

На правах рукописи



Казакова Татьяна Евгеньевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ТРАНСПОРТНОГО ПУТИ ЛИПИДОВ ИЗ ПОЛОСТИ ТОНКОЙ
КИШКИ В СОБСТВЕННУЮ ПЛАСТИНКУ КИШЕЧНОЙ ВОРСИНКИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

14.03.01 – Анатомия человека

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2020

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

Научные руководители:

доктор биологических наук, доцент
Сесорова Ирина Сергеевна
 доктор медицинских наук, профессор
Миронов Александр Александрович

Официальные оппоненты:

Корнилова Елена Сергеевна
 доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, лаборатория динамики внутриклеточных мембран, руководитель
Банин Виктор Васильевич
 доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России), кафедра морфологии человека, заведующий кафедрой

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

Защита состоится «17» февраля 2021 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.087.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореца, д. 39) и на сайте ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России <http://gpmu.org>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
 диссертационного совета,
 доктор медицинских наук, профессор

Кульбах Ольга Станиславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность научного исследования

Кишечное пищеварение, всасывание и секреция пищевых жиров являются важными шагами в поддержании липидного и энергетического гомеостаза всего тела (Abumrad and Davidson, 2012). В настоящее время хорошо известно, что развитие ожирения и связанных с ним заболеваний частично обусловлено чрезмерным потреблением липидов (Butt et al., 2014). Возникшая пандемия ожирения, обусловленная повышенным потреблением жиров и продуктов, богатых энергией, привела к возобновлению интереса к роли тонкой кишки в комплексной регуляции гомеостаза липидов. Кроме того, глубокое понимание процессов трансформации липидов в кишечнике может способствовать прогрессу в лечении дислипидемии, атеросклероза, а также сердечно-сосудистых заболеваний.

Ультраструктуре транспортного пути липидов через энтероцит кишечной ворсинки посвящен ряд работ (Palay and Karlin, 1959; Jersild, 1966; Strauss, 1966; Friedman and Cardell, 1977; Sabesin and Frase, 1977; Christensen et al., 1983; Карелина, 1994). В последние годы, с развитием методов молекулярной и клеточной биологии, наши представления как о строении, так и о механизмах всасывания липидов в тонкой кишке расширились. При этом в подавляющем большинстве работ последних лет основной акцент делается на ключевых белках, участвующих в поглощении и внутриклеточном транспорте жирных кислот и формировании хиломикрона (Pan and Hussain, 2012). Ультраструктуру секреторного пути прехиломикрона изучали Sabesin S. M. and Frase S. (1977), а также Tso P. et al. (1986), которые продемонстрировали возможность выхода липидных частиц, превышающих размер СОPII-зависимых везикул, из эндоплазматического ретикулума и их транспорт к комплексу Гольджи. Однако остался неясным ряд вопросов, связанных с механизмами внутриклеточного транспорта и транцитоза в энтероците. Между тем их детализация позволит уточнить, а в ряде случаев по-новому посмотреть на механизмы транспорта липидов через эпителий кишечной ворсинки в ее собственную пластинку. Так, сегодня принимается, что низкомолекулярные липиды (жирные кислоты и SN-2-моноацилглицерин) транспортируются через щеточную каемку в энтероцит диффузией или с помощью мембранного (кавеол, везикул) или молекулярного переносчика (Mansbach and Siddiqi, 2016). Однако морфологических доказательств эндоцитоза до настоящего времени не представлено.

Мы не встречали детального описания комплекса структур, формирующих барьер между просветом кишечника и просветом лимфатического капилляра. Известно, что энтероциты соединены друг с другом с помощью плотных, промежуточных, щелевых соединений и десмосом (Карелина, 1994; Миронов, 1994), образуют пальцевидные контакты. Однако закономерности расположения контактов и их функциональная роль не изучались.

Гипотезы транспорта липидов из эндоплазматического ретикулума через комплекс Гольджи, как правило, строятся на данных, полученных из экспериментальных исследований транспорта белков, изучаемого на культурах тканей. Насколько эти данные можно экстраполировать применительно к транспорту прехиломикронов – неясно. Не установлен механизм выхода липидов из энтероцита в межклеточное пространство и их прохождения через базальную мембрану в собственную пластинку кишечной ворсинки.

Эти и ряд других вопросов требуют детализации и морфологических обоснований с использованием современных методов микроанатомии, гистологии и цитологии, что позволит по-новому оценить процессы, связанные с нарушением всасывания липидов слизистой оболочкой тонкой кишки, что важно для разработки новых терапевтических стратегий улучшения здоровья сердца и нормализации обмена веществ (Lewis, 2015).

Цель исследования – изучить ультраструктуру транспортного пути липидов из полости тонкой кишки в собственную пластинку кишечной ворсинки и найти морфологическое обоснование механизмов их транспорта.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать структуры кишечной ворсинки начального отдела тонкой кишки крысы, участвующие в транспорте липидов, после 24-часового голодания.
2. Проанализировать временные характеристики транспорта липидов через энтероцит в условиях низкой пищевой нагрузки.
3. Изучить структуру транспортного пути липидов из просвета кишки в эндоплазматический ретикулум.
4. Изучить структуру комплекса Гольджи во время прохождения хиломикрона через стопку цистерн и сравнить полученные результаты с известными моделями транспорта через органеллу.
5. Проанализировать транспортный путь хиломикронов из межклеточного пространства между энтероцитами через базальную мембрану кишечного эпителия в собственную пластинку кишечной ворсинки.
6. Проанализировать роль межклеточных контактов и цитоскелета энтероцита в транспорте липидов через кишечный эпителий.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях низкой пищевой нагрузки липиды поглощаются апикальной частью плазмолеммы энтероцита без эндоцитоза.
2. Транспорт прехиломикронов из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи происходит без формирования СОPII-производных везикул и «мегавезикул».
3. Липиды транспортируются через стопку комплекса Гольджи в течение 20 минут. Концентрация липидов от цис- к транс-полосу стопки, формирование между структурами комплекса Гольджи непостоянных тубулярных соединений и отсутствие липидов в везикулах, образуемых с участием СОPI-покрытия, согласуется с транспортной моделью «слияния и последующего разделения» компартментов («kiss-and-run»).

4. Хиломикроны проходят через поры базальной мембраны, образованные преимущественно дендритными клетками.
5. Пальцевидные (интердигитирующие) межклеточные контакты, локально расположенные между контактами энтероцитов, и окружающие их элементы цитоскелета, связанные с десмосомами и адгезивными соединениями, лежат в основе «насосного» механизма перемещения липидов через клетку и выдавливания хиломикронов из зоны пальцевидных контактов в интерстиций собственной пластинки кишечной ворсинки.

Научная новизна исследования

1. Впервые для изучения механизмов транспорта липидов была использована экспериментальная модель, исключаящая избыточную липидную нагрузку на слизистую оболочку тонкой кишки, что позволяет адекватно сравнить полученные и имеющиеся в литературе данные.
2. Впервые комплексом электронно-микроскопических методов, в том числе трехмерной электронной микроскопией высокого разрешения, проведен анализ ультраструктуры транспортного пути липидов через энтероцит кишечной ворсинки: показано строение эпителиального барьера тонкой кишки.
3. Оригинальным является морфологическое обоснование модели транспорта липидов из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи, из комплекса Гольджи к базолатеральной части плазматической мембраны; через базальную мембрану эпителия в собственную пластинку кишечной ворсинки.
4. Новым является доказательство (с помощью электронно-микроскопических методов) того, что у взрослых крыс во время транспорта липидов через апикальную часть плазматической мембраны энтероцита в условиях, исключающих избыточную липидную нагрузку, эндцитоз не играет существенной роли.
5. Разработана новая модель «насосного» механизма транспорта липидов из зоны пальцевидного контакта соседних энтероцитов в собственную пластинку кишечной ворсинки.

Практическая значимость научного исследования

Полученные результаты:

- 1) позволяют уточнить, а в ряде случаев по-новому посмотреть на механизмы трансформации липидов в кишечнике, что может способствовать прогрессу в лечении дислипидемии, атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний;
- 2) могут использоваться для создания экспериментальных моделей для тестирования лекарственных средств;
- 3) позволят более детально понять клеточные механизмы ряда заболеваний, в том числе ожирения, что важно для обоснования новых методов лечения, интерпретации эффектов после применения лекарственных средств.

Предложенная в работе экспериментальная модель может быть использована для последующего изучения механизмов транспорта липидов и

жирорастворимых веществ и изучения влияния экзо- и эндогенных факторов на процессы всасывания липидов.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедрах гистологии, эмбриологии и цитологии; анатомии, топографической анатомии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в выборе темы, определении цели, формулировке задач, в разработке методических и экспериментальных подходов, проведении научного поиска, проведении эксперимента, обработке, анализе и интерпретации полученных результатов. Ряд наблюдений был осуществлен совместно с другими исследователями, что документировано совместными публикациями и протоколом этического комитета. В частности, подготовка и съемка образцов для электронной томографии осуществлена с помощью д-ра мед. наук Г. В. Безнусенко в лаборатории электронной микроскопии Института молекулярной онкологии, г. Милан (Италия). Некоторые разделы работы выполнены в сотрудничестве с канд. биол. наук И. Д. Димовым, доцентом кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Апробация диссертации

Результаты научного исследования были представлены в виде четырех докладов на конференциях и конгрессах: на XIV-м Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); на IV-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Иваново, 2018); на VII-м Всероссийском съезде анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); на V-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Иваново, 2019).

Публикации

Результаты проведенных исследований отражены в 11-ти научных и приравненных к ним работах, из которых 5 опубликованы в научных рецензируемых журналах, где должны быть представлены результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, в том числе 3 публикации в журналах, индексируемых в международной реферативной базе данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Общий объем диссертации – 128 страниц машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований с иллюстрациями, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. Работа проиллюстрирована 4-мя таблицами и 15-ю комбинированными рисунками. Библиография включает 295 источников, в том числе 10 отечественных и 285 иностранных.

Благодарность

Выражаю персональную благодарность научным руководителям И. С. Сесоровой и А. А. Миронову, а также Г. В. Безнусенко, И. Д. Димову и другим ученым, помогавшим в проведении исследований (подробнее см. текст диссертации).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Объекты исследования, схема эксперимента, химические реагенты. Ультроструктурные механизмы всасывания липидов изучались на крысах линии Вистар комплексом электронно-микроскопических методов с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», 1977 г., Хельсинской декларации 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. Животные перед всеми экспериментами содержались на стандартной лабораторной диете в клетках с дном из сетки. Была использована следующая экспериментальная модель. Животному-донору шприцом с полиэтиленовой трубкой-наконечником вводилось перорально 1,5 мл кукурузного масла. Через 60 мин. у животного под наркозом (комбинация препаратов золетила и рометара в соотношении 3/1, в дозе 0,1 мл на 100 г массы тела) вскрывалась брюшная полость и шприцом из начального отдела тонкой кишки забирался химус, который вводился в верхний отдел тонкой кишки крысе-донору. Для исследования иссекался изолированный участок тонкой кишки через 5, 10, 25 и 45 минут после введения химуса (таблица). Контрольной группой стали 5 крыс после 24-часового голодания.

Электронная микроскопия. Образцы ткани фиксировались 2,5% глутаровым альдегидом, разведенным 0,05 М какодилатным буфером (pH 7,2). Затем образцы отмывались какодилатным буфером (pH 7,2) и постфиксировались 1%-ным раствором OsO₄ в течение 1 часа. Далее образцы снова отмывались тем же буфером и обрабатывались 0,3%-ным раствором тиокарбогидразида и вновь фиксировались OsO₄. После этого образцы обезвоживались спиртами восходящей концентрации. Для этого они помещались последовательно в 50%-, 70%-, 90%- и 100%-этанол, по 10 минут в каждый раствор с трехкратной сменой. Далее образцы помещались в смесь 100%-этанола и эпоксидной смолы («Епон 812») в пропорции 1:1 на 2 часа при комнатной температуре. После удаления смеси добавлялась эпоксидная смола, которая полимеризовалась в течение 24 часов в термостате при +60°C (Миров А. А., 1994).

Способы улучшения контраста. Для усиления контраста белковых покрытий (COP I, COP II и клатрина) использовали 1%-раствор таниновой кислоты. Для дополнительного усиления контраста уже после получения ультратонких срезов данные срезы контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца (по методу E. Reynolds, 1963). Для улучшения контраста липидов мембран мы применяли протоколы с использованием 0,5 %-

раствора тиакарбогидрозида (ОТОТО; методика Seligman A. M. (1966) в модификации). Ультратонкие срезы изготавливались на ультратоме Leica Ultracut-UCT (Leica, Germany).

Таблица – Распределение материала исследования в соответствии с использованными методами

Материал исследования	Кол-во жив./обр.	Методы исследования				Всего
		ТЭМ	СЭМ	ЭТ/3D	М/м	
1. Контроль – животные после 24-часового голодания	5/10	30	2	3/3	30	65/3
2. Экспериментальная группа (животное донор+ реципиент):	(20+40)	150	-	3/3	150	303/3
- через 5 мин. после введения химуса;	5/10	30	-	-	30	60
- через 10 мин. после введения химуса;	5/10	30	-	-	30	60
- через 25 мин. после введения химуса;	5/10	30	-	3/3	30	63/3
- через 45 мин. после введения химуса.	5/10	60	-	-	60	120
ВСЕГО:	25/50	180	2	6/6	180	365/6

Примечание: ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ЭТ/3D – электронная томография/трехмерная реконструкция электронно-томографического изображения; М/м – морфометрия.

Сканирующая электронная микроскопия. Подготовка образцов для сканирующей электронной микроскопии нативных препаратов включала последовательную обработку препаратов 1%-раствором таниновой кислоты на 0,1М какодильном буфере (pH – 7,4), 1%-раствором OsO₄; обезвоживание в этаноле восходящей концентрации и в абсолютном ацетоне; высушивание в углекислоте путем перехода через критическую точку (Миронов А. А., 1994); монтирование на предметный столик; напыление сплавом золота и палладия в аппарате Eico-111-B. Образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе Hitachi-S-405 AS.

Электронная томография. Метод использовался для доказательства дискретности мембранных структур эндоплазматического ретикулюма и комплекса Гольджи (везикул, цистерн) или наличия мембранных связей между структурами. Электронная томограмма была изготовлена на электронном микроскопе Tecnai 12 EM (FEI, The Netherlands), оборудованном гониомет-

ром и имеющим ускоряющее напряжение 120 kV. Для этого 150-200 нм серийные эпоновые срезы высушивались при комнатной температуре и окрашивались протеином-А, конъюгированным с 10 нм золотом, разведенным на дистиллированной воде (1:25). Плотность мечения составляла менее 1-2 гранулы на 100 нм². После окраски и высушивания сетка помещалась в держатель гониометра электронного микроскопа.

После «отжига» среза диафрагму устанавливали на обычное место и начинали отбирать вертикальные срезы КГ с использованием системы поиска в составе программы «AnalySis». Изображение отбиралось при увеличении 26000 или 43000. После выбора структуры начинали забор изображений, начиная с угла +180° до -180° наклона гониометра через каждый градус (361 изображение).

После забора всю серию изображений посылали на компьютер с программой для построения томограмм IMOD. Компьютер, используя гранулы золота, выстраивал срезы по одной оси. Далее вычислялась оптическая плотность для каждой единицы объема изучаемой структуры, и строились серийные виртуальные срезы толщиной 2-3 нм. На их основе программа IMOD строила трехмерное изображение изучаемой структуры. Формальное разрешение метода составило 4-6 нм, а при анализе виртуальных серийных срезов вдоль всех трех осей (XYZ) уровень разрешения достигал до 2-3 нм. Для каждой группы животных оценивались, как минимум, три томограммы.

Томограммы построены с помощью Г. В. Безнусенко (Институт молекулярной онкологии, г. Милан, Италия).

Получение серийных изображений с помощью детектора обратно рассеянных электронов в сканирующем электронном микроскопе, оборудованном внутренним ультратомом. Анализ проводился в соответствии с методом, описанным Н. С. Kalson et al. (2011) на сканирующем электронном микроскопе «Quanta 250» (FEI), оборудованном ультратомом «GATAN». После фиксации, осмирования и заключения в эпоксидную смолу образец наклеивался на держатель сканирующего электронного микроскопа, затачивался на ультратоме в виде пирамидки, на полученную поверхность образца напылялся слой золота, и он помещался в сканирующий электронный микроскоп. После первого полного среза, сканируя поверхность образца узким пучком электронов, с помощью детектора обратно рассеянных электронов получали изображение, образуемое под поверхностью образца от обратного рассеяния тонким слоем электронов (ускоряющее напряжение в 1,5 kV). Серийные изображения получались после каждого срезания слоя смолы толщиной в 70 нм.

Морфометрический анализ проводился путем количественной оценки ряда параметров. Измеряли длину и толщину кишечной ворсинки тонкой кишки; диаметр и высоту микроворсинки энтероцита; толщину базальной мембраны кишечного эпителия и диаметр ее пор; диаметр дендритных клеток, а также длину их плотного контакта с энтероцитом. Определяли количество цистерн в стопке КГ, ширину цистерны в центральной части, ширину

расширений латерального края стопки, диаметр везикулярных структур КГ, относительное количество мембран везикул, тубул и цистерн КГ. Измеряли длину межклеточных контактов энтероцита: плотного, щелевого, промежуточного, пальцевидного и десмосомы. Кроме того, для пальцевидных контактов определяли длину контактирующей поверхности между 2-мя десмосомами, длину проекции контакта на БЛПМ, ширину контактной щели. Подсчитывали количество липидных частиц во время транскитоza в просвете ГЭР, цис- и транс-цистерн КГ, межконтанктной щели. В нашем исследовании каждая величина была получена после анализа как минимум 30 электронно-микроскопических изображений.

Статистический анализ проводился при помощи программы Statistica 6.0. Для каждого параметра вычисляли средние значения, их стандартные ошибки и доверительные интервалы, дисперсии, среднее квадратическое отклонение и размах варьирования признака. Оценку достоверности различий между показателями разных экспериментальных групп осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общее строение кишечной ворсинки начального отдела тонкой кишки крысы после 24-часового голодания и микроанатомия структур, участвующих в транспорте липидов

Анатомически кишечные ворсинки начального отдела тонкой кишки крысы представляют собой выступающие в полость кишки, уплощенные структуры, форму которых можно охарактеризовать как листовидную. Средняя длина ворсинки 675 ± 43 мкм, ширина – 110 ± 32 мкм. Рельеф поверхности ворсинок неровный и соответствует группам эпителиальных клеток. Ворсинка покрыта однослойным призматическим эпителием, подавляющая часть клеток которого представлена каемчатым энтероцитом (всасывающими клетками со щеточной каемкой). Базальная часть плазматической мембраны энтероцита располагается на слое хорошо выраженной базальной мембраны с редкими порами диаметром от 500 нм до 2 мкм. Она представляет собой полосу фибриллярного материала средней электронной плотности шириной 30-50 нм.

В непосредственной близости от базальной мембраны обнаружены «светлые» клетки с относительно гомогенным матриксом низкой электронной плотности до 20 мкм диаметром с неровными контурами и множеством цитоплазматических отростков. Они были нами идентифицированы как дендритные клетки (рисунок 1 а). Дендритные клетки образуют с энтероцитами плотные соединения, а их отростки регистрируются в порах базальной мембраны.

В волокнистую структуру собственной пластинки кишечной ворсинки крысы погружены лимфатические и кровеносные микрососуды. Последние располагаются непосредственно под базальной мембраной и в совокупности

формируют сеть, соответствующую форме ворсинки. Лимфатические капилляры (1-3) расположены, как правило, в центральной части ворсинки, и у го-лодных животных представлены узкими щелевидными образованиями. Среди клеточных элементов стромы кишечной ворсинки чаще всего отмечались макрофаги, базофилы, лимфоциты, а также дендритные клетки, миофибробласты, гладкие мышечные клетки (рисунок 1 а).

Каемчатый энтероцит апикальной части ворсинки тонкой кишки представлен поляризованной клеткой призматической формы. Встречаются клетки с четырьмя и семью гранями. Апикальная часть плазмолеммы образует микроворсинки, которые формируют «щеточную каемку» с хорошо развитым гликокаликсом, электронная плотность которого повышается у основания микроворсинки. Диаметр микроворсинки составил в среднем $84 \pm 0,8$ нм, высота 1235 ± 23 нм.

В основании крипт «щеточной каемки» на апикальной части плазмолеммы мы не обнаружили клатриновых инвагинаций и/или почек, а также кавеол. Непосредственно под микроворсинками в клетке формируется зона цитоплазмы средней электронной плотности шириной 200-300 нм, не содержащая мембранных профилей, в том числе округлой формы. Ниже этой зоны расположен участок концентрации филаментозного материала, формирующий апикальное сплетение. В него вплетаются тонкие филаменты, окружающие плотный контакт, расположенный сразу под «щеточной каемкой» базолатеральной части плазматической мембраны, а также актиновые филаменты центральной части микроворсинок (рисунок 1 б). В апикальной части клетки расположены профили гладкого (ГЭР) и шероховатого (ШЭР) эндоплазматического ретикулума. Между ними лежат многочисленные митохондрии овальной или округлой формы. Профили ШЭР не многочисленны и локализуются вблизи стопок КГ как на цис-, так и на транс-полюсе органеллы. Обнаружены области близкой локализации цистерн ШЭР с цистерной КГ, а также зоны мембранных контактов этих органелл. Мембрана цистерн ШЭР на цис-полюсе КГ не имеет электронно-плотных участков, а также мембранных почек, покрытых электронно-плотной каймой. Профили ГЭР в энтероците кишечной ворсинки многочисленны и локализуются в апикальной части клетки, часть из них лежит в непосредственной близости от базолатеральной части плазматической мембраны около пояса адгезивных соединений. Просвет цистерн ГЭР средней электронной плотности без включений. В центральной области энтероцита, ближе к апикальной поверхности, расположено относительно крупное, овальной или округлой формы ядро, ориентированное вдоль длинной оси клетки с хорошо выраженными зонами эухроматина. Гетерохроматин сконцентрирован по периферии ядра, под нуклеолемой. Над ядром локализуется структура КГ. Органелла представлена дискретными стопками, состоящими из 5-6 уплощенных цистерн ($5,6 \pm 1,2$), ориентированных вдоль базолатеральной части плазматической мембраны. КГ энтероцита относится к стопочной (диктиосомальной) фенотипической форме с хорошо выраженным везикулярным компонентом и имеет морфологиче-

ские признаки не транспортирующей органеллы, в частности, в ряде случаев обнаруживается близкая локализация цистерны ШЭР с последней медиальной цистерной КГ.

Межклеточные контакты энтероцитов эпителия кишечной ворсинки сложно организованы и представляют комплекс соединений, расположение которых имеет определенную закономерность. Сразу ниже основания микроворсинки межклеточная щель замкнута плотным контактом (*zonula occludens*), ниже которого расположен щелевой контакт (*gap junction*). Под ним - промежуточный контакт (*zonula adherens*). Зона, прилежащая к контакту со стороны цитоплазмы, имеет повышенную электронную плотность. К ней примыкает сеть тонких филаментов, которая вплетается в апикальное сплетение. Далее располагается одна или несколько десмосом (рисунок 1 б). Дистально от них формируется зона сложных интердигитирующих контактов (ИДК) (рисунок 1 в). Первый ИДК располагается на уровне стопки КГ. Контакт ориентирован в вертикальной плоскости параллельно длинной оси стопки. Длина и количество пальцевидных выростов в ИДК выше в проксимальной и дистальной частях клетки. На уровне ядра – выражены в меньшей степени. Соседние ИДК разделены между собой десмосомой. На протяжении контакта десмосомы не встречаются. Средняя длина контактирующих поверхностей соседних энтероцитов, ограниченных двумя десмосомами, составила 715 ± 20 нм. Ширина контактной щели равномерна и составляет в среднем 40 нм. Проекция ИДК на базолатеральную часть плазматической мембраны составила 130 ± 6 нм.

Временные характеристики и ультраструктура транспортного пути липидов через энтероцит в условиях низкой пищевой нагрузки

Транспорт липидов через энтероцит можно условно разделить на следующие этапы: поглощение липидов из просвета кишки в энтероцит и доставку в эндоплазматический ретикулум (ЭР); образование прехиломикронов (ПреХМ) в ЭР; транспорт хиломикронов (ХМ) через КГ; секрецию ХМ в зону пальцевидных контактов; выдавливание ХМ из зоны пальцевидных контактов в интерстиций собственной пластинки кишечной ворсинки.

Поглощение липидов из просвета кишки в энтероцит и доставка в эндоплазматический ретикулум

Согласно одной из гипотез, всасывание липидов из просвета кишки в энтероцит осуществляется мембранными переносчиками (везикулами и / или кавеолами) (Mansbach and Siddiqi, 2016). В нашей работе в условиях исключения избыточной «липидной нагрузки» нам не удалось обнаружить на апикальной части плазматической мембраны мембранных почек, а также клаатрин- или кавеолин-производных везикул в субапикальной зоне цитоплазмы энтероцита, что позволяет говорить о низкой вероятности транспорта липидов с помощью мембранных переносчиков. Протокол контрастирования образцов ОТОТО позволил нам визуализировать концентрацию липидов в наружном листке плазматической мембраны (ПМ) микроворсинки энтероцита, что подтверждает гипотезу перемещения липидов вдоль ПМ латеральной

диффузией или с помощью белка-переносчика (рисунок 1 г). Впервые липиды регистрируются в просвете цистерн ГЭР, расположенных около плотного соединения базолатеральной части ПМ через 5 минут после введения химуса в просвет кишки животного. Плотное соединение создает «барьер» латеральной диффузии липидов, направляя их на цитозольный листок плазмолеммы, а оттуда – на мембрану ГЭР. При очень близком расположении мембран ГЭР и плазмолеммы ни одной зоны их слияния или мембранных структур-переносчиков между ними не зарегистрировано (рисунок 1 д). Это означает, что липиды попадают на мембрану ЭР с помощью цитозольных белков-транспортёров.

Транспорт хиломикронов из ЭР через комплекс Гольджи к базолатеральной части плазматической мембраны

Выход хиломикронов из эндоплазматического ретикулума

Цистерны ГЭР и ШЭР связаны между собой, однако липиды регистрируются только в просвете цистерн ГЭР. Через 10 мин. электронно плотные частицы появляются на цис-полюсе КГ. В большинстве гипотез транспорта липидов через ЭР в КГ принимается, что ХМ транспортируются СОРП-производными везикулами. Молекулярно-генетические исследования подтверждают, что СОРП-покрытие (по крайней мере, часть из его белков) необходимы для транспорта липидов из ЭР в КГ. Однако мы не обнаружили, в том числе и с помощью высокоразрешающей электронной микроскопии, ни СОРП-производных почек, ни изолированных везикул, содержащих липиды. Округлые мембранные переносчики с липидами всегда имели соединение 30-40 нм мембранной трубочкой или с цистерной ЭР, или КГ (рисунок 1 е). Данное наблюдение подтверждает гипотезу о независимом от СОРП-производных везикул выходе ХМ из ЭР (Siddiqi et al., 2003; 2010 а).

Механизмы транспорта хиломикронов через комплекс Гольджи

Через 25 мин. основной объем электронно-плотных частиц наблюдается на транс-полюсе КГ. Часть липидов выявляется в транс-переносчиках КГ, направляющихся к базолатеральной части плазмолеммы. При этом мы регистрируем концентрирование липидов в просвете латеральной части цистерн стопки от цис- к транс-полюсу, т.к. количество электронно-плотных частиц на транс-полюсе почти в 2 раза превышает их количество на цис-полюсе органеллы (рисунки 1 ж, 1 з, 1 и). Через 45 мин. липиды в стопке КГ не регистрируются, а концентрируются в зоне пальцевидных контактов энтероцитов и в собственной пластинке кишечной ворсинки (рисунки 2 а, 2 б, 2 в).

О механизмах транспорта ХМ через КГ известно мало. На сегодняшний день обсуждается несколько моделей секреторного транспорта липидов, однако чаще всего принимается, что ХМ перемещаются через КГ с помощью везикул. Попытка экстраполяции наших данных на существующие модели секреторного транспорта показала, что нет морфологических доказательств переноса ХМ через КГ СОРП-производными везикулами. ЭМ-томография выявила отсутствие в округлых профилях мембран КГ электронно-плотного

материала. Кроме того, часть СОРІ-производных везикул соединена «шейкой» с цистернами КГ. Основным противоречием другой модели – «созревания и прогрессии» цистерн – стал факт концентрации липидов при прохождении их через стопку КГ.

ЭМ-томография и 3D-реконструкции томограмм выявили тонкие мембранные соединения между ЭР и КГ, а также между компартментами органеллы. Низкая частота встречаемости таких соединений позволяет говорить об их временном характере. Проанализировав полученные факты, мы пришли к выводу, что модель «слияния и последующего разделения» компартментов (Mironov and Beznoussenko, 2008) позволяет объяснить большинство имеющихся данных о транспорте ХМ через стопку КГ. В основе этой модели лежит механизм «неполного слияния» мембран («kiss-and-run»). СОРІ-производные везикулы способны эффективно регулировать механизм слияния и разделения мембран КГ с помощью тонких тубулярных соединений между цистернами. Временное объединение двух цистерн в одном месте с последующим разделением в другом дает возможность переносчику липидов, не встраиваясь в стопку, продвигаться вдоль органеллы, сливаясь с дистальной цистерной и отделяясь от проксимальной. При этом происходит не только перемещение, но и концентрирование липидов от цис- к транс-полюсу.

*Транспорт липидов через базальную мембрану
в собственную пластинку кишечной ворсинки*

Ранее было высказано предположение (Azumi et al., 2018), что ХМ проходят через поры базальной мембраны, предназначенные для мигрирующих клеток иммунной системы, а их размер и количество увеличивается в тощей кишке животных после кормления (Azumi et al., 2018). Действительно, у крыс после 24-часового голодания поры в базальной мембране регистрируются редко. Напротив, через 45 минут после введения химуса мы наблюдаем многочисленные поры с липидами в просвете. В некоторых из них обнаруживаются цитоплазматические отростки дендритных клеток (рисунок 2 г).

**Роль межклеточных контактов и цитоскелета энтероцита
в транцитозе хиломикронов**

Транцитоз липидов представляет собой сложный многоступенчатый процесс. На начальном этапе всасывания липидов важную роль играет цитоскелет микроворсинки, актиновые микрофиламенты которого связаны с терминальной сетью энтероцита (Delacour et al., 2016), формируя сложный комплекс цитоскелетных и сократительных белков, взаимодействие которых обеспечивает их сокращение и продвижение липидов по плазматической мембране. Через 45 мин. после начала всасывания липиды скапливаются между двумя мембранами сложного пальцевидного контакта, а также над и под базальной мембраной. При этом объем осмиофильных включений и ширина межклеточной щели увеличиваются в дистальном направлении (рисунки 2 б, 2 в).

Выдавливание липидов из зоны пальцевидного контакта к базальной мембране способствует сложноорганизованный комплекс элементов цитоскелета, связанных с десмосомами и адгезивными соединениями, работающий как «насосный механизм». Мы подтвердили данные Krndija D. et al. (2019) о наличии актино-миозиновой «манжетки» вдоль базолатеральной поверхности плазмолеммы. Нами были обнаружены пучки тонких филаментов, расположенных вдоль проекции пальцевидного контакта и связанных с десмосомами, ограничивающими контакт (рисунок 2 д, 2 е, 2 ж). При этом десмосомы не только обеспечивают прочность монослоя, объединяя в единую сеть тонкие филаменты соседних энтероцитов, но и предотвращают «перенаполнение» липидами межклеточной щели и повреждение монослоя. Сокращение пучков тонких филаментов способствует выдавливанию липидов к базальной мембране и дальнейшему их продвижению. Таким образом, кишечная ворсинка представляет собой микроанатомическую структуру тонкой кишки, имеющую разноуровневый «насосный» механизм, который способствует продвижению липидов через эпителиальный пласт в собственную пластинку.

ВЫВОДЫ

1. Ультраструктура кишечной ворсинки тонкой кишки крысы после 24-часового голодания, в том числе каемчатого энтероцита, имеет характеристики низкой функциональной активности.
2. Липиды транспортируются через эпителиальный слой кишечной ворсинки в течение 45 мин.: за первые 5 минут они достигают эндоплазматического ретикулума; через 10 минут уже транспортируются из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи; к 20-й минуте покидают стопку цистерн комплекса Гольджи; а через 45 минут регистрируются в собственной пластинке.
3. Поглощение липидов апикальной частью плазмолеммы происходит практически без эндоцитоза, транспорт незрелых хиломикронов из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи – без формирования СОРП-производных везикул.
4. Во время транспорта липидов через комплекс Гольджи наблюдаются: концентрация хиломикронов от цис- к транс-полосу; формирование временных тубулярных соединений между компартментами стопки; отсутствие липидов в СОРП-производных везикулах. Наиболее вероятной моделью транспорта хиломикронов через стопку является «kiss-and-run»-модель, основанная на механизме «неполного слияния» мембран.
5. Транспорт хиломикронов через базальную мембрану кишечного эпителия опосредован дендритными клетками, отростки которых, образуя с энтероцитом плотный контакт, проходят через базальную мембрану, формируя в ней поры.
6. Комплекс межклеточных контактов энтероцита, функционально связанных с элементами цитоскелета, лежит в основе «насосного механизма», обеспечивающего перемещение липидов через клетку и выдавливание

хиломикронов из зоны межклеточных контактов в интерстиций собственной пластинки кишечной ворсинки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Протокол синхронизации транспорта липидов позволяет адекватно оценить временные характеристики транспортного пути на каждом этапе транспорта, и его использование дает возможность не только для детального изучения структур и молекулярных механизмов, но и для сравнения результатов разных групп исследователей, работающих по данной проблеме.
2. Электронно-микроскопический анализ высокого разрешения (включая электронно-микроскопическую томографию) необходим для доказательства дискретного или непрерывного характера транспортных механизмов молекул в клетке.
3. Метод усиления контрастирования по протоколу ОТОВО позволяет в электронно-микроскопических исследованиях визуализировать липиды в клеточных мембранах без специальной окраски, что может быть использовано для дальнейшего изучения механизмов транспорта липидов и его регуляции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и в журналах, индексируемых в международной информационной базе данных Scopus

1. Sesorova I. S. Structure of the enterocyte transcytosis compartments during lipid absorption / N. R. Karelina, **Т. Е. Казакова**, S. Parashuraman, M. A. Zdorikova, I. D. Dimov, E. V. Seliverstova, G. V. Beznoussenko A. A. Mironov, // **Histochem Cell Biol.** – 2020. – Vol. 153, № 6. – P. 413–429.
2. **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.
3. Сесорова, И.С. Новые возможности световой микроскопии в цитологии и гистологии // И.С. Сесорова, Г.В. Безнусенко, **Т.Е. Казакова**, В.В. Сесоров, И.Д. Димов, А.А. Миронов // **Цитология.** – 2018. – Т. 60, № 5. – С. 319–329.
4. Карелина, Н.Р. Ультраструктурные основы процесса образования лимфы / Н.Р. Карелина, И.С. Сесорова, Г.В. Безнусенко, В.К. Шишло, В.В. Сесоров, **Т.Е. Казакова**, А.А. Миронов // **Морфология.** – 2017 – Т. 151, № 2. – С. 7–19.
5. **Казакова, Т.Е.** Органеллы внутриклеточного транспорта в эндотелии лимфатических коллекторов / Т.Е. Казакова, И.С. Сесорова // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 4. – С. 509.

Прочие публикации

1. Сесорова, И.С. Транспорт липидов через комплекс Гольджи в энтероците кишечной ворсинки / И.С. Сесорова, **Т.Е. Казакова**, И.Д. Димов, А.А. Миронов // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 257.
2. Здорикова, М.А. Морфофункциональные особенности межклеточных контактов энтероцита кишечной ворсинки крысы / М.А. Здорикова, **Т. Е. Казакова** // Сборник материалов V Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека», Иваново, 9-11 апреля 2019 г. / Под ред. И.К. Томиловой. – Иваново: ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России. – 2019. – С. 9–11.
3. Здорикова, М.А. Молекулярные механизмы транспорта липидов из эндоплазматического ретикулума в комплекс гольджи в энтероците кишечной ворсинки / М.А. Здорикова, **Т.Е. Казакова**, И.Д. Димов, И.С. Сесорова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – № 11. – С. 30–34.
4. Карелина, Н.Р. Энтероцит и всасывание липидов / Н.Р. Карелина, И.Д. Димов, **Т.Е. Казакова**, И.С. Сесорова // Морфология. – 2018. – Т. 153, № 3. – С. 129–129а.
5. Димов, И.Д. Структурные различия кишечных ворсинок новорождённых и взрослых крыс / И.Д. Димов, Н.Р. Карелина, **Т.Е. Казакова**, И.С. Сесорова // Морфология. – 2018. – Т. 153, № 3. – С. 96–96а.
6. Кашин, А.Д. Структура межклеточных контактов эндотелия инициальных лимфатических сосудов / А.Д. Кашин, **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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

COPI (coatomer protein I) – первый комплекс белков покрытия

COPII (coatomer protein II) – второй комплекс белков покрытия

SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) – растворимые белки слияния мембран, опосредованного N-этилмалеимидчувствительными рецепторами

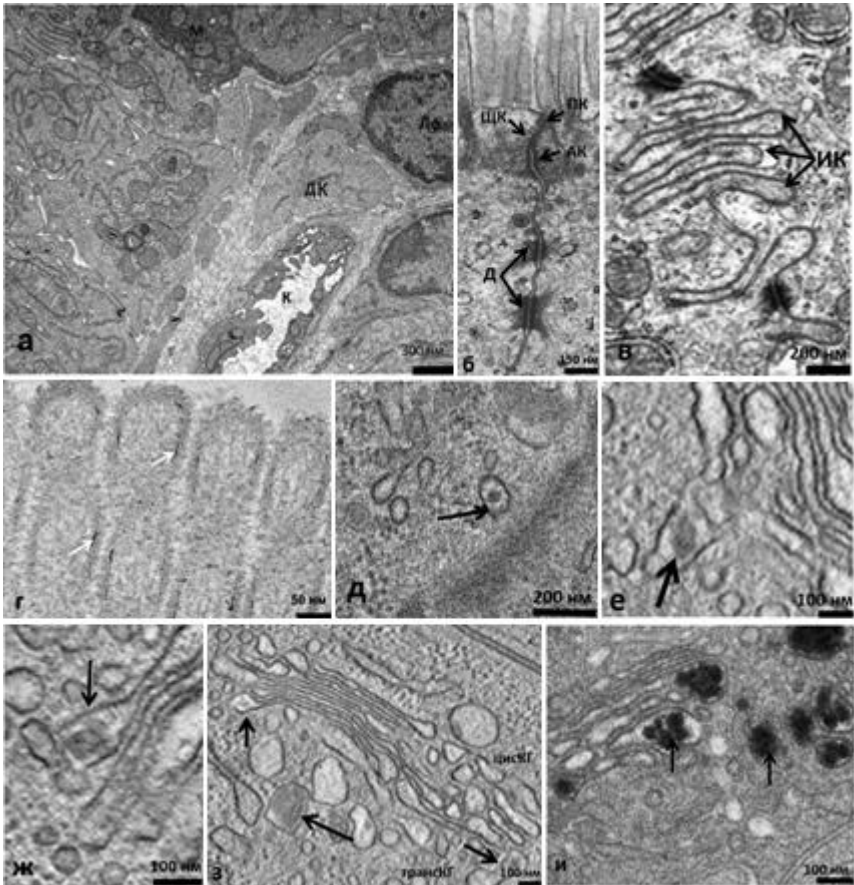


Рисунок 1 – Ворсинка начального отдела тонкой кишки крысы: а – центральная зона ворсинки (контроль), СЭМ с детектором обратно рассеянных электронов; б – расположение межклеточных контактов базолатеральной части плазмолеммы энтероцита (контроль), ТЕМ; в – пальцевидный контакт (контроль), ТЭМ; г – концентрация липидов в плазмолемме микроворсинок энтероцита (↑) (5 мин), ТЕМ, протокол ОТО-ТО; д – цистерна гладкого эндоплазматического ретикулума с липидами (↑) (5 мин), ТЕМ; е – цистерна гладкого эндоплазматического ретикулума с липидами, соединенная с цис-цистерной комплекса Гольджи (↑) (10 мин), ЭМ-томография; ж – липиды в просвете цис-цистерны комплекса Гольджи (↑) (25 мин), ЭМ-томограмма; з – липиды в цис- и медиальных цистернах комплекса Гольджи (↑) (25 мин), ТЭМ; и – липиды на транс-полусе комплекса Гольджи (↑) (25 мин), ЭМ-томография.

ДК – дендритная клетка, К – кровеносный капилляр, Лф – лимфоцит, ПК – плотный контакт, ЩК – щелевой контакт, АК – адгезивный контакт, Д – десмосома, ИК – пальцевидный контакт, цисКГ – цис-полус комплекса Гольджи, трансКГ – транс-полус комплекса Гольджи.

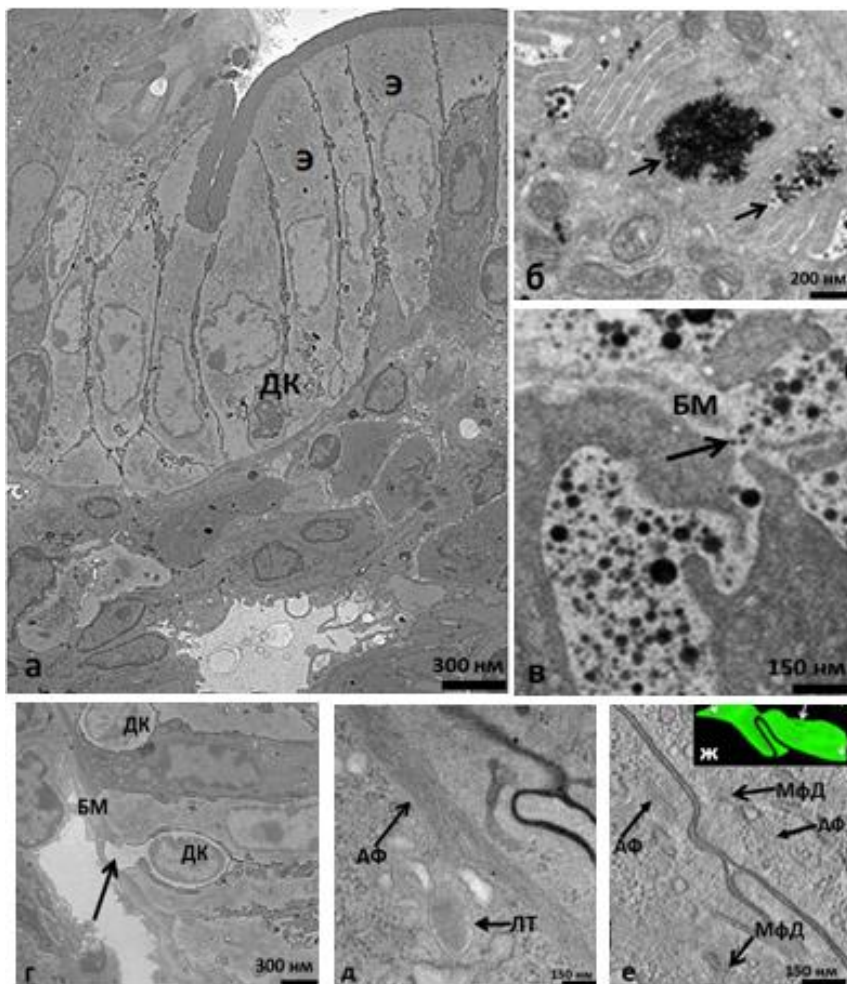


Рисунок 2 – Ворсинка начального отдела тонкой кишки крысы (45 мин): а – кишечная ворсинка, СЭМ с детектором обратно рассеянных электронов; б – скопление липидов в интердигитирующих контактах (↑), ТЭМ; в – прохождение липидов через пору базальной мембраны (↑), ТЭМ; г – отросток дендритной клетки в пору базальной мембраны (↑), СЭМ с детектором обратно рассеянных электронов; д – актиновые филаменты вдоль базолатеральной поверхности энтероцита и липидный транспортер, ТЭМ; е – пучки актиновых филаментов и микрофиламентов десмосом вблизи пальцевидного контакта, ТЭМ; ж – 3D-реконструкция пальцевидного контакта.

Э – энтероцит, ДК – дендритная клетка, БМ – базальная мембрана, АФ – актиновые филаменты, ЛТ – липидный транспортер, МфД – микрофиламенты десмосом.

Казакова Татьяна Евгеньевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ТРАНСПОРТНОГО ПУТИ ЛИПИДОВ ИЗ ПОЛОСТИ ТОНКОЙ
КИШКИ В СОБСТВЕННУЮ ПЛАСТИНКУ КИШЕЧНОЙ ВОРСИНКИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 14.12.2020 г. Формат 60×84 ¹/₁₆.
Авт. л. 1,0. Тираж 100 экз.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия»
Минздрава России
153012, г. Иваново, Шереметевский пр-т, 8