

На правах рукописи

Кашин
Александр Дмитриевич

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ
ЛИМФАТИЧЕСКОГО КАПИЛЛЯРА, ЛИМФАТИЧЕСКОГО
ПРОТОКА И КРАЕВОГО СИНУСА ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА**

14.03.01 – Анатомия человека

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена на кафедре анатомии, топографической анатомии в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Сесорова Ирина Сергеевна - доктор биологических наук, доцент

Научный консультант:

Миронов Александр Александрович- доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Банин Виктор Васильевич - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, кафедра морфологии человека, заведующий

Гурова Ольга Александровна - кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», кафедра анатомии человека, доцент

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «31» мая 2022 г. в 15-30 часов на заседании диссертационного совета Д 208.087.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГПМА Минздрава России по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, д. 39, корпус 2

Автореферат разослан «____» 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кульбах Ольга Станиславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Исследования последних лет значительно расширили наши представления о роли лимфоносных путей. Было доказано, что они являются активными участниками многих физиологических процессов и даже небольшие функциональные нарушения могут стать причиной или модулировать самые различные патологические состояния, в том числе заболевания кишечника (Alessio, 2014), ожирение (Sawane, 2013), метастазирование опухолей (Naxerova, 2017) и многое другое.

Ключевую роль в нормальном функционировании лимфоносных путей играет эндотелий, формирующий пограничный клеточный слой (Жданов, 1952; Куприянов, 1983).

Нарушение проницаемости лимфатического эндотелия лежит в основе большинства патологий, хотя функциональное значение этих нарушений не всегда очевидно. Так, найдена связь между «дефектами» лимфатических сосудов и ожирением. Показано, что нарушение целостности монослоя или снижение насосной функции лимфатических сосудов приводит к высвобождению адипогенных факторов из лимфоносного русла, гиперплазии адипоцитов и/или эктопическому адипогенезу (Escobedo, 2016, Blum, 2014; Garcí'a Nores, 2016). Напротив, избыточный вес вызывает снижение дренажа макромолекул в подкожной жировой клетчатке брюшной полости и дисфункцию лимфатических сосудов, что, в свою очередь, приводит к ожирению (D'Alessio, 2014).

Обсуждается роль лимфатических сосудов и узлов в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта: болезни Крона, язвенного колита и других (Rahier, 2013). Показано нарушение молекулярной структуры контактов; поглощения хиломикронов в кишечной ворсинке и их «утечку» в сосудах брыжейки при воспалительных заболеваниях кишечника (D'Alessio, 2014). Кроме того, острые заболевания желудочно-кишечного тракта и большие хирургические операции могут привести к нарушению барьерной функции лимфатических сосудов кишечника и брыжейки, а так как лимфа из этих сосудов поступает в системное кровообращение через грудной проток, высока вероятность нарушения функций целого ряда органов (Deitch, 2010).

Началось активное изучение молекул, определяющих целостность и проницаемость эндотелиального монослоя, в том числе при их генетическом удалении. Стало понятно, что в зависимости от функциональных особенностей органов лимфатический эндотелий может быть, как высоко проницаемым, так и практически непроницаемым. При этом та или иная фенотипическая форма эндотелия формируется под действием целого комплекса как эндогенных, так и экзогенных факторов (Adamo, 2009) и может меняться при их изменении (Pichol-Thievend, 2018). Если биохимическая и генетическая неоднородность лимфатического эндотелия показана (Takeda,

2019), то морфологических доказательств гетерогенности на сегодняшний день явно недостаточно. Между тем, понимание клеточных механизмов трансэндотелиального переноса макромолекул актуально для решения проблемы таргетной доставки терапевтических препаратов по лимфоносным путям: поглощения молекул лимфатическим капилляром; доставки и удержания в лимфатическом узле; высвобождения в определенную область тела (Naxerova, 2017). Идет поиск эффективных форм как терапевтических, так и молекул-носителей (Kota, 2007). Обсуждается возможность использования липопротеинов, в частности хиломикрона (Francois, 2011).

При этом остаются нерешенными ряд вопросов, связанных с резорбцией макромолекул в лимфатическом капилляре, а также с механизмами транспорта макромолекул через эндотелий в лимфатических сосудах и лимфатических узлах (Pichol-Thievend, 2018; Takeda, 2019; Mironov, 2020). Поэтому возникла необходимость в детализации ультраструктуры эндотелия лимфоносных путей (лимфатических капилляров, лимфатических сосудов и синусов лимфатических узлов), прежде всего, определяющей проницаемость эндотелиального пласта.

Детальное понимание функциональных особенностей эндотелия лимфоносных путей расширит возможности диагностики и лечения самых различных заболеваний и откроет перспективу новым методам лечения онкологии, ожирения, заболеваний желудочно-кишечного тракта и других, в том числе методами таргетной терапии.

Степень разработанности темы исследования

Морфологии лимфатического эндотелия посвящено большое количество фундаментальных исследований отечественных и зарубежных ученых: Д.А. Жданова, В.А. Шахламова, Я.Л. Караганова, А.П. Цамерян, В.В. Куприянова, Ю.Е. Выренкова, А.В. Борисова, Ю.И. Бородина, J. R. Casley-Smith, G. Azzali, P. Baluk и многих других.

Между тем, в последние годы, развитие методов молекулярной биологии расширили наши представления о структуре и функциях лимфоносных путей: доказана неоднородность эндотелия, которая проявляется, в том числе, разной проницаемостью клеточного пласта.

Поэтому ряд клинических и экспериментальных данных о функциональном строении лимфатического эндотелия требуют морфологического подтверждения или детализации. В частности, остаются дискуссионными вопросы организации межклеточных контактов и механизма переноса макромолекул через эндотелиальный монослой (в лимфатических капиллярах, синусов лимфатических узлов, лимфатических сосудов). Между тем, понимание этих вопросов чрезвычайно важно, т.к. оно будет способствовать прогрессу методов диагностики и лечения самых различных патологий.

Цель исследования - выявить особенности строения эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока, используя модельные объекты, и морфологически обосновать механизм транспорта макромолекул через эндотелиальный пласт.

Задачи исследования

1. Изучить особенности ультраструктуры эндотелия лимфатического капилляра на примере кишечной ворсинки крысы.
2. Изучить, используя кишечную ворсинку крысы, транспортный путь липидов и морфологически обосновать механизм их перемещения из собственной пластинки кишечной ворсинки в лимфатический капилляр.
3. Изучить особенности ультраструктуры эндотелия краевого синуса лимфатического узла на примере верхнего брыжеечного лимфатического узла тонкой кишки крысы.
4. Проанализировать, используя верхний брыжеечный лимфатический узел крысы, путь переноса липидов из краевого синуса лимфатического узла в условиях, исключающих высокую липидную нагрузку.
5. Изучить особенности ультраструктуры и параметры тканевой организации эндотелия межклапанного сегмента и створок клапана лимфатического протока на примере грудного протока кролика.
6. Выявить на основе анализа строения эндотелия модельных животных общие морфофункциональные характеристики эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока.

Научная новизна исследования

1. Впервые методами высокоразрешающей электронной микроскопии на модельных объектах проведен сравнительный анализ ультраструктуры эндотелиальных клеток лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла, лимфатического протока, в частности комплекса Гольджи.
2. Новыми являются данные о структуре и низкой функциональной активности комплекса Гольджи в эндотелии лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока, в том числе и после липидной нагрузки.
3. Впервые с помощью модельных объектов проведен сравнительный анализ и показаны особенности организации межэндотелиальных соединений лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока.
4. Оригинальным является доказательство (с помощью электронно-микроскопических методов) существования в лимфатическом капилляре кишечной ворсинки крысы «синусоидного» межэндотелиального соединения. Оно представляет собой адгезионный контакт черепицеобразной формы, по ходу которого расположены точечное адгезивное соединение (на «верхушке») и плотный контакт на некотором

расстоянии от него.

- Получены новые морфологические доказательства гипотезы транспорта макромолекул в просвет лимфатического капилляра через «синусоидное» соединение, которое формирует вместе с якорными филаментами и гладкомышечными клетками, лежащими пучками вокруг лимфатического капилляра в собственной пластинке кишечной ворсинки, внутристеночный клапан, обеспечивающий односторонний ток молекул из интерстиция в просвет лимфатического капилляра.
- Новыми являются данные об отсутствии трансцитоза хиломикронов диаметром 30-100 нм в лимфатическом капилляре кишечной ворсинки крысы в условиях, исключающих избыточную липидную нагрузку на слизистую оболочку тонкой кишки.
- Оригинальными являются данные о фагоцитозе хиломикронов (диаметром 30-100 нм) макрофагами в краевом синусе верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы после липидной нагрузки в эксперименте.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты:

1) позволяют уточнить механизм транспорта макромолекул липидной природы диаметром 30-100 нм в лимфатический капилляр кишечной ворсинки, что поможет в решении проблем таргетной доставки лекарственных препаратов, контроля миграции иммунных клеток, развития и лечения опухолей;

2) служат предпосылкой для изучения метаболизма липидов в лимфатическом узле, что может способствовать прогрессу в лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и методов лучевой диагностики;

3) способствуют пониманию клеточных механизмов развития ряда заболеваний, в основе которых лежит изменение проницаемости эндотелиального пласта, в том числе лимфедемы, ожирения и ряда других.

Кроме того, полученные оригинальные данные детализируют строение эндотелия лимфоносных путей (лимфатического капилляра, лимфатического узла и лимфатических коллекторов) и могут использоваться в учебном процессе морфологических кафедр высших и средних учебных заведений.

Методология и методы исследования

Исследование базируется на системном подходе с применением принципов: объективности и опытной подтверждаемости; взаимосвязи структуры и функции и влияния на них определенных условий. Впервые в России применен комплексный подход, основанный на широком применении методов трехмерного анализа высокого разрешения и адаптации молекулярно-биологических данных, выявленных в культуре клеток, на клетки органов и тканей. Новые результаты получены на линейных лабораторных животных (крысах и кроликах), используемых в качестве модельных объектов,

методами: сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии; электронно-микроскопической томографии; анализа серийных изображений с помощью сканирующего электронного микроскопа, оборудованного внутренним ультратомом и детектором обратно рассеянных электронов; морфометрии и статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. В эндотелии лимфатического капилляра кишечной ворсинки крысы формируется «синусоидное» межэндотелиальное соединение. Якорные филаменты, связывающие околоконтактные участки базолатеральной плазмолеммы эндотелиоцита, и спиральные пучки гладкомышечных клеток собственной пластинки, окружающие лимфатический капилляр, способствуют функционированию такого соединения, как интрамурального клапана.
2. В эндотелии краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы имеется две фенотипические формы клеток, отличающиеся наличием базальной мембранны и частотой встречаемости плотных соединений.
3. Эндотелий синусной поверхности створки клапана грудного протока, по сравнению с клетками межклапанного сегмента и центральной поверхности створки, характеризуется: полиморфизмом, усложнением формы контактных поверхностей при низкой частоте встречаемости плотных соединений, снижением упорядоченности расположения клеток в пласте. Данные особенности определяются условиями локальной циркуляции лимфы и способствуют увеличению проницаемости макромолекул через эндотелиальный пласт в этой области.
4. В условиях, исключающих избыточную липидную нагрузку, хиломикроны диаметром 30-100 нм перемещаются из интерстиция собственной пластинки кишечной ворсинки крысы в лимфатический капилляр по межконтактной щели «синусоидного» межклеточного соединения; из полости краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла поглощаются макрофагами; в грудном протоке не зарегистрированы. Кавеолы и микропиноцитозные везикулы в транспорте хиломикронов не участвуют, что подтверждается признаками низкой функциональной активности комплекса Гольджи.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается: соответствием структуры исследования цели и поставленным задачам, подбором современных методов, использованием линейных животных, достаточным количеством наблюдений и воспроизводимостью результатов. Научные положения, выводы и рекомендации аргументированы и подтверждаются электронограммами и другими полученными данными. Статистический анализ проведен с использованием современных методов обработки информации.

Основные положения диссертации были представлены в 5 докладах на конференциях: IV Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием (г. Иваново, 2018); на II Санкт-Петербургском лимфологическом форуме «Лимфология XXI века: новые подходы и актуальные исследования» (г. Санкт-Петербург, 2019); V Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (г. Иваново, 2019); VII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (г. Иваново, 2021); Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора Александра Кирилловича Косоурова (г. Санкт-Петербург, 2021).

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре анатомии, топографической анатомии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на кафедре общей химической технологии ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Особенности строения эндотелия лимфатического капилляра (ЛК), краевого синуса лимфатического узла (ЛУ) и лимфатического протока изучались на взрослых половозрелых крысах линии Вистар и грудном протоке (ГП) кролика линии Советская шиншилла. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», 1977 г., и «Хельсинской декларацией» 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г.

Особенности ультраструктуры, определяющие проницаемость макромолекул через эндотелиальный пласт, изучались на модели липидной нагрузки, в которой в качестве маркерной молекулы использовался хиломикрон. Диаметр хиломикрона 30-100 нм достигался экспериментальным подходом, исключающим высокую липидную нагрузку. Для этого использовались крысы-доноры, которым вводилось перорально шприцом с полиэтиленовой трубкой-наконечником 1,5 мл кукурузного масла. Далее, через 60 мин после введения масла, у крыс под наркозом вскрывалась брюшная полость и шприцом из начального отдела тонкой кишки забирался химус. Полученный химус вводился в верхний отдел тонкой кишки животным-реципиентам. Участок тонкой кишки иссекался через 45 минут после введения химуса. Через 60 минут забирались верхние брызговые лимфатические узлы.

Эндотелий лимфатического протока изучался на ГП кролика. Кролику за 120 мин до забора материала перорально вводилось 5 мл кукурузного масла. Далее под наркозом вскрывалась грудная клетка и иссекался ГП в области млечной цистерны.

Наркотизация животных осуществлялась комбинацией препаратов золетила и рометара в соотношении 3/1, в дозе 0,1 мл на 100 г массы тела. Животные выводились из эксперимента до окончания действия наркоза после вскрытия грудной клетки быстрым введением насыщенного раствора хлорида калия внутрисердечно в дозе 1-2 ммоль/кг. Распределение экспериментального материала представлено в таблице.

Таблица – Распределение экспериментального материала

Материал исследования	Кол-во жив /обр.	Методы исследования				Всего
		ТЭМ сетки	СЭМ (обр.)	ЭТ	МА изо бр.	
1. ЭК ЛК кишечной ворсинки (крысы после 24 часового голодания)	5/10	25	5	2	30	62
2. ЭК краевого синуса верхнего брыжеечного ЛУ (крысы после 24 часового голодания)	5/10	25	-	2	30	57
3. ЭК ЛК кишечной ворсинки (крысы через 45 мин после введения химуса)	(5+3)/10	25	5	-	30	60
4. ЭК краевого синуса верхнего брыжеечного ЛУ (крысы через 60 мин после введения химуса)	(5+3)/10	25	-	-	30	55
5. ЭК грудного протока кролика (через 2 часа после введения липидов)	5/10	25	10	3	60	98
Всего:	31/50	125	20	7	180	332

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Образцы фиксировались 2,5 %-ным глутаровым альдегидом, постфиксировались 1 %-ным редуцированным OsO₄ по стандартной методике (Миронов А. А., 1994). Для улучшения контраста липидов использовался протокол с 0,3 %-ым

раствором тиокарбогидразида (OTOTO; методика Seligman A. M., 1966), по которому образцы промывались и обрабатывались 0,3 %-ным раствором тиокарбогидразида и 1 %-ным редуцированным OsO₄ дважды. Затем проводилось обезвоживание спиртами восходящей концентрации, заключение в эпоксидную смолу (Epon-812) и полимеризация в течение 24 часов в термостате при +60°C.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Образцы фиксировались 2,5 %-ным глутаровым альдегидом, промывались, обрабатывались последовательно 1 %-ным раствором таниновой кислоты на 0,1 М какодилатном буфере (рН – 7,4) и 1 %-раствором OsO₄. Затем проводили: обезвоживание в этаноле восходящей концентрации и в абсолютном ацетоне; высушивание в углекислоте путем перехода через критическую точку (Ровенский, 1979); монтирование на предметный столик; напыление сплавом золота и палладия в аппарате Eico-111-B. Образцы просматривали в электронном микроскопе Hitachi-S-405 AS.

Серийные изображения были получены на сканирующем электронном микроскопе «Quanta 250» (FEI), оборудованном внутренним ультратомом «GATAN» и детектором обратно рассеянных электронов. Анализ проводился в соответствии с методом, описанным H. C. Kalson et al. (2011).

Электронная томография (ЭТ). Из образцов, заливших в эпоксидную смолу, изготавливали срезы толщиной 150–200 нм на ультратоме «Leica Ultracut-UCT» («Leica», Germany). Забор изображений проводили на электронном микроскопе «Tecnai 12». Для построения трехмерного изображения использовали программу «IMOD». Томограммы построены с помощью Г. В. Безнусенко (Институт молекулярной онкологии, г. Милан, Италия).

Морфометрический анализ (МА). Параметры клеток измерялись на не менее 30-ти случайно выбранных изображений каждого объекта. Определялись следующие величины: длина и ширина ЭК; высота ЭК в наиболее выступающей в просвет сосуда области ядра; длина контактирующей поверхности; частота встречаемости межклеточных соединений разной формы (стыковой, черепицеобразной, простой пальцевидной и сложный пальцевидной). Коэффициент вытянутости рассчитывался как частное от деления показателя длины клетки на ее ширину. Относительное количество мембран КГ, образующих цистерны, везикулы и тубулярные структуры определялось путем наложения морфометрической сетки (100x100 нм) на электронограмму органеллы.

Топологические особенности эндотелиального монослоя ГП оценивались по средней степени связности клеток в пласте (число контактирующих с данным эндотелиоцитом клеток) (Смоляников, 1980). Анализировалось не менее 500 клеток в каждой изучаемой зоне ГП.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы Statistica 6.0. Достоверность различий между параметрами

определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Для анализа частоты встречаемости специальных межклеточных соединений в ЭК лимфатического капилляра использовался χ^2 критерия Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

Особенности строения эндотелия лимфатического капилляра кишечной ворсинки крысы

Лимфатический капилляр (ЛК) кишечной ворсинки крысы начинается слепо в собственной пластинке кишечной ворсинки. Стенка ЛК не имеет базальной мембранны и состоит из одного слоя эндотелиальных клеток (ЭК) (Рисунок 1, а). Организация межэндотелиальных контактов является наиболее спорным вопросом строения ЛК. Наши исследования показали, что в ЛК кишечной ворсинки крысы чаще всего встречаются соединения черепицеобразной формы (в 68 % \pm 2,2 случаев), укрепленные плотным контактом и точечным адгезивным соединением (Рисунок 1, б). Стыковые и сложные пальцевидные соединения встречаются крайне редко. Точечное адгезивное соединение связывает люминальную ламеллоподио эндотелиоцита и подлежащую ей ЭК. В подобных структурах эндотелиоцитов ЛК трахеи были идентифицированы белки LYVE-1 и PECAM (Baluk, 2007) которые, обеспечивая слабую адгезию между клетками, вероятно, предотвращают загибание ламеллоподии и обеспечивают ее последующее возвращение в первоначальное положение. На некотором расстоянии от точечного адгезивного соединения обнаруживается плотный контакт. Р. Baluk (2007), наблюдая подобную закономерность в соединениях ЭК ЛК трахеи, дал название данному соединению - «синусоидный контакт». Несмотря на то, что в ЛК кишечной ворсинки крысы люминально-базальная проекция межклеточного контакта не всегда напоминает синусоиду, сохраняется статистически значимая частота встречаемости и закономерное расположение плотных контактов и точечных адгезивных соединений, аналогичные описанным в ЛК трахеи «синусоидным контактам». Так, в 18-ти случаях из 30-ти в черепицеобразном соединении регистрируются и плотный контакт, и точечное адгезивное соединение. Десмосомы и щелевые соединения в ЛК кишечной ворсинки крысы не встречаются. В зоне «синусоидного» соединения базальная часть плазмолеммы ЭК прикреплена к волокнам интерстиция с помощью якорных филаментов. Так стенка ЛК прикрепляется к эластическому каркасу органа или ткани. При этом плоские люминальные выросты ЭК свободны и могут отклоняться внутрь просвета, пропуская интерстициальную жидкость в полость ЛК. Вокруг ЛК в собственной пластинке кишечной ворсинки расположены пучки гладких мышечных клеток (Рисунок 1, а), к которым подходит нервное окончание.

Особенности строения эндотелия краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы

Анализ ультраструктуры подкапсулярного (краевого синуса) верхнего брыжеечного ЛУ подтвердил различия между эндотелием синуса, прилежащим к подкапсулярному пространству и трабекулам узла («париетальными» клетками) и обращенным к корковому веществу (паренхиме) узла, которые определяют разную проницаемость эндотелиального пласта. Клетки «париетальной стенки» синуса лежат на хорошо выраженной базальной мембране. Эндотелий уплощен и формирует большое количество ($30\pm1,2\%$) межклеточных соединений стыковой формы, укрепленных плотными контактами. Монослой ЭК «висцеральной стенки» синуса не имеет базальной мембраны, в пласте практически не встречаются плотные контакты. Здесь чаще всего регистрируются простые соединения черепицеобразной ($68\pm2,2\%$) и простой пальцевидной ($18\pm1,8\%$) формы. При этом нами не обнаружено точечных адгезивных соединений, а также закономерного расположения плотных контактов. Существенных различий в строении и локализации органелл в клетках краевого синуса не регистрируется, в том числе и в секреторном пути (Рисунок 1, г, д). КГ имеет компактную стопку (среднее количество цистерн - $4,4\pm0,8$; диаметр цистерн - 711 ± 46 нм), редуцированный везикулярный компонент, цис- и транс-сеть, что указывает на низкую секреторную активность органеллы. Так, на везикулярные профили приходится $16\pm2,3\%$ от всех мембран органеллы, на тубулярные - $12\pm2,5\%$.

Особенности ультраструктуры эндотелия грудного протока кролика

ГП был выбран в качестве модельного объекта, в котором макромолекулы не транспортируются через эндотелиальный пласт. Между тем, эндотелиальный монослой лимфатических сосудов неоднороден, что связано с наличием клапанов, ограничивающих межклапанный сегмент, и сократительной активностью лимфангиона (Орлов, 1983). Учитывая тот факт, что эндотелий на створке клапана и в межклапанном сегменте развивается в эмбриогенезе под действием различных молекулярных стимулов (Nogtmén, 2009), можно предположить, что в лимфатических сосудах формируются разные субпопуляции ЭК, имеющие особенности строения. Анализ показал, что ЭК межклапанного сегмента (Рисунок 2, а) ГП по фенотипу похожи на эндотелий «париетальной стенки» краевого синуса ЛУ. Монослой сформирован однородными по форме и размерам, плотно расположенным в пласте клетками, лежащими на базальной мембране. Большинство ЭК связаны между собой соединениями черепицеобразной формы ($65,3\pm2,5\%$), встречаются плотные контакты и десмосомы. Сложные пальцевидные и простые стыковые соединения регистрируются не часто, не более чем в 5 % случаев (Рисунок 2, г). Средняя степень связности клеток в пласте близка к

шести, что указывает на высокую упорядоченность расположения ЭК в монослое и подтверждает его низкую проницаемость. Такой клеточный пласт более чувствителен к внешним стимулам, быстро вовлекается в регенерацию (Сесорова, 2009) и лимфоангиогенез (Chang, 2002). ЭК центральной поверхности створки клапана ГП (Рисунок 2, б, д) более вытянуты, чем в межклапанном сегменте (коэффициент вытянутости 5,04 и 5,2 соответственно), в 2 раза чаще встречаются сложные пальцевидные контакты, длина контактирующих поверхностей не увеличивается. На синусной поверхности створки (Рисунок 2, в), по сравнению с межклапанным сегментом, увеличивается гетероморфизм формы клеток. Почти в 2 раза уменьшается средняя длина и увеличивается ширина ЭК. Коэффициент вытянутости составил 2,62. Меняется форма контактных поверхностей между смежными клетками: увеличивается доля простых и сложных пальцевидных соединений, частота встречаемости которых составила $38,3 \pm 2,5\%$ и $17,6 \pm 1,5\%$ соответственно (Рисунок 2, е). Плотные контакты встречаются крайне редко. Анализ тканевой организации монослоя показал незначительное снижение упорядоченности расположения клеток, по сравнению с межклапанным сегментом и центральной поверхностью створки клапана. Между тем, выявленные морфологические изменения строения эндотелия синусной поверхности створки ГП указывают на его потенциально более высокую проницаемость пласта. Эндотелиальный монослой синусной поверхности створки близок по фенотипу к эндотелию «висцеральной» поверхности краевого синуса и, отчасти, ЛК, что подтверждают данные о генетическом родстве субпопуляции эндотелиоцитов синуса ЛУ и створок клапана сосудов (Frye, 2015). На свободном крае створки ЭК сильно вытянуты (Рисунок 2, ж), что объясняется не только скоростью лимфы, но и формой клапана. Клетки имеют выбухающую ядерную и уплощенную периферическую зоны. Смежные эндотелиоциты формируют преимущественно стыковые соединения ($68 \pm 2,5\%$), укрепленные плотными контактами. Длина контактирующих поверхностей минимальна, относительно других исследуемых зон ГП.

Анализ ультраструктуры ЭК в межклапанном сегменте и на створках клапана ГП не выявил существенных особенностей строения органелл. ЭК имеют низкую синтетическую и транспортную активность, что подтверждает анализ ультраструктуры КГ.

Особенности транспорта липидов через эндотелиальный монослой лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и грудного протока в условиях, исключающих высокую липидную нагрузку

Особенности строения эндотелия, определяющие проницаемость макромолекул через эндотелиальный пласт, изучались в условиях транспорта липидов. Такой экспериментальный подход был обусловлен актуальностью

данных о механизмах всасывания липидов в ЛК и его дальнейшем транспорте (Francois, 2011), а также хорошей визуализацией хиломикрона на электронограммах и его известным размером (30-100 нм в диаметре). Предполагалось, что в транспорте хиломикронов в ЛК кишечной ворсинки могут принимать участие плазмолеммальные везикулы, фенестры или трансэндотелиальные каналы (Куприянов, 1983). По нашим данным через 45 мин после введения в начальный отдел тонкой кишки крысам-реципиентам химуса были обнаружены хиломикроны в собственной пластинке кишечной ворсинки, в просвете ЛК и в просвете щели межклеточных соединений черепицеобразной формы. При этом не было зарегистрировано ни слияния везикул с образованием трансэндотелиальных каналов, ни одной почки или микровезикулы (в том числе кавеолы), содержащей электронно-плотные частицы (Рисунок 1, б). Окаймленные клатрином почки содержали хлопьевидное вещество, возможно липопротеиды низкой плотности. КГ имеет признаки низкой функциональной активности, что может служить косвенным подтверждением низкой вероятности трансцитоза хиломикронов с диаметром 30-100 нм. Через 60 мин. после введения химуса крысам-реципиентам хиломикроны обнаружены в просвете краевого синуса верхнего брыжеечного ЛУ. Липиды не выявлены ни в зоне соединений смежных клеток, ни в цитоплазме ЭК (Рисунок 1, в). Так же, как и в эндотелии ЛК, ни один из немногочисленных везикулярных мембранных профилей ЭК как «париетальной», так и «висцеральной стенки» синуса не содержал хиломикроны. Трансэндотелиальных каналов не обнаружено. Хиломикроны диаметром 30-100 нм поглощаются макрофагами (Рисунок 1, е) и, возможно, могут фагоцитироваться другими иммунными клетками.

Строение эндотелия ЛК и краевого синуса ЛУ в условиях всасывания липидов мы сравнили с эндотелиоцитами ГП кролика через 120 мин. после перорального введения животному кукурузного масла. Немногочисленные кавеолы ЭК не имели электронно-плотного содержимого. Характеристики КГ не отличались от аналогичных показателей в эндотелии ЛК и краевого синуса ЛУ и соответствовали состоянию низкой функциональной активности органеллы.

Таким образом, во всех модельных объектах в условиях, исключающих высокую липидную нагрузку, нами не были обнаружены ультраструктурные признаки поглощения ЭК хиломикронов диаметром 30-100 нм или их трансцитоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. К особенностям ультраструктуры эндотелия лимфатического капилляра в кишечной ворсинке крысы относятся: слабо развитый секреторный аппарат и особая организация межэндотелиальных соединений. Между эндотелиоцитами преобладает контакт черепицеобразной формы, в котором люминальная ламеллоподия эндотелиальной клетки и подлежащая клетка связаны точечным адгезивным соединением, на некотором расстоянии от которого расположен плотный контакт. Околоконтактные участки базолатеральной плазмолеммы эндотелиальных клеток фиксируются якорными филаментами к коллагеновым волокнам интерстиция.

2. Хиломикроны диаметром 30-100 нм транспортируются в просвет лимфатического капилляра кишечной ворсинки крысы по межконтактной щели смежных клеток без участия кавеол и микропиноцитозных везикул, что подтверждается признаками низкой функциональной активности комплекса Гольджи, в том числе во время транспорта липидов.

3. Выявлено две фенотипические формы эндотелия краевого синуса лимфатического узла на примере верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы. Клетки, прилежащие к капсule лимфатического узла, лежат на базальной мемbrane и формируют преимущественно стыковую форму простого соединения, укрепленного плотным контактом. У эндотелия, обращенного к наружной коре, базальная мембрана отсутствует; преобладает черепицеобразная форма простого соединения с единичными плотными контактами.

4. Транспорт хиломикронов диаметром 30-100 нм через эндотелий краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы в условиях, исключающих высокую липидную нагрузку, не обнаружен. Хиломикроны фагоцитируются мигрирующими через стенку синуса макрофагами. Малую вероятность трансцитоза макромолекул подтверждают признаки низкой секреторной активности комплекса Гольджи.

5. Эндотелий синусной поверхности створки клапана в грудном протоке кролика отличается от эндотелия центральной поверхности и межклапанного сегмента полиморфизмом, снижением упорядоченности клеток в пласте, увеличением количества простых соединений пальцевидной формы с редко встречающимися плотными контактами. На свободном крае створки базальной мембраны нет, эндотелиоциты преимущественно имеют стыковую форму межклеточных соединений, укрепленных плотными контактами.

6. Анализ строения эндотелия модельных животных выявил общие характеристики эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока: слабовыраженная полярность клеток, малая численность кавеол и низкая секреторная активность комплекса Гольджи. Признаки проницаемого пласта имеет

эндотелий: лимфатического капилляра, синусной поверхности створки лимфатического протока и краевого синуса, прилежащий к наружной коре лимфатического узла. Эндотелий межклапанного сегмента и краевого синуса, обращенный к капсуле узла, имеет признаки низкой проницаемости монослоя.

Практические рекомендации

1. Используемая в работе экспериментальная модель позволяет исключить высокую липидную нагрузку и получить размеры транспортируемых хиломикронов диаметром 30-100 нм.

2. Предложенный подход можно использовать:

- для дальнейшего поиска и изучения молекулярных конструкций на основе липофильных низкомолекулярных лекарственных препаратов, которые после всасывания в кишечнике включались бы в состав хиломикрона.
- в исследованиях проблем доставки лекарственных препаратов и удержания их в лимфатических узлах;
- для изучения механизмов переноса терапевтической молекулы из лимфатического узла в нужную область или тип клеток.

3. Хиломикрон, контраст которого усилен методом ОТОТО, можно использовать в качестве маркерной молекулы для изучения механизмов транспорта, всасывания, проницаемости, и другое методами электронной микроскопии.

4. Использование метода сканирующей электронной микроскопии с получением изображения на микроскопе, имеющим встроенный ультратом, позволяет получить серийные срезы микроанатомического препарата, что открывает широкие возможности для изучения топографической микроанатомии структур, взаимодействия клеток в ткани, развития процессов и другое.

Перспективы дальнейшего исследования могут быть связаны с детальным изучением молекулярных механизмов проницаемости эндотелиального монослоя, в частности разных по размеру и составу частиц в ЛК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Казакова, Т.Е. Ультраструктура энтероцита кишечной ворсинки мыши в состоянии относительного функционального покоя / Т.Е. Казакова, И.Д. Димов, Н.Р. Карелина, И.С. Сесорова, **А.Д. Кашин**, А.А. Миронов // **Вестник новых медицинских технологий.** – 2018. – Т. 25, № 4. – С. 46–50.

2. Димов, И.Д. Микроангиоархитектоника кишечной ворсинки / И.Д. Димов, **А.Д. Кашин**, М.А. Здорикова, Т.Е. Казакова, Н.Р. Карелина, И.С. Сесорова // **Вестник новых медицинских технологий.** – 2020. – Т. 27, № 4. – С. 11–14.

В журналах, цитируемых базой данных Scopus

1. Sesorova, I.S. Cellular and sub-cellular mechanisms of lipid transport from gut to lymph / I.S. Sesorova, **A.D. Kashin**, V.V. Sesorov, M.A. Zdorikova, I.D. Dimov, N.R. Karelina, G.V. Beznoussenko, A.A. Mironov // **Tissue and Cell.** - 2021. - Т. 72. - С. 1015-29.

Прочие публикации

1. **Кашин, А.Д.** Структура межклеточных контактов эндотелия инициальных лимфатических сосудов / А.Д. Кащин, Т.Е. Казакова, И.С. Сесорова // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека», Иваново, 9-12 апреля 2018 г. / Под ред. И.К. Томиловой. – Иваново: ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России. – 2018. – С. 4–5.

2. **Кашин, А.Д.** Особенности морфофункциональной организации межклеточных контактов эндотелия грудного протока кролика / **А.Д. Кащин**, И.С. Сесорова // Сборник материалов V Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека», Иваново – 2019. – Т. 27, № 4. – С. 13–15.

3. **Кашин, А.Д.** Анализ строения межэндотелиальных контактов грудного протока кролика / А.Д. Кащин, И.С. Сесорова, Н.Р. Карелина // Трансляционная медицина, Приложение № 2. Тезисы научно-практической конференции «II Санкт-Петербургский лимфологический форум. Лимфология XXI века: новые подходы и актуальные исследования», Санкт-Петербург, 10-11 октября 2019 г. – С. 31– 32.

4. **Кашин, А.Д.** Механизмы лимфангиогенеза в эмбриогенезе и наследственная патология лимфатических сосудов. Обзор литературы / А. Д. Кащин, М. А. Здорикова, И. Д. Димов, Н. Р. Карелина, И. С. Сесорова // Российские биомедицинские исследования. – 2020. – Т. 5, № 3. – С. 37–43.

5. Димов, И.Д. Механизмы транспорта липидов через энteroцит кишечной ворсинки / **А.Д. Кащин**, М.А. Здорикова, А.В. Зайцева, Г.Н. Денисова, Н.Р. Карелина // Российские биомедицинские исследования. – 2020. – Т. 5, № 2. – С. 24-30.

6. **Кашин, А.Д.** Внутристеночные клапаны лимфатических капилляров кишечной ворсинки крысы / А. Д. Кащин, И. Д. Димов, М. А. Здорикова, И. С. Сесорова, Н. Р. Карелина, А. А. Миронов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9, № 4. – С. 31–37.

7. **Кашин, Д.А.** Ультраструктура эндотелия краевого синуса верхних брыжеечных лимфатических узлов / Д.А. Кащин, И.Д. Димов, Н.Р. Карелина, И.С. Сесорова, А.В. Зайцева, Г.Н. Денисова // В сборнике: Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора Александра Кирилловича Косоурова. Сборник научных трудов. Воронеж, 2021. С. 142-145.

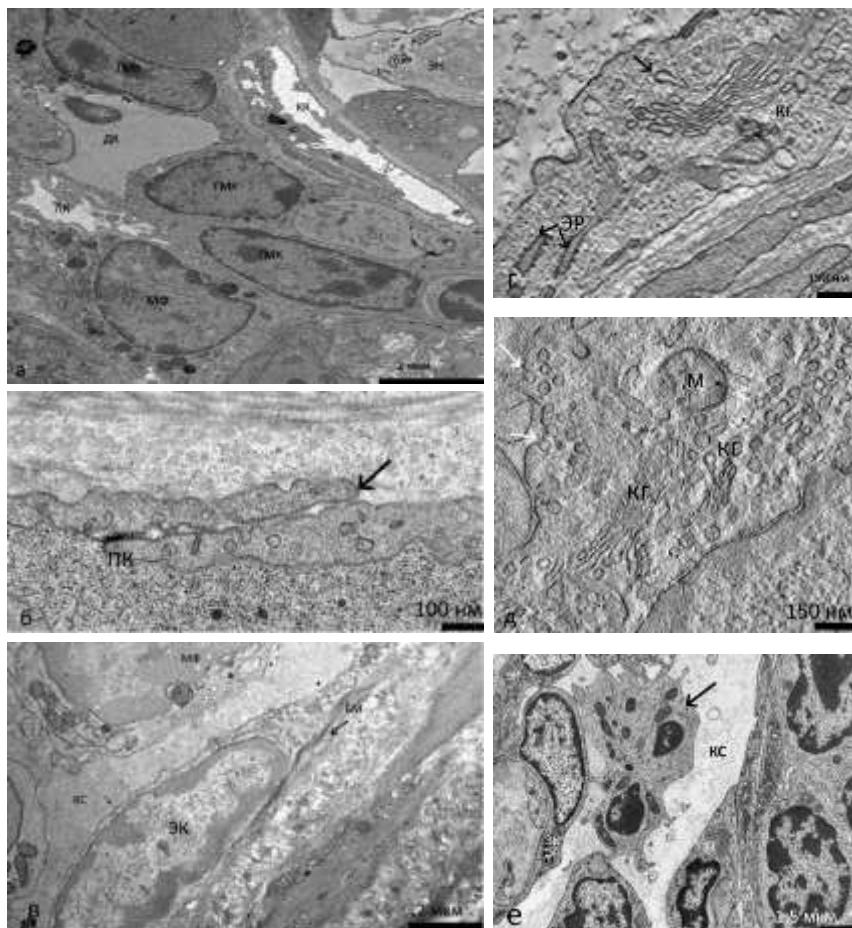


Рисунок 1 – Эндотелий лимфатического капилляра (ЛК) и краевого синуса лимфатического узла (ЛУ) крысы: а - ЛК в собственной пластинке кишечной ворсинки: гладкомышечные клетки (ГМК), кровеносный капилляр (КК), энteroцит (ЭН), дендритная клетка (ДК). СЭМ СУС; б – межэндотелиальное соединение в ЛК: плотный контакт (ПК), точечное адгезивное соединение (↑). ТЭМ; в – краевой синус ЛУ: эндотелиоцит (ЭК), базальная мембрана (БМ), макрофаг (МФ). ТЭМ; г-д – комплекс Гольджи (КГ) в эндотелии ЛК и ЛУ: эндоплазматический ретикулум (ЭР), (↑) - кавеолы. ЭМ-томография; е – краевой синус ЛУ: (↑) – макрофаг. ТЕМ.

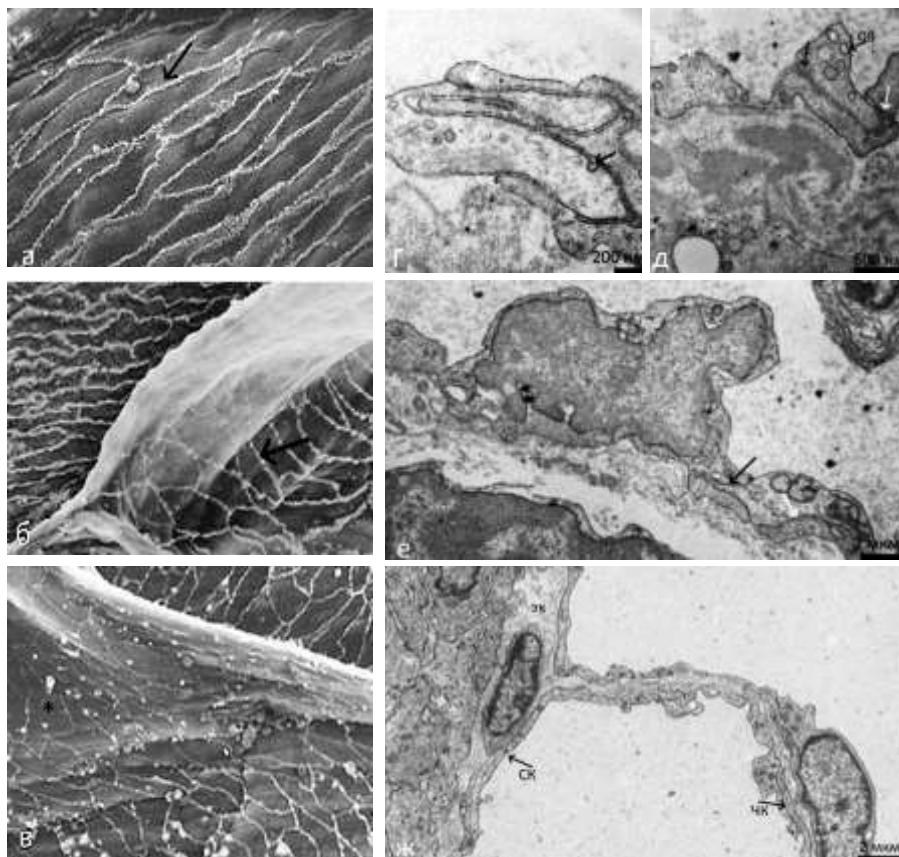


Рисунок 2 – Эндотелий грудного протока кролика: а - межклапанный сегмент, (↑) - межклеточные границы. СЭМ, Ув 2500; б - центральная поверхность створки клапана: (↑)- межклеточные границы. СЭМ, Ув. 2300; в – синусная поверхность створки клапана. СЭМ, Ув. 2300; г - сложное пальцевидное соединение эндотелиальных клеток (ЭК) межклапанного сегмента: (↑) - кавеола; д – черепицеобразное соединение центральной поверхности створки: адгезивное соединение (черная стрелка), плотный контакт (белая стрелка), окаймленная клатрином почка (ОВ). ТЭМ; е - простое пальцевидное соединение (↑) синусной поверхности створки. ТЭМ; ж - створка клапана: стыковое соединение (СК), черепицеобразное соединение (ЧК). ТЭМ.