

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ИВАНОВСКАЯ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Кашин Александр Дмитриевич

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

14.03.01 – анатомия человека

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент,
Сесорова И.С.

научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор,
Миронов А. А.

Иваново - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОГО КАПИЛЛЯРА, СИНУСОВ ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА И ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Общее строение сосудистого эндотелия	13
1.2. Формирование лимфатического эндотелия в эмбриогенезе	15
1.3. Морфофункциональные особенности эндотелия лимфатического капилляра	18
1.4. Строение эндотелия лимфатических сосудов, стволов и протоков	24
1.5. Морфофункциональные особенности эндотелия лимфатического узла	29
1.6. Заключение	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.....	46
3.1. Строение эндотелия лимфатического капилляра в кишечной ворсинке тонкой кишки крысы	46
3. 2. Ультраструктура эндотелия краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы	56
3. 3. Ультраструктура эндотелия грудного протока кролика	61
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ.....	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Исследования последних лет значительно расширили наши представления о роли лимфоносных путей. Было доказано, что они являются активным участником многих физиологических процессов и даже небольшие функциональные нарушения могут стать причиной или модулировать самые различные патологические состояния, в том числе заболевания кишечника [46], ожирение [51], метастазирование опухолей [153] и многое другое.

Ключевую роль в нормальном функционировании лимфоносных путей играет эндотелий, формирующий пограничный клеточный слой [9, 17].

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 [64, 101, 148]. Напротив, избыточный вес вызывает снижение дренажа макромолекул в подкожной жировой клетчатке брюшной полости и дисфункцию лимфатических сосудов, что, в свою очередь, приводит к ожирению [194].

Обсуждается роль лимфатических сосудов и узлов в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта: болезни Крона, язвенного колита и других [86]. Показано нарушение: молекулярной структуры контактов; поглощения хиломикронов в кишечной ворсинке и их «утечку» в сосудах брыжейки при воспалительных заболеваниях кишечника [194]. 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 [87].

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 [44, 191] и может меняться при их изменении [52, 158]. Если биохимическая и генетическая неоднородность лимфатического эндотелия показана [138, 160, 177], то морфологических доказательств на сегодняшний день гетерогенности явно недостаточно.

Между тем, понимание клеточных механизмов трансэндотелиального переноса макромолекул в лимфоносных путях 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 [103, 153, 168]. Идет поиск эффективных форм как терапевтических, так и молекул-носителей [127]. Обсуждается использование липопротеинов, в частности хиломикрона [108].

При этом остаются нерешенными ряд вопросов, связанных с резорбцией макромолекул в лимфатическом капилляре и с механизмами транспорта макромолекул через эндотелий в лимфатических сосудах и в лимфатических узлах [121, 135, 138, 158, 160, 165, 177].

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

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. Новым 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.

5. 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, внутриворсинчатый клапан, обеспечивающий односторонний ток молекул из интерстиция в просвет лимфатического капилляра.

6. Новыми являются данные об отсутствии транцитоза хиломикронов диаметром 30-100 нм в лимфатическом капилляре кишечной ворсинки крысы в условиях, исключающих избыточную липидную нагрузку на слизистую оболочку тонкой кишки.

7. 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 липоидной 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 сердечнососудистых, онкологических заболеваний и методов диагностики.

3) способствуют пониманию клеточных механизмов развития ряда заболеваний, в основе которых лежат изменения 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 мембраны 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, 12.04.2018); на II Санкт-Петербургском лимфологическом форуме «Лимфология XXI века: новые подходы и актуальные исследования» (г. Санкт-Петербург, 10.10.2019); V Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (г. Иваново, 9.04.2019); VII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (г. Иваново, 6.04.2021); Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора Александра Кирилловича Косоурова (г. Санкт-Петербург, 24.05.21).

Внедрение результатов исследования

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».

Личный вклад автора

Автор совместно с научным руководителем осуществлял выбор темы, обсуждал и принимал непосредственное участие в планировании дизайна эксперимента, формулировки цели и задач, в выборе методик исследования. Автором самостоятельно проведен научный поиск, реализована экспериментальная модель липидной нагрузки, проведен забор материала.

Полученный материал был описан и проанализирован, проведена статистическая и морфометрическая обработка данных. Часть наблюдений были осуществлены совместно с другими исследователями. Так, электронная томография комплекса Гольджи была выполнена доктором мед. наук Г.В. Безнусенко (лаборатория электронной микроскопии Института молекулярной онкологии, г. Милан, Италия). Эксперимент по нагрузке липидами выполнен совместно с аспирантом кафедры анатомии и топографической анатомии М.А. Здориковой и с канд. биол. наук И.Д. Димовым, доцентом кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, что указано в совместных публикациях и протоколе этического комитета.

Публикации

Полученные результаты исследования были опубликованы в 10 научных работах, из которых 2 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 1 в журнале международной информационной базы данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста. Структура диссертации: введение, обзор литературы, глава результатов собственных исследований с иллюстрациями, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 18 рисунками. Библиография включает 207 источника.

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю доктору биологических наук, профессору И.С. Сесоровой за определение направления моего исследования и помощь в реализации темы. Искренне признателен моему научному консультанту члену-корреспонденту РАМН, профессору, доктору медицинских наук А.А. Миронову за помощь в интерпретации части результатов

исследования, а также возможность проведения части из них на базе лаборатории электронной микроскопии Института молекулярной онкологии г. Милана. Искренне благодарен доктору медицинских наук Г.В. Безнусенко и доценту И. Д. Димову за помощь в обсуждении материала; заведующему и преподавателям кафедры анатомии человека, топографической анатомии Ивановской государственной медицинской академии за техническую помощь и поддержку.

ГЛАВА 1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОГО КАПИЛЛЯРА, СИНУСОВ ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА И ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Общее строение сосудистого эндотелия

Сосудистый эндотелий представляет собой однослойный пласт пограничных специализированных клеток, определяющих проницаемость сосудистой стенки, и в конечном итоге, нормальное течение всех процессов жизнедеятельности организма [76].

Для сосудистого эндотелия характерны: пограничное положение и полярность клеток; наличие базальной мембраны, содержащей коллаген IV типа; система межклеточных контактов, формирующих непрерывный клеточный пласт [76].

Ультраструктура эндотелиальных клеток имеет характерное строение. В клетке хорошо выделяется центральная или ядерная и периферическая зоны. Кроме овального или лопастного ядра в центральной зоне расположены: комплекс Гольджи, состоящий из коротких уплощенных цистерн; эндоплазматическая сеть; митохондрии со светлым матриксом и малым числом крист. При этом, органеллы общего назначения занимают относительно небольшой объем эндотелиоцита (например, митохондрии - 2-6 % от объема клетки) [126].

Периферическая зона цитоплазмы клетки содержит структуры, обеспечивающие транспорт молекул и проницаемость эндотелиального пласта, которые могут занимать до 30-40% объема цитоплазмы. Это микропиноцитозные везикулы, везикуло-вакуолярные органеллы, трансэндотелиальные каналы, фенестры и поры [76].

Кавеолы представляют собой инвагинацию плазмолеммы колбовидной формы (около 70 нм в диаметре). Она окружена белком кавеолином-1 и имеет в области шейки диафрагму, состоящую, в основном, из гликопротеида PLVAP (plasmalemma vesicle associated protein) [189]. Несколько слившихся между собой

микровезикул получили название везикуло-вакуолярной органеллы [102], а цепочка везикул, соединившая люминальную и аблюминальную поверхности эндотелиальных клеток, - трансэндотелиального канала [189].

В периферических участках эндотелиальных клеток выделяют также два вида трансцеллюлярных отверстий: диаметром 60-70 нм, закрытые, как правило, одной диафрагмой (фенестры); и диаметром до 200 нм без диафрагмы (поры) [143]. Как фенестры, так и поры окружены со стороны цитоплазмы актиновыми филаментами, способными менять диаметр структуры [143].

Формирование транспортных структур в сосудистой эндотелии разных органов и тканей различно, что подтверждает структурную гетерогенность эндотелия [178].

Для сосудистого эндотелия характерна полярность. Плазмолемма эндотелиальной клетки делится на люминальную и базальную части, отличающиеся молекулярным составом [199]. Она может образовывать складки и микроворсинки.

Кроме того, выделяют латеральную часть или контактную поверхность клетки [199]. Она формирует межклеточные контакты и контактные комплексы, которые интегрируют клетки в ткань и могут видоизменяться за счет ремоделирования цитоскелета [53].

Эндотелиоциты формируют между собой три типа соединений: адгезивные, плотные и щелевые. Адгезивные контакты формируются посредством взаимодействия внеклеточных доменов VE-кадгерина двух соседних клеток и связаны с актиновыми микрофиламентами клетки. В образовании плотных контактов принимают участие белки семейства окклюдина, клаудина и ZO (zona occludens proteins), которые также связаны с актиновым цитоскелетом. Количество и распределение плотных соединений определяется активностью парацеллюлярного транспорта в эндотелии сосудистого русла [76].

На базальной поверхности плазматической мембраны эндотелиоциты образует контакты с подлежащими клетками или с фибриллярными структурами интерстиция. Так, с гладкомышечными клетками чаще всего формируется

щелевой контакт [83], с базальной пластинкой – фокальные контакты с участием белков семейства интегрины [166, 173].

Сосудистый эндотелий имеет особенности строения в зависимости от размеров и типа сосуда, структуры, положения и функций органа, функционального состояния, микроокружения и многих других эндогенных и экзогенных факторов [44, 191]. Неясно, как закреплён фенотип эндотелиальной клетки ее индивидуальными функциями, однако биохимически доказано формирование множества гетерогенных популяций сосудистого эндотелия, имеющих характерные особенности строения.

1.2. Формирование лимфатического эндотелия в эмбриогенезе

Сосудистый эндотелий формируется в эмбриогенезе из ангиобластов кровяных островков внезародышевой и зародышевой мезенхимы, периферические клетки которых дают начало эндотелиальному дифферону [28]. Экспрессия определенных генов и действие внешних факторов приводит к достаточно ранней специализации эндотелия на артериальный, венозный и лимфатический [154]. Процесс дифференцировки сопровождается значительным уплощением клеток и формированием межклеточных контактов [28], а также появлением высоко специфических рецепторов и адгезивных молекул [154].

Долгое время существовало представление, что сосудистый эндотелий лимфатических капилляров образуется путем трансдифференцировки из венозного эндотелия [75]. В последние годы, благодаря открытию маркерных белков (LYVE1) [47, 91], обнаружены и другие предшественники ЭК лимфатических сосудов. Было показано формирование «почек» будущих лимфатических сосудов на лимфатических сосудах брыжейки [179], а также из недифференцированных клеток капилляров дермы [138, 158] и из популяции клеток-предшественников на грудинно-рёберной поверхности сердца [122].

Стимулом для формирования «почки» является синтез фактора транскрипции белка Prox1 (Prospero-related homeobox protein-1), который, в свою очередь, стимулирует синтез другого транскрипционного фактора – белка Sox18. Блокада синтеза этих белков исключает формирование у взрослого животного лимфатической системы, в то время как кровеносная система формируется без патологии [132, 201].

На модельном объекте было показано, что повышенная концентрация этих белков в эндотелии вены вызывает образование в ее стенке «почки» и запускает процесс дифференцировки лимфатического эндотелия [108].

В процессе эмбриогенеза эндотелиальные клетки будущих лимфатических капилляров мигрируют от центральных венозных сосудов эмбриона и, сливаясь, образуют в интерстициальном пространстве яремные, подвздошные, срединные, подмышечные эмбриональные лимфатические мешки. Они впоследствии станут источниками первичного лимфатического сплетения.

Для образования эмбриональных лимфатических мешков необходим сигнальный белок, специфический фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor) С-типа, который синтезируется определенными областями мезодермы [192]. Фактор имеет специфические белки-рецепторы VEGFR-3 и VEGFR-2.

Связывание фактора роста эндотелия сосудов с рецептором VEGFR-3 запускает миграцию эндотелиальных клеток и образование монослоя. Комплекс фактора роста эндотелия сосудов с рецептором VEGFR-2 способствует увеличению диаметра лимфатического сосуда, но не влияет на образование «почек» [93]. Оба рецептора являются критическими в лимфангиогенезе, и при их удалении сосуды не формируются [192]. Эмбриональные лимфатические капилляры впервые появляются в непосредственной близости от эмбриональных артериальных сосудов. Такая локализация, по-видимому, важна для нормальной работы внутривенного клапана будущего сосуда. Она реализуется системой сигнальной трансдукции на основе белков Notch/Dll4 [197].

После образования первичного лимфатического сплетения начинается процесс дифференцировки лимфоносного русла [193], который запускается временным повышением синтеза фактора транскрипции Foxc2 [107]. При его блокаде или удалении происходит торможение дифференцировки лимфатического капилляра в сосуд и образование клапанов [156, 173].

В эндотелии лимфатического капилляра снижается синтез Prox1, VEGFR-3, LYVE-1 и Ccl-21, клетка начинает синтезировать компоненты базальной мембраны, к которой начинают мигрировать гладкие мышечные клетки (ГМК) [107, 155]. Их миграция регулируется белками семафорин и нейропилин [65, 124], а также ангиопоэтином-2 [90, 110]. Гладкие мышечные клетки лимфатических сосудов отличаются от гладких миоцитов кровеносных сосудов [141, 204]. Они имеют факторы, характерные как для гладкой, так и поперечнополосатой мышечной ткани [141]. Для привлечения мышечных клеток в лимфатических, как и в кровеносных сосудах, важна экспрессия в эндотелии собирающих лимфатических сосудов еще одного белка - рецептора тромбоцитарного фактора роста (Platelet-derived growth factor) PDGFB и его опосредованное связывание с матриксом [186].

Для роста и последующего функционирования лимфатических сосудов (в том числе для развития клапана) важна правильная поляризация клеток. Ключевыми регуляторами полярности эпителиальных клеток являются белки: Celsr1, Vangl2, Pkd1, Pkd2 [62, 85]. Они, в том числе, обеспечивают связь клетки с цитоскелетом.

Дифференцировка лимфатических сосудов сопровождается формированием клапана. За его образование отвечают белки: Foxc2 [173]; NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (NFAT) [107]; эфрин-Б2 (ephrin-B2) [155]. Мутации этих белков, как и потеря α -интегрина, ведут к нарушению образования или дефекту створок клапанов [59]. Кроме того, для формирования правильной конструкции клапана важна форма и ориентация ЭК, которые поддерживают белки полярности и цитоскелет.

Лимфатический узел начинает формироваться около лимфатического сосуда из обособленной группы мезенхимальных клеток, которые в процессе роста вдавливаются в просвет сосуда [66, 152]. Эндотелий афферентного лимфатического сосуда формирует стенку краевого синуса [41]. Сплетения лимфатических сосудов между тяжами эмбриональной соединительной ткани формируют промежуточные синусы [41].

Лимфатические сосуды играют ключевую роль в развитии лимфатических узлов, обеспечивая взаимодействие лимф токсина с специализированным рецептором лимфоцитов, так называемых клеток индукторов лимфатических узлов [37, 66, 144, 152]. У мышей, лишенных лимф токсина или его рецепторов в эмбриогенезе, лимфатические узлы не развиваются. При этом лимфатическая сосудистая система формируется без патологий [43]. Секвенирование РНК показало, что в лимфатических узлах человека выявляется до шести различных типов эндотелиальных клеток, которые локализуются в разных зонах узла [177]. Причем, они в основном различаются экспрессией различных профилей хемокинов [177].

Таким образом, эндотелиальный монослой лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатических коллекторов формируется на основе общих систем сигнальной трансдукции, при этом нужно сказать, что белки, участвующие в лимфангиогенезе, не совсем специфичны, и многие из них могут быть найдены в кровеносных сосудах.

1.3. Морфофункциональные особенности эндотелия лимфатического капилляра

Лимфатические капилляры представляют собой слепо начинающиеся уплощенные трубочки, отвечающие за резорбцию жидкости, белка, антигенов и пищевых липидов из интерстиция в лимфатическое русло [16], транспорт иммунных клеток [191]. Функциональным особенностям строения лимфатических капилляров посвящен ряд фундаментальных исследований [10, 17, 19, 36, 56, 71].

Было показано, что лимфатический капилляр состоит из уплощенных эндотелиальных клеток с сильно изрезанными краями. Межэндотелиальные границы лучше визуализируются азотнокислым серебром, чем в кровеносных капиллярах, лимфатических сосудах, что косвенно подтверждает их большую проницаемость [17].

В отличие от артериального эндотелия, эндотелиальные клетки лимфатических капилляров в 3-4 раза крупнее и имеют в 4-5 раз большую длину [71]. Еще одна особенность лимфатического эндотелия в капиллярах связана с большим количеством цитоплазматических отростков как на люминальной, так и на аблюминальной части плазмолеммы [36].

В центральной зоне клетки располагается стандартный для сосудистого эндотелия набор органелл [13]. В ядре мелкозернистый, равномерно распределенный хроматин. Стопки комплекса Гольджи небольшие с крупными (диаметром около 300 нм) и мелкими (60-100 нм) везикулами, некоторые из которых содержат протеиновую кайму [13]. Митохондрии крупные, немногочисленные, длиной 250-300 нм. В цитоплазме встречаются свободные рибосомы, немногочисленные полисомы [36].

В периферической зоне концентрируются структуры, обеспечивающие транспорт молекул и проницаемость эндотелиального пласта. Широко признается, что объемная плотность плазмолеммальных везикул в эндотелии лимфатических капилляров выше, чем в кровеносных капиллярах и может достигать 35-40 % объема цитоплазмы [178]. При этом, в эндотелии лимфатического капилляра кишечной ворсинки отмечается лишь 15 % плазмолеммальных везикул [98]. При этом, около половины всей популяции везикул может быть связана с плазматической мембраной [19, 36].

Было показано, что специфическим маркером и основным компонентом плазмолеммальных везикул как лимфатического, так и кровеносного эндотелия является интегральный мембранный белок кавеолин-1, имеющий молекулярную массу 20-22 кДа [176].

В эндотелии лимфатических капилляров также были описаны трансэндотелиальные каналы [131, 176], симфиосомы (кавеолосомы) (везикулы, размером 0,1-4 мкм) [73], везикуло-вакуолярные органеллы [10].

Цитоскелет эндотелиальных клеток представлен микротрубочками, тонкими актиновыми микрофиламентами, диаметром около 5 нм, располагающимися по базальной поверхности, и толстыми филаментами диаметром 9 нм, диспергированными по всей цитоплазме [36].

Эндотелиоциты лимфатического капилляра имеют хорошо развитые якорные филаменты толщиной 4-11 нм, состоящие в основном из фибриллина. Они начинаются от полудесмосом ЭК и фиксируют плазмолемму эндотелиоцита к фибриллярным элементам внеклеточного матрикса. Фибриллин взаимодействует через точечные зоны адгезии с анкирином [35]. Фибриллин и анкирин, а также белки FAK (focal adhesion kinase) имеют близкую локализацию [35, 58]. Считается, что якорные филаменты участвуют в расширении эндотелиальных щелей при скоплении жидкости в интерстиции, что способствует заполнению капилляров лимфой.

Непрерывная базальная мембрана, перициты и гладкомышечные клетки в стенке лимфатических капилляров отсутствуют [35, 36]. Р. Baluk с соавторами (2007) описывают фрагменты базальной мембраны в зонах плотных соединений синусоидных контактов лимфатического капилляра [58].

Принято считать, что структура межклеточных контактов в эндотелии лимфатического капилляра является более сложной, чем в кровеносных капиллярах, а форма контактирующих поверхностей плазмолеммы и частота встречаемости контактных комплексов отличаются значительной вариабельностью [36, 55, 82, 98].

Ряд авторов считает, что наиболее распространенными типами соединений эндотелиоцитов в лимфатическом капилляре являются контакты открытого типа или щели, лишенные специальных соединительных комплексов [10, 73].

Так, межклеточные щели от десятков нанометров до нескольких микрометров были описаны в стенках лимфатических капилляров разных

органов. Их размеры допускают свободное перемещение макромолекул, частиц и даже клеток в просвет лимфатика [29, 73].

По другим данным, открытые контакты встречаются в лимфатических капиллярах достаточно редко, в среднем в 2 % случаев. При этом в 30 % межклеточных контактов лимфатических капилляров встречались плотные соединения [98].

Было высказано предположение, что структурно-функциональные свойства межклеточных контактов в эндотелии лимфатических капилляров непостоянны: контакты закрытого типа легко трансформируются в контакты открытого типа, что связывают с необходимостью резорбции в «корневые» микрососуды макромолекул [16]. При этом сама трансформация контактов является физиологическим явлением. Так, J.R. Casley-Smith (1980) посчитал, что если в норме общая длина открытых контактов достигает 1-6 % от общей длины сосуда, то при отеке она может увеличиться до 50 % [70].

Было высказано предположение, что открытых контактов больше в лимфатических капиллярах механически активных органов (диафрагме, кишке, миокарде). Они могут существовать лишь в определенную фазу образования лимфы, а затем переходить в закрытые контакты и вновь открываться при наполнении лимфатика [74].

G. Azzali (1982) на основе серийных срезов воспроизвел трехмерную реконструкцию лимфатических капилляров тонкой кишки у разных животных (крыса, летучая мышь) и показал, что на 4200 срезах было найдено только 9 открытых контактов. Однако ему удалось выявить каналы, косо пронизывающие стенку сосуда и образованные цитоплазматическими отростками соседних клеток. В интерстиции и просвете лимфатика эти отростки образовывали «трубку», которая в стенке полностью замыкалась за счет контакта с соседней клеткой. Автор посчитал, что открытые контакты могут быть результатом тангенциального среза через показанные ими «интраэндотелиальные» каналы [57].

Вопрос о существовании открытых контактов остается спорным, однако результаты электронно-микроскопического анализа показывают, что

межклеточные контакты в лимфатическом эндотелии достаточно сложны, а форма контакта может меняться на протяжении одной и той же контактной щели. Открытые контакты могут быть также фрагментом более сложного комплекса, в котором контактная щель варьирует по ширине и сложности, а также чередоваться с адгезивным или с локальным плотным контактом [1, 13].

В лимфатическом капилляре трахеи P. Baluk с соавторами (2007) описал межэндотелиальные контакты, которые они по форме контактной поверхности назвали синусоидными [58]. Контакты формировались уплощенными, наслаивающимися на соседнюю клетку выростами цитоплазмы, которые на самой верхушке в крайней точке имели точечную зону промежуточного контакта. Эта зона метилась на белок VE-cadherin [58]. В местах соединения проекции контактов соседних клеток авторы находят типичные плотные соединения [58]. Они предположили, что данные контакты могут работать как клапаны «входа», препятствующие обратному току интерстициальной жидкости из полости лимфатического капилляра в интерстиций [34].

При изучении резорбции макромолекул в лимфатический капилляр было показано, что для большинства молекул размером до 10 нм (или ~16-20 кДа) дренаж из интерстициального пространства происходит главным образом через кровеносные капилляры [50]. Макромолекулы размером от 10 до 100 нм попадают в лимфатические капилляры через межклеточные соединения или, как предполагается, трансцитозом [12, 14, 64, 65, 66]. Показано, что интерстициальный перенос, как правило, зависит от заряда молекулы. Движение гидрофильных макромолекул, а также несущих отрицательный или нейтральный заряд, происходит более эффективно, т.к. основной компонент интерстиция, гиалуроновая кислота, несет отрицательный заряд [67, 68]. Переносу макромолекул в лимфу способствуют также факторы, изменяющие давление и поток интерстициальной жидкости [58, 62].

Хорошо известно, что большая часть пищевых липидов попадает из кишечника в кровь через лимфатическую систему. Липиды всасываются кишечным эпителием в виде моноглицерида и жирных кислот и ресинтезируются

в энтероцитах кишечной ворсинки, формируя транспортную форму – хиломикрон.

Обсуждение механизмов проницаемости эндотелия лимфатических капилляров для хиломикронов длится на протяжении уже нескольких десятилетий. Долгое время среди физиологов существовала негласная договоренность о том, что хиломикроны транспортируются в просвет лимфатического капилляра через межклеточные промежутки [55]. В 1959 году S.L. Palay показал хиломикроны на электронограммах в области межэндотелиальных соединений и в просвете лимфатического капилляра [94, 95, 96].

Позже появились изображения в статьях, демонстрирующие хиломикроны как в области стыков межклеточных контактов, так и в просвете везикул в цитоплазме эндотелиальных клеток [73]. J. Casley-Smith предположил существование двух путей транспорта хиломикронов через стенку лимфатического капилляра, но считал, что параклеточный путь, вероятнее всего, имеет первостепенное значение [94, 95, 96].

В 1970 году W. Dobbins демонстрирует многочисленные везикулы, содержащие хиломикроны, и показывает, что большая часть контактов между эндотелиоцитами закрытые [83, 98]. Автор пришел к выводу, что хиломикроны попадают в просвет лимфатического капилляра трансклеточно, а визуально открытые контакты, показанные в более ранних работах, могут быть результатом среза и получены искусственно.

Y. Collan (1974) изучает контакты эндотелия лимфатических капилляров и показывает, что наряду со «сложными» стыковыми областями разбросаны «простые стыковые зоны», которые, по всей вероятности, и являются местом транспорта хиломикронов [82]. Споры по поводу двух механизмов транспорта хиломикронов продолжаются.

I.4. Строение эндотелия лимфатических сосудов, стволов и протоков

В отличие от кровеносного эндотелия морфологию эндотелия лимфатических сосудов, стволов и протоков определяют (кроме его пограничного положения) сегментарное строение сосудистой стенки и наличие внутрипросветных клапанов сложного строения [2, 31].

Микрорельеф эндотелиоцитов межклапанного сегмента протоков редуцирован [6], что является следствием эндолимфатического давления и низкого напряжения сдвига [18]. Напротив, он хорошо выражен в областях соединения и разделения лимфатических коллекторов, на створках клапанов и брыжейкоподобных складках клапанов [2].

Форма эндотелиальных клеток лимфатических сосудов разнообразна и зависит от размера сосуда, степени его растяжения и локализации клеток. Длина эндотелиоцитов также варьирует [2]. Люминальная (апикальная) и аблюминальная (базолатеральная) части плазмалеммы практически одинаковые. Гликокаликс в лимфатических сосудах выражен хуже, чем в кровеносных [119].

В эндотелиальных клетках лимфатических сосудов, также, как и в кровеносных, отчетливо выделяется околядерная и периферическая области [30]. Высота клеток околядерной зоны в межклапанном сегменте грудного протока составляет 1-3 мкм, а минимальная высота периферической области клетки достигает 20 нм [2].

В центральной (околядерной области) эндотелия лимфатических сосудов расположено одно, иногда 2-3 ядра овальной формы и длинным диаметром, ориентированным вдоль оси сосуда [30]. В грудном протоке, в условиях регенерации эндотелиального пласта, встречаются симпласты с 10-ю и более ядрами [30].

Цитоплазма эндотелиальных клеток грудного протока содержит характерные для сосудистого эндотелия органеллы: немногочисленные митохондрии; относительно хорошо развитый синтетический аппарат с короткими канальцами агранулярной и гранулярной эндоплазматической сети,

свободные рибосомы, компактные стопки комплекса Гольджи [2]. Стопки комплекса Гольджи немногочисленны и состоят из трех-пяти уплощенных цистерн. Концы цистерн расширены и покрыты каймой. Из общего объема мембран стопки до 60 % приходится на мембраны цистерн, 7-10 % на тубулярные структуры цис- и транс- сетей [29].

В эндотелиальных клетках грудного протока найдены тельца Вейбеля-Паладе [97] липидные капли большей или меньшей величины, достигающие 0,45 мкм. [72]. Между тем, дискуссия по поводу существования в эндотелии лимфатических сосудов телец Вейбеля-Паладе, заполненных фактором Виллебранда и некоторыми другими антитромботическими белками, продолжается [39].

В периферической зоне эндотелиальных клеток описываются плазмолеммальные везикулы диаметром 50-80 нм с электронно-прозрачным содержимым, занимающие до 13 % объема цитоплазмы [2, 18, 72].

В эндотелиальном пласте лимфатических сосудов описаны замыкающие соединения (плотные, *zonula occludens*), адгезионные контакты (*junction adhaesionis*) и коммуникационные контакты (*junction communicans*) [60]. С функциональной точки зрения такие контакты объединяют в единую группу «закрытых контактов» [74]. Этим контактам противопоставляют открытые контакты (*open junctions*), в которых величина межклеточной щели варьирует от 0,1 мкм до нескольких микрометров. Указывается, что в интима грудного протока все межэндотелиальные соединения, закрытые [69].

В грудном протоке были описаны следующие формы адгезивных контактов: простые стыковые, черепицеобразные, простые пальцевидные и сложные пальцевидные [36, 183]. В числе специальных межклеточных соединений были описаны: замыкающее пятно и плотный контакт (*macula et zonula occludens*), пятна адгезии или десмосомы (*macula adherens*) [73]. В составе десмосомы обнаружены белки плакоглобин и десмоплакин, ассоциированные с VE-кадгерином [60].

В плотных соединениях эндотелия лимфатических сосудов, в отличие от кровеносных, обнаружены только окклюдин, клодин и белок ZO-1 [58]. При этом отмечается повышенное содержание ряда других белков: Prox-1, LYVE-1 и PECAM [108, 120], неурофилина (neuropilin-2, Nrp-2), десмоплакина [91], семафорина (semaphorin) [40, 47] и некоторых других. Эти белки используются в качестве специфических маркеров ЭК лимфатических сосудов. Маркером кровеносных сосудов является чаще всего белок CD-31 [47].

В эндотелиальном пласте лимфатических сосудов отсутствует непрерывный пояс плотных соединений. Этот факт вызывает споры по поводу наличия в лимфатическом эндотелии между люминальной и аблюминальной частями плазмолеммы асимметричного распределения липидов и белков, которое характерно для поляризованных клеток [58].

Образовавшаяся в лимфатических капиллярах лимфа транспортируется по собирающим лимфатическим сосудам, контакты которых должны предотвращать ее «утечку» [58, 160]. Нарушение проницаемости эндотелиального монослоя лежит в основе патогенеза самых различных заболеваний [116, 195].

Целостность и проницаемость эндотелиального пласта обеспечивается молекулами плотных соединений, соединительными молекулами адгезии (JAM, Junctional adhesion molecules) [15], цитоплазматическими белками семейства ZO-1 [207], мембранными липидами, цитоскелетом и рядом других молекул и представляет собой сложную систему межмолекулярных взаимодействий [207].

Плотные соединения ограничивают межклеточный транспорт молекул и разграничивают апикальный и базолатеральные домены плазматической мембраны [207].

В плотных соединениях эндотелия лимфатических сосудов отсутствует ряд белков, обнаруженных в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов. В лимфатическом эндотелии хорошо изучены белки: occludens-1 (ZO-1) [89], клаудины [172]; соединительные молекулы адгезии [125]; селективная молекула адгезии эндотелиальных клеток (ESAM) [118] и некоторые другие.

Показано, что отсутствие клаудина-5 у эмбрионов (CLDN-5) не вызывает морфологических дефектов сосудистой (в том числе в лимфатической системе), но приводит к постнатальному нарушению проницаемости сосудов и быстрой гибели эмбрионов после рождения [58].

Избирательная проницаемость эндотелиального барьера в лимфатических сосудах контролируется высоко консервативным трансмембранным белком эфрин-В2 (EphrinB2), который связывается преимущественно со своим рецептором, образуя комплекс (EphrinB2-EphB4) [205]. Было обнаружено, что непрерывная базальная передача сигналов EphrinB2/EphB4 селективно поддерживает стабильность межклеточных соединений в эндотелиоцитах, контролируя актиновый цитоскелет и локализацию белка клаудина. Эфрин-В2 также способен модулировать сигнализацию через рецепторы VEGFR-3 и VEGFR-2, запуская лимфоангиогенез как в нормальных, так и в опухолевых тканях [174]. Генетическое удаление эфрина и его рецептора у новорожденных мышей приводит к нарушению структуры лимфатических сосудов некоторых органов [109], а также сосудах дермы и легких.

Мутация гена *Efnb2* приводит к аномально высокой частоте встречаемости открытых соединений в монослое эндотелия стенки краевого синуса паховых лимфатических узлов [66, 144], брыжеечных лимфатических сосудах, а также к нарушению структуры клапана лимфатических сосудов при неизменной структуре монослоя межклапанного сегмента [109, 146]. Было высказано предположение, что взаимодействие эфрина и его рецептора (EphrinB2 / EphB4) контролирует стабильность соединений ЭК через ГТФ-зависимую регуляцию актинового цитоскелета [99], т.к. при блокаде сигнала наблюдается усиленное образование стрессовых волокон F-актина [42].

Цитоплазматический белок ZO-1 необходим для образования плотного контакта, который не образуется при его дефиците. Он динамически взаимодействует с клаудином и актиновым цитоскелетом и рядом сигнальных белков. Показано, что активация цитоскелета с сокращением актомиозина

приводит к временному очаговому расширению межклеточного пространства и повышению межклеточной проницаемости эндотелиального пласта.

Адгезионные соединения распространены во всех кровеносных и лимфатических сосудах. Они могут формировать специализированные мембранные структуры, образуя адгезивный пояс (опоясывающая десмосома, *zonula adhaerens*); десмосому или пятно адгезии (*macula adhaerens*). Десмосомы связывают боковые поверхности ЭК между собой, образуя межклеточную десмосомальную пластинку, в которую вплетаются виментиновые промежуточные филаменты ЭК [99].

В адгезивных контактах лимфатических сосудов ключевой молекулой адгезии является VE-кадгерин. Он экспрессируется во всех эндотелиальных клетках, в том числе всех лимфатических сосудах. При этом показано, что нарушение структуры молекулы приводит к нарушению межклеточного соединения, повышению проницаемости сосудистой стенки и образованию тяжелого лимфатического отека [109, 114, 200].

Однако эти эффекты различны в зависимости от органа и типа сосуда. Например, потеря VE-кадгерина у взрослых мышей приводит к нарушению функционирования соединений в эндотелиальном монослое и повышению проницаемости сосудов в сердце и легких, а LEC-специфическая делеция VE-кадгерина приводит к органоспецифическому разрушению эндотелиальных соединений собирающих сосудов брыжейки. При этом ни потеря, ни мутация VE-кадгерина не влияют на лимфатические сосуды дермы [109, 200]. VE-кадгерин также может регулировать эмбриональный ангиогенез, модулируя функции рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста, апоптоз, определять полярность и пролиферацию ЭК в пласте [130].

Локализация клаудина-5 в соединениях эндотелиальных клеток лимфатических сосудов дермы, видимо, не зависит от VE-кадгерина, в отличие от, например, венозных сосудов, т.к. истощение VE-кадгерина в сосудах дермы не приводит к нарушению соединений, опосредованных клаудином-5 [182].

В лимфатических сосудах, стволах и протоках под эндотелиальным монослоем лежит хорошо выраженная базальная мембрана. На электронограммах она выглядит как волокнистая структура толщиной от 20 до 200 нм. Кроме ламинина, коллагена IV типа, протеогликанов, гепарансульфатов и, так называемых белков-нидогенов, характерных для кровеносных сосудов [59], базальная мембрана лимфатических сосудов содержит также и ряд других белков, например: fibulin-1 (BM 90) и fibulin-2; тромбоспондин-1 и -2; BM-40 (остеонектин, SPARC); коллаген VIII, XV, XVIII типов; [5, 59]. При этом показано, что основная секреция компонентов базальной мембраны происходит в момент созревания плотных межэндотелиальных соединений [39].

Кроме того, толщина базальной мембраны мало меняется после достижения половой зрелости человека. Это свидетельствует о том, что зрелые эндотелиальные клетки практически не секретируют белки базальной мембраны, что подтверждают исследования, показавшие отсутствие в большинстве эндотелиоцитов лимфатических сосудов секреторных гранул, содержащих белки внеклеточного матрикса, такие как фибронектин, проколлаген III и IV типов, коллаген VII типа, гепарансульфат, протеогликаны, ламинин, интегрины, энтактины, фибриллин, дистрогликаны [39].

I.5. Морфофункциональные особенности эндотелия лимфатического узла

Лимфатические узлы представляют собой высокоспециализированные органы, обеспечивающие эффективный иммунный ответ [35, 170], в реализации которого помимо лимфоцитов, лейкоцитов, макрофагов, дендритных клеток существенную роль играют эндотелиальные клетки [187, 202]. Антигены, активированные дендритные клетки, большинство лейкоцитов и лимфоцитов попадают с током лимфы в лимфатический узел по приносящим лимфатическим сосудам, которые внутри узла трансформируются в разветвленную систему синусов [61]. Изнутри синусы выстланы эндотелиальными клетками, формирующими барьер между лимфой и паренхимой узла [4].

Структурная организация синусов лимфатических узлов у человека и ряда других млекопитающих, включая крыс и мышей, в значительной степени сохраняется [150, 170]. Приносящие лимфатические сосуды проникают через коллагеновую капсулу лимфатического узла и открываются в узкий подкапсулярный или краевой синус. Он расположен между капсулой и наружной корой узла. Краевой синус продолжается в промежуточный корковый (межузелковый), который, по данным ряда авторов, включает в себя корковый (глубокие инвагинации подкапсулярного синуса) и паракортикальный синусы. Последний появляется в виде слепых выпячиваний коркового синуса в паракортикальной зоне лимфатического узла [61]. Граница между подкапсулярным и мозговым синусами четко не определяется, однако есть данные о формировании уникального фенотипа эндотелия подкапсулярного синуса [177]. Мозговые синусы формируют афферентные лимфатические сосуды, покидающие лимфатический узел [150, 170]. Важное значение в функционировании синусов лимфатического узла имеет тот факт, что их суммарный диаметр значительно превосходит диаметр приносящих сосудов, что определяет медленное течение лимфы и ее более длительный контакт с клетками узла [86].

Просвет подкапсулярного синуса пересекают пучки ретикулярных волокон, покрытые эндотелием. Сам синус содержит мигрирующие лейкоциты афферентной лимфы и многочисленные макрофаги, редкие резидентные дендритные клетки [112, 113]. Последние формируют в просвет синуса отростки.

Все синусы представляют собой локальную, высоко дифференцированную сеть лимфатических сосудов внутри лимфатического узла. Стенки синусов выстланы плоскими клетками, названными M. Sigmund в 1923 г. литоральными или береговыми, тканевая принадлежность которых долго обсуждалась [196]. Между тем, по мере открытия молекулярных маркеров сосудистого эндотелия, проводились исследования по выявлению и идентификации лимфатического эндотелия, в том числе синусов лимфатических узлов.

Эндотелиальные клетки синуса синтезируют маркерный белок LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial HA receptor 1) [78, 98, 136]. Кроме того, они имеют положительную окраску на десмоплакин и антиген, связанный с фактором-VIII, в то время как кровеносный эндотелий лимфатического узла положительно на десмоплакин не отвечает [128, 171]. Между тем тельца Вейбеля-Паладе, содержащие антиген, связанный с фактором-VIII, в ультраструктурных исследованиях эндотелия синусов лимфатических узлов еще не упоминаются [176].

Маркером лимфатического эндотелия признается трансмембранный гликопротеин CD-31, также известный как молекула адгезии эндотелиальных клеток тромбоцитов-1 (PECAM-1). Он обнаруживается в эндотелиальных клетках лимфатических сосудов, хотя имеет интенсивность окрашивания слабее по сравнению с эндотелием кровеносных сосудов [120].

Сообщалось также, что антиген CD-31 встречается в лимфатическом эндотелии подкапсулярного синуса лимфатических узлов человека и мыши [88, 104, 123, 128]. Было показано также сильное окрашивание эндотелия моноклональным антителом EN-4 [171], которое распознает CD-31 [80]. В последние годы были открыты и другие белки, которые могут быть использованы в качестве специфических маркеров эндотелия лимфатических узлов: подопланин [50, 79] VEGFR-3 [192], макрофазальный рецептор к манозидазе [137], хемокин для привлечения дендритных клеток CCL-21 [161] и ряд других.

Таким образом, эндотелиальная природа литоральных клеток в настоящее время мало у кого вызывает сомнения, однако нужно отметить, что специфический маркер для лимфатического эндотелия лимфатических узлов пока не найден.

Между тем, сейчас гистохимически в лимфатическом эндотелии синусов лимфатических узлов выделяют не менее шести различных субпопуляций эндотелиальных клеток. Все эти клетки имеют только один общий маркер — белок Prox-1 [134, 198].

Среди выстилающих синусы литоральных клеток описываются три морфологически различных типа клеток [3]. Первый представляет собой плоские клетки, обедненные органеллами, имеющие малое количество кавеол и в порах, которых иногда видны лимфоциты.

Второй тип представлен более высокими клетками, содержащими большее количество органелл. Клетки третьего типа похожи на макрофаги печеночных синусов и имеют длинные отростки, пронизывающие синусы [3].

О морфологии эндотелия синусов лимфатического узла известно немного. Описываются органеллы, характерные для сосудистого эндотелия [98].

Цитоплазма эндотелиальных клеток краевого синуса, обращенных к капсуле узла и выстилающих трабекулы, содержит развитой агранулярный эндоплазматический ретикулум. Напротив, в эндотелии, прилежащем к паренхиме узла, содержится хорошо шероховатый эндоплазматический ретикулум и лизосомы. В отличие от краевого синуса, в эндотелии промежуточного синуса отмечается большее количество органелл [142]. Большинство эндотелиоцитов синуса лимфатического узла содержат тонкие филаменты, расположенные вдоль длинной оси клетки.

Предполагается, что эндотелиальный слой краевого синуса лимфатического узла непрерывный, без открытых контактов, что препятствует прямому обмену между полостью синуса и паренхимой узла [92]. Между соседними клетками описаны десмосомы, плотные соединения, белки адгезивных контактов [35, 92]. Однако электронно-микроскопические исследования поставили под сомнение «непрерывность» эндотелия краевого синуса лимфатического узла, т.к. были найдены поры между клетками диаметром 0,1–1,0 мкм. В этих пространствах фиксировались отростки лейкоцитов [45].

Данные о базальной мембране, подстилающей эндотелиальные клетки синуса лимфатического узла, разнятся. Описываются прерывистая [35] или сплошная базальная мембрана эндотелия краевого синуса [92], и отсутствие базальной мембраны у береговых клеток [35].

В полости синуса описывается сеть ретикулярных клеток и их отростков, а также волокон, которые могут служить для создания турбулентного потока лимфы, ее замедленного внутриузлового течения, что будет способствовать более длительному контакту лимфы с различными клетками узла [38]. Кроме того, облегчают прохождение лимфы через лимфатический узел гладкие миоциты, расположенные в капсуле и трабекулах узла, сокращение которых «выжимает» лимфу в эфферентные лимфатические сосуды [149].

В процессе прохождения лимфы через лимфатический узел из нее резорбируется вода и электролиты, что приводит к увеличению концентрации белков в вытекающей из узла лимфе [151]. Предполагается, что перемещению молекул воды способствует трансмембранный белок аквапорин-1, который был найден в эндотелии лимфатических капилляров, а также на люминальной и базальной плазмалемме эндотелиальных клеток лимфатических сосудов [149].

Было показано, что в эфферентной лимфе, в отличие от афферентной, снижается концентрация целого ряда молекул, что свидетельствует об их эффективном клиренсе в лимфоузле [115, 163, 164]. Многочисленные функциональные исследования показали, что подкожное введение высокомолекулярных молекул (включая декстраны и IgM) приводит, в значительной степени к их исключению из паренхимы ЛУ тогда как многие малые молекулы получают мгновенный доступ и накапливаются в паренхиме [187].

Несколько микроскопических исследований в реальном времени отметили быстрое проникновение молекул размером более 70 кДа в паренхиму лимфатического узла [111]. Так, вводили подкожно антитела IgG и IgA (около 150 кДа), которые через несколько минут обнаруживали с помощью специфической окраски в паренхиме дренирующих лимфатических узлов [187]. Этот перенос был рецепторно-независимым жидкофазным процессом, чувствительным к динеину, и происходил без участия макрофагов. Высокомолекулярные белки и олигосахариды (например, IgM с молекулярной массой 850 аДа) в паренхиму узла не попадали [187].

Также было показано, что часть молекул может фагоцитироваться макрофагами и дендритными клетками, которые постоянно сканируют содержимое подкапсулярного синуса [113]. Другая часть – транцитироваться через эндотелий синусов [187]. Показано участие макрофагов в переносе коллоидного углерода через эндотелий краевого синуса [169].

В эндотелии подкапсулярного синуса лимфатического узла описаны многочисленные поверхностные инвагинации плазмолеммы, цитоплазматические пузырьки, фенестры и трансэндотелиальные каналы, закрытые диафрагмой, которые могут указывать на эндоцитозную активность клеток [84, 106, 185]. Было показано, что диафрагма состоит из фибриллярного белка PLVAP (plasmalemma vesicle associated protein), ассоциированного с кавеолами, которые могут избирательно физически или физикохимически переносить молекулы диаметром до 70 кДа [185]. У мышей с дефицитом PLVAP в эндотелии лимфоузлов отсутствуют диафрагмы, что вызывает поступление и накопление в паренхиме лимфатического узла белков до 500 кДа [185].

Предполагается также, что эндотелий краевого синуса лимфатических узлов может также напрямую представлять антигены иммунным клеткам [202] и косвенно модулировать функции дендритных клеток и Т-лимфоцитов.

Таким образом, есть данные, указывающие на фагоцитарную и эндоцитозную активность эндотелия краевого синуса лимфатических узлов. Между тем, необходимы дополнительные исследования, чтобы точно установить, насколько является проницаемым эндотелиальный барьер краевого синуса лимфатического узла и какие пути транспорта молекул через эндотелий синуса реализуются. Детальное понимание механизмов переноса макромолекул может быть реализовано в клинической практике для доставки фармакологических препаратов, в том числе моноклональных антител к дренирующим лимфатическим узлам для модуляции иммунного ответа [187].

1.6. Заключение

Литературные данные последних лет показывают, что общепринятые взгляды на роль лимфоносных путей при нормальном и патологическом состоянии человека в настоящее время меняются.

Биохимически и генетически доказана неоднородность лимфатического эндотелия, которая формируется под действием самых различных факторов и проявляется, в том числе, разной проницаемостью эндотелиального пласта (от высоко проницаемого, до практически непроницаемого). Между тем, морфологических данных о разных фенотипических формах лимфатического эндотелия практически не представлено.

Лимфатический капилляр, образованный высоко проницаемым эндотелием, в настоящее время хорошо изучен. Однако остается дискуссионным вопрос строения межклеточных контактов и механизма переноса через эндотелиальный монослой макромолекул. Так, неясно, сохраняется ли строение «синусоидного» контакта, который описал Р. Baluk (2007) [58], в капиллярах других тканей и органов. Дискуссионным остается вопрос о транспорте через эндотелий молекул диаметром 80-250 нм, в том числе хиломикронов, и о доли участия в их переносе в лимфу микропиноцитозных везикул, в том числе кавеол.

Исследования эндотелия крупных лимфатических сосудов показали, что в эндотелиальном монослое все контакты закрытого типа и клетки имеют низкое содержание микропиноцитозных везикул, что косвенно указывает на низкую проницаемость эндотелиального пласта. В лимфатических сосудах (по сравнению с кровеносными) были найдены также существенные молекулярные особенности строения межклеточных контактов, а также сложная сигнальная система их стабилизации. Описывается в эндотелиальном монослое отсутствие непрерывного пояса плотных соединений. Учитывая эти и ряд других фактов, а также то, что изменение проницаемости лимфатических сосудов может модулировать патогенез самых разных заболеваний, существует необходимость детализации строения эндотелия лимфатических сосудов.

Эндотелиальные клетки синусов лимфатических узлов играют существенную роль в формировании эффективного иммунного ответа, обеспечивая сортировку молекул и клеток. Имеются дискуссионные данные об особенностях строения эндотелия синусов, в частности особенностях межклеточных контактов. Не изучался транспорт хиломикронов по синусам лимфатических узлов. Между тем, эти данные важны для развития направления таргетной терапии, использующей липоидные частицы в качестве молекулы-носителя.

Кроме того, требует дальнейшего изучения и детализации вопрос строения секреторного пути в лимфатическом эндотелии, о котором в литературе имеются лишь отрывочные данные.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфофункциональные особенности строения эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока изучались на взрослых половозрелых крысах-самцах линии Вистар и грудном протоке кролика линии Советская шиншилла (таблица 1).

Строение эндотелия лимфатического капилляра и краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла изучалось на крысах, не получавших корм в течение 24 часов. У них под наркозом вскрывалась брюшная полость, и иссекался начальный отдел тонкой кишки (суженный участок кишки, расположенный каудальнее сфинктера привратника) и верхние брыжеечные лимфатические узлы. В качестве наркоза использовалась комбинация препаратов золетила и медитина в соотношении 3/1, в дозе 0,1 мл на 100 г массы тела.

Крысы являются широко используемым лабораторным животным, на котором выполнена большая часть исследований, изучающих как строение эндотелия, так и транспортные механизмы в клетке [108], что дает возможность интерпретации и сравнения наших данных с полученными ранее [11]. При этом молекулярно-генетические исследования последних лет доказали общность и высокую степень гомологии молекулярных механизмов в клетках человека и позвоночных животных, что позволяет экстраполировать данные, полученные с использованием лабораторных животных, на человека [97].

Выбор кишечной ворсинки крысы в качестве модели был обусловлен актуальностью проблемы, связанной с механизмом всасывания липидов в лимфатический капилляр кишки и его дальнейшем транспорте [105]. Для изучения проницаемости эндотелиального монослоя в качестве маркерной молекулы использовался хиломикрон, так как он хорошо визуализируется на электронограммах.

Хиломикроны при низкой интенсивности всасывания липидов образуют частицы диаметром 30-100 нм и могут сливаться в более крупные образования при большой «липидной нагрузке» на эпителий кишки [11]. Механизм транспорта

частиц в данном диапазоне их диаметра наиболее спорный в настоящее время, а его понимание позволит снять некоторые, существующие противоречия о биодоступности частиц при их пероральном введении и всасывании молекул в лимфатический капилляр [105, 147, 162].

Для достижения нужного нам размера хиломикронов использовалась модель, исключаящую высокую липидную нагрузку. Для этого животным-донорам перорально вводилось 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. Параллельно наркотизировалось второе животное, которому также под наркозом вскрывалась брюшная полость, и каудальнее привратника желудка вводился в полость тонкой кишки химус, полученный от животного - реципиента. Вскрытая брюшная полость закрывалась влажной салфеткой, и через 45 минут после введения химуса иссекался участок тонкой кишки около 0,5 см ниже места вкола иглы. У второго животного-реципиента через 60 минут после введения химуса иссекались верхние брыжеечные лимфатические узлы (Таблица 1).

Все манипуляции на животных проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», 1977 года, и «Хельсинской декларацией» 1975 года и ее пересмотренным вариантом 2000 года. Все 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.

Грудной проток был выбран в качестве модельного объекта лимфатического эндотелиального пласта, в котором стенка в норме практически не пропускает макромолекулы. Однако наличие в лимфатических стволах и протоках внутрипросветных клапанов, делает эндотелиальный монослой интимы структурно и функционально неоднородным. Поэтому мы решили изучить особенности строения эндотелия и монослоя на створках клапана и в межклапанном сегменте.

Выбор в качестве объекта исследования грудного протока кролика продиктован плохой доступностью для электронно-микроскопических исследований высокого разрешения сосудов мелких лабораторных животных. Между тем, большое количество исследований морфологии грудного протока на этих лабораторных животных также дают возможность сравнению и анализу полученных нами данных, а общность молекулярного строения клетки их экстраполяции на человека [2, 7, 21, 29, 30, 31].

Для визуализации грудного протока кролику за 120 мин до забора материала перорально вводилось 5 мл кукурузного масла.

Таблица 1 – Распределение экспериментального материала

Материал исследования	Кол-во жив/обр	Методы исследования				Всего
		ТЭМ сетки	СЭМ (обр.)	ЭТ	М/м (изобр)	
1. ЭК ЛК кишечной ворсинки (крысы после 24 часового голодания)				2		
2. ЭК краевого синуса верхнего брыжеечного ЛУ (крысы после 24 часового голодания)			-	2		
3. ЭК ЛК кишечной ворсинки (крысы через 45 мин после введения химуса)				-		
4. ЭК краевого синуса верхнего брыжеечного ЛУ (крысы через 60 мин после введения химуса)			-	-		
5. ЭК грудного протока кролика (через 2 часа после перорального введения липидов)				3		
Всего:				7		

Примечание: ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ЭТ – электронная томография; М/м – морфометрия.

Наркотизация животных осуществлялась комбинацией препаратов золетила и медитина в соотношении 3/1, в дозе 0,25 мл на 100 г массы тела. После вскрытия грудной клетки в области млечной цистерны иссекался грудной проток. Полученный материал фиксировался 2,5 % глутаровым альдегидом и изучался комплексом электронно-микроскопических методов.

Электронная микроскопия эпоксидных срезов

Подготовка срезов для электронной микроскопии проводилась по стандартной методике [20]. Материал был обработан фиксатором (2,5 % глутаровый альдегид), проведено осмирование, обезвоживание в спиртах восходящей концентрации и 100% ацетоне с последующим заключением в эпоксидную смолу («Епон 812»). После помещения образцов в смолу проводили полимеризацию при постоянной температуре +60 °С в течение 24 часов.

Методы улучшения контраста

Для улучшения контраста белков (СОРІ, СОРІІ и клатрина) используется таниновая кислота 1 %-ой концентрации. После обработки клеток 1 % редуцированным осмием их промывают 0,05 М какодилатным буфером нейтральной кислотности. После промывки добавлялась 1% таниновая кислота на 0,05 М какодилатном буфере, выдерживалась 1 час. Далее образцы промывались 0,05 М какодилатным буфером и трижды раствором PBS. На следующем этапе подготовки образцы три раза погружали в спирты, с повышением концентрации этанола (50 %, 70 %, 90 % 100 %) в каждой пробе. Время выдержки 10 минут в каждой. Затем образцы инкубировались два раза по 30 минут в растворе 100 % ацетона.

В дальнейшем материал погружали в смесь эпоксидной смолы («Епон 812») и 100 % ацетона в соотношении 1:1 при температуре +4°С. Время выдержки 2 часа. Впоследствии смесь удалялась и добавлялась эпоксидная смола. Образцы выдерживались в течение 2-3 часов при температуре 21°С, затем отправлялись в термостат при вышеуказанных параметрах для процедуры полимеризации. Для получения дополнительного усиления контрастности после получения срезов их

контрастируют раствором цитрата свинца и уранилацетата по методике Е. Рейнольдса (1963) [20].

Для увеличения контрастности липидов мембран использовалась модифицированная методика А.М. Селигмана (1966) с использованием тиокарбогидрозида (ОТОТО). Предварительно зафиксированные 1% глутаровым альдегидом ткани на 0,15 М растворе HEPES (pH 7.2) шестикратно промывались на 0,05 М какодилатным буфером нейтральной концентрации, с последующей обработкой редуцированным осмием в течение 60 минут при комнатной температуре. Редуцированный осмий приготавливался следующим образом: 2 % концентрация тетраоксида осмия на какодилатном буфере (pH 7,2) и 3 % ферроцианид калия в пропорции 1:1 с 0,2 М какодилатным буфером (pH 7,2). Далее материал промывали 0,05 М какодилатным буфером нейтральной кислотности.

Затем образцы погружали в 0,5 % раствор тиокарбогидрозида на 30 минут при температуре 21°C, далее следует трехкратный этап промывки какодилатным буфером, затем обработка редуцированным осмием при температуре 21°C в течение 20 минут. Этап проводится двукратно, затем шестикратно промывается PBS и начинается этап дегидратации и заливки в смолу по методике, описанной выше.

Сканирующая электронная микроскопия

Грудной проток кролика иссекался в области млечной цистерны. Образцы ткани промывались в среде 199 в течение 20 минут и далее готовились по следующей схеме:

1. обработка в растворе 1 %-ой таниновой кислоты на 0,1 М какодилатном буфере (pH-7,4) в течение 30 минут;
2. выдержка образцов в 1 %-ом растворе оксида осмия (IV) в течение 60 минут;
3. промывка в 0,05 М какодилатном буфере (pH-7,4);
4. повторная обработка таниновой кислотой согласно второму этапу.

Все этапы проводились при температуре 18-21°C. Препараты промывались дистиллированной водой, затем проводилась процедура дегидратации в этаноле с

повышением концентрации этанола и абсолютном ацетоне по 10 минут с трехкратной сменой растворов (этанол 50 %, 70 %, 90 % концентрации, смесь спирта и ацетона 1:1 и ацетон). Образцы высушивали путем перехода через критическую точку в углекислоте по методике Ю.А.Ровенского (1979) и монтировали на предметный столик. Далее в аппарате Eico-111В напыляли на образцы сплав золота и палладия. Микроскопия проводилась на микроскопе Hitachi-S-405AS.

Получение серийных изображений с помощью сканирующего электронного микроскопа, оборудованного внутренним ультратомом и детектором обратно рассеянных электронов

Для подготовки к микроскопии образцы начального отдела тонкой кишки фиксировались глутаровым альдегидом 2 %, затем промывались 0,05 М какодилатным буфером pH=7,2. Постфиксация проводилась в редуцированном 1 % тетроксиде осмия (OsO_4). Далее следовала промывка образцов и обработка их 0,3 % тиокарбогидразидом и новая промывка. Для усиления контраста процедура промывки и обработки осмием повторялась двукратно. Далее проводилась дегидратация образцов в этаноле и заливка в смолу Эпон 812.

Образцы после полимеризации смолы приклеиваются на специальный столбик-держатель и на ультрамикротоме сначала изготавливались полутонкие срезы для обзорного просмотра образца с целью наиболее точного определения зоны исследования, а затем затачивалась пирамидка в зоне интереса исследования. После чего образцы закрепляются в микроскоп для исследования. Образец сканировался, и детектор обратно рассеянных электронов формировал изображение. Поле среза толщиной в 70 нм. По результатам исследования получается серия срезов, позволяющих составить послойное микроскопическое изображение кишечной ворсинки. Полученные результаты позволили изучить форму, локализацию клеток и структур их топографию и взаимосвязи. Срезы были приготовлены по методике Х.С Калсона (2011). Микроскоп Quanta 250, ультратом GATAN, с ускоряющим напряжением 1,5 кВ.

Электронная томография

Методика использовалась для детализации строения комплекса Гольджи. После того, как с сеточек с серийными срезами испарялась вода (при комнатной температуре), на них наносили конъюгированное с протеином-А 10 нм золото, разведенное дистиллированной водой в пропорции 1 к 25. Золото необходимо в томограмме в качестве маркера. После окраски и высушивания сетка помещалась в гониометр электронного микроскопа.

Срезы подготавливались с помощью предварительного облучения дефокусированным пучком электронов без диафрагмы. Время облучения 3-5 минут. Облучение необходимо для стабилизации срезов. В дальнейшем диафрагма устанавливалась обратно и начинался предварительный забор изображений комплекса Гольджи. При этой работе использовалась система поиска в составе программы «ТИА», позволяющая автоматически перемещать срез в предварительно выбранную зону для последующего забора томограмм. Изображения забирались при увеличении 7800 х или – 9600 х. После выбора структур изображение забиралось под углом от - 65° до + 65° наклона гониометра. Съемка изображения производилась через каждый градус наклона. Всего было сделано 131 изображение для каждой электронной томограммы.

После исследования вся серия изображений отправлялась на компьютер с программой для построения томограмм IMOD, которая на основе оптической плотности строила серийные виртуальные срезы, а затем трехмерное изображение. При изучении комплекса Гольджи лимфатического капилляра, узла и грудного протока оценивали, как минимум по три томограммы. В исследовании был использован микроскоп Теснаі 12 EM 200 кВ с гониометром.

Морфометрический анализ

Морфофункциональные особенности строения эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и грудного протока выявлялись проведением количественной оценки ряда параметров клетки. Измерялись длина и ширина эндотелиоцитов, средняя высота клетки в наиболее выступающей в

просвет сосуда области ядра. Коэффициент вытянутости рассчитывался как частное от деления показателя длины клетки на ее ширину. Определялась частота встречаемости простых адгезионных соединений разной конфигурации (стыковой, черепицеобразный, простой пальцевидный и сложный пальцевидный). Форма конфигурации определялась следующим образом: стыковая – при прямой контактной щели, длина которой более чем в 3 раза превышает длину проекции контакта; черепицеобразная - при наложении выроста одной клетки на другую (черепицеобразно) без инвагинации; простая пальцевидная - при наличии одной инвагинации между плазмолеммами соседних клеток; сложная пальцевидная – при наличии более, чем одной инвагинации [2].

В межэндотелиальных контактах грудного протока кролика измерялся курвиметром показатель длины контактирующих поверхностей непосредственным измерением на электронограммах. Частота встречаемости плотного контакта оценивалась как высокая при его регистрации более, чем в 50 % случаев наблюдения. Низкая частота встречаемости (или единичные случаи) плотного контакта фиксировались в изучаемом участке сосуда при его встречаемости не более, чем 1-2 раза.

При анализе комплекса Гольджи определяли среднее количество цистерн в стопке, диаметр цистерн, относительное количество мембран, образующих цистерны, везикулы и тубулярные структуры. Показатель рассчитывался путем наложения морфометрической сетки (100 x 100 нм) на электроннограмму комплекса Гольджи в эндотелии лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и грудного протока. При определении каждого параметра анализировалось не менее 30 случайно выбранных изображений каждого объекта.

Статистический анализ

Для проведения анализа особенностей строения эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и грудного протока использовалась программа Statistica 6.0. Достоверность различий между параметрами определялась с помощью t-критерия Стьюдента, а также

анализировались показатели описательной статистики (их стандартные ошибки и доверительные интервалы, дисперсии, среднее квадратическое отклонение и размах варьирования признака).

Закономерный характер расположения плотного и точечного адгезивного контакта на протяжении межэндотелиальных соединений разной конфигурации (стыкового, черепицеобразного, пальцевидного) оценивался с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Связь между факторными и результативными признаками оценивалась по выборке из 30-ти вариантов, степень свободы – 6.

Топологические особенности эндотелиального монослоя грудного протока оценивались по средней степени связности клеток в пласте. За степень связанности клетки в монослое принималось количество контактирующих с данным эндотелиоцитом клеток (координационное число) [32]. Для определения средней степени связности анализировалось не менее 500 клеток в каждой изучаемой зоне грудного протока.

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Строение эндотелия лимфатического капилляра в кишечной ворсинке тонкой кишки крысы

Микроокружение лимфатического капилляра. Лимфатический капилляр (ЛК) кишечной ворсинки крысы расположен в центральной части собственной пластинки кишечной ворсинки и может быть представлен как одиночным, так и несколькими (один-три) сосудами. В нижней трети микроворсинки в просвете капилляра выявляется вырост эндотелиальной клетки – створка клапана.

Терминальный участок капилляра окружен интерстицием собственной пластинки кишечной ворсинки. Он содержит редкие коллагеновые, а также эластические волокна, гладкомышечные клетки (ГМК), многочисленные лейкоциты, макрофаги, плазмоциты, дендритные и другие клетки (Рисунок 1).

У голодных животных ЛК представлен чаще щелевидными, реже округлыми образованиями. В непосредственной близости от ЛК в интерстиции собственной пластинки кишечной ворсинки располагаются ГМК. Они лежат группами по 3-4, в которых клетки близко расположены друг от друга и имеют спиральное, относительно продольной оси кишечной ворсинки, расположение (Рисунок 1, а). Между соседними ГМК выявляются щелевидные соединения. Между группами ГМК расположены более светлые гладкомышечные клетки, переходящие из одного «пучка» клеток в другой. В местах, где ГМК близко прилежат к эндотелию ЛК, к гладкомышечным клеткам подходят нервные окончания.

Ультраструктура эндотелиоцитов. Стенка лимфатического капилляра не имеет базальной мембраны и перицитов (Рисунок 1, а, б). Эндотелиоциты сильно уплощены. Средняя высота клетки периферической зоны $321 \pm 6,5$ нм. Ядродержащие зоны мало выступают в просвет сосуда.

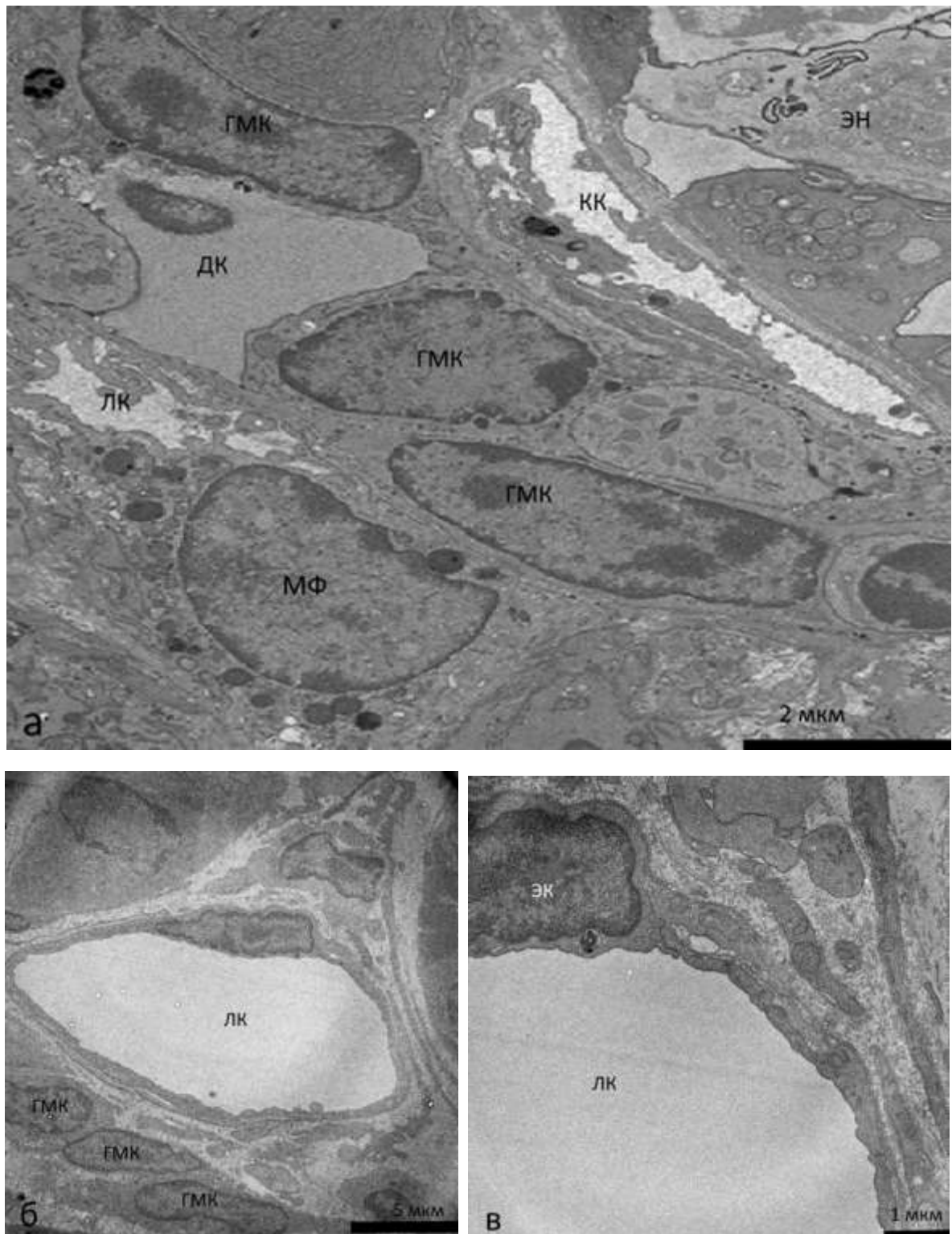


Рисунок 1 – Лимфатический капилляр (ЛК) в собственной пластинке кишечной ворсинки крысы:

а – гладкомышечные клетки (ГМК), кровеносный капилляр (КК), энтероцит (ЭН); дендритная клетка (ДК); б, в – эндотелиальная клетка (ЭК). СЭМ серийных срезов (микроскоп со встроенным ультратомом).

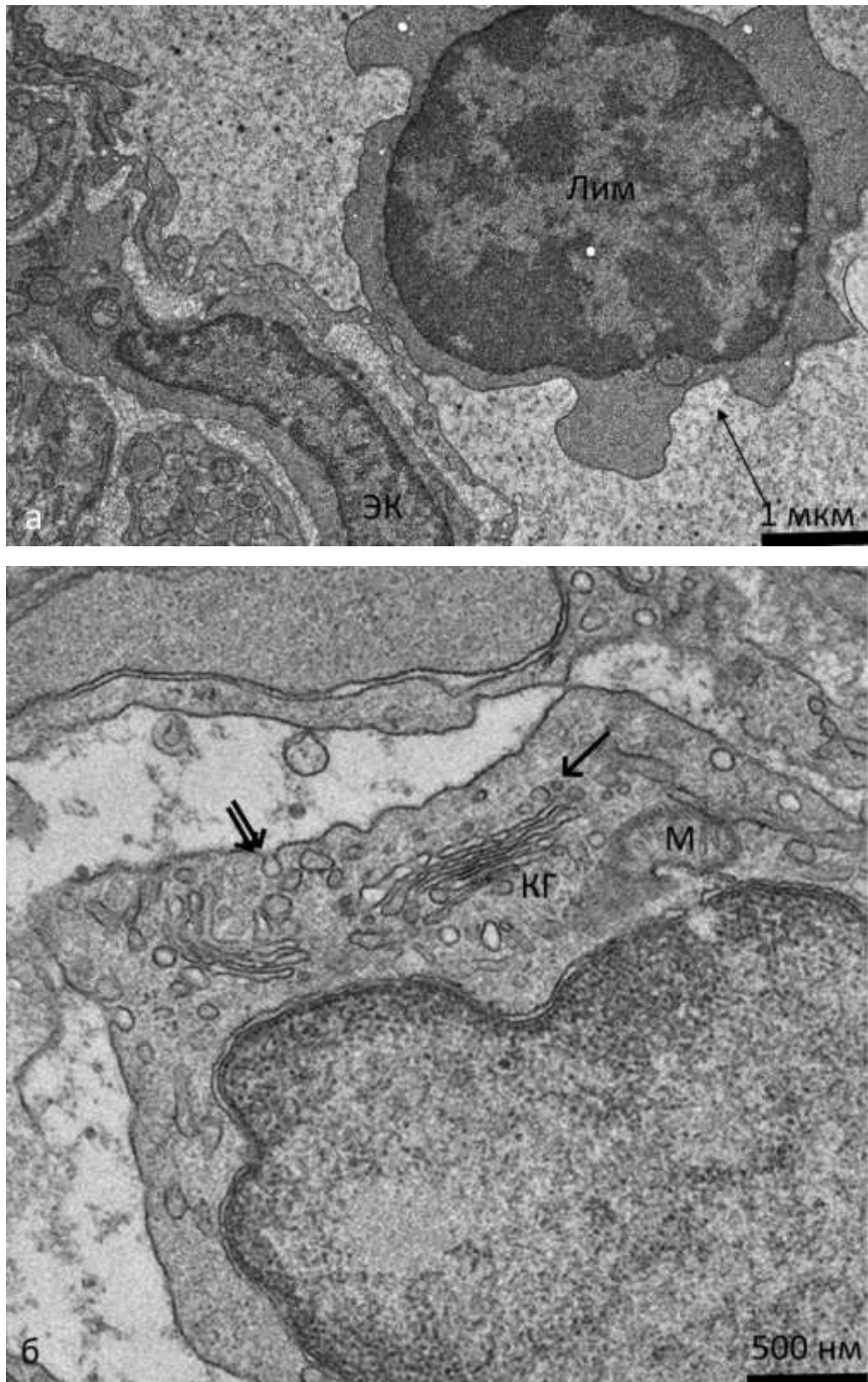


Рисунок 2 – Просвет лимфатического капилляра (ЛК) кишечной ворсинки крысы:
 а – лимфоцит в просвете ЛК; б - ультраструктура эндотелиальной клетки ЛК:
 комплекс Гольджи (КГ), СОРІ-зависимые везикулы – черная стрелка, кавеола –
 двойная стрелка. ТЭМ.

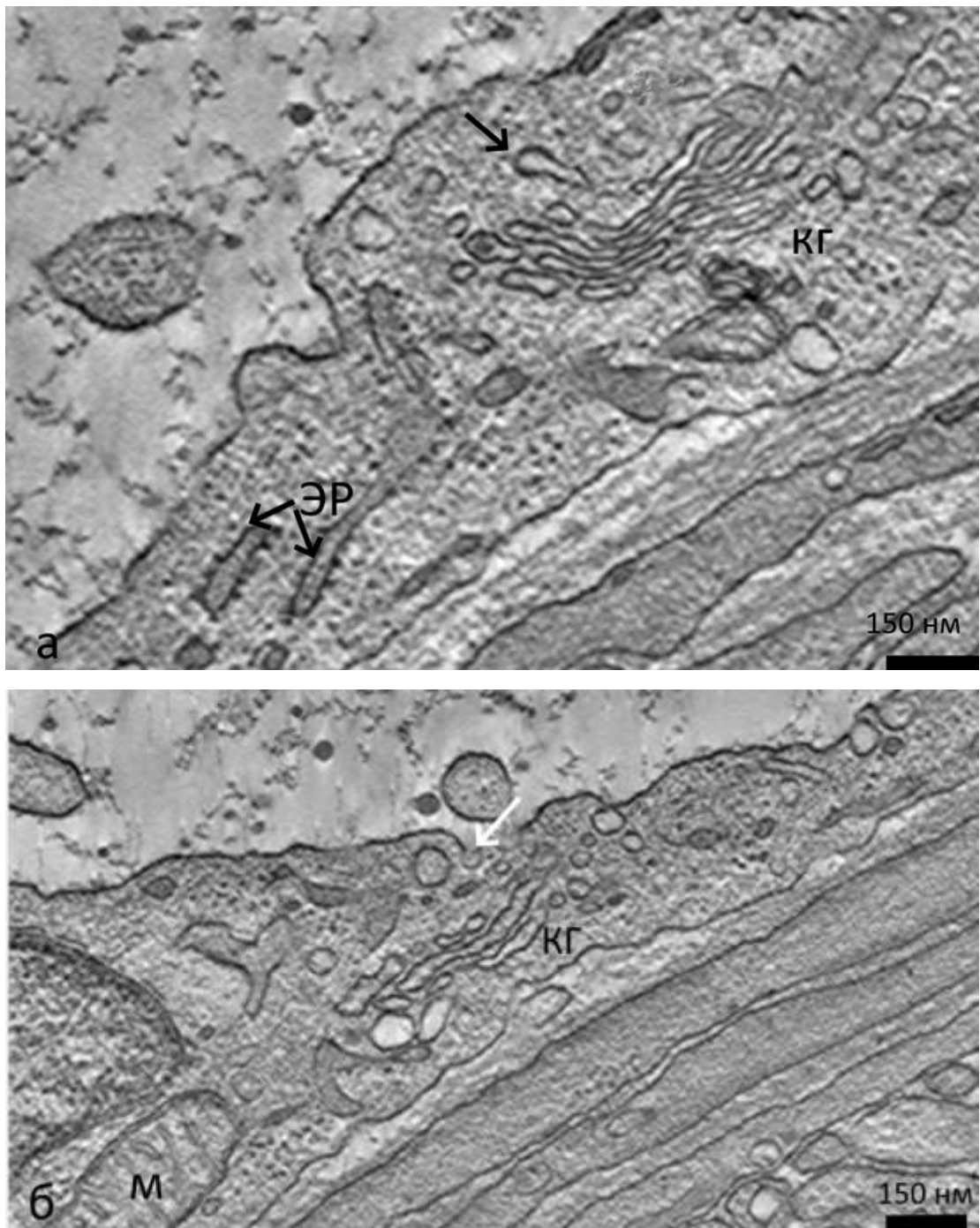


Рисунок 3 – Эндотелиальная клетка лимфатического капилляра кишечной ворсинки крысы:

а – синтетический аппарат: комплекс Гольджи (КГ), гранулярный эндоплазматический ретикулум (ЭР), эндосома (черная стрелка); б – околоядерная область: митохондрия (М), кавеола (белая стрелка). ЭМ-томография.

Ядро эндотелиоцита овальной формы с центральной и периферической зоной гетерохроматина (Рисунок 2, а, б). Средняя высота клеток в максимально выступающей в просвет сосуда области ядра в среднем $2,19 \pm 0,23$ мкм. Люминальная часть плазмолеммы имеет редкие плазмолеммальные везикулы колбовидной формы диаметром 60 нм и с просветом средней электронной плотности. Везикулы имеют хорошо выраженную «шейку», просвет которой закрыт полосой материала, имеющего большую электронную плотность, чем внутреннее содержимое. На аблюминальной поверхности плазмолеммы микропиноцитозные везикулы не регистрируются (Рисунок 3, б).

Большая часть органелл локализуется в окооядерной области (Рисунок 3, б). Здесь расположены овальной формы митохондрии, цистерны эндоплазматического ретикулума и комплекс Гольджи (КГ) (Рисунок 3, а, б).

КГ представлен диспергированными компактными стопками, состоящими из 3-5 (в среднем $4,28 \pm 1,2$) цистерн (Таблица 4). Цистерны имеют диаметр в среднем $881 \pm 6,24$ нм. Латеральный край цистерн незначительно расширен. Их высота в среднем $60 \pm 2,2$ нм. Высота цистерн в центральной части $32 \pm 2,2$ нм. Цис-цистерна перфорирована. Иногда отсутствует. Медиальные цистерны в количестве 2-3. На цистерны приходится в среднем $68 \pm 2,5$ % мембран органеллы. Транс-сеть представлена слабо выраженным тубулярным сплетением, которое может также локализоваться на некотором расстоянии от стопки. На ряде срезах транс-сеть может отсутствовать. На тубулярные структуры приходится в среднем $17 \pm 2,5$ % мембран органеллы. Ассоциированных со стопкой 60 нм везикул умеренное количество. Они занимают в среднем $15 \pm 2,5$ % мембран органеллы (Таблица 4). Тубулярные соединения между цистернами не выявлены.

Электронно-микроскопический анализ показал, что между ЭК лимфатического капилляра кишечной ворсинки формируются адгезионные соединения, имеющие разные виды контактных поверхностей: стыковой, черепицеобразный и простой пальцевидный (интердигитирующий).

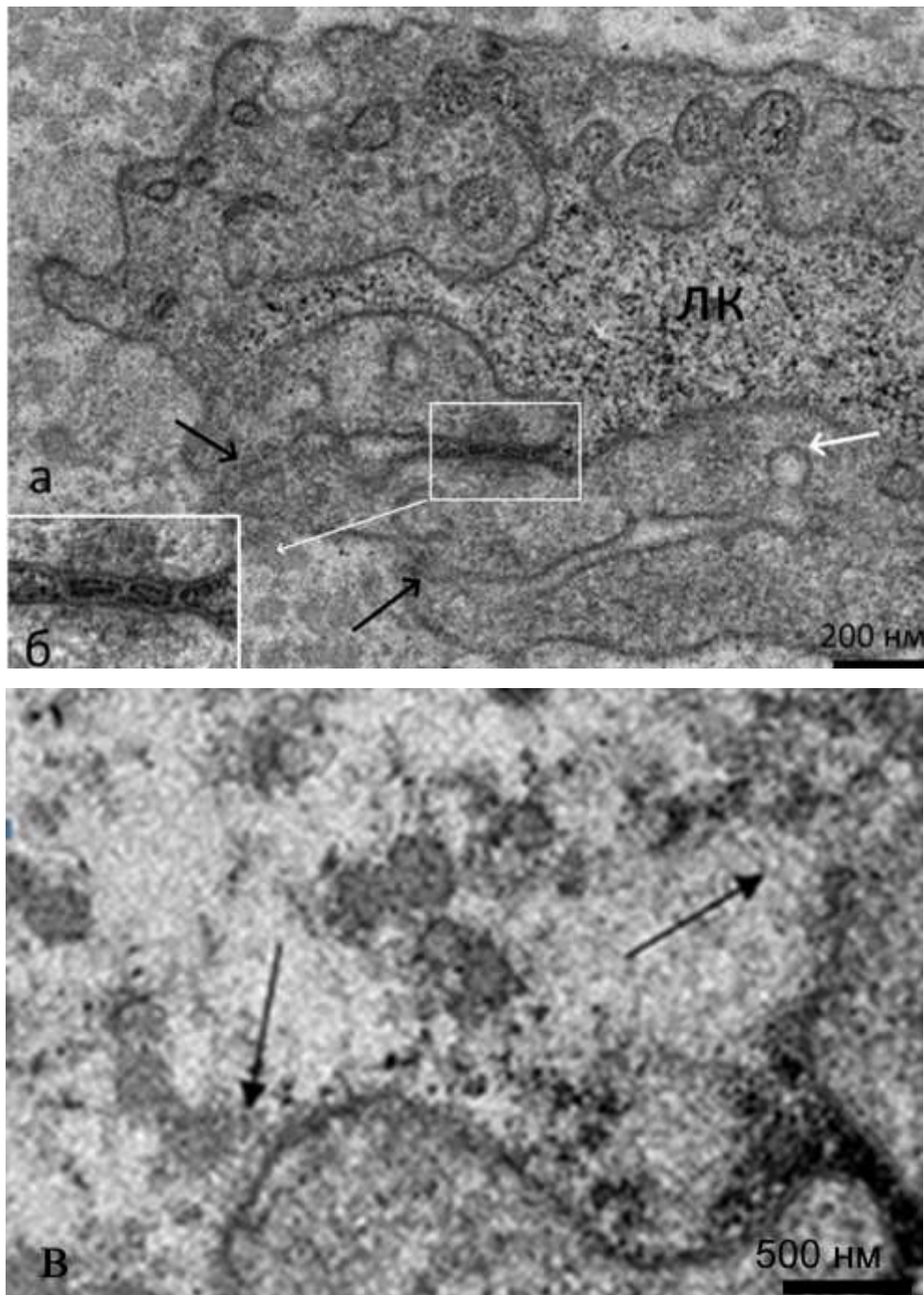


Рисунок 4 – Ультраструктура межклеточных контактов эндотелия лимфатического капилляра (ЛК) кишечной ворсинки крысы:

а – «слепой конец» ЛК: кавеола (белая стрелка), адгезивное точечное соединение (черная стрелка); б – плотный контакт; в – якорные филаменты (черная стрелка). ТЭМ.

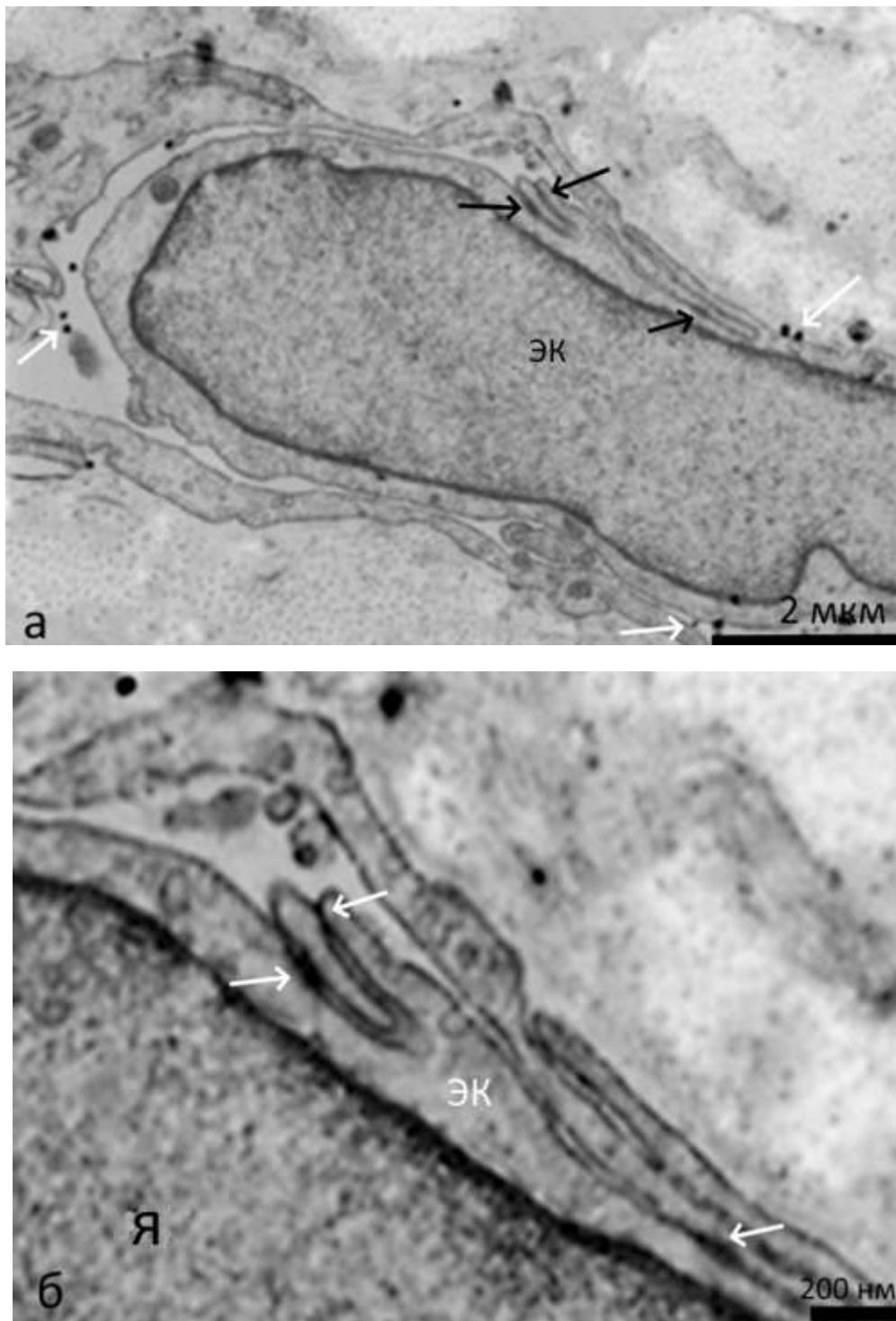


Рисунок 5 – Лимфатический капилляр (ЛК) кишечной ворсинки крысы после липидной нагрузки:

а – терминальный отдел ЛК: плотный контакт (черная стрелка), хиломикроны (белая стрелка); б – интердигитирующая форма адгезионного соединения эндотелиальных клеток (ЭК): Я - ядро, плотный контакт (белая стрелка). ТЭМ.

Сложные пальцевидные контакты нами не найдены. Стыковой контакт встречается в среднем на 2-х из 30-ти изображений терминального отдела лимфатического капилляра кишечной ворсинки ($7,0 \pm 0,8$ %) (Таблица 2). Он имеет прямую проекцию, как на продольном, так и на поперечном срезе. Черепицеобразный контакт регистрируется в подавляющем большинстве, в среднем в 22-ти случаях ($68 \pm 2,2$ %). Он формируется при попеременном «чешуйчатом» перекрытии двух соседних эндотелиальных клеток. Простой пальцевидный контакт регистрируется в $25 \pm 2,4$ % случаев. Он имеет одно зубчатое соединение двух соседних клеток.

В межконтактной щели расположены точечные адгезивные и плотные контакты (Рисунок 4, а; 5, а). Мы выявили закономерность в их расположении. Ближе к крайней точке контакта (верхушке, выступающей ламеллоподии эндотелиоцита) часто в срез попадает точечное адгезивное соединение (Рисунок 4, а). По ходу межконтактной щели на некотором расстоянии от него встречается плотный контакт (*zonula occludens*) (Рисунок 4, а, б). На электронограммах выявляется зона контакта, около 60 нм протяженностью, в которой плазмолеммы соседних клеток образуют 2-3 области (места) слияния (Рисунок 4, б).

Анализ частоты встречаемости контактных комплексов в межэндотелиальных соединениях разной конфигурации показал, что в 18-ти случаях из 30-ти в черепицеобразном контакте регистрируются и плотный и точечный адгезивный контакт. В простом интердигитирующем соединении в 6-ти случаях из 30-ти встречаются оба межклеточных контакта (Рисунок 7).

В начальном отделе лимфатического капилляра мы находим только два простых стыковых соединения, один из которых имел плотный контакт. Анализ расчетов χ^2 - критерия Пирсона показал, что значение χ^2 - критерия больше критического ($23,500 \geq 16,812$) при степени свободы равной шести, а связь между факторными и результативными признаками значимая и находится на уровне $p \leq 0,01$.

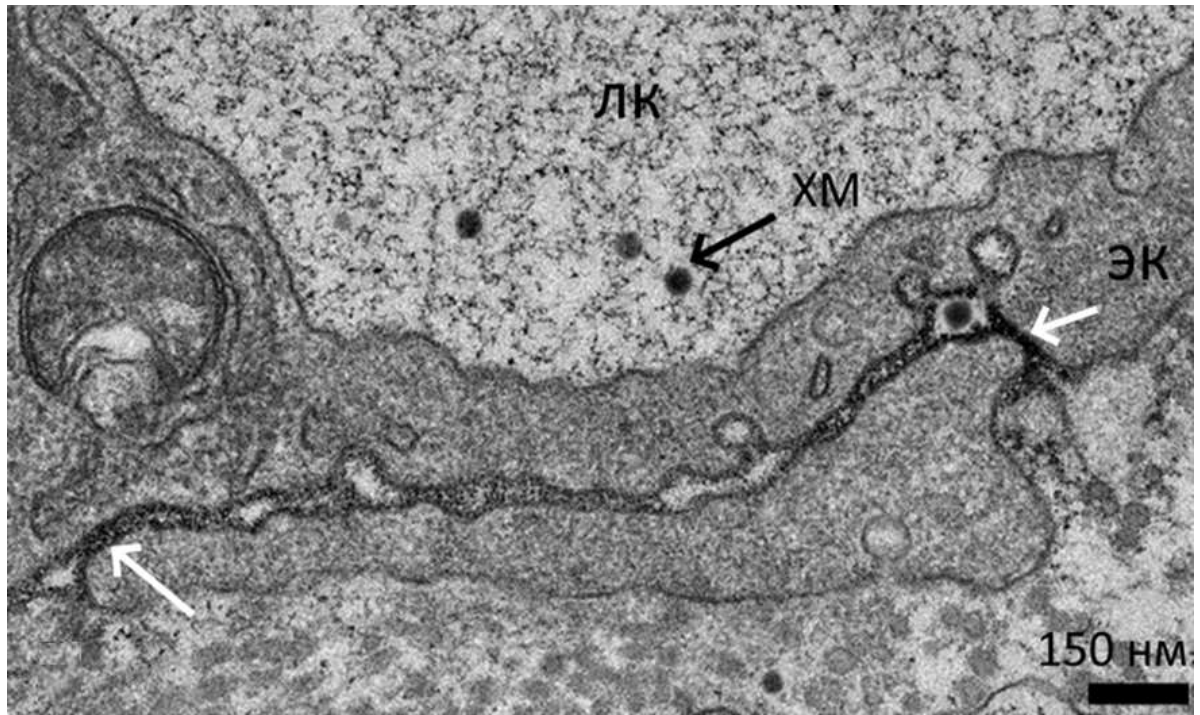


Рисунок 6 – Лимфатический капилляр (ЛК) через 45 мин после введения химуса в просвет тонкой кишки: хиломикрон в межконтактной щели и в просвете ЛК: плотный контакт (белая стрелка). ТЭМ.

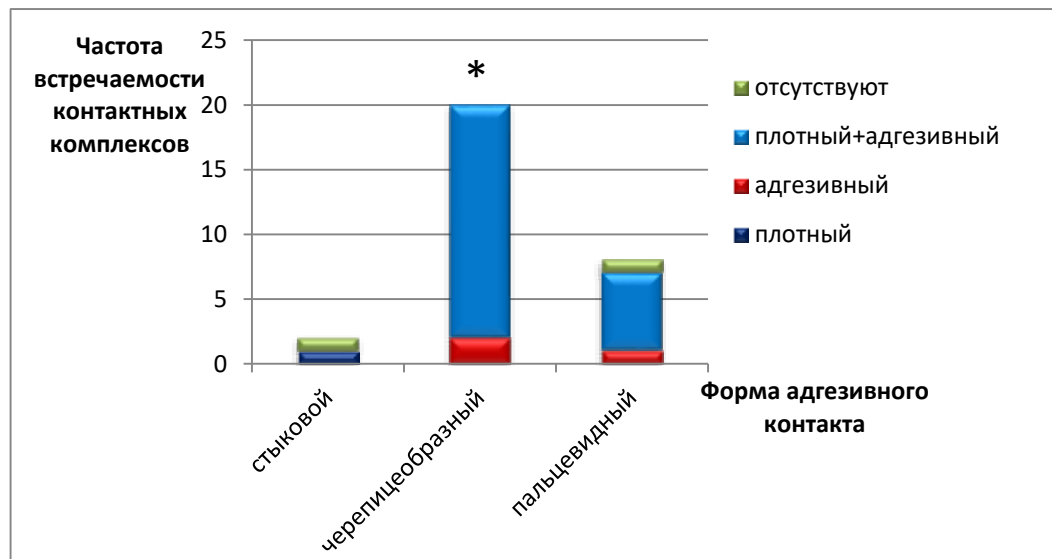


Рисунок 7 – Гистограмма распределения частоты встречаемости контактных комплексов в структуре адгезивных контактов разных форм. * – связь между факторами статистически значима на уровне $p \leq 0,01$ ($\chi^2=23,500$).

Полученное значение χ^2 -критерия Пирсона указывает на закономерный характер расположения специальных межклеточных соединений в адгезионном соединении черепицеобразной формы. Околоконтактные участки базолатеральной плазмолеммы подлежащего эндотелиоцита связываются якорными филаментами с эластическими волокнами собственной пластинки кишечной ворсинки (Рисунок 4, б). Якорные филаменты имеют косое направление волокон. При этом плоские ламеллоподии ЭК, направленные люминально, остаются свободными.

Через 45 мин после введения химуса в начальный отдел тонкой кишки крысы терминальный лимфатический капилляр кишечной ворсинки хорошо выявляется и приобретает округлую форму. Хиломикроны диаметром в среднем 98 ± 15 нм регистрируются в интерстиции собственной пластинки кишечной ворсинки, просвете ЛК, а также в просвете межклеточных контактов (Рисунок 6). При этом, край люминального «языка» эндотелиоцита остается прикрепленным к нижележащей клетки. Как на апикальной, так и на базальной части плазмолеммы регистрируются прикрепленные плазмолеммальные везикулы диаметром 60 нм, колбовидной формы и с суженной «шейкой» (Рисунок 6). Редко регистрируются свободные округлые мембранные профили в цитоплазме ЭК. Ни прикрепленные, ни свободные округлые мембранные профили не содержат хиломикроны. В условиях низкой липидной нагрузки не обнаружено слияния везикул с образованием трансэндотелиальных каналов.

Морфология КГ в условиях липидной нагрузки практически не меняется. Стопки органеллы остаются дискретными. Среднее количество медиальных цистерн 2-3. Процентное соотношение мембран разных типов (цистерн, тубул, везикул) сохраняется. Так, на цистерны приходится в среднем $64 \pm 2,5$ % мембран органеллы. Транс-сеть плохо выражена, может примыкать к стопке, а также локализоваться на некотором расстоянии от нее. На тубулярные структуры приходится в среднем $22 \pm 2,5$ % мембран органеллы. Ассоциированные со стопкой 60 нм везикулы занимают в среднем $14 \pm 2,5$ % мембран органеллы. Тубулярные соединения между цистернами также не выявлены.

3. 2. Ультраструктура эндотелия краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы

Краевой синус регионального лимфатического узла тонкой кишки крысы после 24-х часового голодания представлен щелевидной структурой, расположенной между капсулой и наружной корой лимфатического узла.

Эндотелиальные клетки, прилежащие к капсуле лимфатического узла, лежат на хорошо выраженной базальной мембране (Рисунок 8). Эндотелиоциты плоские, средняя высота клетки в зоне ядра составила – $1,780 \pm 36$ мкм. ЭК чаще всего формируют между собой черепицеобразную форму простого адгезионного соединения (Таблица 2). Однако высока также доля стыковых форм контактных поверхностей ($30 \pm 1,2\%$), которые укреплены плотными контактами. Простые пальцевидные формы соединений регистрируются в $12 \pm 0,8\%$ случаев. Реже, в $6 \pm 1,8\%$ случаев, регистрируются сложные пальцевидные соединения.

В ядродержащей зоне эндотелиоцитов сконцентрированы органеллы синтетического аппарата клетки. Канальцы эндоплазматического ретикулума немногочисленны. Комплекс Гольджи формирует диспергированные компактные стопки из трех, редко пяти цистерн. Среднее количество цистерн - $4,4 \pm 0,8$ (Таблица 4). Цис- и транс- цистерны часто отсутствуют или представлены небольшими, перфорированными мешочками, меньшими, чем медиальные цистерны по диаметру. Средний диаметр цистерн комплекса Гольджи - 711 ± 46 нм. Латеральный край цистерн незначительно расширен, часто заканчивается мембранной почкой диаметром 60 нм. Вокруг стопки локализуются округлые 60-80 нм мембранные профили. Они составляют в среднем $16 \pm 2,3\%$ от всех мембран комплекса Гольджи.

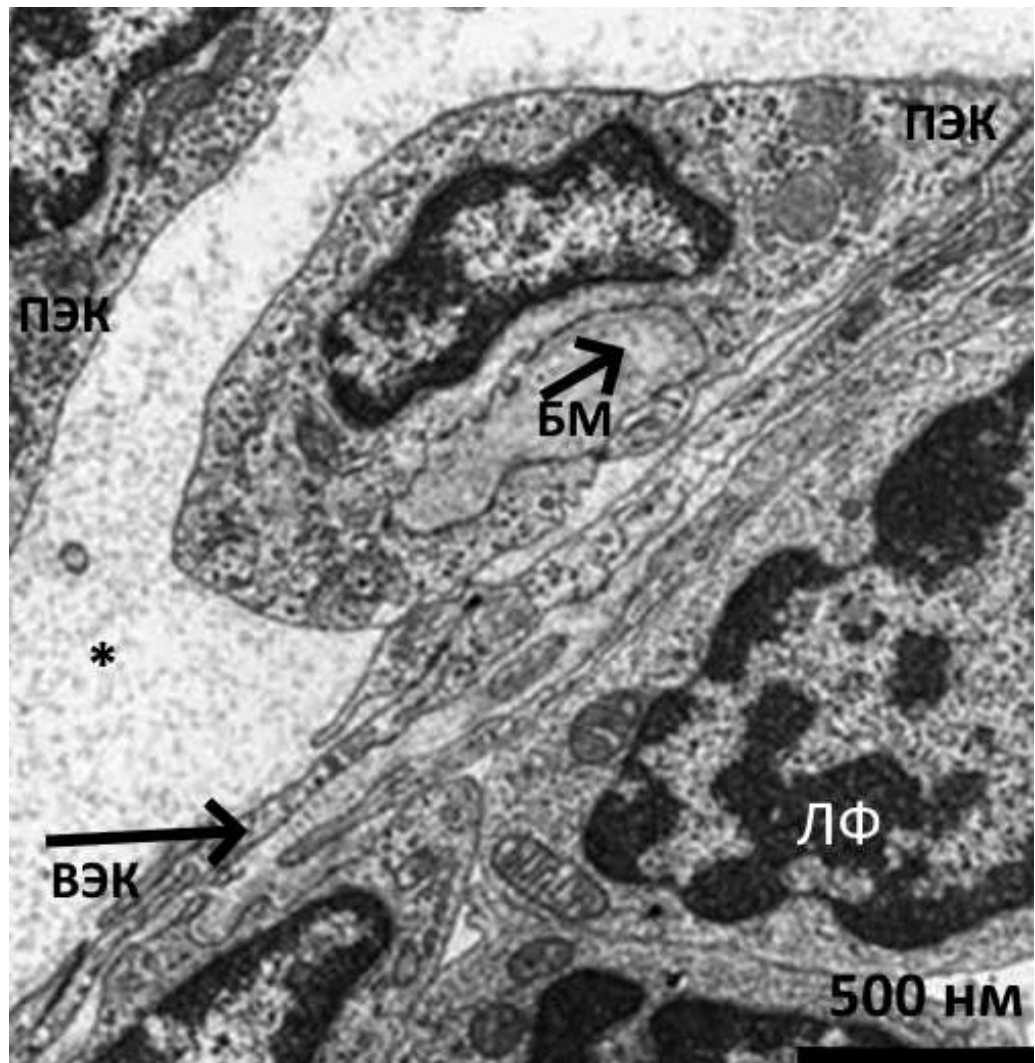


Рисунок 8 – Краевой синус регионального лимфатического узла тонкой кишки крысы после голодания:

ПЭК – эндотелиальные клетки, обращенные к подкапсулярному пространству узла; ВЭК – эндотелиальная клетка, обращенная к корковому веществу узла; БМ - базальная мембрана; * - просвет краевого синуса; ЛФ - лимфоцит. ТЭМ.

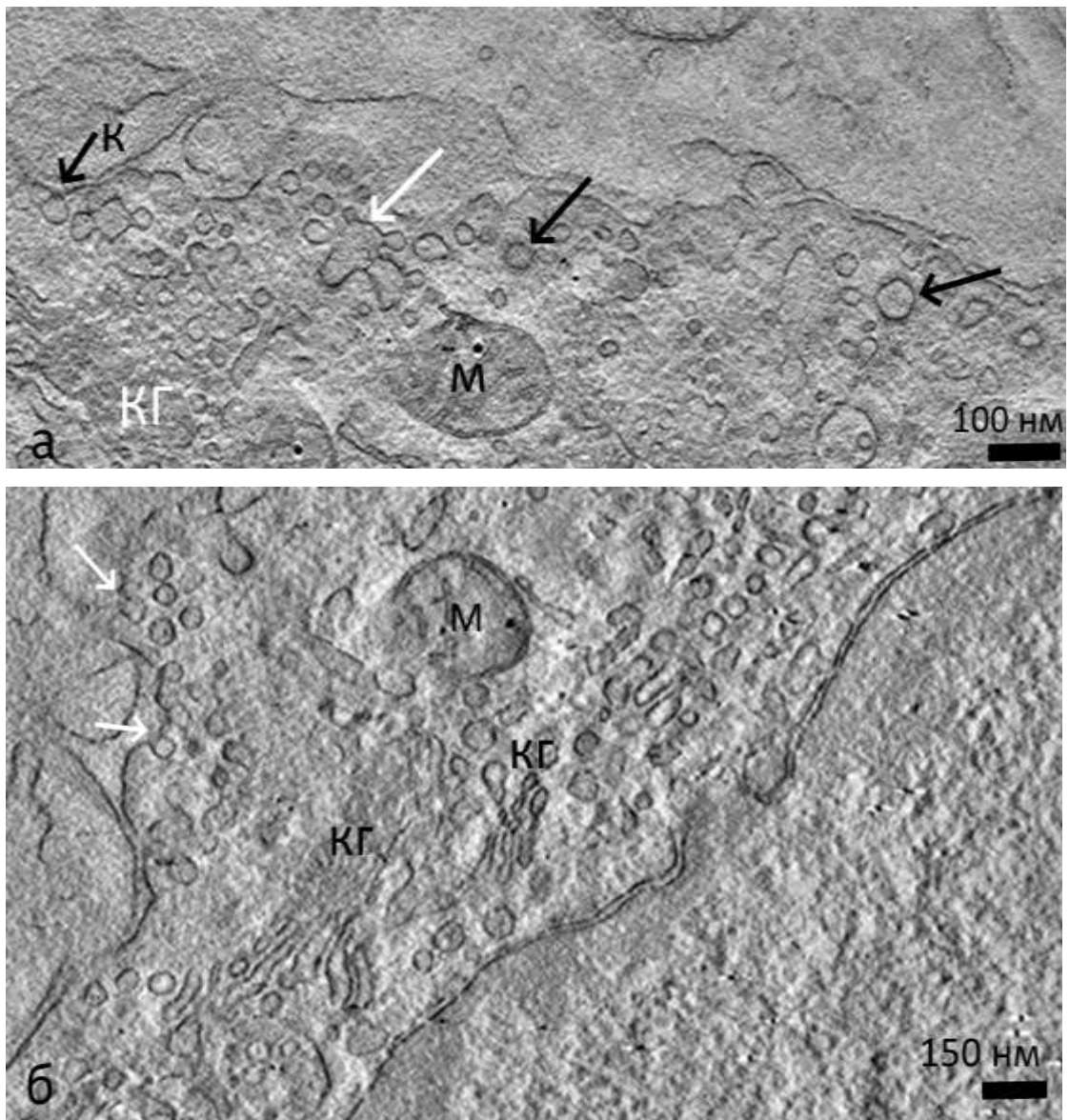


Рисунок 9 – Ультраструктура эндотелиальной клетки, обращенной к подкапсулярному пространству краевого синуса регионального лимфатического узла крысы после голодания:

а – комплекс Гольджи (КГ), митохондрия (М), кавеолосома (белая стрелка), клатриновые везикулы (черная стрелка), кавеола (К); б – комплекс Гольджи (КГ), митохондрия (М), кавеолы (белая стрелка). ЭМ-томография.

Тубулярных структур мало, около $12 \pm 2,5$ %. Основная масса мембран органеллы представлены уплощенными цистернами, на которые приходится около $71 \pm 2,5$ % мембран. В околоядерной зоне регистрируются округлые митохондрии, многочисленные эндосомы, встречаются окаймленные везикулы. Кавеолы встречаются редко, 1-2 на 200 нм срез.

Эндотелиоциты, обращенные к наружной коре, базальной мембраны не имеют. Средняя высота клетки в зоне ядра составила $3,250 \pm 0,05$ мкм. Основная форма контактной поверхности между смежными клетками – черепицеобразная, которая встречается в $68 \pm 2,2$ % случаев (Таблица 2). Простые пальцевидные соединения зарегистрированы в $18 \pm 1,8$ % случаев. Стыковые и сложные пальцевидные встречаются в среднем одинаково редко, в $3,0 \pm 0,2$ % и $5,6 \pm 0,8$ % случаев соответственно. Плотные контакты встречаются крайне редко. Ядра овальной или округлой формы с периферическими зонами гетерохроматина. В околоядерной зоне сконцентрированы митохондрии, одиночные цистерны эндоплазматического ретикулума, компактные одиночные стопки комплекса Гольджи (Рисунок 8, 9). Кавеол регистрируется немного, однако они встречаются чаще, чем в «париетальных» клетках краевого синуса. Для уточнения функционального строения эндотелия краевого синуса лимфатического узла были изучены особенности ультраструктуры синуса в процессе всасывания липидов.

Через 60 мин после введения химуса в начальный отдел тонкой кишки крысы лимфа с липидами доходит до верхних брыжеечных лимфатических узлов. Макроскопически у животных мы наблюдаем увеличение объема узла в 2-3 раза. На образцах, изученных с помощью СЭМ, мы регистрируем миграцию многочисленных макрофагов в полость краевого синуса через монослой «париетальных» ЭК (Рисунок 10, а, б, в). Анализ ультраструктуры макрофагов показал у них наличие липидных включений в цитоплазме (Рисунок 10, в). В цитоплазме эндотелиоцитов, прилежащих к наружной коре лимфатического узла, много плазмолеммальных везикул. Электронно-плотных включений в просвете плазмолеммальных везикул не зарегистрировано (Рисунок 10, а, г).

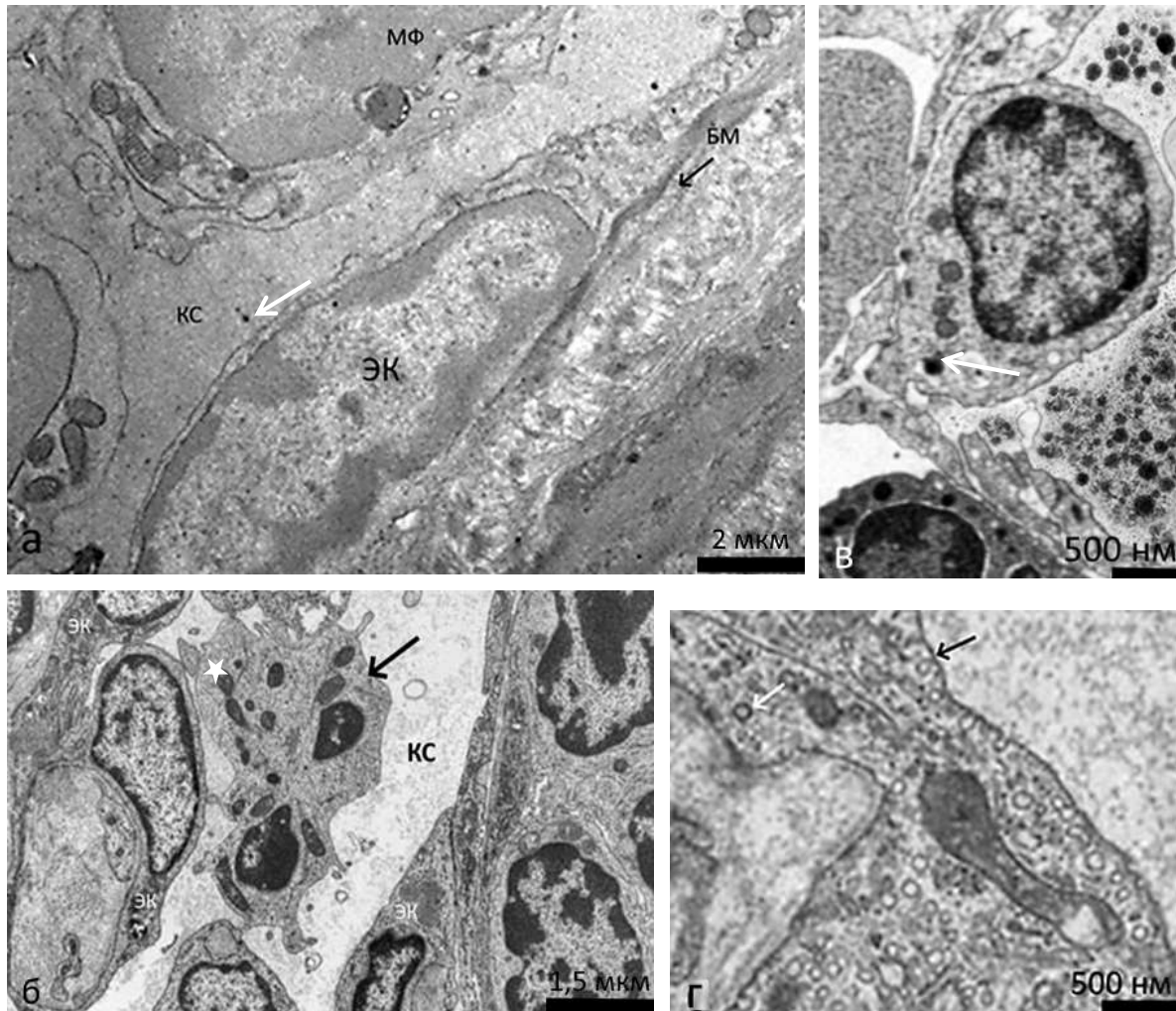


Рисунок 10 – Краевой синус регионального лимфатического узла крысы после липидной нагрузки:

а - эндотелиальные клетки (ЭК) краевого синуса (КС), лежат на базальной мембране (БМ), липиды в полости синуса (белая стрелка); б - макрофаг (*) в полости краевого синуса; в – липидные включения в цитоплазме макрофага (белая стрелка); г – ультраструктура эндотелиальной клетки, кавеолы (черная стрелка), окаймленные везикулы (белая стрелка). ТЭМ.

3. 3. Ультраструктура эндотелия грудного протока кролика

Стенка лимфатических сосудов, стволов и протоков состоит из участков, ограниченных с двух сторон клапанами (лимфангионов). Для исследования особенностей строения эндотелия мы выбрали четыре зоны сосудистой стенки: межклапанный сегмент, центральная, синусная поверхность створки и свободный край створки (Рисунок 11, а).

По данным СЭМ, эндотелий *межклапанного сегмента* представлен вытянутыми вдоль оси сосуда клетками. Клетки лежат на хорошо выраженной базальной мембране. Межклеточные границы хорошо визуализируются (Рисунок 11, б). Видны немногочисленные микроворсинки, выступающие зоны ядер. Длина клетки в среднем составила $42,12 \pm 2,3$ мкм. Средняя ширина клетки $8,34 \pm 0,6$ мкм. Коэффициент вытянутости составил 5,04 (Таблица 5).

Мозаика эндотелиального пласта представляет собой пласт эндотелиальных клеток довольно гетерогенных по своей форме. Большинство эндотелиоцитов в межклапанном сегменте (71,1 %) представлено топологическими гексагонами, т.е. большинство клеток в пласте контактируют с 6-ю эндотелиоцитами. Клеток, имеющих степень связанности четыре и восемь, немного, по 4,5 % каждой. Клеток со степенью связанности пять - 13,3 %. Таким образом, средняя степень связанности клеток в пласте составила $5,98 \pm 0,02$ (Таблица 6).

По данным ТЭМ, эндотелий *межклапанного сегмента* представлен плоскими клетками, лежащими на хорошо выраженной базальной мембране (Рисунок 15, а). Микрорельеф клеток редуцирован. Ядра овальной формы, уплощены. Высота клетки в наиболее выступающей зоне ядра составляет в среднем 1320 ± 45 нм. Гетерохроматин равномерно распределен по объему ядра или локализуется по периферии ядра. Митохондрии немногочисленные и локализируются в около ядерной области. Короткие цистерны эндоплазматической сети встречаются как около ядра, так и на периферии клетки. Комплекс Гольджи в срез попадает редко (Рисунок 14 а, б).

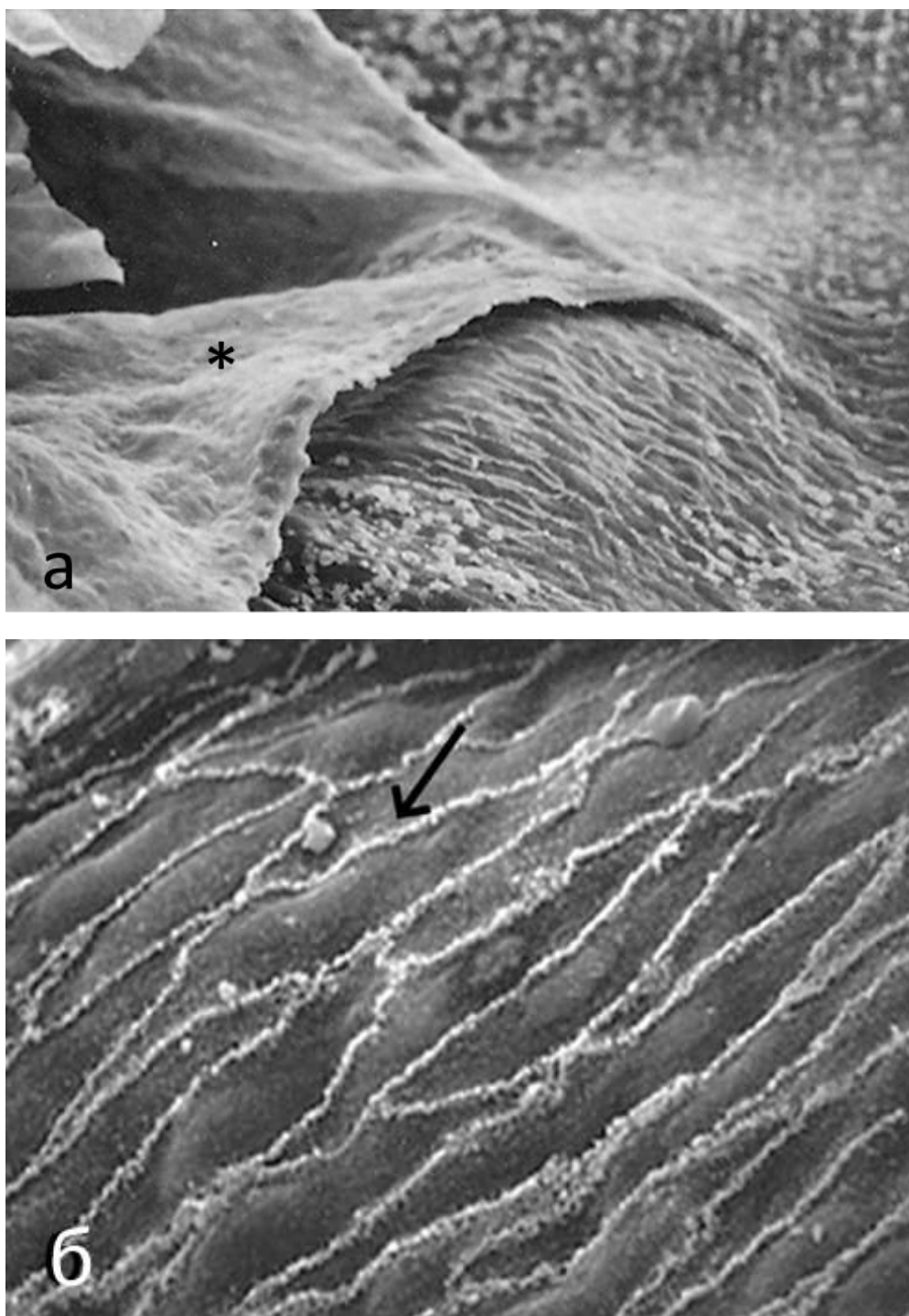


Рисунок 11 – Эпителиальный пласт грудного протока кролика:
а – створка клапана: *- центральная поверхность створки. СЭМ, Ув. 2700; б –
межклапанный сегмент, межклеточные границы (стрелка). СЭМ, Ув 2500.

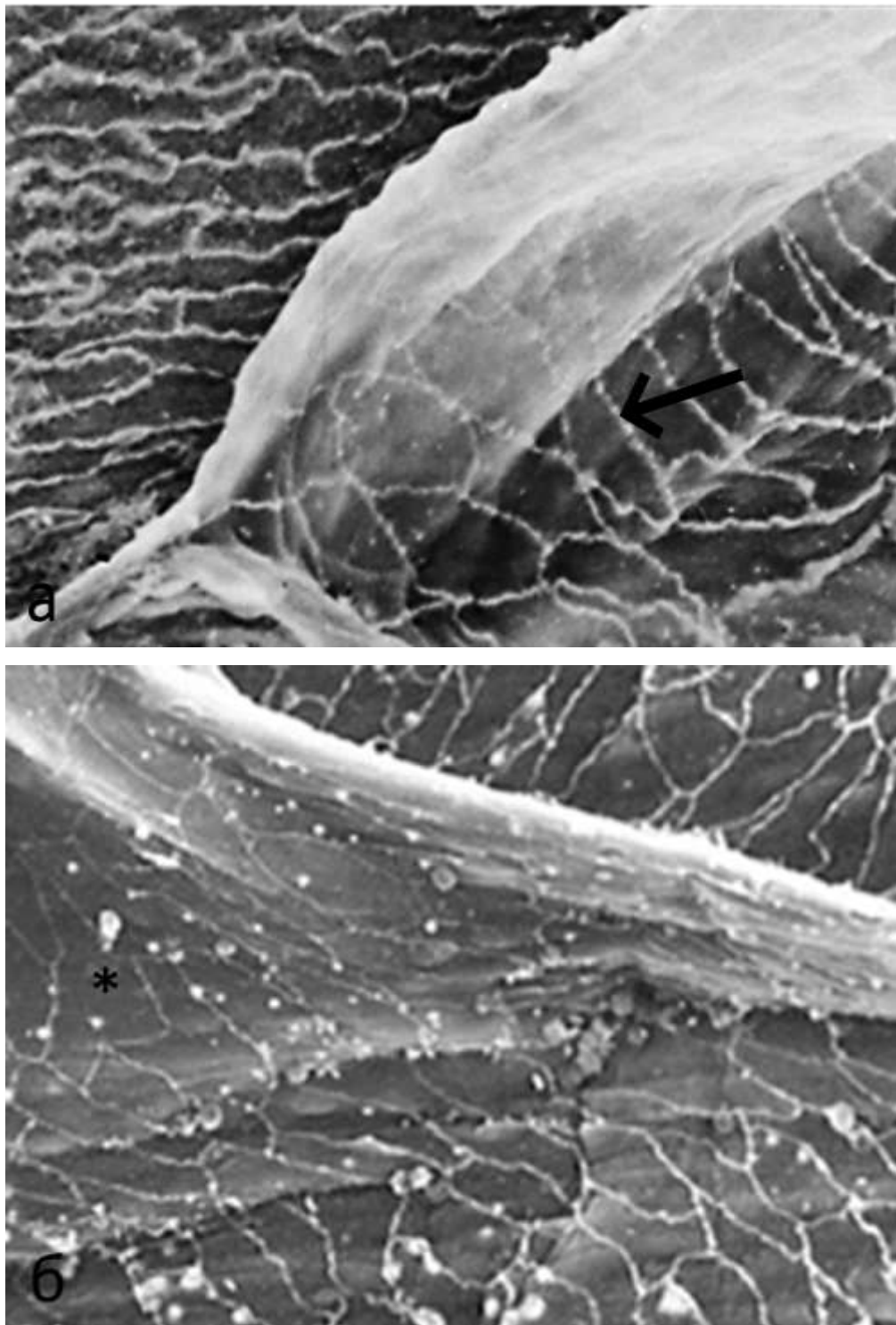


Рисунок 12 – Эпителиальный пласт створки клапана грудного протока:

а – центральная поверхность створки клапана: межклеточная граница (стрелка). СЭМ, Ув. 2300; б – синусная поверхность створки клапана: * -многоугольная клетка. СЭМ, Ув. 2300.

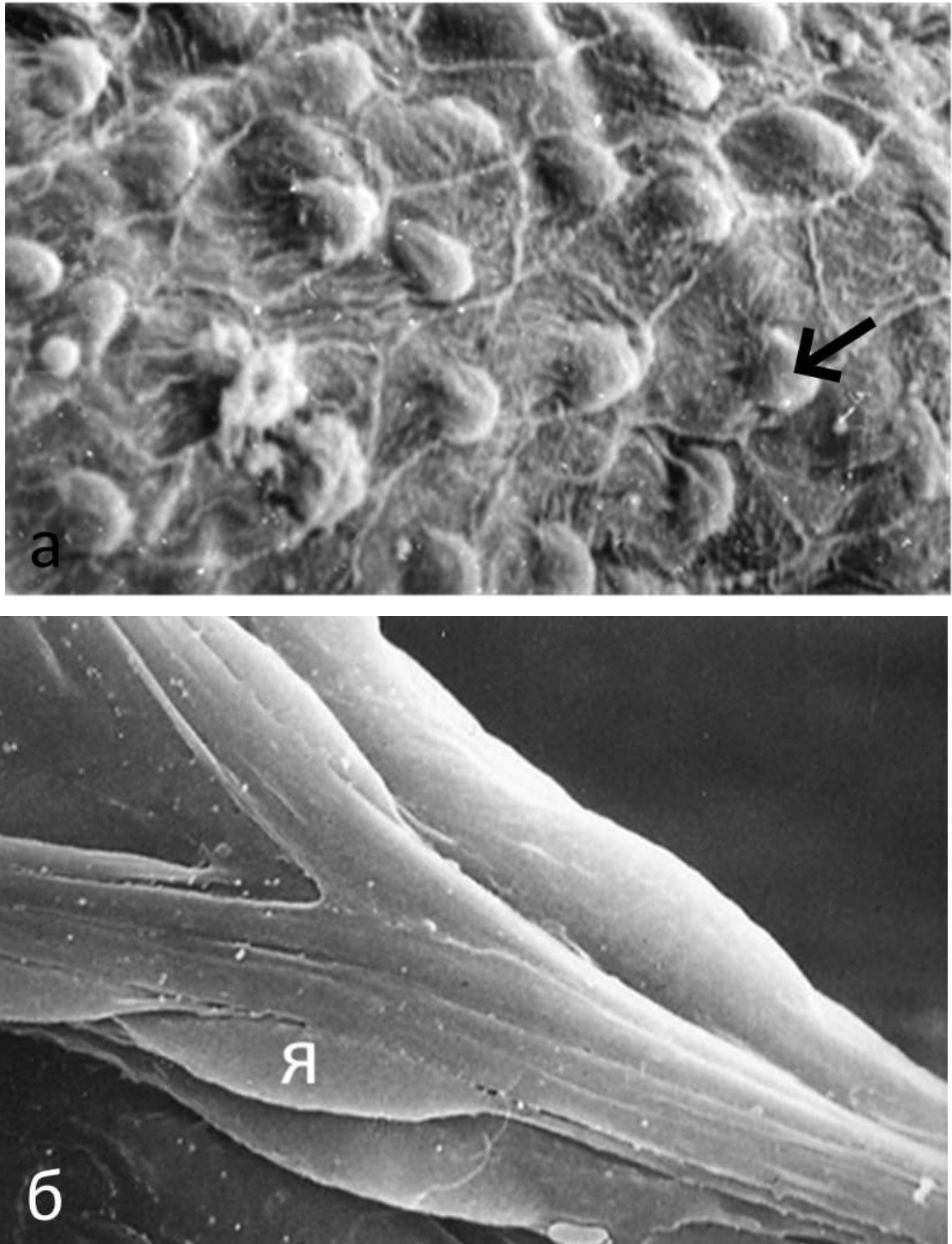


Рисунок 13 – Эпителиальный пласт створки клапана грудного протока кролика: а – синусная поверхность створки клапана: ядродержащая зона (стрелка). СЭМ, Ув 2300; б - свободный край створки клапана: Я – ядро клетки. СЭМ, Ув. 4750.

Органелла представлена дискретными стопками из 3-4, реже пяти практически не перфорированных, плоских цистерн (в среднем $4,4 \pm 1,2$). Высота цистерн в центральной области $30 \pm 2,1$ нм, в периферической области в среднем $60 \pm 2,1$ нм. Часто стопка состоит только из 2-3 медиальных цистерн, при этом цис- и транс-цистерны отсутствуют. На латеральном крае стопки регистрируются 60 нм везикулы. Часть из них связаны мембранной шейкой с цистернами органеллы. На везикулярные профили в структуре комплекса Гольджи приходится $16 \pm 2,5$ % мембран органеллы. Тубулярных профилей немного. Всего около $14 \pm 2,5$ %. На цистерны стопки приходится $72 \pm 2,5$ % мембран органеллы (Таблица 4).

Свободных везикулярных профилей в цитоплазме ЭК межклапанного сегмента немного. На люменальной поверхности плазмолеммы расположены немногочисленные кавеолы с содержимым средней электронной плотностью. На аблюменальной поверхности плазмолеммы кавеолы практически не встречаются (Рисунок 14).

Анализ строения межклеточных контактов показал, что в межклапанном сегменте грудного протока в $65,3 \pm 2,5$ % случаев встречается адгезионное соединение черепицеобразной формы (Рисунок 15, а). Мы видим наложение краев клеток друг на друга. На втором месте по встречаемости простой пальцевидной контакт, который регистрируется в $25,3 \pm 1,5$ % случаев. В контакте плазмолеммы соседних клеток образуют инвагинации разной глубины. Простая стыковая и сложная пальцевидная форма (Рисунок 15, в) контактной поверхности смежных клеток встречаются в $4,5 \pm 0,2$ % и в $5 \pm 0,2$ % случаев соответственно (Таблица 2). Адгезионные соединения укрепляются плотными контактами. В среднем в межклапанном сегменте длина контактирующей поверхности клеток составила $1,72 \pm 0,08$ мкм. Адгезионные соединения практически всегда укреплены плотным соединением или десмосомой.

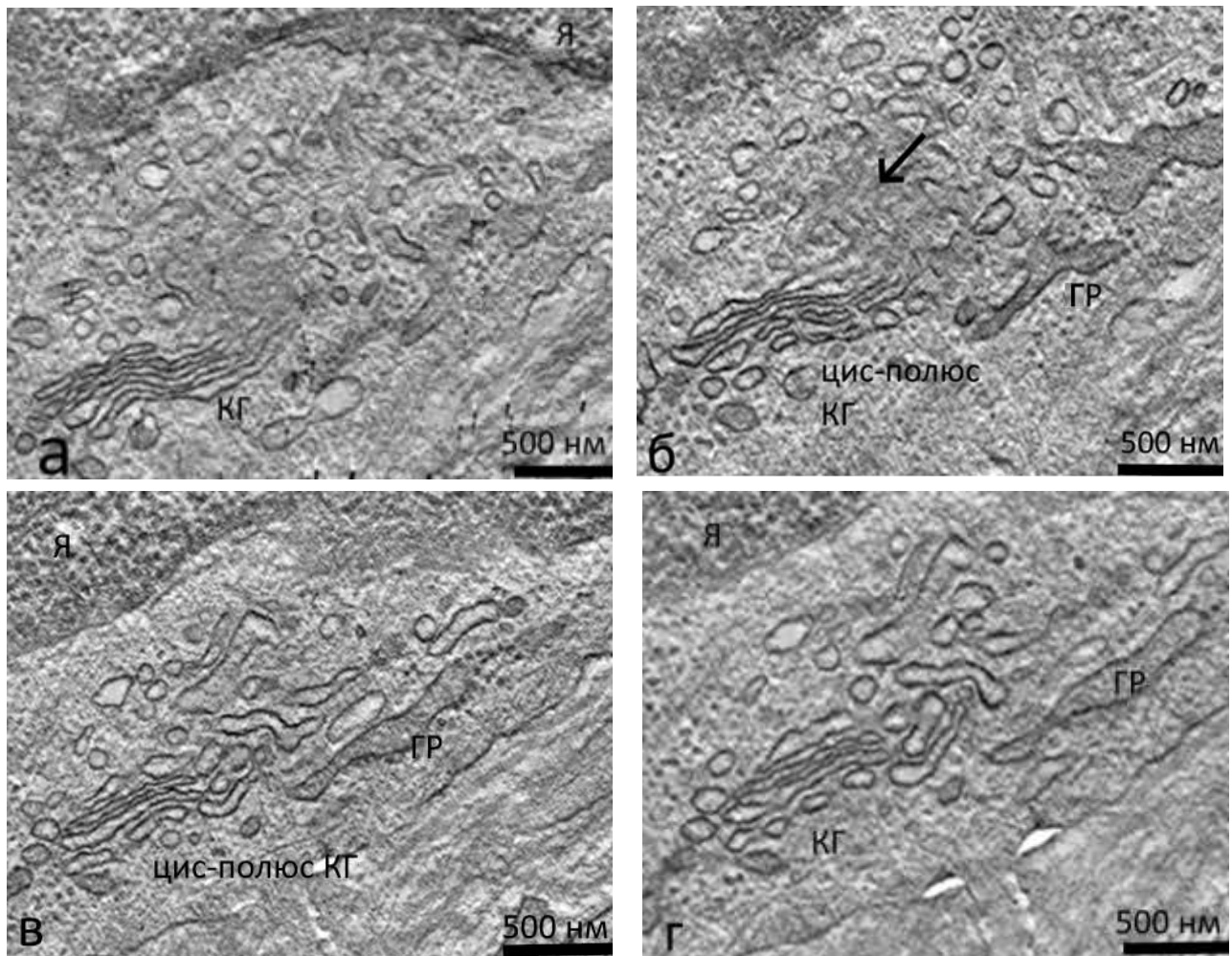


Рисунок 14 – Комплекс Гольджи в эндотелии грудного протока кролика:
 а – в – серийные срезы стопки комплекса Гольджи (КГ): Я – ядро; ГР –
 гранулярный эндоплазматический ретикулум; цис-полюс КГ; цистерна КГ
 (стрелка). ЭМ-томография.

На центральной поверхности створки клетки, по данным СЭМ, также имеют вытянутую, преимущественно веретеновидную форму. Средняя длина клетки составила $46 \pm 2,6$ нм, ширина $8,8 \pm 0,6$ нм. Коэффициент вытянутости составил 5,0 (Таблица 5). Межклеточные границы хорошо визуализируются (Рисунок 12, а).

Анализ расположения клеток в пласте показал, что большинство клеток (57,5 %) контактируют с 6-ю эндотелиальными клетками, т.е. имеют шесть «соседей». Пять «соседей» имеют 17,5 % клеток. С семью клетками контактирует 15 % эндотелиоцитов, с четырьмя и восьмью - по 5 % клеток. Таким образом, средняя степень связанности клеток в пласте составила $5,97 \pm 0,02$ (Таблица 6).

Ультраструктура эндотелия центральной поверхности створки мало отличается от ультраструктуры клеток межклапанного сегмента. Ядра овальной формы, уплощенные. Гетерохроматин сконцентрирован вдоль ядерной мембраны, а также в центральной области ядра. В околоядерной области локализуются округлые митохондрии, дискретные стопки КГ, цистерны эндоплазматического ретикулума. Свободных везикулярных профилей в цитоплазме немного. С люминальной поверхностью связаны немногочисленные кавеолы. На аблюминальной поверхности плазмолеммы кавеолы встречаются редко.

На центральной поверхности створки чаще всего клетки образуют черепицеобразную форму адгезионного контакта (Рисунок 15, б), который встречается в $60 \pm 2,5$ % случаев. Простая пальцевидная форма соединения встречается в $23 \pm 1,5$ % случаев. Стыковой и сложный пальцевидные формы зарегистрированы в $5 \pm 0,2$ % и $12 \pm 0,5$ % случаев соответственно (Таблица 2). Адгезионные соединения так же, как и в межклапанном сегменте, как правило, укреплены плотным контактом (Рисунок 15, г), встречаются десмосомы. В среднем на центральной поверхности створки длина контактирующей поверхности клеток составила $1,92 \pm 0,1$ мкм.

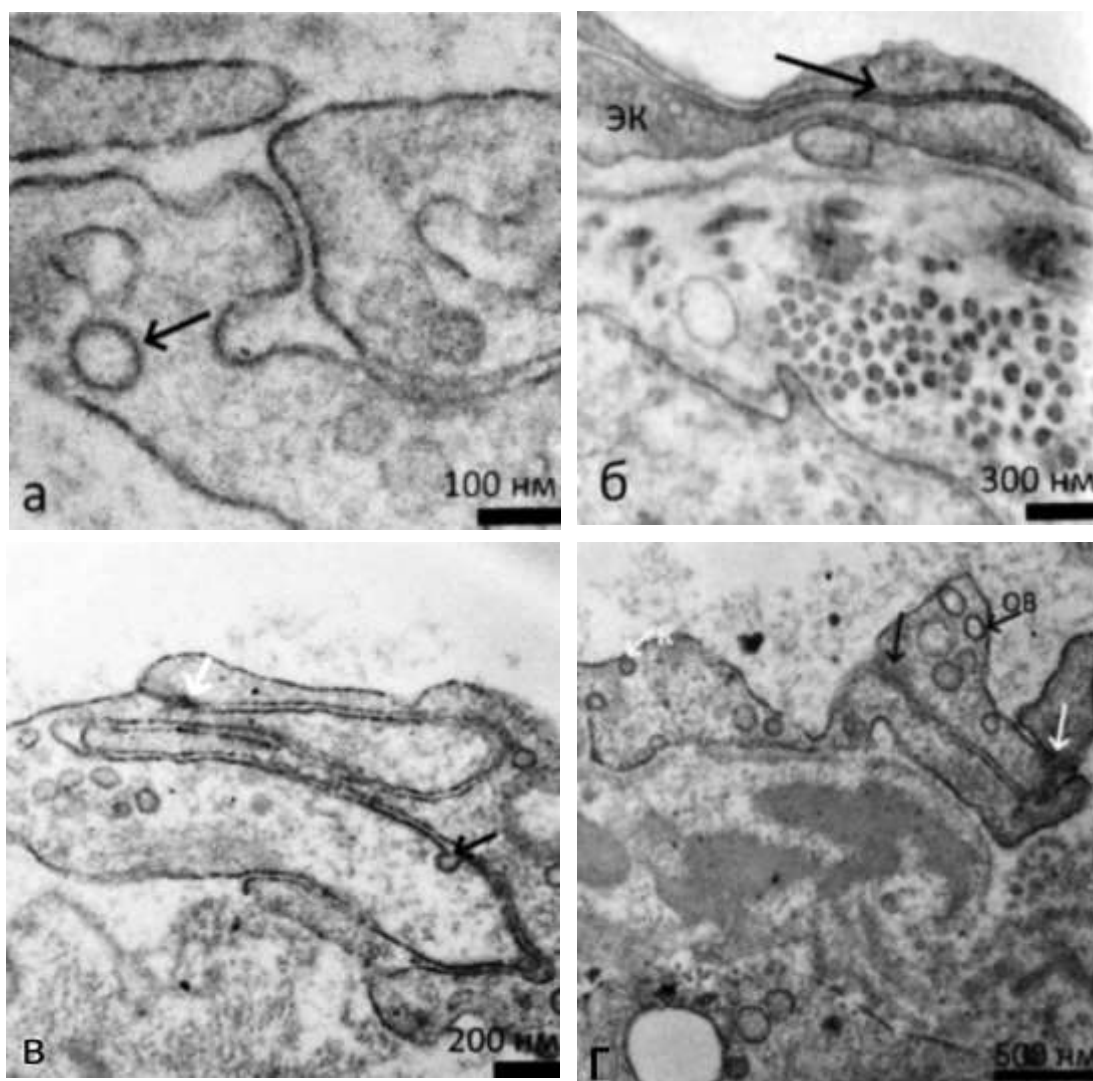


Рисунок 15 – Эндотелиальные клетки межклапанного сегмента и центральной поверхности створки клапана грудного протока:

а – черепицеобразная форма соединения (ЧК) эндотелиальных клеток межклапанного сегмента: окаймленные везикулы (стрелка). ТЭМ; б – ЧК центральной поверхности створки (стрелка). ТЭМ; в – сложное пальцевидное соединение эндотелиальных клеток межклапанного сегмента: кавеола (стрелка). ТЭМ; г - ЧК эндотелия на центральной поверхности створки: адгезивное соединение (черная стрелка), плотный контакт (белая стрелка); окаймленная клатрином почка (ОВ). ТЭМ.

На синусной поверхности створки, по данным СЭМ, наблюдается большое разнообразие форм клеток. Кроме вытянутых веретенообразных встречаются клетки неправильной угольной формы (Рисунок 12, б). Средняя длина клеток составила $26,34 \pm 2,3$ мкм, ширина $10,05 \pm 0,34$ нм. Коэффициент вытянутости составил 2,62 (Таблица 5).

На электронограммах, полученных с помощью СЭМ, хорошо визуализируется микрорельеф эндотелиальных клеток (хорошо видны межклеточные границы и выбухающие ядродержащие зоны).

Анализ расположения клеток в пласте показал, что 60 % клеток контактируют с шестью «соседями», 17,5 % - с пятью, 8 % контактируют с 4-мя клетками и 4 % с восьмью эндотелиоцитами. Средняя степень связанности клеток в пласте $5,92 \pm 0,06$ (Таблица 6).

Ультраструктура *синусной поверхности створки* также мало отличается от ультраструктуры центральной поверхности створки и межклапанного сегмента. Органеллы в основном сконцентрированы в околядерной зоне (Рисунок 16, а). Свободных везикулярных профилей также не много. Колбовидные инвагинации диаметром 60 нм встречаются в периферической зоне клетки на люминальной поверхности плазмолеммы, а также в зоне интердигитирующих соединений.

Основные отличия ультраструктуры клеток синусной поверхности связаны с организацией межклеточных соединений. Несмотря на то, что преобладающей формой поверхности адгезионных соединений эндотелиоцитов является черепицеобразная (Таблица 2), возрастает встречаемость простой пальцевидной ($38,3 \pm 2,5$ %) и сложной пальцевидной форм - $17,6 \pm 1,5$ % (Рисунок 16, б). Стыковые формы соединений встречаются редко, в среднем $2,6 \pm 0,2$ % случаев. Также крайне редко встречаются плотные соединения. Длина контактирующих поверхностей эндотелиоцитов на синусной поверхности створки клапана составила $1,63 \pm 0,02$ мкм.

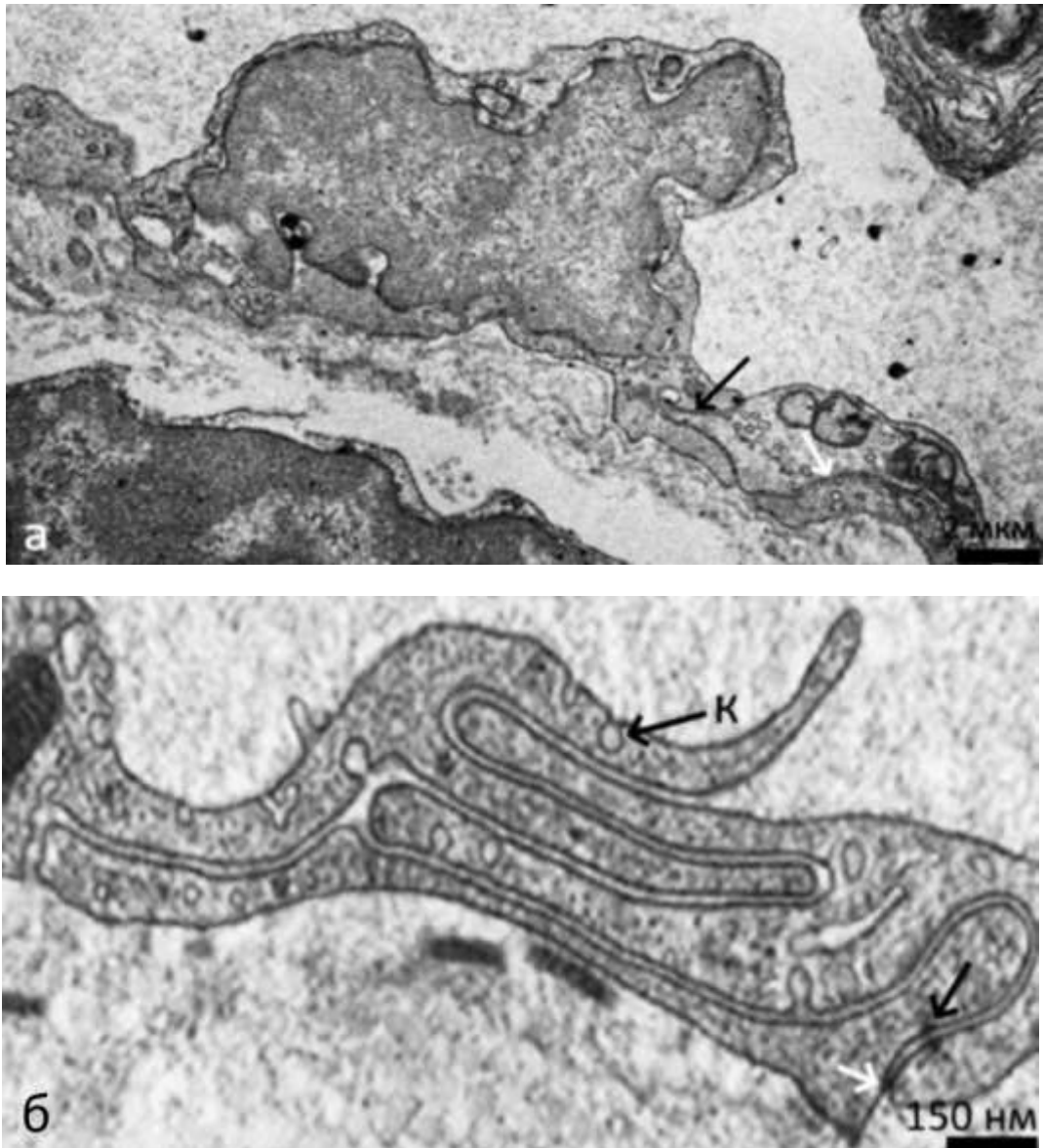


Рисунок 16 – Эндотелиальные клетки синусной поверхности створки клапана грудного протока кролика:

а – простое пальцевидное адгезионное соединение (стрелка) эндотелиальных клеток. ТЭМ; б – сложное пальцевидное соединение эндотелиальных клеток, точечное адгезивное соединение (белая стрелка), кавеола (К). ТЭМ;

На *свободном крае створки* клетки резко вытянуты (Рисунок 17, а). Длина клеток может составлять до 200 мкм. Микрорельеф хорошо выражен. В периферической зоне клетки регистрируются микроворсинки и выросты плазмолеммы. Ядра эндотелиоцитов резко выступают в просвет сосуда, периферическая область клетки сильно истончена. Высота клетки в наиболее выступающей области ядра составила 1430 ± 23 нм (Таблица 5).

Большая часть органелл ЭК локализуется в околоядерной зоне. Однако в периферической зоне чаще встречаются митохондрии. Комплекс Гольжи выявляется на ТЭМ свободного края створки крайне редко. Стопки органеллы короткие, в среднем диаметром $580 \pm 3,6$ нм, компактные, состоящие из 2-3 цистерн, малоперфорированные. Цистерны эндоплазматического ретикулума короткие, встречаются как в около ядерной, так и периферической области клетки. Кавеолы встречаются чаще, чем в межклапанном сегменте. Они регистрируются в среднем 4-5 на 200 нм срез. При этом кавеолы могут быть связаны с плазмолеммой ЭК как наружной, так и внутренней поверхности створки клапана.

ЭК свободного края створки, в большинстве случаев, связаны между собой стыковой формой межклеточного соединения (Рисунок 17, б, в), который встречается в $68 \pm 2,5$ % случаев. Сложные пальцевидные соединения регистрируются крайне редко, менее 2 % случаев. Черепицеобразная и простая пальцевидная формы встречаются с частотой $20,7 \pm 1,5$ % и $9,3 \pm 0,5$ % соответственно. Стыковые соединения укреплены хорошо выраженными плотными контактами (Рисунок 18 б, в). Длина контактирующих поверхностей почти в 2 раза меньше, чем в межклапанном сегменте и составила $0,65 \pm 0,01$ мкм.

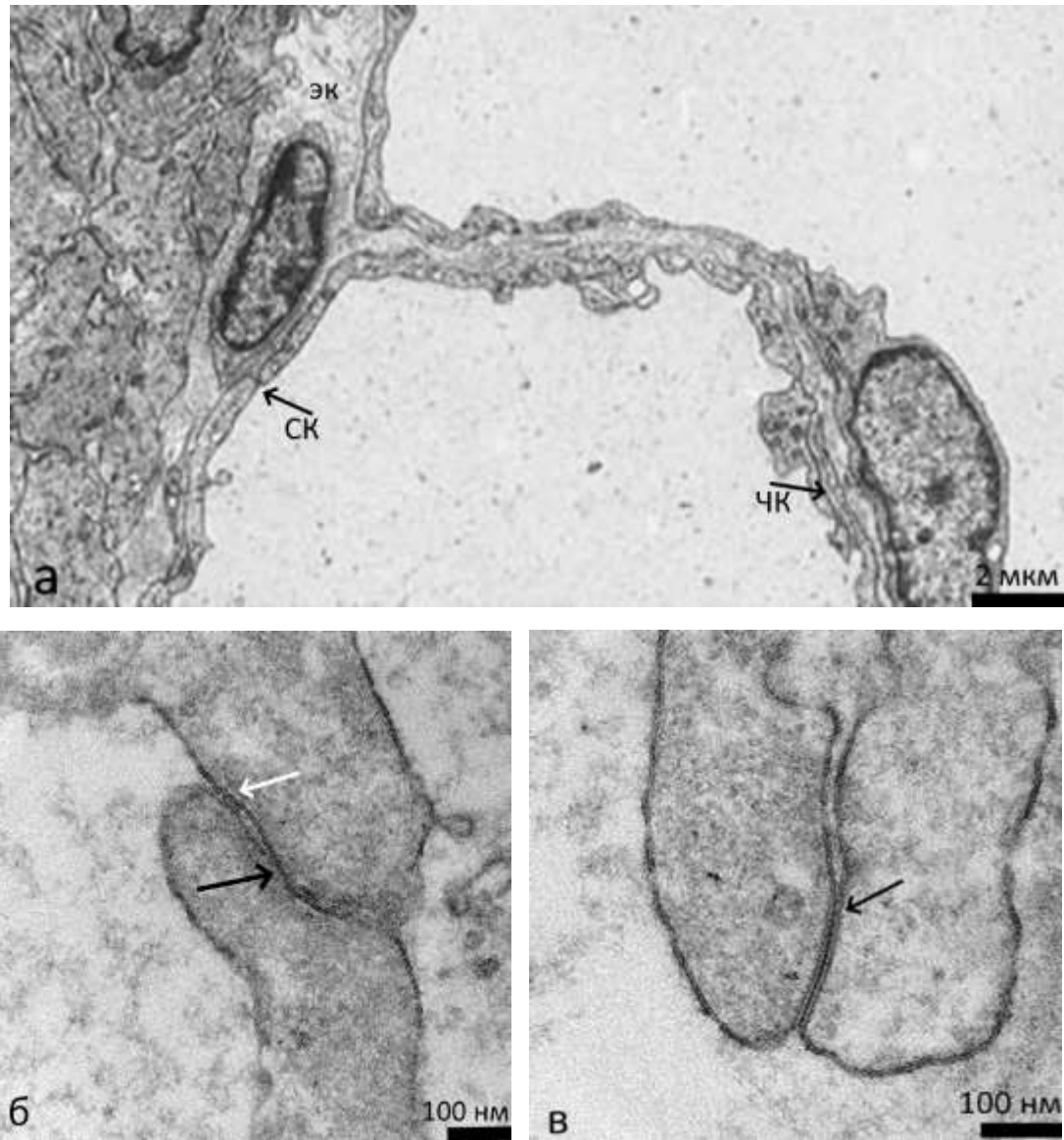


Рисунок 17 – Эндотелиальные клетки свободного края створки клапана грудного протока кролика:

а - створка клапана, стыковой контакт (СК), черепицеобразный контакт (ЧК). ТЭМ; б – стыковой контакт: плотное соединение (черная стрелка), адгезивное соединение (белая стрелка); в - стыковой контакт: щелевое соединение (стрелка). ТЭМ.

Таблица 2 – Частота встречаемости адгезионных соединений разной формы в эндотелии лимфатического капилляра (ЛК), краевого синуса лимфатического узла (ЛУ) и грудного протока (ГП)

Вид контакта	Стыковой %	Черепицеобразный %	Простой пальцевидный %	Сложный пальцевидный %
Эндотелий ЛК	7,0±0,8	68±2,2	25±2,4	-
Эндотелий, обращенный к капсуле ЛУ	30±1,2	52±1,8	12±0,8	6±1,8
Эндотелий, обращенный к паренхиме ЛУ	3,0±0,2	68±2,2	18±1,8	5,6±0,8
Межклапанный сегмент ГП	4,5±0,2	65,3±2,5	25,3±1,5	5±0,2
Центральная поверхность створки ГП	5,0±0,2	60±2,5	23±1,5	12±0,5
Синусная поверхность створки ГП	2,6±0,2	41,5±2,5	38,3±2,5	17,6±1,5
Свободный край створки ГП	68±2,5	20,7±1,5	9,3±0,5	2,0±0,2

Таблица 3 – Длина контактирующей поверхности смежных клеток в эндотелии лимфатического капилляра (ЛК), краевого синуса лимфатического узла (ЛУ) и грудного протока

Показатель, мкм	ЛК	ЛУ	Грудной проток			
			Межклапанный сегмент	Центральная поверхность створки	Синусная поверхность створки	Свободный край створки
Длина контактирующей поверхности	1,69±0,02	1,58±0,02	1,72±0,08	1,92±0,1	1,63±0,02*	0,65±0,01*

*- статистически достоверные при $p \leq 0,05$ различия показателей эндотелия створки с межклапанным сегментом;

Таблица 4 – Морфометрические характеристики структур комплекса Гольджи в эндотелии лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла, грудного протока

№	Показатель	Лимфатический капилляр	Лимфатический узел	Грудной проток
1.	Число цистерн (шт.)	4,28±1,2	4,4±0,8	4,4±1,2
2.	Диаметр цистерн (нм)	881±26,2	711±46	748,5±24
3.	Ширина цистерн в центральной части (нм)	32±2,2	30±2,2	30±2,1
4.	Ширина расширений латерального края стопки (нм)	60±2,2	63±2,2	60±2,1
5.	% мембран везикул	15±2,5	16±2,3	16±2,5
6.	% мембран тубул	17±2,5	12±2,5	14±2,5
7.	% мембран цистерн	68±2,5	71±2,5	72±2,5

Таблица 5 – Морфометрические характеристики эндотелиальных клеток грудного протока (ГП)

Объект /Показатель	Длина клетки (мкм)	Ширина (мкм)	Коэффициент вытянутости
Межклапанный сегмент ГП	42,12±2,3	8,34±0,6	5,04
Центральная поверхность створки ГП	46±2,6	8,8±0,16	5,2
Синусная поверхность створки ГП	26,34±2,3*	10,05±0,34*	2,62*

*- различия с значениями межклапанного сегмента статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

Таблица 6 – Средняя степень связанности эндотелиальных клеток в пласте грудного протока

Объект/показатель	Межклапанный сегмент	Центральная поверхность створки	Синусная поверхность створки
Средняя степень связанности	5,98±0,02	5,97±0,02	5,92±0,06
Дисперсия	0,00016	0,00018	0,00144
Среднее квадратическое отклонение	0,01245	0,01357	0,03792
Коэффициент вариации	0,21	0,23	0,64

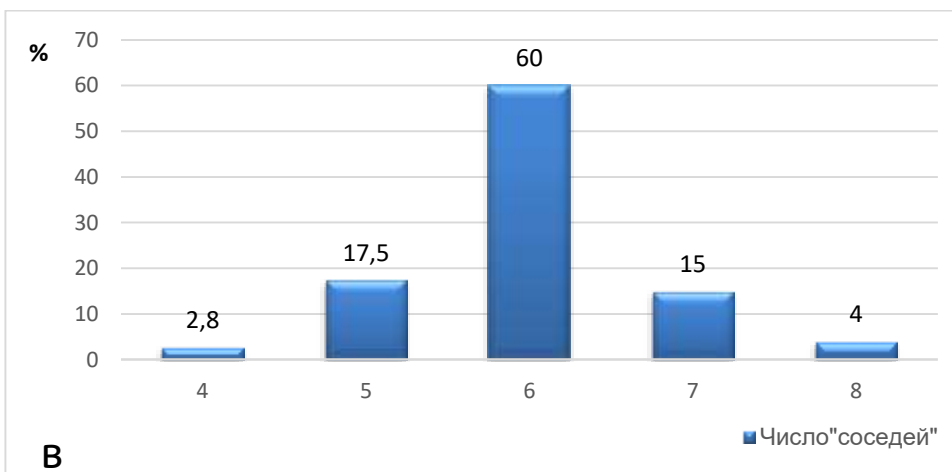
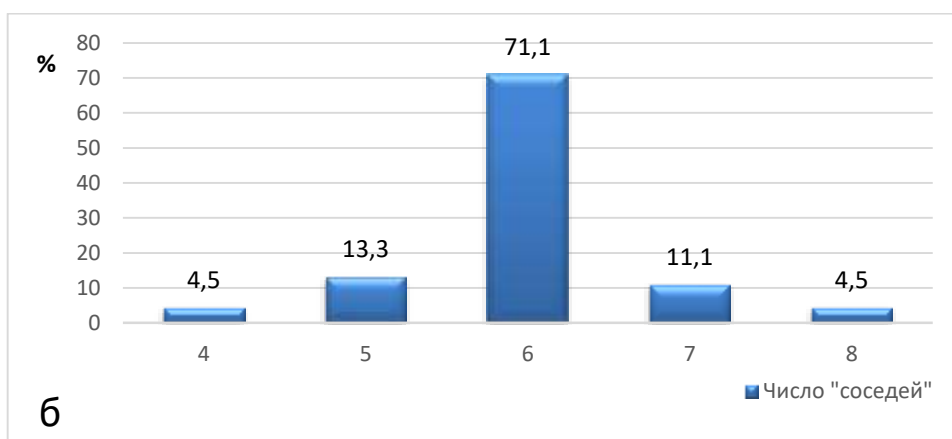
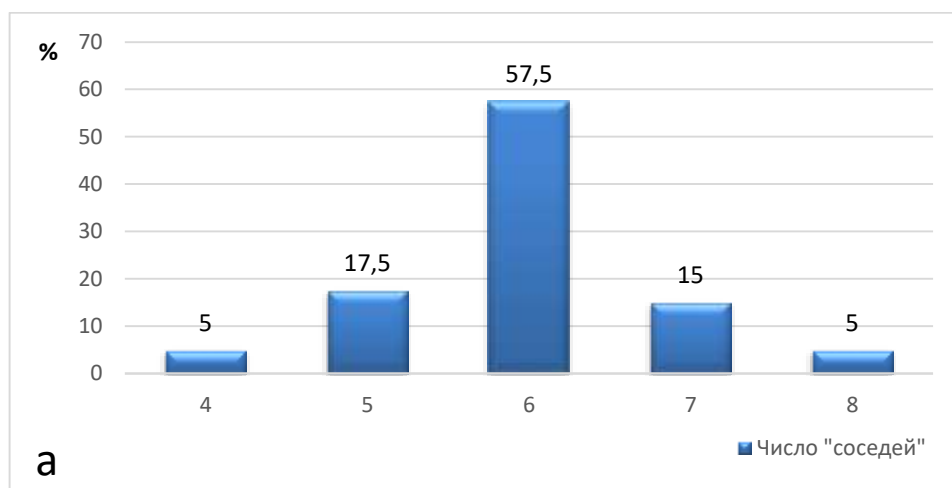


Рисунок 18 – Гистограмма распределения клеток в пласте по степени связности:
а- центральная поверхность створки; б – межклапанный сегмент, в – синусная поверхность створки.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ультраструктуре лимфатического эндотелия посвящен ряд фундаментальных исследований [10, 12, 14, 17]. Однако развитие современных методов клеточной и тканевой биологии позволили детализировать особенности строения лимфатической «системы» и по-новому посмотреть на ее роль в организме. Исследования последних лет показали, что даже незначительные функциональные изменения лимфатических сосудов могут привести к развитию целого ряда самых различных патологий [39, 81, 140, 153, 184], осмысление механизма развития которых нам еще предстоит достичь. Кроме того, с развитием новых технологий лечения, использующих таргетную доставку молекул к клеткам/органам мишеням, возникла необходимость детального понимания механизмов транспорта макромолекул через эндотелий лимфоносных путей.

При выборе объектов исследования мы обратили внимание на активно развивающееся направление поиска молекулярных конструкций, которые могли бы быть использованы в качестве носителя терапевтического препарата и который доставлялся бы к органам-мишеням по лимфоносным путям [108, 127].

При введении лекарственного препарата в лимфоносные пути возможен более высокий терапевтический эффект, т.к. сосуды или узлы могут содержать высокие концентрации антигена или патологического агента. С другой стороны, лекарственный препарат может быстрее достичь органа-мишени посредством иммунокомпетентных клеток, концентрация которых в лимфе также велика. Так, например, показано, что в реактивные узлы активно привлекаются нейтрофилы, концентрация которых увеличивается в несколько раз, по сравнению с «покоящимися» лимфатическими узлами [177].

В клинической практике существует опыт лимфотропной терапии [23]. Однако таргетная доставка терапевтических молекул значительно расширяет возможности воздействия на патогенез самых различных заболеваний, в первую очередь онкологических, а также может быть использована при разработке вакцин.

В связи с этим идет активный поиск молекулярных конструкций, которые могли бы быть использованы в адресной доставке лекарственного вещества, а также имели удобную для приема фармакологическую форму. Перспективным является направление поиска пероральных терапевтических конструкций, которые бы хорошо всасывались в желудочно-кишечном тракте и попадали заведомо в лимфатический капилляр [203].

Анализ литературных данных показал, что для достижения высокой биодоступности важна и структура, и размер молекулы-носителя. Так, для твердых липидных частиц, нагруженных инсулином, биодоступность составила 4,9-7,1% [206].

Почти нулевое всасывание в лимфатический капилляр показано для латексных частиц диаметром 27 нм и 100-250 нм [147, 162] и очень низкое поглощение полимерных материалов диаметром от 2,5-15 нм вводимых перорально [162]. Есть данные, что около 13,7 % полимерных частиц диаметром 60 нм попадают в лимфатический капилляр после их инъекции в тонкий кишечник [105] и 30-45 % полистерольных частиц диаметром от 500 нм до 5 мкм [54].

Так как биодоступность синтетических наночастиц невысокая, было высказано предположение, что использование липофильных препаратов и пролекарств при их пероральном введении может быть высоко эффективным путем их транспорта в лимфоносное русло [188].

Для таких препаратов лимфатический доступ возможен через ассоциацию с абсорбцией липидов в кишечнике и синтезом хиломикронов в энтероците кишечной ворсинки [188]. Поэтому тип и доза липидов, с которыми может вводиться препарат, являются важными факторами. Так, введение препарата с длинноцепочечными липидами способствует лимфатическому транспорту более эффективно, чем введение с короткоцепочечными или среднецепочечными липидами [188].

Между тем, при всей глубине разработки проблемы введения лекарственных форм посредством лимфоносных путей нет четкого понимания

механизма всасывания макромолекул в лимфатический капилляр, а также остаются неясными механизмы, обуславливающие разную проницаемость эндотелиального монослоя в лимфатических сосудах и узлах.

Таким образом, мы решили сконцентрироваться, прежде всего, на особенностях строения эндотелия, определяющих проницаемость макромолекул через эндотелиальный пласт. Особенности ультраструктуры эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока мы изучали на модельных животных, а также использовали эксперимент, позволяющий модулировать липидную нагрузку.

Выбор в качестве модельного объекта кишечную ворсинку крысы был обусловлен также актуальностью данных о механизмах всасывания липидов в лимфатический капилляр кишки и их дальнейшем транспорте [108]. Кроме того, хиломикроны являются удобной маркерной молекулой для изучения проницаемости эндотелиального монослоя, так как они хорошо визуализируются на электронограммах. Для усиления контраста липидных частиц использовался также метод усиления контраста ОТОВО.

В работе был выбран методический подход, позволяющий исключить высокую липидную нагрузку [180] и слияние хиломикронов. В результате из энтероцита кишечной ворсинки крысы в интерстиций собственной пластинки выходят хиломикроны в среднем 30-100 нм в диаметре. Изучение механизма транспорта молекул данного диапазона позволит снять некоторые, существующие в настоящее время, противоречия о биодоступности частиц при их пероральном введении и всасывании молекул в лимфатический капилляр [105, 147, 162].

Краевой синус лимфатического узла, формируя часть лимфоносных путей, является важным функциональным звеном иммунной системы и защиты организма от патогенов. Брыжеечные лимфатические узлы первыми принимают лимфу, богатую хиломикронами на пути из слизистой тонкой кишки в грудной проток. Эндотелиоциты синуса служат своеобразным фильтром, обеспечивающим сортировку антигенов для оптимального иммунного ответа, прохождения клеток в паренхиму и из нее, а также для удаления воды [4, 150].

При этом в онкологии, фармакологии, КТ-диагностике и ряде других областей важно понимание того, как быстро макромолекулы покидают лимфатический узел [153, 168].

Поэтому для детализации ультраструктуры эндотелия краевого синуса был выбран верхний брыжеечный лимфатический узел, а в качестве модели для изучения эндотелиальной проницаемости макромолекул использовалась модель всасывания липидов.

Из кишечника лимфа, минуя лимфатические узлы, попадает в лимфатические стволы и грудной проток [7]. Грудной проток содержит до 70 % лимфы, поступающей из желудочно-кишечного тракта, которая сбрасывается через венозное русло в системный кровоток [7]. Стенка крупных лимфатических сосудов, лимфатических стволов и протоков в норме практически не пропускает макромолекулы. Однако нарушение проницаемости может происходить как при наличии генетически наследуемых дефектов межклеточных соединений [66, 109, 146], так и под действием патологических факторов [51].

Несмотря на активное изучение молекулярно-генетической основы проницаемости сосудистого эндотелия, морфологических данных, подтверждающих особенности строения эндотелия в разных условиях его функционирования, немного [2]. Сегментарное строение лимфатических сосудов, обусловленное наличием внутрипросветных клапанов, делает эндотелиальный монослой интимы структурно и функционально неоднородным. Поэтому мы решили изучить особенности строения эндотелия и монослоя на створках клапана и в межклапанном сегменте.

Выбор в качестве объекта исследования грудного протока кролика продиктован плохой доступностью для электронно-микроскопических исследований высокого разрешения сосудов мелких лабораторных животных. Между тем, большое количество исследований морфологии грудного протока на этих лабораторных животных дает возможность сравнению и анализу полученных нами данных [2, 7, 21, 29, 30, 31].

Морфофункциональные особенности эндотелия лимфатического капилляра

Лимфатический капилляр представляет собой начальный отдел лимфоносных путей, обеспечивающих дренаж интерстициальной жидкости и макромолекул, а в кишечной ворсинке – всасывание хиломикронов [48]. Лимфатический капилляр кишечной ворсинки (в количестве один-три) начинается слепо в собственной пластинке кишечной ворсинки в ее средней трети.

Лимфатические капилляры кишечной ворсинки захватывают хиломикроны и другие компоненты интерстициальной жидкости и транспортируют их к собирающим лимфатическим сосудам подслизистой оболочки и брыжеечным узлам тонкой кишки [36]. Стенка лимфатического капилляра состоит из одного слоя эндотелиальных клеток, высокопроницаема для макромолекул, патогенов и иммунных клеток, а также обеспечивает однонаправленный ток жидкости из интерстиция в просвет капилляра [24, 58].

Организация межклеточных контактов в лимфатическом капилляре продолжает обсуждаться среди морфологов. При этом ученые сходятся во мнении, что контакты в эндотелии лимфатического капилляра сложно организованы и отличаются большим разнообразием [9, 35, 70]. Потому мы детально проанализировали строение межэндотелиальных контактов лимфатического капилляра кишечной ворсинки, в том числе после липидной нагрузки. Наши исследования показали, что в лимфатическом капилляре кишечной ворсинки чаще всего встречаются адгезионные соединения черепицеобразной формы. Стыковые и сложные пальцевидные встречаются крайне редко.

В ранних исследованиях в стенке лимфатического капилляра описывались щели, по которым предполагалось перемещение макромолекул [35, 72]. Другие авторы указывали на низкую частоту встречаемости открытых соединений и большое количество плотных контактов [98]. Мы полагаем, что авторы

описывали адгезионные соединения черепицеобразной формы, которые на срезах могут выглядеть как косые межэндотелиальные щели.

Причем адгезионные соединения эндотелия лимфатического капилляра имеют молекулярные особенности строения, в отличие от межэндотелиальных соединений кровеносных микрососудов. В лимфатическом капилляре обнаружены особые белки десмоплакин и плакоглобин и некоторые ещё не идентифицированные белки подобного типа, а также кальций-зависимые трансмембранные гликопротеины, VE-кадгерин и кадгерин-5 [14]. При этом эндотелиальные клетки капилляра кишечной ворсинки не включают другие известные в настоящее время десмоглеины и десмоколин-адгезионные соединения, присутствующие в эпителии, миокарде и некоторых других клетках. Эти особенности молекулярного строения еще предстоит понять с точки зрения функциональной морфологии эндотелия лимфатического капилляра.

Между тем, наши исследования показали, что в черепицеобразном и пальцевидном соединениях в крайней точке уплощенной периферической зоны или выроста ламеллоподии между этим выростом и подлежащей клеткой, как правило, в срез попадает точечное адгезивное соединение. Подобные соединения были описаны в лимфатическом капилляре трахеи, где были идентифицированы белки LYVE-1 и PECAM [58]. Эти белки могут обеспечивать слабую адгезию, между люминально уплощенным выростом и подлежащим участком эндотелиоцита которой, видимо, достаточно, чтобы предотвратить загибание люминального выроста и обеспечить его последующее возвращение в первоначальное положение.

На некотором расстоянии от точечного адгезивного соединения, а точнее в основании ламеллоподии, обнаруживается плотный контакт (tight junction). Однако он имеет маленькую протяженность и часто не образует сплошных «гребешков» из внутримембранных частиц, что может указывать на его меньшую прочность, чем в кровеносных сосудах.

Плотный контакт и точечное адгезивное соединение имеют статистически закономерный характер расположения. Подобное расположение описывал

P. Baluk (2007) в лимфатическом капилляре трахеи. Авторы указывают, что адгезивное соединение не всегда может располагаться строго по центру выроста клетки [58]. Однако в большинстве случаев точки, меченные на белок VE-cadherin, видны по ходу контакта, образуемого наложением люминальных плоских выростов ЭК [58]. В стенке трахеи P. Baluk (2007 г.) описывает извилистые границы эндотелия лимфатического капилляра, контактная щель которого, в ряде случаев, похожа на край дубового листа. При этом на люминально–базальной проекции такие контакты имеют форму близкую к синусоиде, а плотный контакт формируется при переходе синусоиды контактной щели через, так называемую «нулевую точку». P. Baluk назвал описанный контакт «синусоидным» [58].

В клетках кишечной ворсинки люминально–базальная проекция межклеточного контакта не всегда напоминает синусоидную кривую, однако сохраняется закономерное расположение плотных контактов и точечных адгезивных соединений, аналогичное описанным «синусоидным» контактам трахеи.

Десмосомы и щелевые соединения в лимфатическом капилляре кишечной ворсинки не встречаются. Однако они могут регистрироваться в зонах простых соединений в эндотелии грудного протока.

В зоне «синусоидного» контакта базальная часть плазматической мембраны эндотелиоцита прикреплена к коллагеновым фибриллам и эластическим волокнам интерстиция с помощью якорных филаментов. Так стенка лимфатического капилляра прикрепляется к эластическому каркасу органа или ткани. При этом плоские выросты эндотелиальных клеток, направленные люминально, свободны и могут отклоняться током внутрь просвета, пропуская интерстициальную жидкость в полость лимфатического капилляра.

Таким образом, можно утверждать, что большая часть эндотелиальных клеток лимфатического капилляра кишечной ворсинки соединена между собой «синусоидными» контактами, которые могут функционировать как

внутристеночные клапаны, в норме пропускающие жидкость и молекулы в одном направлении – в просвет капилляра.

Комплекс Гольджи не только участвует в синтезе белков, их упаковке и доставке по клеточным «адресам», но также обеспечивает плазмолемму необходимым объемом мембран, для обеспечения эндо- и транскитоza. Анализ строения комплекса Гольджи показал морфологические признаки низкой функциональной активности органеллы. Мы регистрируем компактную стопку, редуцированную цис- и транс-сеть, небольшое количество ассоциированных со стопкой COP1 везикул. В просветах мембран КГ не обнаружено электронно-плотного вещества. Морфологические характеристики органеллы не меняются в образцах у животных после липидной нагрузки, что является косвенным подтверждением низкой вероятности транскитоza хиломикронов.

На следующем этапе нам необходимо было изучить механизм транспорта хиломикронов через эндотелий кишечной ворсинки. Предполагалось, что в качестве возможного транспортера хиломикронов могут выступать плазмолеммальные везикулы, фенестры или трансэндотелиальные каналы [8, 19].

В ранних исследованиях описывается высокое содержание плазмолеммальных везикул в лимфатическом эндотелии, объем которых может достигать до 35-40 % цитоплазмы клетки. При этом авторы указывают, что около половины всей популяции везикул связано с поверхностью эндотелиоцитов [19, 36]. Позже было показано, что специфическим маркером плазмолеммальных везикул эндотелиальных клеток является белок кавеолин-1 [176].

Долгое время кавеолы рассматривались в качестве основного механизма транскитоza молекул в лимфатическом капилляре [119, 178]. В более поздних исследованиях с помощью ЭМ-томографии было обнаружено минимальное количество кавеол [26, 117], при этом с помощью серийных срезов было показано, что подавляющая часть кавеол связана с плазматической мембраной и только менее 1 % кавеолин-зависимых везикул были не связаны с плазмолеммой или друг с другом.

В нашем исследовании мы использовали хиломикроны в качестве маркерной молекулы диаметром 30-100 нм. Через 60 мин после введения химуса крысам-реципиентам в начальный отдел тонкой кишки хиломикроны обнаруживаются в собственной пластинке кишечной ворсинки, в просвете лимфатического капилляра и в межэндотелиальной щели контакта.

При этом в цитоплазме эндотелия лимфатического капилляра плазмолеммальных везикул немного. Среди них встречаются единичные окаймленные клатрином почки и единичные колбовидные кавеолы, чаще всего связанные с люминальной, реже с базальными частями плазмолеммы. Кавеолосомы встречаются редко. Причем их количество в цитоплазме эндотелиоцитов после липидной нагрузки не меняется. Мы также не обнаружили в кавеолах и кавеолосомах ни одной электронно-плотной частицы, что указывает на низкую вероятность транспорта, по крайней мере липидов, трансцитозом. Также мы не обнаружили зоны слияния кавеол в трансэндотелиальные каналы, а также фенестры, что подтверждает данные о том, что трансэндотелиальные каналы для эндотелия лимфатических капилляров нетипичны [11, 131].

Таким образом, наши исследования показали, что в условиях низкой липидной нагрузки не обнаружено ни слияния везикул с образованием трансэндотелиальных каналов, ни одной почки или микровезикулы, содержащей электронно-плотные частицы. Напротив, хиломикроны выявлялись в просвете щели адгезионных соединений эндотелиальных клеток черепицеобразной формы. Наши данные подтверждают исследования, показывающие накопление хиломикронов в интерстиции кишечной ворсинки после воздействия высоких концентраций VEGF-A, приводящих к увеличению плотных соединений между эндотелиоцитами [205]. Таким образом, вероятнее всего, кавеолы не играют значительной роли в трансцитозе макромолекул через эндотелий (по крайней мере хиломикронов, в условиях, исключающих высокую липидную нагрузку) лимфатического капилляра.

Кроме кавеол [26, 117] в цитоплазме ЭК лимфатического капилляра описаны окаймленные клатрином почки [175]. В наших исследованиях

окаймленные клатрином почки содержали вещество средней электронной плотности, вероятнее всего липопротеиды низкой плотности. Наши предположения подтверждают данные о возможности небольшой части частиц липопротеидов низкой плотности (около 20 %) связываться с клатрин-окаймленными ямками, транспортироваться в эндосомы и достигать лизосом или попадать в просвет лимфатического капилляра [175].

Таким образом, наши исследования показали, что проницаемость макромолекул через эндотелий лимфатического капилляра обеспечивается особой организацией межклеточных контактов эндотелиальных клеток. Трансцитоз макромолекул липофильной природы диаметром 30-100 нм маловероятен.

Гипотеза механизма резорбции макромолекул из перилимфатического интерстициального пространства в лимфатический капилляр

Наши исследования позволили дополнить гипотезу механизма резорбции макромолекул из перилимфатического пространства в лимфатический капилляр, предложенную Р. Baluk (2007) [58]. Известно, что одним из основных механизмов резорбции интерстициальной жидкости и взвешенных в ней «частиц» в большинстве органов и тканей является периодическое изменение гидростатического давления в интерстиции вследствие его сжатия и расширения, чему способствует ряд различных факторов [25].

На серийных срезах кишечной ворсинки, полученных на микроскопе со встроенным ультратомом, обнаружены в собственной пластинке кишечной ворсинки вокруг лимфатического капилляра группы спирально расположенных веретеновидных гладкомышечных клеток, к которым подходит нервное окончание. Гладкомышечные клетки лежат на сплошной базальной мембране и связаны между собой щелевыми соединениями.

Вероятнее всего, сокращение гладких миоцитов, находящихся под контролем нервной системы, является одним из механизмов изменения

гидростатического давления в перилимфатическом интерстициальном пространстве и в просвете ЛК.

Кроме того, в интерстиции вокруг лимфатического капилляра лежат многочисленными лимфоциты, дендритные и другие клетки. Такое «плотное» микроокружение, видимо, также не случайно и, вероятно, играет важную роль, помогая фиксировать изменения давления жидкости в просвете капилляра и в перилимфатическом интерстициальном пространстве.

При исчезновении внешнего давления структура органа или ткани принимает первоначальную форму, и просвет лимфатического капилляра увеличивается, т.к. эндотелиальные клетки фиксированы якорными филаментами к волокнам интерстиция.

Давление в просвете лимфатического капилляра падает, и интерстициальная жидкость давит на стенку капилляра, что приводит к «отклеиванию» точечного адгезивного соединения в зоне черепицеобразного контакта эндотелиоцитов. При этом, плоские выросты ЭК, налегающие на соседнюю клетку со стороны просвета, отгибаются, образуя косорасположенный и достаточно широкий канал, через который интерстициальная жидкость и макромолекулы попадают в просвет лимфатического капилляра. Точечное адгезивное соединение не позволяет люминальным выростам эндотелиальных клеток отворачиваться, и они позже возвращаются в исходное положение.

После того, как орган или ткань снова сдавливается, давление внутри просвета лимфатического капилляра быстро повышается, и лимфа продвигается проксимально в посткапилляр. Восстанавливается связь между белками LYVE-1 и PECAM, формируя точку адгезии. Интрамуральные клапаны закрываются и не позволяют лимфе вытекать из лимфатического капилляра обратно в интерстиций.

Если принять наличие в лимфатическом капилляре двух клапанных систем (один в стенке, другой – на границе с посткапилляром), односторонний транспорт в начальном отделе лимфоносных сосудов можно описать следующим образом.

Во время расширения начального отдела лимфатического капилляра, его просвет заполняется интерстициальной жидкостью. В этот период внутристеночные клапаны должны быть открыты, а внутрипросветные, на границе лимфатического капилляра и посткапилляра, закрыты, чтобы предотвратить перетекание лимфы проксимально. Во время сжатия лимфатического капилляра внутристеночные клапаны должны быть закрыты, чтобы предотвратить выход лимфы обратно в интерстиций, в то время как внутрипросветные клапаны открыты. Далее лимфа будет транспортироваться в проксимальном направлении к сосудам, обладающим сократительной активностью и лимфатическим узлам.

Таким образом, ключевой особенностью строения эндотелия лимфатического капилляра кишечной ворсинки являются «синусоидные» межклеточные соединения, аналогичные описанным в стенке трахеи [58]. Якорные филаменты, фиксирующие стенку лимфатического капилляра к волокнам интерстиция, формируют вместе с «синусоидным» соединением структуру способную функционировать как клапан, обеспечивающий односторонний ток жидкости. Функционально такой клапан дополняется микроокружением лимфатического капилляра.

Хиломикроны диаметром 30-100 нм транспортируются по «синусоидным» контактам» в процессе образования лимфы. Трансцитоз макромолекул в условиях, аналогичных описанным, имеет низкую вероятность, что доказывается отсутствием хиломикронов в клатриновых и кавеолин-зависимых почках и везикулах и в редко встречающихся трансэндотелиальных каналах и низкой секреторной активностью комплекса Гольджи, которая не увеличивается после липидной нагрузки. Наличие «внутристеночных клапанов» в лимфатическом капилляре и внутрипросветных на границе с посткапилляром уменьшает роль давления лимфы в просвете лимфатического капилляра. При этом важно временное падение давления внутри капилляра ниже давления интерстициальной жидкости.

Можно предположить, что к нарушению процесса реабсорбции интерстициальной жидкости и макромолекул в просвет капилляра могут привести целый комплекс нарушений как молекулярных межклеточных взаимодействий, так и структурных - кишечной ворсинки (в том числе лимфатического капилляра). Эти нарушения, в свою очередь, могут привести к развитию ряда патологий, в том числе желудочно-кишечного тракта, ожирения и других [51]. Это предположение подтверждается и другими, пока немногочисленными, исследованиями.

Так, например, показано, что точечные адгезионные соединения, необходимые при поглощении интерстициальной жидкости и для правильной работы «синусоидного» контакта, теряются у мышей при воспалении тонкой кишки [159], что препятствует эффективному дренированию и уменьшению воспаления. Застой лимфы может вызвать адипогенный эффект и в перспективе висцеральное ожирение [159].

Напротив, увеличение уровня VEGF-A приводит к образованию плотных соединений между эндотелиальными клетками лимфатического капилляра тонкой кишки и нарушению всасывания хиломикронов [181]. Этот эффект можно использовать для создания мышей, устойчивых к ожирению и в перспективе для лечения ожирения.

Функциональные особенности эндотелия краевого синуса лимфатического узла

Лимфатические сосуды морфологически и функционально тесно связаны с лимфатическими узлами [36]. Так как образование лимфы не требует участия рецепторов и большинство попадающего в лимфатический капилляр материала – чужеродные молекулы (от разрушенных клеток и тканей до опухолевых клеток и микроорганизмов), необходимы структуры и механизм, обеспечивающий сортировку антигенов для оптимального иммунного ответа [187]. Показано, что эндотелий краевого синуса может быстро и эффективно транцитировать множество эндогенных и экзогенных грузов из полости синуса в паренхиму узла,

причем, как минимум на 10 часов раньше, чем антиген-нагруженные дендритные клетки попадут в лимфатический узел [157].

Молекулярные и клеточные механизмы транспорта через эндотелий синусов лимфатических узлов начали активно изучаться [45, 133, 177]. Показана миграция дендритных клеток через эндотелий подкапсулярного синуса в паренхиму узла [33, 45]. Активно изучается роль эндотелия краевого синуса в распространении опухолевых клеток [190]. Доказано, что эндотелий синусов узла может напрямую представлять антигены иммунным клеткам [202] и косвенно модулировать функции дендритных клеток и Т-лимфоцитов.

Таким образом, эндотелий краевого синуса должен обладать достаточно высокой проницаемостью, как для молекул, так и для клеток.

Анализ ультраструктуры подкапсулярного или краевого синуса верхнего брыжеечного лимфатического узла подтвердил морфологические различия между эндотелием синуса, прилежащим к подкапсулярному пространству и трабекулам узла, и клетками, обращенными к корковому веществу (паренхиме) узла, определяющие разную проницаемость эндотелиального пласта синуса.

В первую очередь проницаемость эндотелиального пласта определяет базальная мембрана, прохождение через которую потребует участия дендритных клеток или иного механизма. Она хорошо выражена на «париетальной стенке» синуса и отсутствует на «висцеральной».

Эндотелий «париетальной стенки» уплощен и формирует большое количество соединений стыковой формы, укрепленных плотными контактами. Похожее строение соединений наблюдается на свободном крае створки клапана грудного протока, кроме того, что там отсутствует базальная мембрана.

Монослой эндотелиоцитов краевого синуса, обращенный к корковому веществу узла, служит своеобразным фильтром для прохождения молекул и клеток в паренхиму и из нее, а также для удаления воды. Необходимость в более высокой проницаемости слоя объясняет отсутствие базальной мембраны. Кроме того, в пласте практически нет плотных контактов. Чаще всего регистрируются черепицеобразные формы простых соединений, а также простые пальцевидные.

При этом точечных адгезивных соединений, а также особым образом расположенных плотных контактов (подобно «синусоидным» соединениям лимфатического капилляра) нами обнаружено не было.

Строение межклеточных соединений в эндотелиальном монослое «париетальной» и «висцеральной стенки» краевого синуса, а также наличие базальной мембраны на «париетальной» поверхности стенки синуса указывает на разную проницаемость эндотелия в синусе, что обусловлено их разной функциональной ролью.

Если эндотелий «париетальной стенки» имеет плоскую форму, то высота клеток «висцеральной стенки» краевого синуса увеличивается. Уплощенная форма определяет расположение органелл, которые концентрируются вокруг ядра. Существенных различий в строении и расположении органелл в клетках синуса не регистрируется, в том числе и в строении органелл секреторного пути.

Структура комплекса Гольджи не имеет значимых особенностей строения по сравнению с органеллой в эндотелии лимфатического капилляра и грудного протока. Компактная стопка, отсутствие тубулярных соединений между цистернами, редуцированный везикулярный компонент, структура цис- и транс-сетей указывают на низкую секреторную активность органеллы, которая не меняется и во время транспорта липидов. Не выявлена разница в строении эндотелия «париетальной» и «висцеральной стенки» синуса, несмотря на то, что «париетальные» эндотелиоциты лежат на базальной мембране, компоненты которой секретируются комплексом Гольджи.

Есть данные о том, что эндотелий синусов лимфатических узлов обладает высокой фагоцитарной и эндоцитозной способностью, что позволяет синусу эффективно отбирать образцы экзогенных антигенов [164, 202]. При этом доставка антигена или лекарственного препарата к лимфатическому узлу может быть реализована непосредственно по лимфоносным путям прямым поглощением антигена эндотелиальными клетками или опосредованно с помощью мигрирующих в узел иммунных клеток [177]. В нашей модели в качестве маркерной частицы использовались хиломикроны, диаметром в среднем 30-100

нм. Они доставлялись к лимфатическому узлу в составе афферентной лимфы. Нами было показано, что поступление в краевой синус лимфы богатой липидами активировало миграцию макрофагов из паренхимы узла через эндотелиальный слой, которые проявляли высокую фагоцитарную активность и поглощали хиломикроны из полости синуса. Напротив, у голодных животных в краевом синусе верхнего брыжеечного лимфатического узла встречаются лишь единичные макрофаги. Кроме того, многочисленные макрофаги синусов ЛУ могут формировать своеобразный сложно устроенный фильтр, через который проходит и фильтруется лимфа [38].

Роль фагоцитарной активности макрофагов по отношению к хиломикронам еще предстоит изучить. Однако использование липофильных молекулярных конструкций в качестве носителя терапевтической молекулы может помочь решить проблему низкого терапевтического эффекта лекарственного препарата при его доставке в узел из-за его слабого взаимодействия с клетками узла [49].

Анализ ультратонких изображений стенки краевого синуса не выявил липиды ни в зоне соединений смежных клеток, ни в цитоплазме эндотелиоцитов. Так же, как и в лимфатическом капилляре, эндотелиальные клетки синуса лимфатического узла имеют немногочисленные плазмолеммальные везикулы и почки, локализующиеся, в своем большинстве, на апикальной части плазмолеммы. Трансэндотелиальных каналов в эндотелиальных клетках как «париетальной стенки» синуса, так и «висцеральной» не обнаружено. Ни один из немногочисленных везикулярных мембранных профилей не содержал хиломикроны.

Таким образом, транцитоз хиломикронов через эндотелий краевого синуса, в условиях, исключающих высокую липидную нагрузку, так же, как и в лимфатическом капилляре, маловероятен. Хиломикроны диаметром 30-100 нм поглощаются макрофагами и, возможно, могут фагоцитироваться другими иммунными клетками.

Функциональные особенности строения эндотелия грудного протока

Грудной проток представляет собой лимфатический сосуд, по которому лимфа из двух третей тела человека направляется в венозное русло [9]. Было показано, что лимфа грудного протока после кормления кроликов кукурузным маслом содержит хиломикроны диаметром от 960 А до 1435 А [83].

Грудной проток мы выбрали в качестве модельного объекта, обладающего условно непроницаемым эндотелиальным пластом для макромолекул. Между тем, эндотелиальный монослой грудного протока неоднороден, что связано с сегментарным строением сосуда, наличием клапанов, ограничивающих межклапанный сегмент, а также сократительной активностью лимфангиона [22]. Поэтому в грудном протоке можно выделить две функционально различные зоны эндотелия: на створке клапана и в межклапанном сегменте [7]. Кроме того, известно, что эндотелий межклапанного сегмента и створки клапана формируется в эмбриогенезе под действием различных молекулярных стимулов [107], а также показано, что мутация или потеря α -интегрина, эфрина-Б2 и некоторых других белков ведет к дефекту створки клапана без видимых изменений строения межклапанного сегмента [107, 155]. Поэтому эндотелий межклапанного сегмента и створки клапана может представлять разные субпопуляции клеток, имеющие особенности строения.

Эндотелий грудного протока находится в разных условиях функционирования. Лимфангион обладает сократительной активностью, поэтому на эндотелиальный монослой межклапанного сегмента действуют силы растяжения и сжатия [22]. Поэтому ЭК межклапанного сегмента сильно уплощены, имеют редуцированный микрорельеф и умеренно вытянуты вдоль оси сосуда. В этой зоне самая низкая средняя высота клетки в области ядра. Большинство клеток связаны между собой адгезионными соединениями черепицеобразной формы, укрепленными плотным контактом, встречаются десмосомы. Сложные пальцевидные и простые стыковые формы соединений встречаются не часто, не более, чем в 5 % случаев.

Согласно закону равновестного распределения двумерного пространства, открытому Льюисом в тридцатых годах двадцатого века, эндотелиальный монослой наиболее стабилен при максимальной упаковке клеток в пласте, которая достигается при гексагональной симметрии [30, 32]. Отсюда, одним из параметров тканевой организации эндотелиального монослоя выступает степень связности клеток в пласте, т.е. среднее количество смежных клеток отдельно взятого эндотелиоцита. Мы решили использовать этот показатель для описания тканевой организации эндотелиоцитов в пласте и в качестве дополнительной количественной оценки гетероморфности монослоя [30].

Мы предположили, что анализ упаковки клеток в пласте позволит найти отличия между эндотелием межклапанного сегмента и створки клапана.

Исследования показали, что в межклапанном сегменте полиморфизм клеток низкий, а средняя степень связности близка к шести, т.е. большинство клеток представлены топологическими гексагонами. Таким образом, эндотелиальный пласт межклапанного сегмента имеет высокую упорядоченность клеток в пласте, что позволяет предположить высокую степень реализации барьерной функции [30].

При сокращении лимфангиона скорость лимфы на центральной поверхности створки возрастает, однако «напряжение сдвига» также останется низким, по сравнению с эндотелием кровеносных сосудов [25]. Поэтому монослой этой области похож по форме и размерам клеток на монослой межклапанного сегмента. Не имеет статистических различий и показатель средней связности клеток в пласте, а также дисперсия средней степени связности. Как в межклапанном сегменте, так и на центральной поверхности створки большинство клеток представлены топологическими гексагонами и контактируют в среднем с шестью соседними клетками. Коэффициент вариации небольшой, т.е. наблюдается невысокий гетероморфизм клеток эндотелиального монослоя. Между тем, клетки незначительно, но больше вытянуты в длину, в 2 раза чаще встречаются сложные пальцевидные формы контактов, увеличивается длина контактирующих поверхностей.

На синусной поверхности створки клапана сокращение лимфангиона способствует формированию турбулентного тока лимфы. Монослой этой зоны отличается высоким гетероморфизмом формы клеток. В результате чего мы наблюдаем уменьшение средней длины клеток, почти в 2 раза по сравнению с межклапанным сегментом, и увеличение ширины эндотелиоцитов. Клетки неправильной полигональной формы, о чем говорит также коэффициент вытянутости, который почти в 2 раза меньше, чем у клеток межклапанного сегмента и центральной поверхности створки клапана. Форма контактных поверхностей между смежными клетками в этой области тоже разнообразная: уменьшается количество черепицеобразных, увеличивается - простых и сложных пальцевидных соединений. Длина контактирующих поверхностей несколько уменьшается по сравнению с межклапанным сегментом и створками клапанов. Плотные контакты встречаются крайне редко.

Анализ тканевой организации эндотелиального пласта показал незначительное снижение упорядоченности клеток в пласте, по сравнению с межклапанным сегментом и центральной поверхностью створки клапана. Средняя степень связности клеток в пласте статистически не меняется, однако увеличивается дисперсия и коэффициент вариации, что подтверждает данные СЭМ о высоком гетероморфизме клеток в пласте. Так, на синусной поверхности створки по сравнению с межклапанным сегментом увеличивается количество клеток в монослое, имеющих пять и семь «соседей». Наши данные подтверждают более ранние исследования, показавшие увеличение гетероморфизма клеток в пласте в местах турбулентного тока лимфы (область клапанов, места деления потока) [2].

В кровеносных сосудах было показано, что зоны слияния и разделения сосудов имеют высокий гетероморфизм эндотелиального монослоя и высокую проницаемость пласта, что приводит, в частности, к накоплению липидов в интима артерий [27]. Особенности строения и тканевой организации позволяют, с высокой степенью вероятности, утверждать о потенциально более высокой проницаемости эндотелиального пласта синусной поверхности створки клапана.

Наконец, монослой свободного края створки сильно отличается от изучаемых нами зон стенки грудного протока. Створка грудного протока сложной формы и часто формирует брыжейко-подобную складку [2]. Поэтому на свободном крае клетки сильно вытянуты, что объясняется не только скоростью лимфы, но и формой клапана. Тем не менее, средняя высота клеток относительно большая, за счет сильно выбухающих ядерных зон, расположенных ближе к основанию створки клапана. Клетки соединяются преимущественно стыковыми соединениями, укрепленными плотными контактами. По этой причине длина контактирующих поверхностей минимальна, относительно других исследуемых зон стенки сосуда.

Таким образом, анализ межэндотелиальных контактов и упаковки клеток в пласте, а также наличие хорошо выраженной базальной мембраны в межклапанном сегменте сосуда, и встречаемость плотных контактов доказывают разную проницаемость эндотелиального монослоя в межклапанном сегменте и створки клапана. Вероятнее всего, эндотелиальный монослой синусной поверхности створки больше проницаем, чем эндотелий межклапанного сегмента и центральной поверхности створки.

Анализ ультраструктуры эндотелиоцитов в разных функциональных зонах грудного протока не выявил существенных особенностей строения. ЭК имеют низкую синтетическую и транспортную активность, что подтверждает анализ ультраструктуры комплекса Гольджи.

Органелла имеет компактную стопку, а число цистерн в стопке достоверно не отличается от данного показателя в эндотелии лимфатического капилляра и краевого синуса лимфатического узла. Цистерны узкие, их периферическая зона имеет незначительное увеличение ширины, соответствующее диаметку COP-I везикулы. Низкое содержание в комплексе Гольджи тубулярных структур, отсутствие соединений между стопками, редуцированные цис- и транс- сети говорят о низкой синтетической активности органеллы в эндотелии грудного протока. Со стопкой ассоциированы COP-I везикулы. Их соотношение к

мембранным профилям также говорит о низкой транспортной функции органеллы.

Таким образом, несмотря на данные о секреторной активности эндотелия, который синтезирует компоненты базальной мембраны (фибронектин, проколлаген III, проколлаген IV, коллаген VII) [5, 59], белки внеклеточного матрикса (протеогликан гепарансульфата, ламинин, интегрины, фибрилин) [39], антитромботические белки [39] и другие, тем не менее, ультраструктурный анализ указывает на низкую секреторную активность органеллы в нормальных условиях. Кроме того, мы также не наблюдаем транспорт коллагена через стопку комплекса Гольджи эндотелиальных клеток. Наши наблюдения подтверждаются данными авторов, доказывающих, что синтез компонентов базальной мембраны минимален у взрослых организмов, а увеличение секреторной активности клеток можно наблюдать в условиях регенерации лимфатического сосуда [29, 31].

Активный трансцитоз также невозможен при «спящем» комплексе Гольджи, так как органелла обеспечивает также доставку мембран на апикальную часть плазмолеммы клетки [63].

Нам не удалось статистически проанализировать количественные изменения плазмолеммальных везикул, что требует большого количества серийных срезов, т.к. зачастую округлое образование на электронограмме может быть срезом тубулярной структуры. Однако в немногочисленных кавеолах мы не выявили какого-либо электронно-плотного вещества. Не были обнаружены также в эндотелии грудного протока трансэндотелиальные каналы. Редко встречались мультивезикулярные тельца, также не имеющие электронно-плотного содержимого. При этом вызывает интерес факт расположения кавеол в зонах сложных пальцевидных соединений. Похожая закономерность отмечается и в эндотелии лимфатических узлов. Мы предполагаем, что кавеолы могут использоваться клеткой в качестве резервуара мембраны при ее возможных структурных перестройках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследования, проведенные на модельных объектах комплексом методов электронной микроскопии, в том числе высокого разрешения, детализировали функциональную морфологию эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока. Эндотелий, выбранных для модельных объектов (лимфатический капилляр кишечной ворсинки крысы, краевой синус верхнего брыжеечного лимфатического узла крысы и грудной проток кролика) имеет единый источник происхождения [66, 152], но входит в органы разных систем, значительно отличающихся по функциям. Существенной функциональной особенностью эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока является разная проницаемость макромолекул через эндотелиальный пласт.

Эндотелий лимфатического капилляра хорошо проницаем для макромолекул и частиц. Мы не нашли в лимфатическом капилляре кишечной ворсинки крысы открытых соединений, существование которых продолжает обсуждаться. При этом было выявлено закономерное расположение плотных контактов и точечных адгезивных соединений на протяжении черепицеобразного межэндотелиального соединения, что соответствует описанию «синусоидного» контакта, который показал Р. Baluk (2007) в эндотелии лимфатического капилляра трахеи [58]. Такое соединение вместе с якорными филаментами, фиксирующими плазмолемму подлежащей клетки к волокнам интерстиция, работает как внутристеночный клапан.

Эндотелий краевого синуса лимфатического узла имеет две фенотипические формы клеток, которые формируют монослой с разной проницаемостью. Эндотелий «париетальной стенки» лежит на хорошо сформированной базальной мембране, межклеточные соединения укреплены плотным контактом. Эндотелий «висцеральной стенки» не имеет базальной мембраны, плотные контакты встречаются редко.

Монослой эндотелия грудного протока имеет минимальную проницаемость по сравнению с эндотелиальным пластом краевого синуса и лимфатического капилляра. Эндотелий межклапанного сегмента имеет фенотип близкий к фенотипу эндотелия «париетальной стенки» краевого синуса. Монослой сформирован однородными по форме и размерам, плотно расположенными в пласте и связанными между собой плотными контактами клетками, лежащими на базальной мембране.

Такой эндотелиальный пласт более чувствителен к внешним стимулам, быстро вовлекается в регенерацию [31] и лимфоангиогенез [77]. Эндотелиальный монослой синусной поверхности створки похож по фенотипу на эндотелий «висцеральной» поверхности краевого синуса лимфатического узла и, отчасти, на эндотелий лимфатического капилляра. Субпопуляции эндотелиоцитов краевого синуса лимфатического узла и створок клапана лимфатических сосудов, вероятно, имеют генетическое родство. Так, мутация эфрина-Б2 вызывает увеличение открытых соединений и проницаемости эндотелиального пласта в синусах узлов и створках клапанов сосудов и не оказывает влияние на монослой межклапанного сегмента лимфатических сосудов [109, 146]. Кроме того, мутация этого белка в эмбриональный период приводит к дефекту створки клапана [107].

Конфигурация щели межклеточных соединений в большей степени формируется под действием внешних факторов, в частности лимфодинамики. Общей характеристикой эндотелия лимфатического капилляра, краевого синуса лимфатического узла и лимфатического протока является низкая секреторная активность комплекса Гольджи.

В условиях, исключаящих высокую липидную нагрузку, транцитоз хиломикронов диаметром 30-100 нм не обнаружен во всех изучаемых объектах. В цитоплазме эндотелиоцитов не выявлены трансэндотелиальные каналы и фенестры. Кавеолы не имели электронно-плотного содержимого, в том числе после липидной нагрузки. Хиломикроны из краевого синуса лимфатического узла активно поглощались макрофагами. Эти данные подтверждают перспективность идеи об использовании хиломикрона в качестве носителя терапевтической

молекулы. Такой носитель, вероятнее всего, минимизирует токсичность и облегчит контролируемое высвобождение вещества в нужной клетке или области тела.

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 капсуле лимфатического узла, лежат на базальной мембране 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 транцитоза 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 ОТОВО, 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БМ-базальная мембрана
- ГМК – гладкомышечная клетка
- ГП-грудной проток
- КГ – комплекс Гольджи
- КК – кровеносный капилляр
- ЛК – лимфатический капилляр
- ЛС – лимфатический сосуд
- ЛУ – лимфатический узел
- ПМ – плазматическая мембрана, плазмолемма
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
- ХМ – хиломикрон
- ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум
- АЭР – агранулярный эндоплазматический ретикулум
- ЭК – эндотелиальная клетка
- ЭН-энтероцит
- ЭР – эндоплазматический ретикулум, эндоплазматическая сеть
- LYVE1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) – эндотелиальный рецептор гиалуронана лимфатического сосуда
- PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1/CD31) – гликопротеин
- VVOs-везикуло-вакуолярные органеллы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банин, В. В. Механизмы обмена внутренней среды / В. В. Банин. – М. : РГМУ, 2000. – 276 с.
2. Банных, С. И. Клапанный аппарат и тканевая организация эндотелия грудного протока / С. И. Банных, И. С. Сесорова, А. А. Миронов (мл.) [и др.] // Морфология. – 1996. – Т. 109, № 1. – С. 40–50.
3. Бородин, Ю. И. Лимфатический узел при циркуляторных нарушениях / Ю. И. Бородин, В. Н. Григорьев. – Новосибирск : Наука, 1986. – 302 с.
4. Бородин, Ю. И. Функциональная анатомия лимфатического узла / Ю. И. Бородин, М. Р. Сапин, Л. Е. Этинген, В. Н. Григорьев, В. А. Труфакин, Д. Шмерлинг. – Новосибирск : Наука : Сиб. отд-ние, 1992. – 257 с.
5. Бородин, Ю. И. Эндотелиальные маркеры ангиогенеза кровеносных и лимфатических сосудов / Ю. И. Бородин, В. В. Асташов, П. М. Ларионов, Е. В. Старкова, М. Б. Васильева // Лимфология / В. И. Коненков [и др.]. – Новосибирск: Издательский дом Манускрипт, 2008. – Гл. 3,10. – С. 197–204.
6. Выренков, Ю. Е. Микрорельеф сосудов гемо- и лимфомикро-циркуляторного русла сердца / Ю. Е. Выренков, В. К. Шишло, В. Д. Мишалов, М. А. Беклемишев // Морфология. – 1996. – № 1. – С. 26–31.
7. Выренков, Ю. Е. Микрорельеф внутренней поверхности грудного протока собак / Ю. Е. Выренков, В. К. Шишло, А. А. Миронов, В. А. Миронов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1988. – Т. 95, № 9. – С. 31–35.
8. Выренков, Ю. Е. Особенности строения лимфатического посткапилляра / Ю. Е. Выренков, Н. А. Калашникова, А. Ю. Харитонов // Вестник лимфологии. – 2008. – № 1. – С. 17–22.
9. Жданов, Д. А. Общая анатомия и физиология лимфатической системы / Д. А. Жданов. – Л. : Медгиз, 1952. – 336 с.
10. Жданов, Д. А. Сравнительное электронно-микроскопическое исследование строения стенок кровеносных и лимфатических капилляров / Д. А. Жданов, В. А. Шахламов // Архив анатомии. – 1964. – Т. 75, № 10. – С. 13–18.

11. Карелина, Н. Р. Морфогенез, микроскопическая анатомия и ультраструктура ворсинок тощей кишки (экспериментально-морфологическое исследование) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.02 / Н. Р. Карелина. – М., 1994. – 39 с.
12. Карелина, Н. Р. Топографические особенности организации лимфатических капилляров и резорбция липидов в ворсинке тощей кишки белой крысы / Н. Р. Карелина, В. В. Камышова, В. В. Банин // Морфология. - 1984. - Т. 87, № 11. - С. 53-61.
13. Комиссарчик, Я. Ю. Электронная микроскопия клеток и тканей / Я. Ю. Комиссарчик, А. А. Миронов. – Л. : Наука, 1990. – 143 с.
14. Коненков, В. И. Лимфология / В. И. Коненков, Ю. И. Бородин, М. С. Любарский. – Новосибирск : Издательский дом Манускрипт, 2012. – 1179 с.
15. Кузник, Б. И. Семейство молекул JAM и их роль в регуляции физиологических и патологических процессов / Б. И. Кузник, Н. С. Линькова, Н. В. Колчина [и др.] // Успехи физиологических наук. –2016. – Т. 47, № 4. – с. 76–98.
16. Куприянов, В. В. Пути микроциркуляции / В. В. Куприянов. – Кишенев : Картя Молдовеняска. – 1969. – 260 с.
17. Куприянов, В. В. Структура и функция лимфатических посткапилляров (механизм сопряжения процессов интерстициального транспорта и лимфатической резорбции) / В. В. Куприянов, В. В. Банин, А. П. Король // Архив анатомии. – 1989. – Т. 96, № 6. – С. 31–49.
18. Лобов, Г. И. Активные и пассивные механические свойства стенки лимфангиона / Г. И. Лобов, Р. С. Орлов, М. А. Костикова // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 1989. – Т. 78. – С. 218–226.
19. Микролимфология / В. В. Куприянов [и др.]. – Москва : Медицина, 1983. – 288 с.
20. Миронов, А. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. / А. А. Миронов, Я. Ю. Комиссарчик, В. А. Миронов ; отв. ред. Н. Н. Никольский ; Рос. акад. наук, Ин-т цитологии. – СПб. : Наука, 1994. – 399 с.

21. Миронов, В. А. Клапанный аппарат и тканевая организация эндотелия грудного протока / В. А. Миронов, В. К. Шишло, С. И. Банных, И. С. Сесорова [и др.] // Морфология. - 1996. - № 1. - С. 40-50.
22. Орлов, Р. С. Лимфатические сосуды. Структура и механизмы сократительной активности / Р. С. Орлов, А. В. Борисов, Р. П. Борисова – Л. : Наука. – 1983. – 253 с.
23. Панченков, Р. Т. Эндолимфатическая антибиотикотерапия / Р. Т. Панченков, Ю. Е. Выренков, И. В. Ярема, Э. Г. Щербакова. - М. : Медицина, 1984. – 240 с.
24. Пестерева, Н. А. Ультраструктура лимфатических капилляров стенки тонкой кишки / Н. А. Пестерева // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1981. – Т. 81, № 7. – С. 35–41.
25. Петунов, С. Г. Регуляторные механизмы транспорта лимфы / С. Г. Петунов, Р. С. Орлов, А. И. Кривченко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2010. - Т. 9, № 3. - С. 4-14.
26. Повещенко, О. В. Эндотелиальные прогениторные клетки и неоваскулогенез / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // Лимфология / В. И. Коненков [и др.] – Новосибирск : Издательский дом Манускрипт, 2012. – Гл. 3,11. – С. 205–214.
27. Полищук, Р. С. Строение внутренней оболочки аорты человека в местах деления кровотока : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.00.23 / Р. С. Полищук. – М., 1994. – 18. с.
28. Развитие сосудистого эндотелия в раннем периоде эмбриогенеза млекопитающих / О. Ю. Гурина, Я. В. Гурин, Е. Р. Павлович [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 9. – С. 129-131.
29. Сесорова, И. С. Морфология эндотелия клапанного аппарата грудного протока / И. С. Сесорова, А. А. Миронов // Вестник лимфологии. – 2009. – № 2. – С. 17–19.
30. Сесорова, И. С. Морфофункциональные особенности регенерации эндотелия грудного протока (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.03.04 / И. С. Сесорова. – М., 1995. – 35 с.

31. Сесорова, И. С. Оценка состояния эндотелиального монослоя после реэндотелизации участка криоповреждения грудного протока / И. С. Сесорова, Т. В. Лазоренко // Морфология. – 2009. – Т. 136, № 6. – С. 57–61.
32. Смолянинов В. В. Математические модели биологических тканей / В. В. Смолянинов. – М. : Наука. 1980. 360 с.
33. Талаев, В. Ю. Исследование миграции дендритных клеток и трафика антигенов в целях совершенствования средств иммунопрофилактики / В. Ю. Талаев, М. В. Плеханова // МедиАль. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 154–171.
34. Ультраструктурные основы процесса образования лимфы / Н. Р. Карелина, И. С. Сесорова, Г. В. Безнусенко [и др.] // Морфология. – 2017. – Т. 151, № 2. – С. 7–19.
35. Шахламов, В. А. Капилляры / В. А. Шахламов. - Москва : Медицина, 1971. - 200 с.
36. Шахламов, В. А. Очерки по ультраструктурной организации лимфатической системы / В. А. Шахламов, А. П. Цамерян. – Новосибирск : Наука, 1982. - 120 с.
37. Шишло, В. К. Филогенез и онтогенез лимфатической системы / В. К. Шишло, И. С. Сесорова, А. А. Миронов // Вестник лимфологии. - 2013. - С. 410-417.
38. Шишло, В. К. Лимфо- и гемомикроциркуляторное русло лимфатического узла по данным сканирующей электронной микроскопии / В. К. Шишло, А. А. Миронов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – Т. 99, № 11. – С. 35–43.
39. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules / A. Aspelund, S. Antila, S. T. Proulx [et al.]. – DOI: 10.1084/jem.20142290 // J. Experimental Medicine. – 2015. – Vol. 212, № 7. – P. 991–999.
40. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema / M. J. Karkkainen [et al.] // Proceeding of. National Academy of Sciences. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 12677–12682.

41. A non-invasive method to assess environmental contamination with avian pathogens: beak and feather disease virus (BFDV) detection in nest boxes / J. M. Martens, H. S. Stokes, M. L. Berg [et al.]. – DOI: 10.7717/peerj.9211 // *Magrath Peer Journal*. – 2020. – Vol. 4. – P. 1–20.
42. Abéngozar, M. A. Blocking ephrinB2 with highly specific antibodies inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor growth / M. A. Abéngozar, S. de Frutos, S. Ferreiro [et al.]. – DOI: 10.1182/blood-2011-09-380006 // *Journal Blood*. – 2012. – Vol. 119, № 19. – P. 4565–4576.
43. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin / P. De. Togni, J. Goellner, N. H. Ruddle [et al.]. – DOI: 10.1126/science.8171322 // *Science*. – 1994. – Vol. 264, № 5159. – P. 703–707.
44. Adamo, L. AICAR activates the pluripotency transcriptional network in embryonic stem cells and induces KLF4 and KLF2 expression in fibroblasts / L. Adamo, Y. Zhang, G. García-Cardena. – DOI: 10.1186/1471-2210-9-2 // *BMC Pharmacology*. – 2009. – Vol. 9, № 2. – P. 1–7.
45. Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration / A. Braun, T. Worbs, G.L. Moschovakis [et al.]. – DOI: 10.1038/ni.2085 // *Natural Immunology*. – 2011. – Vol. 12, № 9. – P. 879–887.
46. Alessio, S. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease / S. Alessio, C. Correale, C. Tacconi [et al.]. – DOI: 10.1172/JCI72189 // *J. Clinical Investigations*. – 2014. – Vol. 124, № 9. – P. 3863–3878.
47. Alitalo, K. Lymphangiogenesis in development and human disease. / K. Alitalo, T. Tammela, T. V. Petrova // *Nature*. – 2005. – Vol. 438, № 7070. – P. 946–953.
48. Alitalo, K. The lymphatic vasculature in disease. / K. Alitalo. – DOI: 10.1038/nm.2545 // *Natural Medicine*. – 2011. – Vol. 17, № 11. – P. 1371–1380.
49. Andorko, J. Harnessing biomaterials to engineer the lymph node microenvironment for immunity or tolerance / J. Andorko, K. Hess, C. Jewell // *AAPS J. American Academy of Pediatrics*. – 2014. – Vol. 17. – P. 323–338.

50. Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries: Population as a Specific Marker for Lymphatic Endothelium / S. Breitender-Geleff, A. Soleiman, H. Kawalski [et al.]. – DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65285-6 // American Journal of Pathology. – 1999. – Vol. 154. – P. 385–394.
51. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity / M. Sawane, K. Kajiya, H. Kidoya [et al.]. – DOI: 10.2337/db12-0604 // Diabetes. – 2013. – Vol. 62. – P. 1970–1980.
52. Arterial identity of endothelial cells is controlled by local cues / K. Othman-Hassan, K. Patel, M. Papoutsis [et al.]. – DOI: 10.1006/dbio.2001.0383 // Development Biology. – 2008. – Vol. 237, № 2. – P. 398–409.
53. Alieva, I.B. Role of microtubule cytoskeleton in regulation of endothelial barrier function / I. B. Alieva // Biochemistry (Mosc). – 2014. – Vol. 79, № 9. – P. 964–975.
54. Attili-Qadri, S. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption / S. Attili-Qadri, N. Karra, A. Nemirovski [et al.] // Proceedings of National Academy of Sciences of USA. – 2013. – Vol. 110, № 43. – P. 17498–17503.
55. Azzali, G. The lymphatic vessels and the so-called "lymphatic stomata" of the diaphragm: a morphologic ultrastructural and three-dimensional study / G. Azzali // Microvascular Researches. – 1999. – Vol. 57, № 1. – P. 30–43.
56. Azzali, G. Ultrastructure of absorbing peripheral lymphatic vessel (ALPA) in guinea pig Peyer's patches / G. Azzali, M. Vitale, M. L. Arcari // Microvascular Researches. – 2002. – Vol. 64, № 2. – P. 289–301.
57. Azzali, G. Ultrastructure of small intestine submucosal and serosal-muscular lymphatic vessels / G. Azzali // Lymphology. – 1982. – Vol. 15. – P. 101–106.
58. Baluk, P. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels / P. Baluk, J. Fuxe, H. Hashizume [et al.] // J. Experimental Medicine. – 2007. – Vol. 204, № 10. – P. 2349–2362.

59. Bannich, S. I. Regeneration of the endothelium of thoracic duct / S. I. Bannich, G. N. Bannich, A. A. Mironov, I. S. Sesorova // *Microscopia Electronica*. –1993. – Vol. 14, № 2 (Supp. 1). – P. 199–200.
60. Bazzoni, G. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis / G. Bazzoni, E. Dejana. - DOI: 10.1152/physrev.00035.2003 // *Physiological reviews*. –2004. – Vol. 84. – P. 869–901.
61. Bélisle, C. Topography of the deep cortex of the lymph nodes of various mammalian species / C. Bélisle, G. Sainte-Marie // *The Anatomical Records*. – 1981. – Vol. 201, № 3. – P. 553–561.
62. Betterman, K. L. Atypical cadherin FAT4 orchestrates lymphatic endothelial cell polarity in response to flow / K. L. Betterman, D. L. Sutton, G. A. Secker [et al.] // *J. Clinical Investigations*. – 2020. – Vol. 130, № 6. – P. 3315–3328.
63. Beznoussenko G. V. Transport of soluble proteins through the Golgi occurs by diffusion via continuities across cisternae / G. V. Beznoussenko, S. Parashuraman, R. Rizzo, R. Polishchuk [et al.] // *Life*. – 2014. - V. 27, № 3. – P. 1-27.
64. Blum, M. The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms / M. Blum, K. Feistel, T. Thumberger [et al.] // *Published by The Company of Biologists Ltd Development*. – 2014. – Vol. 141. – P. 1603-1613.
65. Bouveret, E. Bacterial interactomes: from interactions to networks / E. Bouveret, C. Brun // *Methods Molecular Bioljgy*. – 2012. – Vol. 804. – P. 15–33.
66. Bovay, E. Multiple roles of lymphatic vessels in peripheral lymph node development / E. Bovay, A. Sabine, B. Prat-Luri [et al.] // *J. Experimental Medicine*. – 2018. – Vol. 215, № 11. – P. 2760–2777.
67. Bundgaard, M. Extreme rarity of transendothelial channels in the frog mesenteric capillary / M. Bundgaard // *J. Physiology*. – 1979. – Vol. 291. – P. 38.
68. Bundgaard, M. Permeabilities of single arterioles and venules in the frog skin: A functional and morphological study / M. Bundgaard // *Microvascular Research*. – 1984. – Vol. 28, № 1. – P. 1–22.

69. Casley-Smith, J. R. The dimensions and numbers of small vesicles in cells, endothelial and mesothelial and the significance of these for endothelial permeability / J. R. Casley-Smith // *Chemistry Medicine Journal of microscopy*. – 1969.
70. Casley-Smith, J. R. The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics / J. R. Casley-Smith // *Lymphology*. – 1980. – Vol. 13. – P. 177–183.
71. Casley-Smith, J. R. The prelymphatic pathways of the brain as revealed by cervical lymphatic obstruction and the passage of particles / J. R. Casley-Smith, E. Földi-Börsök, M. Földi // *British Journal of experimental Pathology*. – 1976. – Vol. 57. - P. 179–188.
72. Casley-Smith, J. R. The structure and functioning of the blood vessels, interstitial tissue, and lymphatics / J. R. Casley-Smith // *Lymphangiology*. – Stuttgart : Schattauer Verlag, 1983. – P. 27.
73. Casley-Smith, J. R. The identification of chylomicra and lipoproteins in tissue sections and their passage into jejunal lacteals / J. R. Casley-Smith // *J. of Cell Biology*. – 1962. – Vol. 15. – P. 259–277.
74. Casley-Smith, J. R. Protein concentrations in regions with fenestrated and continuous capillaries, and in initial and collecting lymphatics / J. R. Casley-Smith, M. A. Sims // *Microvascular Researches*. – 1976. – Vol. 12. – P. 245–257.
75. Ccbe1 is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting / B. M. Hogan, F. L. Bos, J. Bussmann [et al.] // *Nature Genetic*. – 2009a. – Vol. 41, № 4. – P. 396-398.
76. CCR7 and IRF4-dependent dendritic cells regulate lymphatic collecting vessel permeability / S. Ivanov, J. P. Scallan, K. W. Kim [et al.]. - DOI: 10.1172/JCI84518 // *J. of Clinical Investigation*. – 2016. – Vol. 126, № 4. – P. 1581–1591.
77. Chang, L. Lymphangiogenesis new mechanisms / L. Chang, A. Kaipainen, J. Folkman // *Annals of New York Academy of Sciences*. – 2002. - № 979. – P. 111–119.
78. Changes in kidney tissue elements after ligation of the lymphatic vessels. Role of disorders of lymph outflow after kidney transplantation / A. A. Mironov, G. A.

- Eremin, V. A. Vasilenko [et al.] // *Arkives of Anatomy Gistology and Embriology*. – 1980. – Vol. 79, № 10. – P. 80-89.
79. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes / A. Wetterwald, W. Hoffstetter, M. G. Cecchini [et al.] // *Biology, Medicine Bone*. – 1996. – Vol. 18, № 2. – P. 125-132.
 80. Characterization of EN4 monoclonal antibody: a reagent with CD31 specificity / V. L. Burgio, S. Zupo, S. Roncella [et al.] // *Clinical Experimental Immunology*. – 1994. – Vol. 96, № 1. – P. 170–176.
 81. CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature / A. Louveau, J. Herz, M. N. Alme [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2018. – Vol. 21, № 10. – P. 1380–1391.
 82. Collan, Y. Topographic relations of lymphatic endothelial cells in the initial lymphatic of the intestine / Y. Collan, T. V. Kalima // *Lymphology*. – 1974. – Vol. 7. – P. 175–84.
 83. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels / M. Schmelz, R. Moll, C. Kuhn [et al.] // *J. Differentiation*. – 1994. – Vol. 57, № 2. – P. 97–117.
 84. Compton, C. C. Structure of the sinus-lining cells in the popliteal lymph node of the rabbit / C. C. Compton, E. Raviola // *Anatomy Records*. – 1985. – Vol. 212, № 4. – P. 408–423.
 85. Coxam, B. Pkd1 Regulates Lymphatic Vascular Morphogenesis during Development / B. Coxam, A. Sabine, N. I. Bower [et al.] // *J. Generate reference*. – 2014. – Vol. 7, № 3. – P. 623–633.
 86. Decreased lymphatic vessel density is associated with postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease / Jean-François Rahier, L. Dubuquoy, Jean-Frédéric Colombel [et al.] // *Inflammatary Bowel Disise*. – 2013. – Vol. 19, №10. – P. 2084-90.
 87. Deitch, E. A. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction / E. A. Deitch // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 1207, № 1. – P. 103-111.

88. Dejana, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together / E. Dejana // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2004. – Vol. 5. – P. 261–270.
89. Dejana, E. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability / E. Dejana, M. G. Lampugnani, O. Martinez-Estrada [et al.] // *International Journal of Developmental Biology*. – 2004. – Vol. 44, № 6. – P. 743–748.
90. Dellinger, R. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 / R. P. Dellinger, M. M. Levy, J. M. Carlet [et al.] // *Intensive Care Medicine*. – 2008. – Vol. 34, № 1. – P. 17–60.
91. Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels / N. Ebata, Y. Nodasaka, Y. Sawa [et al.] // *Microvascular Research*. – 2001a. – Vol. 61, № 1. – P. 40–48.
92. Distinct molecular composition of blood and lymphatic vascular endothelial cell junctions establishes specific functional barriers within the peripheral lymph node / F. Pfeiffer, V. Kumar, S. Butz [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 38, № 8. – P. 2142–2155.
93. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting / M. Wirzenius, T. Tammela, M. Uutela [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2007. – Vol. 204, № 6. – P. 1431–1440.
94. Dixon J. B. Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals / J. B. Dixon // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2010. – V. 1207, № 1. – P. 52-57.
95. Dixon, J. B. Mechanisms of chylomicron absorption in lacteals / J. B. Dixon // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2010. – 1207 : E52-7.
96. Dixon, J. B. Lymphatic lipid transport: sewer or subway? / J. B. Dixon // *Trends Endocrinol Metab*. – 2010. – Vol. 21, № 8. – P. 480–487.
97. Djoneidi, M. Isolation and Characterization of Rat Lymphatic Endothelial Cells / M. Djoneidi, P. Brodt // *Microcirc Endothelium Lymphatics*. – 1991. – Vol. 7, № (4-6). – P. 161–82.
98. Dobbins, W. O. Intestinal mucosal lymphatic permeability: an electron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions / W. O. Dobbins, E. L. Rollins // *J. Ultrastructural Research*. – 1970. – Vol. 33, № 1. – P. 29–59.

99. Dorland, Y. L. Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling / Y. L. Dorland, S. Huveneers // *Cell Molecular. Life Science.* – 2017. – Vol. 74, № 2. – P. 279–292.
100. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis / L. K. Chang, G. Garcia-Cardena, F. Farnebo [et al.] // *Proceedings of National Academy of Sciences.* – 2004. – Vol. 101, № 32. – P. 11658–11663.
101. Escobedo, N. The lymphatic vasculature: its role in adipose metabolism and obesity / N. Escobedo, G. Oliver // *Cell Metabolism.* – 2017. – Vol. 26, № 4. – P. 598–560.
102. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity / A. M. Dulak, P. Stojanov, S. Peng [et al.] // *Nature Genetics.* – 2013. – Vol. 45, № 5. – P. 478–486.
103. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines / S. T. Reddy, A. J. van der Vlies, E. Simeoni [et al.] // *Nature Biotechnology.* – 2007. - Vol. 25, № 10. – P. 1159–1164.
104. Expression and cell distribution of the intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, endothelial leukocyte adhesion molecule, and endothelial cell adhesion molecule (CD31) in Reactive human lymph nodes and in Hodgkin's disease / L. P. Ruco, D. Pomponi, R. Pigott [et al.] // *American Journal of Pathology.* – 1992. – Vol. 140, № 6. – P. 1337–1344.
105. Fievez, V. Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination / V. Fievez, L. Plapied, Anne des Rieux [et al.] // *European Journal of Pharmacology. Biopharmacology.* – 2009. - Vol. 73, № 1. – P. 16–24.
106. Fossum, S. The architecture of rat lymph nodes. IV. Distribution of ferritin and colloidal carbon in the draining lymph nodes after foot-pad injection / S. Fossum // *Scandinavian Journal of Immunology.* – 1980. – Vol. 12, № 5. – P. 433–441.
107. FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1 / C. Norrmén, K. I. Ivanov, J. Cheng [et al.] // *J. Cell Biology.* – 2009. – Vol. 185, № 3. – P. 439–457.

108. Francois, M. The transcriptional control of lymphatic vascular development / M. Francois, N. L. Harvey, B. M. Hogan // *Physiology (Bethesda)*. – 2011. – Vol. 26, № 3. – P. 46-155.
109. Frye, M. A. Development of a bipolar disorder biobank: differential phenotyping for subsequent biomarker analyses / M. A. Frye, S. L. McElroy, M. Fuentes [et al.] // *International Journal of Bipolar Disorders*. – 2015. – Vol. 3, № 14. – P. 1–7.
110. Gale, N. W. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1 / N. W. Gale, G. Thurston, S. F. Hackett [et al.] // *Developmental Cell*. – 2002. – Vol. 3, № 3. – P. 411–423.
111. Gerner, M. Y. Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity / M. Y. Gerner, K. A. Casey, W. Kastenmuller [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2017. – Vol. 214, № 10. – P. 3105–3122.
112. Gerner, M. Y. Strategically localized dendritic cells promote rapid T cell responses to lymph-borne particulate antigens / M. Y. Gerner, P. Torabi-Parizi, R. N. Germain // *Immunity*. – 2015. – Vol. 42, № 1. – P. 172–185.
113. Gray, E. E. Lymph node macrophages / E. E. Gray, J. G. Cyster. - DOI: 10.1159/000337007 // *J. Innate Immunology*. – 2012. – Vol. 4, № 5/6. – P. 424–436.
114. Hägerling, R. Distinct roles of VE-cadherin for development and maintenance of specific lymph vessel beds / R. Hägerling, E. Hoppe, C. Dierkes [et al.] // *European Journal of molecular Biology*. – 2018. – Vol. 37, № 22. – P. 1–18.
115. Hansen, K. C. Lymph formation, composition and circulation: a proteomics perspective / K. C. Hansen, A. D'Alessandro, C. C. Clement [et al.] // *International Immunology*. – 2015. – Vol. 27, № 5. – P. 219–227.
116. Henry, B. M. Methods of evidence-based anatomy: a guide to conducting systematic reviews and meta-analysis of anatomical studies / B. M. Henry, K. A. Tomaszewski, J. A. Walocha // *Annals of Anatomy*. – 2016. – Vol. 205. – P. 16–21.
117. High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveolacytoskeleton interactions / T. Richter, M. Floetenmeyer, C. Ferguson [et al.] // *Medicine, Biology Traffic*. – 2008. – Vol. 9, № 6. – P. 893–909.

118. Hirata, S. Capturing and toying with hyraxes (*Dendrohyrax dorsalis*) by wild chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Bossou, Guinea / S. Hirata, G. Yamakoshi, S. Fujita [et al.] // *American Journal of Primatology*. – 2001. – Vol. 53, № 2. – P. 93–97.
119. Hu, G. Regulation of Endothelial Permeability by Src Kinase Signaling: Vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules / G. Hu, A. T. Place, R. D. Minshall // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008a. – Vol. 171. – P. 177–189.
120. Immunoelectron microscopic study of PECAM-1 expression on lymphatic endothelium of the human tongue / N. Ebata, Y. Sawa, Y. Nodasaka [et al.] // *Tissue Cell*. – 2001b. – Vol. 33, № 3. – P. 211–218.
121. Intracellular transports and atherogenesis / A. A. Mironov, G. V. Beznoussenko, I. S. Sesorova [et al.]. // *Frontiers in Bioscience*. – 2020. – Vol. 25, № 7. – P. 1230–1258.
122. Isl1-expressing non-venous cell lineage contributes to cardiac lymphatic vessel development / K. Maruyama, S. Miyagawa-Tomita, K. Mizukami [et al.] // *Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 452, № 2. – P.47-64.
123. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells / M. Aurrand-Lions, L. Duncan, C. Ballestrem, [et al.] // *J. Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, № 4. – P. 2733–2741.
124. Jurisic, V. Effects of TNF on expression membrane molecules in tumor K-562 cell: 437 / V. Jurisic, T. Srdic-Rajic // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 42. – P. 80–81.
125. Keiper, T. The role of junctional adhesion Molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment / T. Keiper, N. Al-Fakhri, E. Chavakis [et al.] // *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. – 2005. – Vol. 19, № 14. – P. 2078–2080.
126. Kluge, M. A. Mitochondria and endothelial function / M. A. Kluge, J. L. Fetterman, J. A. Vita // *Circulation Research*. – 2013. – Vol. 112, № 8. – P. 1171–1188.

127. Kota, J. Lymphatic absorption of subcutaneously administered proteins: influence of different injection sites on the absorption of darbepoetin alfa using a sheep model / J. Kota, K. K. Machavaram, D. N. McLennan, [et al.] // *Drug Metabolism Disposition*. – 2007. - Vol. 35, № 12. – P. 2211–2217.
128. Krenács, T. Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells / T. Krenács, M. Rosendaal // *J. Histochemistry Cytochemistry*. – 1995. – Vol. 43, № 11. – P. 1225–1137.
129. Lampugnani, M. G. CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity / M. G. Lampugnani, O. Fabrizio, R. Noemi [et al.] // *J. Cell Science*. – 2010. – Vol. 123, № 7. – P. 1073–1080.
130. Lampugnani, M. G. Endothelial adherens junctions and the actin cytoskeleton: An “infinity net”? / M. G. Lampugnani // *J. Biology*. – 2010. – Vol. 9, № 3. – P. 1–4.
131. Leak, L.V. Studies on the permeability of lymphatic capillaries / L.V. Leak // *J. Cell Biology*. – 1971. – Vol. 50, № 2. – P. 300–323.
132. Live imaging of lymphatic development in the zebrafish / K. Yaniv, S. Isogai, D. Castranova [et al.] // *Nature Medicine*. – 2006. – Vol. 12, № 6. – P. 711–716.
133. Lymph node blood vessels provide exit routes for metastatic tumor cell dissemination in mice / M. Brown, F.P. Assen, A. Leithner [et al.] // *Science*. – 2018. – Vol. 359, № 6382. – P. 1408–1411.
134. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor / T. V. Petrova, T. Mäkinen, T. P. Mäkelä [et al.] // *European Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 21, № 17. – P. 4593–4599.
135. Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL / H. Y. Lim, C. H. Thiam, K. P. Yeo [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2013. - Vol. 17, № 5. – P. 671–684.
136. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan / S. Banerji, J. Ni, S.-X. Wang [et al.] // *J. Cell Biolgy*. – 1999. – Vol. 144. – P. 789–801.

137. Mannose receptor is a novel ligand for I-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium / H. Irjala, E. L. Johansson, R. Grenman [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2001. – Vol. 194. – P. 1033-1042.
138. Martinez-Corral, I. Nonvenous origin of dermal lymphatic vasculature / I. Martinez-Corral, M. H. Ulvmar, L. Stanczuk [et al.] // *Circulation Researches*. – 2015. – Vol. 116, № 10. – P. 1649–1654.
139. Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules / J. Hu, Y. Shibata, C. Voss [et al.] // *Biology and Medicine Science*. – 2008. – Vol. 319, № 5867. – P. 1247-50.
140. Milasan, A. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in Ldlr (-/-) mice / A. Milasan, A. Smaani, C. Martel // *Atherosclerosis*. – 2019. – Vol. 283. – P. 106–119.
141. Molecular and functional analyses of the contractile apparatus in lymphatic muscle / M. Muthuchamy, A. Gashev, N. Boswell [et al.] // *Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2003. – Vol. 17, № 8. – P. 920-922.
142. Mori, Y. Electron microscopic atlas of lymph node cytology and pathology / Y. Mori, K. Lennert. – Berlin-Heidelberg-New York : Springer, 1969. – 310 p.
143. Multimodal super-resolution optical microscopy visualizes the close connection between membrane and the cytoskeleton in liver sinusoidal endothelial cell fenestrations / V. Mönkemöller, C. Øie, W. Hübner [et al.] // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 1–10.
144. Multiple roles of lymphatic vessels in peripheral lymph node development / A. Sabine, B. Prat-Luri, T. V. Petrova [et al.] // *J. Experimental Medicine*. – 2017. – Vol. 215, № 11. – P. 2760-2777.
145. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3 / Y. Xu, L. Yuan, J. Mak [et al.] // *J. Cell Biology*. – 2010. – Vol. 188, № 1. – P. 115–130.
146. Nitschke, M. R. The effect of elevated temperature and substrate on free-living *Symbiodinium* cultures / M. R. Nitschke, S. K. Davy, T. H. Cribb & S. Ward // *Coral Reefs*. – 2015. – Vol. 34. – P. 161–171.

147. Novel self assembling nanoparticles for the oral administration of fondaparinux: synthesis, characterization and in vivo evaluation / B. Ralay-Ranaivo, D. Desmaële, E. P. Bianchini [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2014. - Vol. 194. – P. 323–331.
148. Obesity but not high-fat diet impairs lymphatic function / G. D. García Nores, D. A. Cuzzone, N. J. Albano [et al.] // *International Journal of Obesity (London)*. – 2016. – Vol. 40, № 10. – P. 1582-1590.
149. Ohtani, O. Lymph circulation in the liver / O. Ohtani, Y. Ohtani // *The Anatomical Record*. – 2008. – Vol. 291. – P. 643–652.
150. Ohtani, O. Structure and function of rat lymph nodes / O. Ohtani, Y. Ohtani // *Archives of Histology and Cytology*. – 2008. – Vol. 71, № 2. – P. 69–76.
151. Ohtani, O. Three-dimensional organization of lymphatics and their relationship to blood vessels in rabbit small intestine. A scanning electron microscopic study of corrosion casts / O. Ohtani, A. Ohtsuka // *Archives of Histoogyl Journal*. – 1985. – Vol. 48, № 3. – P. 255–268.
152. Onder, L. Lymphatic Endothelial Cells Control Initiation of Lymph Node Organogenesis / L. Onder, U. Mörbe, N. Pikor [et al.] // *Immunity*. – 2017. – Vol. 47, № 1. – P. 18-35.
153. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer / K. Naxerova, J. G. Reiter, E. Brachtel [et al.] // *Science*. – 2017. – Vol. 357, № 6346. – P. 55-60.
154. Paz, N. G. Arterial versus venous endothelial cells / N. G. dela Paz, P. A. D'Amore // *Cell Tissue Research*. – 2009. – Vol. 335, № 1. – P. 5–16.
155. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature / T. Makinen, R. H. Adams, J. Bailey [et al.] // *Genes Development*. – 2005. – Vol. 19. – P. 397–410.
156. Petrova, T. V. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis / T. V. Petrova, T. Karpanen, C. Normén [et al.] // *J. Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10, № 9. – P. 974–981.

157. Phenotypical characterization of cells in the thoracic duct of patients with and without systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure / L. C. Lemaire, S. J. van Deventer, J. J. van Lanschot [et al.] // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 1998. – Vol. 47, № 1. – P. 69–75.
158. Pichol-Thievend, C. A blood capillary plexus-derived population of progenitor cells contributes to genesis of the dermal lymphatic vasculature during embryonic development / C. Pichol-Thievend, K. L. Betterman, X. Liu [et al.]. - DOI: 10.1242/dev.160184 // *Development*. – 2018. – Vol. 145, № 10. – P. 1–14.
159. Plasticity of button-like junctions in the endothelium of airway lymphatics in development and inflammation / L. C. Yao, P. Baluk, R. S. Srinivasan [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2012. – Vol. 180, № 6. – P. 2561–2575.
160. Potente. M. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease / M. Potente, T. Mäkinen // *Nature Revue of Molecular Cell Biology*. – 2017. – Vol. 18, № 8. – P. 477–494.
161. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7 / K. Günther, J. Leier, G. Henning [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2005. – Vol. 116. – P. 726–33.
162. Pulmonary administration of PEGylated polylysine dendrimers: absorption from the lung versus retention within the lung is highly size-dependent / G. M. Ryan, L. M. Kaminskis, B. D. Kelly [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2013. - Vol. 10, № 8. – P. 2986–2995.
163. Quantitative profiling of the lymph node clearance capacity / C. C. Clement, W. Wang, M. Dzieciatkowska [et al.] // *Sciense Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 11253.
164. Randolph, G. J. The lymphatic system: integral roles in immunity / G. J. Randolph, S. Ivanov, B. H. Zinselmeyer [et al.] // *Annual Revue Immunology*. – 2017. – Vol. 35. – P. 31–52.
165. Reed, A. L. Demonstration of ATP-dependent, transcellular transport of lipid across the lymphatic endothelium using an in vitro model of the lacteal / A. L. Reed,

- S. A. Rowson, J. B. Dixon // *Pharmaceutical Research*. – 2013. - Vol. 30. – P. 3271–3280.
166. Rigor, R. R. Activation of PKC Isoform β I at the Blood-Brain Barrier Rapidly Decreases P-Glycoprotein Activity and Enhances Drug Delivery to the Brain / R. R. Rigor, B. T. Hawkins, D. S. Miller // *Journal of Controlled Release* – 2010. – Vol. 30, № 7. – P. 1373–1383.
 167. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes / C. Qu, E. W. Edwards, F. Tacke [et al.] // *J. Experimental Medicine*. – 2004. – Vol. 200, № 10. – P. 1231–1241.
 168. Ryan, G. M. Nano-chemotherapeutics: maximising lymphatic drug exposure to improve the treatment of lymph-metastatic cancers / G. M. Ryan, L. M. Kaminskas, C. J. Porter // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Vol. 193. – P. 241–256.
 169. Sainte-Marie, G. Overall architecture and pattern of lymph flow in the rat lymph node / G. Sainte-Marie, F. S. Peng, C. Belisle // *American Journal of Anatomy*. – 1982. – Vol. 164, № 4. – P. 275–309.
 170. Sainte-Marie, G. The lymph node revisited: development, morphology, functioning, and role in triggering primary immune responses / G. Sainte-Marie // *Anatomy Records*. – 2010. – Vol. 293, № 2. – P.320–337.
 171. Schmelz, M. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes / M. Schmelz, W. W. Franke // *European Journal of Cell Biology*. – 1993. – Vol. 61, № 2. – P. 274–289.
 172. Schneeberger, E. The tight junction: a multifunctional complex / E. Schneeberger, R. D. Lynch // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2004. – Vol. 286. – P. 1213–1228.
 173. Schulte-Merker, S. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease / S. Schulte-Merker, A. Sabine, T. V. Petrova // *Journal of Cell Biology*. – 2011. – Vol. 193, № 4. – P. 607–618.

174. Shengan, X. L. Endogenous pore-forming protein complex targets acidic glycosphingolipids in lipid rafts to initiate endolysosome regulation / X. L. Guo, L. Z. Liu, Q. Q. Wang [et al.] // *Communications biology*. – 2019. – № 59. – P. 1–13.
175. Simionescu, M. Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey / M. Simionescu, A. Gafencu, F. Antohe // *Published Biology, Medicine*. – 2002. – Vol. 57, № 5. – P. 269–88.
176. Simionescu, N. Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels / N. Simionescu, M. Simionescu, G. E. Palade // *The Journal of Cell Biology*. – 1975. – Vol. 64. – P. 586–607.
177. Single-cell survey of human lymphatics unveils marked endothelial cell heterogeneity and mechanisms of homing for neutrophils / A. Takeda, M. Hollmén, D. Dermadi [et al.] // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51, № 3. – P. 561–572.
178. Stan, R. V. Structure and function of endothelial caveolae / R.V. Stan // *Microscopy Research Technique*. – 2002. – Vol. 57. – P. 350–364.
179. Stanczuk, L. Ckit lineage hemogenic endothelium-derived cells contribute to mesenteric lymphatic vessels / L. Stanczuk, I. Martinez-Corral, M. Ulvmar [et al.] // *Cell Reports*. – 2015. – Vol. 10, № 10. – P. 1708–1721.
180. Structure of the enterocyte transcytosis compartments during lipid absorption / I. S. Sesorova, T. E. Kazakova, M. A. Zdorikova, [et al.] // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2020. – Vol. 153, № 6. – P. 413–429.
181. Su, S. Essential roles of EphrinB2 in mammalian heart: from development to diseases / S. Su, Y. Xie, Y. Zhang [et al.] // *J. Cell Communication and Signaling*. – 2019. – Vol. 17, № 29. – P. 1–9.
182. Tadde, A. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5 / A. Taddei, C. Giampietro, A. Conti [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2008. – Vol. 10, № 8. – P. 923–934.
183. Takada, M. Presence of fenestrated capillaries in the skin / M. Takada, S. Hattori // *Anatomy Research*. – 1972. – Vol. 173. – P. 213–220.

184. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction / J. M. Vieira, S. Norman, C. V. Del Campo [et al.] // J. Clinical Investigation. – 2018. – Vol. 128, № 8. – P. 3402–3412.
185. The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes / P. Rantakari, K. Auvinen, N. Jäppinen [et al.] // Nature Immunology. – 2015. – Vol. 16, №4. – P. 386–396.
186. The inhibition of protein translation mediated by AtGCN1 is essential for cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* / L. Wang, H. Li, C. Zhao [et al.] // Plant Cell Environment. – 2017. – Vol. 40, № 1. – P. 56–68.
187. Transcytosis route mediates rapid delivery of intact antibodies to draining lymph nodes / L. Kähäri, R. Fair-Mäkelä, K. Auvinen [et al.] // J. Clinical Investigation. – 2019. – Vol. 129, № 8. – P. 3086–3102.
188. Trevaskis, N. L. Lipidbased delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update / N. L. Trevaskis, W. N. Charman, C. J Porter // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2008. - Vol. 60. – P. 702–716.
189. Tse, D. Morphological heterogeneity of endothelium / D. Tse, R. V. Stan // Review Semin Thromb Hemost. – 2010. – Vol. 36, № 3. – P. 236–245.
190. Tumor-associated factors are enriched in lymphatic exudate compared to plasma in metastatic melanoma patients / Maria A. S. Broggi, L. Maillat, C. C. Clement [et al.] // J. Experimental Medicine. – 2019. – Vol. 216, № 10. – P. 1091–1107.
191. Validation of numerical simulation with PIV measurements for two anastomosis models / J. M. Zhang, L. P. Chua, D. N Ghista [et al.] // Medical engineering and Physics. – 2008. – Vol. 30, № 2. – P. 226–247.
192. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins / M. J. Karkkainen, P. Haiko, K. Sainio [et al.] // Nature Immunology. – 2004. – Vol. 5, № 1. – P. 74–80.
193. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts / I. Nilsson, F. Bahram, X. Li [et al.] // European Molecular Biology Organization. – 2010. – Vol. 29, № 8. – P. 1377–1388.

194. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease / S. D'Alessio, C. Correale, C. Tacconi [et al.] // J. Clinical Investigation. – 2014. – Vol. 124, № 9. – P. 3863-3878.
195. Vuorio, J. Atomistic fingerprint of hyaluronan–CD44 binding / J. Vuorio, I. Vattulainen, H. Martinez-Seara // PLoS Computational Biology. – 2017. – Vol. 13, № 7. – P. 1–24.
196. Wacker, H.H. Sinus lining cells. Immune accessory cells of lymph node sinuses / H. H. Wacker // Veröffentlichungen aus der morphologischen Pathologie. – 1994. – Vol. 143, № 1. – P. 217.
197. Wang, Y. Cloning of complete genomes of large dsDNA viruses by in vitro transposition of an F factor containing transposon / Y. Wang, Nina Stojiljkovic, J. A. Jehle // Journal of Virological Methods. – 2010. – Vol. 167. – P. 95–99.
198. Wigle, J. T. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system / J. T. Wigle, G. Oliver // Cell. – 1999. – Vol. 98, № 6. – P. 769–778.
199. Worzfeld, T. Apicobasal polarity of brain endothelial cells / T. Worzfeld, M. Schwaninger // J. Cerebral Blood Flow Metabolism. – 2015. – Vol. 36, № 2. – P. 340–362.
200. Yang, R. QuBiT: a quantitative tool for analyzing epithelial tubes reveals unexpected patterns of organization in the Drosophila trachea / R. Yang, E. Li, Y. J. Kwon [et al.] // Development. – 2019. – Vol. 146, № 12. – P. 1–18.
201. Yaniv, K. Live imaging of lymphatic development in the zebrafish / K. Yaniv, S. Isogai, D. Castranova [et al.] // Biology and Medicine. Nature Medicine. – 2006. – Vol. 4, № 1. – P. 23-30.
202. Yeo, K. P. Bidirectional crosstalk between lymphatic endothelial cell and T cell and its implications in tumor immunity / K. P. Yeo, V. Angeli // Frontiers in Immunology. – Vol. 8. – P. 83–94.
203. Yun, Y. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery / Y. Yun, Y. W. Cho, K. Park // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2013. - Vol. 65. – P. 822–832.

204. Zawieja, D. C. Contractile physiology of lymphatics / D. C. Zawieja // *Lymphatic Research and Biology* – 2009. – Vol. 7, № 2. – P. 87–96.
205. Zhang, H. NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice / H. Zhang, D. Ryu, Y. Wu [et al.] // *Science J.* – 2016. – Vol. 352, № 6292. – P. 1436–1443.
206. Zhang, N. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin / N. Zhang, Q. Ping, G. Huang, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2006. - Vol. 327, № 1–2. – P. 153–159.
207. Zihni, C. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates / C. Zihni, C. Mills, K. Matter [et al.] // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 564–580.