо свитков, кристаллы, бусины и нитевидные образования [67, 113]. Очевидно, что данные структуры могут быть обусловлены взаимным расположением СРАЗ с триптазой и химазой, а также другими преформированными компонентами секретомы. В ранее выполненных работах показано принципиальная возможность солокализации СРАЗ с химазой, триптазой и катепсином G [112].

В линии мышей с нокаутом гена СРАЗ дефекты гранул не были выявлены на ультраструктурном уровне, однако наблюдалась повышенная растворимость протеогликанов гранул ТК [104]. Возможно, что отсутствие СРАЗ приводило к изменению пространственной конфигурации серглицина со специфическими протеазами тучных клеток, и, как следствие, изменению гистохимического окрашивания гранул.

Однако вопрос о молекулярной локализации протеаз в визуализируемых ультраструктурах гранул следует считать открытым, поскольку с момента цитируемых результатов электронномикроскопических исследований к настоящему времени изменилась как техника пробоподготовки, так и технологии микроскопии [114]. Структура гранул будет определяться степенью зрелости, активностью включения компонентов секретома, этапами формирования специфических протеаз, а также интенсивностью секреторных путей, которая будет определяться совокупностью значимых внутриклеточных и экстракеллюлярных сигналов.

Аспекты солокализации СРАЗ с другими компонентами гранул тучных клеток могут быть исчерпывающе охарактеризованы при использовании технологии мультиплексной иммуногистохимии [109]. Наши исследования показали, что протеазы могут находиться как в разных гранулах, так и в одних и тех же, занимая сходные локусы в интрагранулярном матриксе (Рисунок 3). Соотношение тучных клеток с иммунофенотипами СРАЗ⁺Тг⁺Сh⁺, СРАЗ⁺Тг⁺Сh⁻ или СРАЗ⁺Тг⁻Сh⁺ в органоспецифичной популяции и оценка активности секреции СРАЗ имеет важное значение для определения состояния тканевого микроокружения, обладая диагностической значимостью как адаптивных, так и патологических изменений [10, 109, 115]. Кроме того, на уровне отдельно взятой ТК следует учитывать локализацию карбоксипептидаза-позитивных гранул, которые могут располагаться перинуклеарно, заполнять весь объем цитоплазмы с различной степенью плотности расположения либо занимать периферическое положение, локализуясь в периплазмалеммной области (рис. 2). При этом в случае наличия у тучной клетки

вытянутой цитоплазмы ее безъядерная часть может напоминать отросток, в котором также сохраняется периферическая локализация гранул. Данная закономерность была обнаружена и в ТК при мастоцитозе [109]. Дальнейшее исследование молекулярной морфологии интрагранулярной солокализации СРАЗ с другими компонентами секретома с большой долей вероятности может привести к верификации новых диагностических маркеров, включая социально значимые заболевания.

Можно предположить, что СРАЗ необходима для биогенеза как триптазы, так и химазы тучных клеток. В то же время нет уверенности в том, что иммуногистохимическое окрашивание учитывает весь объем популяции тучных клеток в органе. В частности, в экспериментах на крысах с помощью комбинированного гистохимического протокола мы показали, что по признаку метакромазии может выявляться большее количество тучных клеток в коже. Это позволяет считать, что общий пул ТК в органе может ускользать от внимания исследователей, если они опираются только на содержание одной из специфических протеаз [91].

Особенностью, которая отличает СРАЗ от ферментативных аналогов карбоксипептидаз в поджелудочной железе, является высокое содержание положительно заряженных аминокислотных остатков. Это может опосредовать взаимодействия СРАЗ с отрицательно заряженными протеогликанами серглицина в комплексе с гепарином или хондроитин-сульфатом, которые в большом количестве присутствуют в секреторных гранулах ТК [116]. Была показана высокая афинность связи СРАЗ с гепарином, при этом имеются данные об отличии комплексов гепарина с СРАЗ и химазой от гепарин-триптазных комплексов [110, 117]. Кроме того, возможно, что после дегрануляции химаза и СРАЗ некоторое время могут удерживаться на поверхности ТК [118].

Четкие доказательства необходимости гепарина в регулировании накопления и хранения СРАЗ были получены после экспериментов по инактивации гена ключевого фермента в биосинтезе гепарина — N-деацетилазы/N-сульфотрансферазы-2 [119,

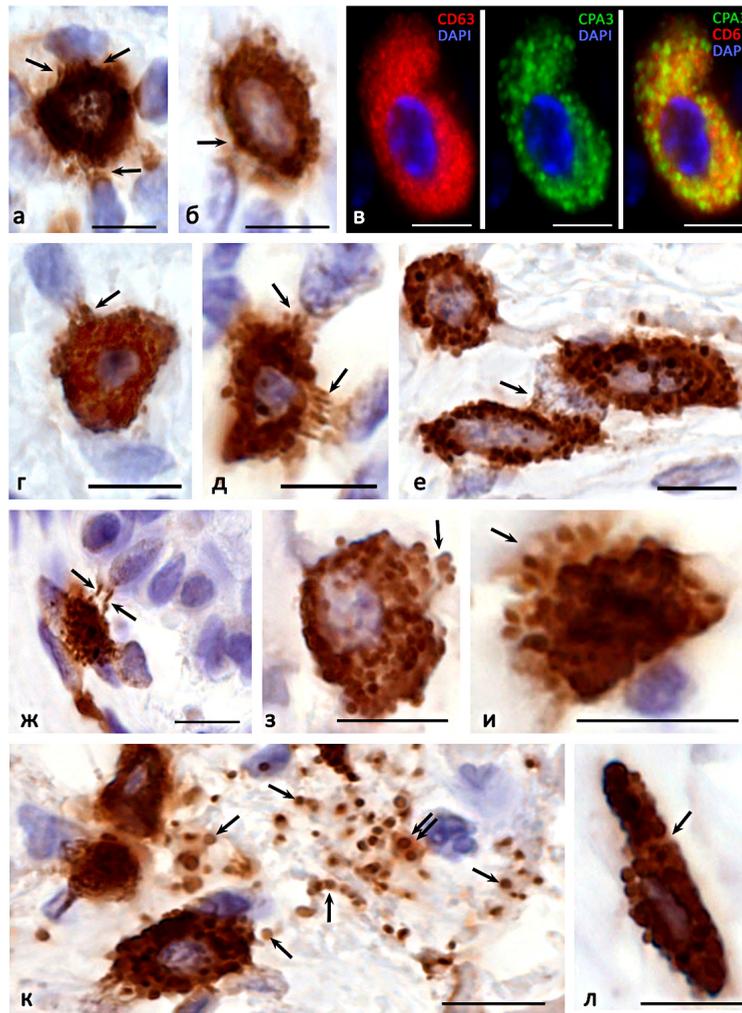


Рис. 4. . Морфологические эквиваленты секреторных путей CPA3-позитивных тучных клеток: (а, б) – тонзилла, смешанный экзоцитоз CPA3 с вероятным участием пейсмекерной дегрануляции; (в) - меланома кожи, высокое содержание экзосом в CPA3+ тучной клетке; (г-д) – тонзилла, морфологические эквиваленты направленной секреции CPA3 к соседним клеткам механизмом экзоцитоза; (е, ж) – кожа, совместный экзоцитоз двух ТК CPA3+ секреторного материала по направлению ядра фибробласта (указано стрелкой) и коллагеновых волокон (двойная стрелка); (з-и) – тонзилла, начальная (з) и последующая (и) стадии дегрануляции тучных клеток механизмом экзоцитоза (указано стрелкой); (к-л) - кожа, активный экзоцитоз секреторных гранул во внеклеточный матрикс с формированием локусов тканевого микроокружения с высоким содержанием CPA3+ гранул (указано стрелкой), морфологические эквиваленты отшнуровки макровезикулы от материнской CPA3+ ТК (указано стрелкой)

Fig. 4. Morphological equivalents of secretory pathways of CPA3-positive mast cells: (a, б) -tonsilla. Mixed exocytosis of CPA3 with probable involvement of pacemaker degranulation; (в) - skin melanoma, high content of exosomes in CPA3+ mast cell; (г-д) – tonsillar, morphological equivalents of CPA3 directed secretion to neighboring cells by the mechanism of exocytosis; (е, ж) – skin, co-exocytosis of two CPA3+ MC of the secretory material in the direction of the fibroblast nucleus (indicated by an arrow) and collagen fibers (a double arrow); (з-и) – tonsillar, the initial (з) and subsequent (и) stages of mast cell degranulation by the mechanism of exocytosis (indicated by an arrow); (к-л) – skin, active exocytosis of secretory granules into the extracellular matrix with the formation of tissue microenvironment loci with a high content of CPA3+ granules (indicated by an arrow), morphological equivalents of the macrovesicle detachment from the maternal CPA3+ MC (indicated by an arrow)

120]. У таких животных практически полностью отсутствовал белок СРАЗ, несмотря на поддержание высокого уровня соответствующей мРНК. Показано важное значение гепарина и серглицина для хранения СРАЗ [79, 81, 120].

Секреторные пути СРАЗ

Можно предположить, что хранение СРАЗ в активной форме, готовой для реализации физиологических эффектов, позволяет ТК практически моментально использовать ее ферментативный потенциал при различных способах секреции, включая пейсмерную дегрануляцию, механизм «kiss-and-run», смешанный экзоцитоз и др. (см. рис. 1, 4). При высвобождении СРАЗ из интрагранулярных локусов хранения в экстрацеллюлярный матрикс сохранение ее биологической активности может зависеть от связей с гепарином, защищающим от действия эндогенных ингибиторов. Очевидно, что способы секреции СРАЗ во внеклеточный матрикс определяют особенности ее биологических эффектов на структуры и клетки тканевого микроокружения. При необходимости поддержания определенных концентраций СРАЗ во внеклеточном матриксе ее определенный уровень может создаваться фоновой секрецией протеазы с помощью постепенной (или пейсмерной) дегрануляции ТК (см. рис. 1).

Активность пейсмерной секреции определяется существующими в настоящий момент стимулами во внеклеточной среде для достижения определенных фоновых значений СРАЗ во внеклеточной среде. Безусловно, эти значения гораздо ниже по сравнению с уровнями, необходимыми для реализации врожденного иммунитета, однако, очевидно, они вносят свой вклад в формирование общей резистентности организма по отношению к некоторым вызовам. Механизмы «челночной» секреции связаны с процессами обособления от материнской гранулы микровезикул, размер которых составляет от 30 до 150 нм [121]. Микровезикулы могут содержать небольшие количества протеаз, протеогликанов и других медиаторов, предназначенных для секреции за пределы материнской ТК для селективных эффектов на компоненты специфического

тканевого микроокружения. Показано, что в механизмах пейсмерной дегрануляции ключевое значение выполняют везикулярные белки (v-SNARE) и белки принимающей органеллы (t-SNARE), обеспечивающие транспорт микровезикул в цитоплазме ТК, а также слияние с другими мембранными органеллами или плазматической мембраной [122]. Несмотря на то, что интенсивность постепенной дегрануляции с вовлечением СРАЗ может меняться в соответствии с существующими потребностями тканевого микроокружения [70, 78; 123], в первую очередь данный секреторный путь используется для организации выведения в экстрацеллюлярный матрикс небольших количеств СРАЗ (рис. 1, 4 а, б). Кроме того, функциональный потенциал пейсмерной дегрануляции используется в обеспечении взаимодействия ТК внутри органоспецифичной популяции, и в некоторых случаях ассоциирован с развитием патологии, в том числе аллергии, воспалении, онкогенезе и др. [70].

Секреция СРАЗ с помощью пейсмерной дегрануляции может быть превалирующим механизмом в тучных клетках. При этом отсутствие СРАЗ в гранулах может вызвать ошибочное представление об уровне экспрессии данной протеазы в тучной клетке. Подобное мнение выражают авторы о биогенезе СРАЗ в тучных клетках легких, в которых секреция СРАЗ предположительно происходила без хранения в гранулах [20]. Секреторные пути предварительно сформированных компонентов секретора тучных клеток с помощью не-IgE-опосредованных механизмов широко используются тучными клетками в ответ на воздействие инфекционных агентов, токсинов, гормонов, аларминов, а также при изменении параметров интегративно-буферной метаболической среды тканевого микроокружения [2].

Другим вариантом секреторных путей медиаторов ТК является механизм «kiss-and-run» [78] (рис. 1). В некоторых исследованиях была показана высокая частота использования данного механизма для секреции [124]. При этом секреторная гранула ТК локализуется в периплазматической области, соприкасается с плазматической мембраной, и образует временную пору. В этот момент через

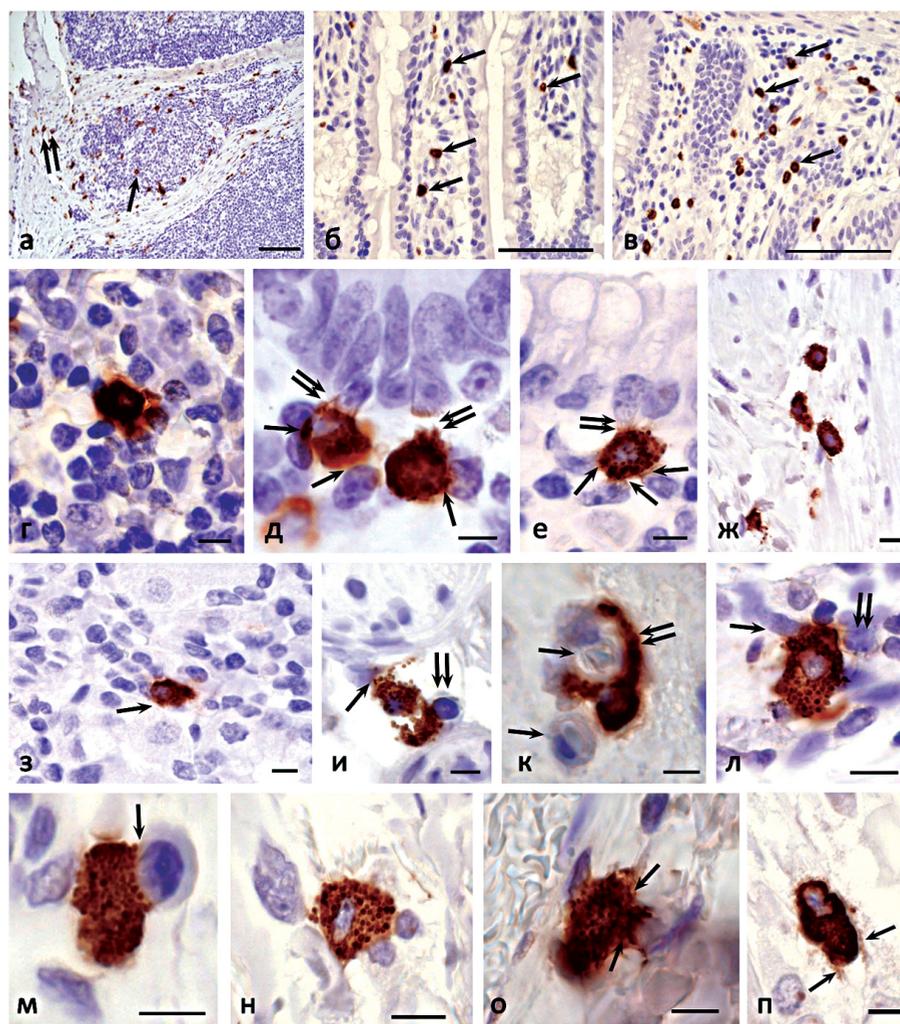


Рис. 5. Гистотопографические особенности распределения CPA3+ тучных клеток в органах: (а) – тонзилла, локализация CPA3+ ТК в лимфоидной ткани (указано стрелкой) и строме (указано двойной стрелкой); (б, в) – тощая кишка, распределение ТК в строме ворсин (б – указано стрелкой) и межкрипальной строме собственной пластинки слизистой оболочки (в – указано стрелкой); (г) – тонзилла, ТК в тяжах лимфоидной ткани; (д) – тощая кишка, взаимодействие ТК с покровным эпителием собственной пластинки слизистой оболочки; (е-и) – желудок, солокализация ТК с покровным эпителием слизистой оболочки (е), гладкими миоцитами в мышечном слое (ж), железистым эпителием собственной пластинки слизистой оболочки (з), периневрием подслизистой оболочки (и); (к, л) – кожа, капилляры в дерме кожи (указаны стрелкой) и CPA3+ ТК, окружающая один из них (указано стрелкой), (к) – солокализация ТК со стромальными клетками, очевидно, что CPA3+ ТК может воздействовать на несколько клеток одновременно, включая фибробласт (обозначен стрелкой) и иммунокомпетентную клетку (указано двойной стрелкой); (м) – тощая кишка, взаимодействие CPA3+ тучной клетки с активированным лимфоцитом (указано стрелкой); (н-п) – меланома кожи, солокализация ТК с фибробластом (н), волокнистым компонентом (о), и аморфным компонентом внеклеточного матрикса; масштаб: а-в – 100 мкм, остальные – 5 мкм

Fig. 5. Histotopographic features of the CPA3+ mast cell distribution in organs: (a) – tonsillar, localization of CPA3+ MC in lymphoid tissue (indicated by an arrow) and stroma (indicated by a double arrow); (б, в) – Jejunum, distribution of MC in the stroma of villi (б – indicated by an arrow) and the intercryptal stroma of the lamina propria (в – indicated by an arrow); (г) – tonsilla, MC in the cords of the lymphoid tissue; (д) – jejunum, MC interaction with the integumentary epithelium of the proper mucosal plastics; (е-и) – Stomach, MC co-localization with the integumentary epithelium of the mucous membrane (е), smooth myocytes in the muscle layer (ж), glandular epithelium of the lamina propria (з), perineuria of the submucosa (и); (к, л) – skin, capillaries in the skin dermis (indicated by an arrow) and CPA3+ MC surrounding one of them (indicated by an arrow) (к), MC co-localization with stromal cells, it is obvious that CPA3+ MC can affect several cells simultaneously including fibroblast (indicated by an arrow) and an immunocompetent cell (indicated by a double arrow); (м) – jejunum, interaction of CPA3+ mast cell with an activated lymphocyte (indicated by an arrow). (н-п) Skin melanoma. MC co-localization with fibroblast (н), fibrous component (о), and an amorphous component of the extracellular matrix; scale: а-в – 100 μm, the rest - 5 μm

соустье с межклеточным матриксом возможна секреция протеаз и других медиаторов, которые могут оказывать свои физиологические эффекты в месте дегрануляции, при этом ресурс медиаторов секреторной гранулы сохраняется. Вероятно, что при таком способе дегрануляции возможно более интенсивное выведение СРАЗ за единицу времени.

Имеются морфологические свидетельства о возможности использования в секреторных путях СРАЗ ТК молекулярного механизма трансгрануляции (рис. 1). При солокализации с другими клетками в прилегающем локусе плазматической мембраны ТК формируются микровыпячивания, контактирующие с плазмалеммой другой клетки. Описана трансгрануляция между ТК и фибробластами, эндотелием капилляров и нейронами [70]. Можно интерпретировать индуктивное влияние СРАЗ при прилегании ТК к другим клеткам и внеклеточным структурам специфического тканевого микроокружения, включая иммунокомпетентные клетки, эпителии, представителей фибробластического дифферона, коллагеновые волокна и т.д. [125] (рис. 5).

Формирование экзосом представляет собой важный механизм по реализации биологических эффектов специфических протеаз тучных клеток как в физиологических условиях секреции, так и патологических состояниях активации дегрануляции [70, 92, 93, 126] (рис. 1). Состав продуцируемых экзосом в ТК является пластичным параметром и может существенно изменяться в зависимости от конститутивной секреции или стимулированной дегрануляции, вызванной различными причинами [93, 101]. В экзосомах могут содержаться различные виды РНК, включая мРНК и микро-РНК, фактор некроза опухоли альфа и другие компоненты секретора, которые могут подвергаться трансферу в другие ТК, а также в другие иммунокомпетентные и стромальные клетки в зоне паракринного влияния, оказывая специфические эффекты на процессы развития, миграции и биосинтеза цитокинов, хемокинов и факторов роста [126]. Возможность либерализации СРАЗ из ТК в составе экзосом существенно расширяет регуляторный потенциал протеазы по отношению к клеточным и неклеточным

компонентам специфического тканевого микроокружения [93]. В силу известных комплексов химазы с СРАЗ вполне возможна секреция последней с помощью экзосом. Различная степень вовлеченности экзосомального механизма в секреторные пути СРАЗ ТК подтверждается результатами мультиплексного иммуногистохимического окрашивания (рис. 4в).

В некоторых случаях для интенсификации поступления СРАЗ ТК во внеклеточный матрикс могут быть использованы механизмы секреции отдельных гранул или отдельных фрагментов цитоплазмы ТК — «макровезикул» (рис. 4 г-л) [70; 82, 83, 127]. Данные способы секреторной деятельности ТК приводят к формированию обособленных структур, обладающих свойствами автономии и тем самым представлять собой вариант расширения реализации потенциальных эффектов ТК на расстоянии, значительно превышающим область распространения паракринных эффектов. В ряде случаев становится очевидной направленная секреция СРАЗ в направлении ядерных структур других клеток (рис. 4 г-ж). Исследование СРАЗ в данном аспекте представляется особенно интересным после открытия способности триптазы оказывать регуляторные эффекты на гистоны ядер и тем самым влиять на пролиферативную активность клеток [128–130]. Тем более имеются четкие иммуногистохимические доказательства солокализации триптазы и СРАЗ при направленной секреции протеаз к ядрам других клеток (рис. 3а). Однако значение СРАЗ в данном явлении еще предстоит выяснить. Иногда вследствие активной дегрануляции ТК СРАЗ+ секреторные гранулы содержатся в высоком количестве в зонах секреции тканевого микроокружения (рис. 4 е, к). Такой способ секреции, с одной стороны, позволяет не только создавать во внеклеточном матриксе значительные количества СРАЗ ТК в составе гранул или фрагментах цитоплазмы, но и формировать условия пролонгации координирующей деятельности ТК в отношении некоторых структур [67, 131]. Мы наблюдали образование довольно обширных индуктивных полей с высокой концентрацией СРАЗ, в частности, у пациентов с меланомой в коже или в тонзилле при хроническом воспалении (рис. 4 к, л). Ультра-

микроскопические свидетельства присутствия РНК и рибосом в составе секреторных гранул допускают продолжение биосинтетической активности и после выхода из цитоплазмы ТК [106, 107]. По сравнению с отдельными гранулами фрагменты цитоплазмы ТК можно рассматривать как пролонгацию эффекторного действия специфических протеаз [82, 83]. Кроме того, заслуживает внимания возможность активной миграции к таким образованиям других клеток соединительной ткани, например лейкоцитов, для эндоцитоза необходимых компонентов или получения регуляторных эффектов протеазы.

Анафилактическая дегрануляция ТК представляет собой патологический вариант секреции гранул во внеклеточный матрикс, приводящий к массивной и неконтролируемой экстррузии содержимого гранул во внеклеточный матрикс (рис. 1) [78]. При этом взаимодействие IgE с рецепторами FcεRI приводит к процессу форсированного транспорта секреторных гранул к плазмалемме ТК, слиянием с ней и дегрануляции медиаторов, включая специфические протеазы ТК. С помощью SNARE-комплекса, в том числе белков SNAP-23, VAMP-7 и VAMP-8, в процесс дегрануляции вовлекаются в первую очередь гранулы, занимающие периплазмалемное положение, однако в течение короткого в процесс вступают остальные гранулы, что приводит к высвобождению их секреторного пула (рис. 1) [78–132]. Морфологически процесс проявляется потерей интенсивности окрашивания гранул вследствие потери их содержимого, а также формированием крупных цитоплазматических выпячиваний до 1,5 мкм [133]. В цитоплазме ТК можно визуализировать морфологические проявления формирования внутриклеточных магистралей дегрануляции, по которым осуществляется ускоренный транспорт СРАЗ к локусам выведения.

Биологические эффекты

Несмотря на обилие СРАЗ в тучных клетках в настоящее время отмечается дефицит знаний о ее биологических эффектах по сравнению с другими специфическими протеазами тучных

клеток — триптазой и химазой. Наиболее хорошо известно участие СРАЗ во врожденном иммунитете. В частности, показано участие протеазы в защите организма от ядов змей и некоторых токсинов [24, 134–136]. Продуцируемые нематодой *Ascaris* ингибиторы СРАЗ ТК существенно увеличивают выживаемость паразита при инфицировании [137]. ТК являются ключевыми игроками в защите от сосудоуживающего пептида эндотелина 1 (ЕТ-1), который играет важную патогенетическую роль при сепсисе, кожном зуде, развитии фиброза и др. [24, 138–141]. Кроме того, ограничивая биологические эффекты ЕТ-1 с помощью СРАЗ, ТК оказывают важные эффекты на состояние легочной паренхимы и системный кровоток [138, 142].

Также было показано, что СРАЗ ТК опосредованно обладает вазодилаторными и бронходилаторными эффектами благодаря способности к трансформации лейкотриена С₄ в лейкотриен F₄ и тем самым снижения вероятности образования лейкотриенов D₄ и E₄ с более мощными бронхо- и сосудоуживающим эффектами [143].

Известно, что СРАЗ может расщеплять нейротензин, кинетензин, нейромедин N и ангиотензин I [23, 25, 134, 144, 145]. Дегградация сарафотоксина, нейротензина и ЕТ-1 приводит к потере их биологической активности, тогда как дегградация аполилопротеина В может способствовать слиянию липопротеинов низкой плотности и, таким образом, образованию атеросклеротических бляшек [146, 147, 148]. Недостаток СРАЗ в плазме крови был отмечен как фактор риска для развития заболеваний сердечно-сосудистой системы, включая элементы микроциркуляторного русла [34].

Функциональное значение комплекса СРАЗ с химазой неоднократно рассматривалось, в том числе в аспекте более эффективной дегградации субстрата при солокализация протеаз [17, 139, 148]. Кроме того, химаза и СРАЗ могут также взаимодействовать в ферментативном расщеплении ангиотензина II [23], при котором каждый из ферментов обладает своей каталитической активностью по отношению к конкретным субстратным белкам.

Достаточно тесная морфологическая солокализация химазы и СРАЗ может сохраняться после дегрануляции ТК и принимать участие в конвейерном расщеплении белков или других пептидных мишеней внеклеточного матрикса, требующих одновременного присутствия эндо- и экзопептидаз. Предполагается важное значение СРАЗ в биогенезе волокнистого компонента внеклеточного матрикса и ремоделировании внеклеточного матрикса. С одной стороны, комплекс СРАЗ-химаза может индуцировать возрастание митотической активности фибробластов вместе с их биосинтетическим потенциалом [149]. С другой стороны, данный комплекс или протеазы по отдельности могут принимать участие в модификации молекул проколлагена, индуцируя образование коллагеновых фибрилл [15, 150]. Проведенные исследования свидетельствуют об активном участии ТК в механизмах фибриллогенеза, которое проявляется индуктивным влиянием на образование волокнистого компонента тканевого микроокружения, прежде всего рядом с клеточными представителями фибробластического дифферона [125] (рис. 5 д, е, л, н). Также в непосредственной близости к плазмалемме ТК показано наличие ретикулярных волокон или точек инициации фибриллогенеза [125]. Данные аспекты косвенно подтверждаются исследованиями по моделированию спаечных процессов в брюшной полости на лабораторных животных, а также в исследовании легких, подверженных хроническому воспалению или фиброзу, и почках [20, 25, 151].

Недавно были показаны эпигенетические эффекты триптазы благодаря влиянию на состояние гистонов ядра и стабилизацию ДНК [128–130]. Тесная солокализация СРАЗ с триптазой создает определенный интерес к степени вовлеченности экзопептидазы в данные эффекты (рис. 3).

У мышей линии $\text{Cra3}^{\text{Cre+}}$ с дефицитом СРА в ТК было обнаружено неполноценное восстановление костной ткани, обусловленное уменьшением численности интраорганный популяции ТК, задержкой ревааскуляризации, накопления и минерализации межклеточного вещества новообразованного оссеоида, а также изменением активности остеокластов

и макрофагов [30]. Детекция изменения экспрессии СРАЗ при многих заболеваниях подчеркивает существование многих других точек приложения протеазы, исследования которых в будущем поможет идентифицировать новые молекулярные мишени таргетной терапии для повышения эффективности лечения [33, 36, 37, 152–154].

Заключение

Показанные особенности процессинга, аккумуляции и секреторных путей СРАЗ вместе с фактами обильного содержания в ТК позволяют считать данную протеазу важной характеристикой протеазного фенотипа ТК и одним из ключевых компонентов органоспецифических характеристик их популяции. Особенности внутриклеточной солокализации СРАЗ с другими специфическими протеазами тучных клеток, а также пространственное распределение CRA3^+ тучных клеток в ткани с установлением закономерностей их солокализации с иммунокомпетентными и стромальными клетками формируют новые представления о фундаментальных механизмах регуляции состояния интегративно-буферной метаболической среды и внеклеточного матрикса. В то же время очевидно, что наши знания о биологических эффектах данной протеазы по сравнению с триптазой и химазой существенно ограничены. Будущие исследования прольют свет на механизмы вовлеченности СРАЗ в патогенез различных заболеваний, и что особенно важно, механизмы их зарождения на уровне специфического тканевого микроокружения. СРАЗ является перспективной мишенью в трансляционной медицине, как с точки зрения диагностического значения, так и в качестве потенциальной мишени таргетной терапии.

Библиографический список/ References

1. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):478–494.
2. Redegeld FA, Kumari S, Charles N, Blank U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev*. 2018;282(1):87–113.
3. Aponte-López A, Muñoz-Cruz S. Mast Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1273:159–173. doi: 10.1007/978-3-030-49270-0_9

4. Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(3):342—365. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2
5. Kolkhir P, Elieh-Ali-Komi D, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Understanding human mast cells: lesson from therapies for allergic and non-allergic diseases. *Nat Rev Immunol.* 2021. doi: 10.1038/s41577-021-00622-y
6. Elieh Ali Komi D, Kuebler WM. Significance of Mast Cell Formed Extracellular Traps in Microbial Defense. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2021;22:1—20. doi: 10.1007/s12016-021-08861-6
7. Dahlin JS, Maurer M, Metcalfe DD, Pejler G, Sagi-Eisenberg R, Nilsson G. The ingenious mast cell: Contemporary insights into mast cell behavior and function. *Allergy.* 2021;77(16):83—99. doi: 10.1111/all.14881
8. Paivandy A, Pejler G. Novel Strategies to Target Mast Cells in Disease. *J Innate Immun.* 2021;13(3):131—147. doi: 10.1159/000513582
9. Ribatti D, Annese T, Tamma R. Controversial role of mast cells in breast cancer tumor progression and angiogenesis. *Clin Breast Cancer.* 2021; S:1526—8209. doi: 10.1016/j.clbc.2021.08.010
10. Crivellato E, Travan L, Ribatti D. The Phylogenetic Profile of Mast Cells. Mast Cells: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology.* 2015;1220:11—27.
11. Ribatti D. The development of human mast cells. An historical reappraisal. *Exp. Cell Res.* 2016; 342:210—215.
12. Valent P, Akin C, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Hermine O, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, George TI, Kluin-Nelemans HC, Ustun C, Triggiani M, Brockow K, Gotlib J, Orfao A, Kovanen PT, Hadzijusufovic E, Sadvnik I, Horny HP, Arock M, Schwartz LB, Austen KF, Metcalfe DD, Galli SJ. Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics.* 2020;10(23):10743—10768. doi: 10.7150/thno.46719
13. Galli SJ, Tsai M, Marichal T, Tchougounova E, Reber LL, Pejler G. Approaches for analyzing the roles of mast cells and their proteases in vivo. *Adv Immunol.* 2015;126:45—127.
14. Mukai K, Mindy Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews.* 2018;282:121—150.
15. Pejler G, Åbrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases *Adv Immunol.* 2007;95:167—255.
16. Pejler G, Rönnerberg E, Waern I, Wernersson S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood.* 2010;115(24):4981—4990.
17. Pejler G, Knight SD, Henningsson F, Wernersson S. Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A. *Trends Immunol.* 2009;30(8):401—8. doi: 10.1016/j.it.2009.04.008
18. Grujic M, Paivandy A, Gustafson AM, Thomsen AR, Öhrvik H, Pejler G. The combined action of mast cell chymase, tryptase and carboxypeptidase A3 protects against melanoma colonization of the lung. *Oncotarget.* 2017;8(15):25066—25079. doi: 10.18632/oncotarget.15339
19. Grujic M, Hellman L, Gustafson AM, Akula S, Melo FR, Pejler G. Protective role of mouse mast cell tryptase Mcpt6 in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020;33(4):579—590. doi: 10.1111/pcmr.12859
20. Siddhuraj P, Clausson CM, Sanden C, Alyamani M, Kadivar M, Marsal J, Wallengren J, Bjermer L, Erjefält JS. Lung Mast Cells Have a High Constitutive Expression of Carboxypeptidase A3 mRNA That Is Independent from Granule-Stored CPA3. *Cells.* 2021;10(2):309. doi: 10.3390/cells10020309
21. Akula S, Hellman L, Avilés FX, Wernersson S. Analysis of the mast cell expressed carboxypeptidase A3 and its structural and evolutionary relationship to other vertebrate carboxypeptidases. *Dev Comp Immunol.* 2021;127:104273. doi: 10.1016/j.dci.2021.104273
22. Lundequist A, Tchougounova E, Åbrink M, Pejler G. Cooperation between Mast Cell Carboxypeptidase A and the Chymase Mouse Mast Cell Protease 4 in the Formation and Degradation of Angiotensin II. *J. Biol. Chem.* 2004;279:32339—32344.
23. Schneider LA, Schlenner SM, Feyerabend TB, Wunderlin M, Rodewald HR. Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *J Exp Med.* 2007;204(11):2629—39. doi: 10.1084/jem.20071262
24. Scanduzzi L, Beghdadi W, Daugas E, Åbrink M, Tiwari N, Brochetta C, Claver J, Arouche N, Zang X, Pretolani M, et al. Mouse Mast Cell Protease-4 Deteriorates Renal Function by Contributing to Inflammation and Fibrosis in Immune Complex-Mediated Glomerulonephritis. *J. Immunol.* 2010;185:624—633.
25. Tanco S, Lorenzo J, Garcia-Pardo J, Degroove S, Martens L, Aviles FX, Gevaert K, Van Damme P. Proteome-derived peptide libraries to study the substrate specificity profiles of carboxypeptidases. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(8):2096—110. doi: 10.1074/mcp.M112.023234
26. Xing D, Zhang R, Li S, Huang P, Luo C, Hei Z, Xia Z, Gan X. Pivotal role of mast cell carboxypeptidase A in mediating protection against small intestinal ischemia-reperfusion injury in rats after ischemic preconditioning. *J Surg Res.* 2014;192(1):177—86. doi: 10.1016/j.jss.2014.05.050
27. Sverrild A, Bergqvist A, Baines KJ, Porsbjerg C, Andersson CK, Thomsen SF, Hoffmann HJ, Gibson P, Erjefalt JS, Backer V. Airway responsiveness to mannitol in asthma is associated with chymase-positive mast cells and eosinophilic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 2016;46:288—297.
28. Kovanen PT, Bot I. Mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease—Activators and actions. *Eur. J. Pharmacol.* 2017;816:37—46.
29. Ramirez-Garcia Luna JL, Chan D, Samberg R, Abou-Rjeil M, Wong TH, Li A, Feyerabend TB, Rodewald HR, Henderson JE, Martineau PA. Defective bone repair in mast cell-deficient Cpa3Cre/+ mice. *PLoS One.* 2017 Mar 28;12(3): e0174396. doi: 10.1371/journal.pone.0174396
30. Dellon ES, Selitsky SR, Genta RM, Lash RH, Parker JS. Gene expression-phenotype associations in adults with eosinophilic esophagitis. *Dig. Liver Dis.* 2018;50:804—811.
31. Sallis BF, Acar U, Hawthorne K, Babcock SJ, Kanagaratham C, Goldsmith JD, Rosen R, Vanderhoof JA, Nurko S, Fiebiger EA. Distinct Esophageal mRNA Pattern Identifies Eosinophilic Esophagitis Patients with Food Impactions. *Front. Immunol.* 2018;9:2059.
32. Fricker M, Gibson PG, Powell H, Simpson JL, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, Jenkins C. A sputum 6-gene signature predicts future exacerbations of poorly controlled asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019;144:51—60.
33. Lewicki Ł, Siebert J, Koliński T, Piekarska K, Reiwier-Gostomska M, Targoński R, Trzonkowski P, Marek-Trzonkowska N. Mast cell derived carboxypeptidase A3 is decreased among patients with advanced coronary artery disease. *Cardiol J.* 2019;26(6):680—686. doi: 10.5603/CJ.a2018.0018

35. Wu B, Tao L, Yang D, Li W, Xu H, He Q. Development of an Immune Infiltration-Related Eight-Gene Prognostic Signature in Colorectal Cancer Microenvironment. *BioMed Res. Int.* 2020;1:1–43.
36. Yan Z, Liu L, Jiao L, Wen X, Liu J, Wang N. Bioinformatics Analysis and Identification of Underlying Biomarkers Potentially Linking Allergic Rhinitis and Asthma. *Med. Sci. Monit.* 2020;26: e924934.
37. Collins MH, Martin LJ, Wen T, Abonia JP, Putnam PE, Mukkada VA, Rothenberg ME. Eosinophilic Esophagitis Histology Remission Score: Significant Relations to Measures of Disease Activity and Symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020;70(5):598–603. doi: 10.1097/MPG.0000000000002637
38. Xu C, Yan S, Guo Y, Qiao L, Ma L, Dou X, Zhang B. Lactobacillus casei ATCC 393 alleviates Enterotoxigenic Escherichia coli K88-induced intestinal barrier dysfunction via TLRs/mast cells pathway. *Life Sci.* 2020;244:117281. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117281.
39. Winter NA, Gibson PG, McDonald VM, Fricker M. Sputum Gene Expression Reveals Dysregulation of Mast Cells and Basophils in Eosinophilic COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2021;16:2165–2179. doi: 10.2147/COPD.S305380
40. Soria-Castro R, Meneses-Preza YG, Rodríguez-López GM, Romero-Ramírez S, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Pérez-Fragoso A, Torres-Ruiz JJ, Gómez-Martín D, Campillo-Navarro M, Álvarez-Jiménez VD, Pérez-Tapia SM, Chávez-Blanco AD, Estrada-Parra S, Maravillas-Montero JL, Chacón-Salinas R. Severe COVID-19 is marked by dysregulated serum levels of carboxypeptidase A3 and serotonin. *J Leukoc Biol.* 2021;110(3):425–431. doi: 10.1002/JLB.4HI0221-087R
41. Pejler G, Abrink M, Wernersson S. Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *Biofactors.* 2009;35(1):61–8. doi: 10.1002/biof.11
42. Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol.* 1987;138(8):2611–5.
43. Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev.* 2007;217:141–54. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00509.x
44. Goldstein SM, Kaempfer CE, Kealey JT, Wintroub BU. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1630–6. doi: 10.1172/JCI114061
45. Reynolds DS, Gurley DS, Austen KF. Cloning and characterization of the novel gene for mast cell carboxypeptidase A. *J Clin Invest.* 1992;89(1):273–82.
46. Everitt MT, Neurath H. Rat peritoneal mast cell carboxypeptidase: localization, purification, and enzymatic properties. *FEBS Lett.* 1980;110:292–296.
47. Goldstein SM, Kaempfer CE, Proud D, Schwartz LB, Irani AM, Wintroub BU. Detection and partial characterization of a human mast cell carboxypeptidase. *J Immunol.* 1987;139(8):2724–9. PMID: 2443571.
48. Cole KR, Kumar S, Trong HL, Woodbury RG, Walsh KA, Neurath H. Rat mast cell carboxypeptidase: amino acid sequence and evidence of enzyme activity within mast cell granules. *Biochemistry.* 1991;30:648–655.
49. Reynolds DS, Gurley DS, Stevens RL, Sugarbaker DJ, Austen KF, Serafin WE. Cloning of cDNAs that encode human mast cell carboxypeptidase A, and comparison of the protein with mouse mast cell carboxypeptidase A and rat pancreatic carboxypeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(23):9480–4. doi: 10.1073/pnas.86.23.9480
50. Reynolds DS, Stevens RL, Gurley DS, Lane WS, Austen KF, Serafin WE. Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem.* 1989;264(33):20094–9.
51. Li L, Li Y, Reddel SW, Cherrian M, Friend DS, Stevens RL, Krilis SA. Identification of basophilic cells that express mast cell granule proteases in the peripheral blood of asthma, allergy, and drug-reactive patients. *J Immunol.* 1998;161(9):5079–86.
52. Lutzelschwab C, Pejler G, Aveskogh M, Hellman L. Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J Exp Med.* 1997;185(1):13–29. doi: 10.1084/jem.185.1.13
53. Serafin WE, Dayton ET, Gravalles PM, Austen KF, L. Stevens R. Carboxypeptidase A in mouse mast cells: identification, characterization, and use as a differentiation marker. *J. Immunol.* 1987;139:3771–3776.
54. Serafin WE, Sullivan TP, Conder GA, Ebrahimi A, Marcham P, Johnson SS, Austen KF, Reynolds DS. Cloning of the cDNA and gene for mouse mast cell protease 4. Demonstration of its late transcription in mast cell subclasses and analysis of its homology to subclass-specific neutral proteases of the mouse and rat. *J Biol Chem.* 1991;266(3):1934–41.
55. MacDonald AJ, Pick J, Bissonnette EY, Befus AD. Rat mucosal mast cells: the cultured bone marrow-derived mast cell is biochemically and functionally analogous to its counterpart in vivo. *Immunology.* 1998;93(4):533–9. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00465.x
56. Weidner N, Austen KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract.* 1993;189(2):156–62. doi: 10.1016/S 0344-0338(11)80086-5
57. Dougherty RH, Sidhu SS, Raman K, Solon M, Solberg OD, Caughey GH, Woodruff PG, Fahy JV. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:1046–1053.
58. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;130:410–420.
59. Abonia JP, Blanchard C, Butz BB, Rainey HF, Collins MH, Stringer KF, Putnam PE, Rothenberg ME. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;126:140–149.
60. Gurish MF, Ghildyal N, McNeil HP, Austen KF, Gillis S, Stevens RL. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *J Exp Med.* 1992;175(4):1003–12. doi: 10.1084/jem.175.4.1003
61. Henningson F, Hergeth S, Cortelius R, Abrink M, Pejler G. A role for serglycin proteoglycan in granular retention and processing of mast cell secretory granule components. *FEBS J.* 2006;273(21):4901–12. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05489.x.
62. Zon LI, Gurish MF, Stevens RL, Mather C, Reynolds DS, Austen KF, Orkin SH. GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J Biol Chem.* 1991;266(34):22948–53.
63. Dobson JT, Seibert J, Teh EM, Da'as S, Fraser RB, Paw BH, Lin TJ, Berman JN. Carboxypeptidase A5 identifies a novel mast

- cell lineage in the zebrafish providing new insight into mast cell fate determination. *Blood*. 2008;112(7):2969—72. doi: 10.1182/blood-2008-03-145011
64. Morii E, Tsujimura T, Jippo T, Hashimoto K, Takebayashi K, Tsujino K, Nomura S, Yamamoto M, Kitamura Y. Regulation of mouse mast cell protease 6 gene expression by transcription factor encoded by the mi locus. *Blood*. 1996;88(7):2488—94.
65. Tchekneva E, Serafin WE. Kirsten sarcoma virus-immortalized mast cell lines. Reversible inhibition of growth by dexamethasone and evidence for the presence of an autocrine growth factor. *J Immunol*. 1994;152:5912—5921.
66. Eklund KK, Humphries DE, Xia Z, Ghildyal N, Friend DS, Gross V, Stevens RL. Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J Immunol*. 1997;158(9):4373—80.
67. Dvorak AM. Ultrastructure of human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):100—5.
68. Hammel I, Lagunoff D, Galli SJ. Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J Cell Mol Med*. 2010 Jul;14(7):1904—16. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01071.x
69. Robida PA, Puzzovio PG, Pahima H, Levi-Schaffer F, Bochner BS. Human eosinophils and mast cells: Birds of a feather flock together. *Immunol Rev*. 2018;282(1):151—167. doi: 10.1111/imr.12638
70. Vukman KV, Försönits A, Oszvald Á, Tóth EÁ, Buzás EI. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;67:65—73.
71. Arvan P, Castle D. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J*. 1998;332(Pt3):593—610. doi: 10.1042/bj3320593
72. Blank U. The mechanisms of exocytosis in mast cells. *Adv Exp Med Biol*. 2011;716:107—22. doi: 10.1007/978-1-4419-9533-9_7.
73. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Apr;9(4):273—84. doi: 10.1038/nrm2378. PMID: 18354421
74. Hammel I, Lagunoff D, Krüger PG. Studies on the growth of mast cells in rats. Changes in granule size between 1 and 6 months. *Lab Invest*. 1988;59(4):549—54.
75. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:483—525. doi: 10.1146/annurev.cb.05.110189.002411
76. Kolset SO, Tveit H. Serglycin—structure and biology. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(7—8):1073—85. doi: 10.1007/s00018-007-7455-6.
77. Rönnberg E, Melo FR, Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(12):950—62. doi: 10.1369/0022155412458927
78. Blank U, Madera-Salcedo IK, Danelli L, Claver J, Tiwari N, Sánchez-Miranda E, Vázquez-Victorio G, Ramírez-Valadez KA, Macías-Silva M, González-Espinosa C. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol*. 2014;5:453.
79. Henningsson F, Ledin J, Lunderius C, Wilén M, Hellman L, Pejler G. Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing. *Biol Chem*. 2002;383(5):793—801. doi: 10.1515/BC.2002.083
80. Murakami M, Karnik SS, Husain A. Human prochymase activation. A novel role for heparin in zymogen processing. *J Biol Chem*. 1995 Feb 3;270(5):2218—23.
81. Abrink M, Grujic M, Pejler G. Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40897—905. doi: 10.1074/jbc.M405856200
82. Atiakshin D, Buchwalow I, SamoiloVA V, Tiemann M. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells. *Histochemistry and Cell Biology*. 2018;149(5) 461—477.
83. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol*. 2019;152(4):253—269. doi: 10.1007/s00418-019-01803-6
84. Springman EB, Dikov MM, Serafin WE. Mast cell procarboxypeptidase A. Molecular modeling and biochemical characterization of its processing within secretory granules. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1300—7. doi: 10.1074/jbc.270.3.1300
85. Henningsson F. Mast cell cathepsins C and S control levels of carboxypeptidase A and the chymase, mouse mast cell protease 5. *Biol. Chem*. 2003;384:1527—1531.
86. Henningsson F. A role for cathepsin E in the processing of mast-cell carboxypeptidase A. *J Cell Sci*. 2005;118:2035—2042.
87. Rath-Wolfson L. An immunocytochemical approach to the demonstration of intracellular processing of mast cell carboxypeptidase. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001 Mar;9(1):81—5.
88. Dikov MM, Springman EB, Yeola S, Serafin WE. Processing of procarboxypeptidase A and other zymogens in murine mast cells. *J Biol Chem*. 1994;269(41):25897—904.
89. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol*. 2012;22(4): R 116—20. doi: 10.1016/j.cub.2012.01.028
90. Blair EA, Castle AM, Castle JD. Proteoglycan sulfation and storage parallels storage of basic secretory proteins in exocrine cells. *Am J Physiol*. 1991;261(5 Pt 1): C 897—905. doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.5.C897
91. Atiakshin DA, Shishkina VV, Gerasimova OA, Meshkova VY, Samodurova NY, Samoilenko TV, Buchwalow IB, SamoiloVA VE, Tiemann M. Combined histochemical approach in assessing tryptase expression in the mast cell population. *Acta Histochem*. 2021;123(4):151711. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151711
92. Kormelink TG, Arkesteijn GJA, van de Lest CHA, Geerts WJC, Goerdal SS, Altelaar MAF, Redegeld FA, Nolte Hoen ENM, Wauben MHM. Mast Cell Degranulation Is Accompanied by the Release of a Selective Subset of Extracellular Vesicles That Contain Mast Cell-Specific Proteases. *J Immunol*. 2016;197:3382—3392.
93. Lecce M, Molfetta R, Milito ND, Santoni A, Paolini R. FcεRI Signaling in the Modulation of Allergic Response: Role of Mast Cell-Derived Exosomes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5464. doi: 10.3390/ijms21155464
94. Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*. 1997;8(12):2631—45. doi: 10.1091/mbc.8.12.2631
95. Azouz NP, Hammel I, Sagi-Eisenberg R. Characterization of mast cell secretory granules and their cell biology. *DNA Cell Biol*. 2014;33(10):647—51. doi: 10.1089/dna.2014.2543
96. Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z, Rivera J, Soranzo MR, Zabucchi G, Hong W, Blank U. VAMP-8

segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood*. 2008;111(7):3665–74. doi: 10.1182/blood-2007-07-103309

97. Grimberg E, Peng Z, Hammel I, Sagi-Eisenberg R. Synaptotagmin III is a critical factor for the formation of the perinuclear endocytic recycling compartment and determination of secretory granules size. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 1):145–54. doi: 10.1242/jcs.00186

98. Nakazawa S, Sakanaka M, Furuta K, Natsuhara M, Takano H, Tsuchiya S, Okuno Y, Ohtsu H, Nishibori M, Thurmond RL, Hirasawa N, Nakayama K, Ichikawa A, Sugimoto Y, Tanaka S. Histamine synthesis is required for granule maturation in murine mast cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):204–14. doi: 10.1002/eji.201343838

99. Rickard A, Lagunoff D. Eosinophil peroxidase accounts for most if not all of the peroxidase activity associated with isolated rat peritoneal mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;103(4):365–9. doi: 10.1159/000236655. PMID: 7510560.

100. Ohtsu H, Kuramasu A, Tanaka S, Terui T, Hirasawa N, Hara M, Makabe-Kobayashi Y, Yamada N, Yanai K, Sakurai E, Okada M, Ohuchi K, Ichikawa A, Nagy A, Watanabe T. Plasma extravasation induced by dietary supplemented histamine in histamine-free mice. *Eur J Immunol*. 2002;32(6):1698–708. doi: 10.1002/1521-4141(200206)32:6<1698::AID-IMMU1698>3.0.CO;2-7.

101. Olszewski MB, Groot AJ, Dastyh J, Knol EF. TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *J Immunol*. 2007;178(9):5701–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5701

102. Duelli A, Rönnerberg E, Waern I, Ringvall M, Kolset SO, Pejler G. Mast cell differentiation and activation is closely linked to expression of genes coding for the serglycin proteoglycan core protein and a distinct set of chondroitin sulfate and heparin sulfotransferases. *J Immunol*. 2009;183(11):7073–83. doi: 10.4049/jimmunol.0900309

103. Moon TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol*. 2014;5:569. doi: 10.3389/fimmu.2014.00569

104. Feyerabend TB, Hausser H, Tietz A, Blum C, Hellman L, Straus AH, Takahashi HK, Morgan ES, Dvorak AM, Fehling HJ, Rodewald HR. Loss of histochemical identity in mast cells lacking carboxypeptidase A. *Mol Cell Biol*. 2005;25(14):6199–210. doi: 10.1128/MCB.25.14.6199-6210.2005

105. Stevens RL, McNeil HP, Wensing LA, Shin K, Wong GW, Hansbro PM, Krilis SA. Experimental Arthritis Is Dependent on Mouse Mast Cell Protease-5. *J Biol Chem*. 2017;292(13):5392–5404. doi: 10.1074/jbc.M116.773416

106. Dvorak AM, Morgan ES, Lichtenstein L, Weller PF, Schleimer RP. RNA is closely associated with human mast cell secretory granules, suggesting a role(s) for granules in synthetic processes. *J Histochem Cytochem*. 2000;48:1–12.

107. Dvorak AM, Morgan ES. Ribosomes and secretory granules in human mast cells: Close associations demonstrated by staining with a chelating agent. *Immunol Rev*. 2001;179:94–101.

108. Dvorak AM. Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(9):1043–70. doi: 10.1369/jhc.5R6647.2005

109. Atiakshin D, Buchwalow I, Horny P, Tiemann M. Protease profile of normal and neoplastic mast cells in the human bone marrow with special emphasis on systemic mastocytosis. *Histochem Cell Biol*. 2021;155(5):561–580. doi: 10.1007/s00418-021-01964-3

110. Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest*. 1988;58(6):682–91.

111. Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of maturing human T and TC mast cells in situ. *Lab Invest*. 1989;60(1):147–57.

112. Weidner N, Austen KF. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of normal mast cells at multiple body sites. *J Invest Dermatol*. 1991;96(3 Suppl):26S-30S. doi: 10.1111/1523-1747.ep12468966

113. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol*. 2004;19(1):259–270.

114. De Boer P, Hoogenboom JP, Giepmans BN. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! *Nat Methods*. 2015;12:503–13.

115. Caughey GH. Mast cell proteases as pharmacological targets. *Eur J Pharmacol*. 2016;778:44–55. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.04.045

116. Schwartz LB. Localization of carboxypeptidase A to the macromolecular heparin proteoglycan-protein complex in secretory granules of rat serosal mast cells. *J Immunol*. 1982;128:1128-1133.

117. Goldstein SM, Leong J, Schwartz LB, Cooke D. Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase. *J Immunol*. 1992;148(8):2475–82.

118. Schwartz LB, Riedel C, Caulfield JP, Wasserman SI, Austen KF. Cell association of complexes of chymase, heparin proteoglycan, and protein after degranulation by rat mast cells. *J Immunol*. 1981;126(6):2071–8.

119. Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellén L. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature*. 1999;400(6746):773–6. doi: 10.1038/23488

120. Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*. 1999;400(6746):769–72. doi: 10.1038/23481

121. Dvorak AM, McLeod RS, Onderdonk A, Monahan-Earley RA, Cullen JB, Antonioli DA, Morgan E, Blair JE, Estrella P, Cisneros RL. Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;99(1):74–83.

122. Xu H, Bin NR, Sugita S. Diverse exocytic pathways for mast cell mediators. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(2):235–247.

123. Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;274(1):778–84.

124. Williams RM, Webb WW. Single granule pH cycling in antigen-induced mast cell secretion. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 21:3839–50.

125. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2020 Jul;154(1):21–40.

126. Veerappan A, Thompson M, Savage AR, Silverman ML, Chan WS, Sung B, Summers B, Montelione KC, Benedict P, Groh B, Vicencio AG, Peinado H, Worgall S, Silver RB. Mast cells and exosomes in hyperoxia-induced neonatal lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(11):L1218–32.

127. Atiakshin D, SamoiloVA V, Buchwalow I, Boecker W, Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(6):683—694.
128. Melo FR, Wallerman O, Paivandy A, Calounova G, Gustafson AM, Sabari BR, Zabucchi G, Allis CD, Pejler G. Tryptase-catalyzed core histone truncation: A novel epigenetic regulatory mechanism in mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(2):474—485.
129. Alanazi S, Grujic M, Lampinen M, Rollman O, Sommerhoff CP, Pejler G, Melo FR. Mast Cell beta-Tryptase Is Enzymatically Stabilized by DNA. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):5065. doi: 10.3390/ijms21145065
130. Alanazi S, Rabelo Melo F and Pejler G Tryptase Regulates the Epigenetic Modification of Core Histones in Mast Cell Leukemia Cells. *Front. Immunol.* 2021;12:804408. doi: 10.3389/fimmu.2021.804408
131. Kunder CA, St John AL, Li G, Leong KW, Berwin B, Staats HF, Abraham SN. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *J Exp Med.* 2009;206(11):2455—67.
132. Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;105:2580—2585.
133. Mulloy B, Lever R Page CP. Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconjugate journal.* 2017;34(3):351—361.
134. Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammel V, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science.* 2006;313(5786):526—30. doi: 10.1126/science.1128877
135. Rivera J. Snake bites and bee stings: the mast cell strikes back. *Nat Med.* 2006;12(9):999—1000. doi: 10.1038/nm0906-999
136. Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, Okada H, Okada N. Absence of procarboxypeptidase R induces complement-mediated lethal inflammation in lipopolysaccharide-primed mice. *J Immunol.* 2004;173(7):4669—74. doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4669
137. Sanglas L, Aviles FX, Huber R, Gomis-Rüth FX, Arolas JL. Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of Ascaris parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1743—7. doi: 10.1073/pnas.0812623106
138. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nat. Cell Biol.* 2004;432:512—516.
139. Pejler G. The emerging role of mast cell proteases in asthma. *Eur Respir J.* 2019;54(4):1900685. doi: 10.1183/13993003.00685-2019
140. Owens EP, Vesey DA, Kassianos AJ, Healy H, Hoy WE, Gobe GC. Biomarkers and the role of mast cells as facilitators of inflammation and fibrosis in chronic kidney disease. *Transl Androl Urol.* 2019;8(Suppl2): S 175-S 183. doi: 10.21037/tau.2018.11.03.
141. Magnúsdóttir EI, Grujic M, Bergman J, Pejler G, Lagerström MC. Mouse connective tissue mast cell proteases tryptase and carboxypeptidase A3 play protective roles in itch induced by endothelin-1. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):123. doi: 10.1186/s12974-020-01795-4
142. Hültner L, Ehrenreich H. Mast cells and endothelin-1: A life-saving biological liaison? *Trends Immunol.* 2005;26:235—238.
143. Reddanna P, Prabhu KS, Whelan J, Reddy CC. Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4. *Arch Biochem Biophys.* 2003;413(2):158—63. doi: 10.1016/s0003-9861(03)00080-8
144. Goldstein SM, Leong J, Bunnett NW. Human mast cell proteases hydrolyze neurotensin, kinetensin and Leu5-enkephalin. *Peptides.* 1991;12(5):995—1000. doi: 10.1016/0196-9781(91)90049-u
145. Bunnett NW, Goldstein SM, Nakazato P. Isolation of a neuropeptide-degrading carboxypeptidase from the human stomach. *Gastroenterology.* 1992;102(1):76—87. doi: 10.1016/0016-5085(92)91786-4
146. Cochrane DE, Carraway RE, Boucher W, Feldberg RS. Rapid degradation of neurotensin by stimulated rat mast cells. *Peptides.* 1991;12(6):1187—94. doi: 10.1016/0196-9781(91)90193-s
147. Piliponsky AM, Chen CC, Nishimura T, Metz M, Rios EJ, Dobner PR, Wada E, Wada K, Zacharias S, Mohanasundaram UM, Faix JD, Abrink M, Pejler G, Pearl RG, Tsai M, Galli SJ. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med.* 2008;14(4):392—8. doi: 10.1038/nm1738
148. Kokkonen JO, Vartiainen M, Kovanen PT. Low density lipoprotein degradation by secretory granules of rat mast cells. Sequential degradation of apolipoprotein B by granule chymase and carboxypeptidase A. *J Biol Chem.* 1986;261(34):16067—72.
149. Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y. Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(1Pt2): S 78—84. doi: 10.1067/mai.2000.106058
150. Dell'Italia LJ, Collawn J, Ferrario CM. Multifunctional Role of Chymase in Acute and Chronic Tissue Injury and Remodeling. *Circ Res.* 2018;122:319—336.
151. Okamoto Y, Takai S, Miyazaki M. Significance of chymase inhibition for prevention of adhesion formation. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;484:357—359.
152. Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, Erzurum SC, Bleeker E, Busse WW, Castro M, Gaston B, Israel E, Schwartz LB, Curran-Everett D, Moore CG, Wenzel SE. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(3):299—309. doi: 10.1164/rccm.201002-0295OC
153. Lill M, Köks S, Soomets U, Schalkwyk LC, Fernandes C, Lutsar I, Taba P. Peripheral blood RNA gene expression profiling in patients with bacterial meningitis. *Front Neurosci.* 2013;7:33. doi: 10.3389/fnins.2013.00033
154. Mikus MS, Kolmert J, Andersson LI, Östling J, Knowles RG, Gómez C, Ericsson M, Thörngren JO, Khoonsari PE, Dahlén B, Kupczyk M, De Meulder B, Auffray C, Bakke PS, Beghe B, Bel EH, Caruso M, Chanez P, Chawes B, Fowler SJ, Gaga M, Geiser T, Gjomarkaj M, Horváth I, Howarth PH, Johnston SL, Joos G, Krug N, Montuschi P, Musial J, Nizankowska-Mogilnicka E, Olsson HK, Papi A, Rabe KF, Sandström T, Shaw DE, Siafakas NM, Uhlen M, Riley JH, Bates S, Middelveldt RJM, Wheelock CE, Chung KF, Adcock IM, Sterk PJ, Djukanovic R, Nilsson P, Dahlén SE, James A; U-BIOPRED (Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease outcome) Study Group; BIOAIR (Longitudinal Assessment of Clinical Course and Biomarkers in Severe Chronic Airway Disease) Consortium. Plasma proteins elevated in severe asthma despite oral steroid use and unrelated to Type-2 inflammation. *Eur Respir J.* 2021 Nov 4;2100142. doi: 10.1183/13993003.00142-2021

Ответственный за переписку: Дмитрий Андреевич Атякшин — доктор медицинских наук, директор научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа, Российский университет дружбы народов, Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая 8. E-mail: atyakshin-da@rudn.ru

Атякшин Д.А. SPIN-код 3830-8152; ORCID 0000-0002-8347-4556

Костин А.А. SPIN-код 8073-0899; ORCID 0000-0002-0792-6012

Троценко И.Д. SPIN-код 5522-4303; ORCID 0000-0002-6667-0125

Шишкина В.В. SPIN-код 9339-7794; ORCID 000-0001-9185-4578

Тиманн М. ORCID 0000-0002-6499-4855

Бухвалов И.Б. ORCID 0000-0003-1142-7483

Corresponding author: Dmitrii Atiakshin — MD, Director of the Scientific and Educational Resource Center for Innovative Technologies of Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis of the RUDN University, Peoples' Friendship University of Russia, 117198, ul. Miklukho-Maklaya, 8, Moscow, Russian Federation. E-mail: atyakshin-da@rudn.ru

Atiakshin D.A. ORCID 0000-0002-8347-4556

Kostin A.A. ORCID 0000-0002-0792-6012

Trotsenko I.D. ORCID 0000-0002-6667-0125

Shishkina V.V. ORCID 000-0001-9185-4578

Tiemann M. ORCID 0000-0002-6499-4855

Buchwalow I.B. ORCID 0000-0003-1142-7483