

*Н.Р.Карелина,¹ И.С.Сесорова², Г.В.Безнусенко³, В.К.Шишло⁴, В.В.Сесоров²,
Т.Е.Казакова⁵, А.А.Миронов³*

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ ЛИМФЫ

¹ Кафедра анатомии человека (зав. — проф. Н.Р.Карелина), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет»; ² кафедра анатомии (зав. — проф. С.И.Катаев), ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия»; ³ лаборатория электронной микроскопии (зав. — проф. А.А.Миронов), Институт молекулярной онкологии, г. Милан, Италия; ⁴ научный отдел клинической лимфологии (зав. — проф. Ю.Е.Выренков), ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия постдипломного образования» РАН, Москва; ⁵ кафедра экологии (зав. — проф. М.В.Шептуховский), ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет»

Наряду с кратким обзором строения различных отделов лимфоносного русла представлены новые данные о строении, молекулярной организации и функции эндотелиоцитов лимфоносного русла. Оценено участие кавеол и внутрисстеночных клапанов в обеспечении трансэндотелиального транспорта, а на примере межэндотелиоцитарных контактов лимфатических капилляров (ЛК) кишечной ворсинки детализированы структуры, позволяющие по-новому взглянуть на процессы транспорта интерстициальной жидкости и макромолекул при образовании лимфы. Обосновывается активный механизм резорбции интерстициальной жидкости и образования лимфы. Высказана гипотеза о том, что описанная организация ЛК обусловлена необходимостью доставки антигенов к иммунокомпетентным клеткам в лимфатических узлах.

Ключевые слова: лимфатическая система, лимфатический сосуд, ультраструктура

В последние годы огромный интерес вызвало открытие в самых различных тканях так называемых экзосом, внеклеточных пузырьков, имеющих размеры от 45 до 200 нм и более и происходящих из самых различных тканей [54], в том числе твердой мозговой оболочки [28]. Эти мембранные пузырьки заполнены молекулами белков и РНК [61]. Они образуются различными клетками в тканях, а затем оказываются в кровеносном русле.

Известно, что резорбция белков из интерстиция может осуществляться через венозные отделы кровеносных капилляров и венулы [1]. Однако размеры резорбируемых подобным образом структур и агрегатов белка резко ограничены. Поэтому через стенку кровеносных капилляров экзосомы проникнуть не могут, поскольку слишком велики для того, чтобы попасть в кровеносное русло. Экзосомы, образованные клетками соединительной ткани, должны проникнуть через базальную мембрану капилляров, которая в боль-

шинстве тканей сплошная, а затем через цитоплазму эндотелиоцитов (ЭЦ) капилляров, которые в большинстве тканей не имеют сквозных пор. Исключением являются ЭЦ кровеносных синусоидов печени. Порозный же эндотелий клубочков почек не только не пропускает мембранные пузырьки таких размеров, как экзосомы, но и препятствует фильтрации молекул альбумина размером всего 3,6 нм. Разрывы стенки капилляров в нормальных условиях наблюдаются крайне редко. Наконец, экзосомы, образуемые эпителиальными клетками, должны, кроме того, проникнуть и сквозь базальную мембрану эпителия. Следовательно, должен существовать механизм, обеспечивающий поступление экзосом в кровеносное русло другим путем. Таким путем могло бы стать всасывание экзосом в лимфатические капилляры (ЛК) через систему внутрисстеночных клапанов (см. ниже) и последующий транспорт по лимфоносным путям в вены. Поскольку, согласно

Сведения об авторах:

Карелина Наталья Рафаиловна (e-mail: karelina_nr@gpma.ru), кафедра анатомии человека, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет», 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 8

Сесорова Ирина Сергеевна (e-mail: Irina-S3@yandex.ru), *Сесоров Виталий Викторович* (e-mail: vit-sesorov@yandex.ru), кафедра анатомии, ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», 153012, г. Иваново, Шереметевский пр., 8

Безнусенко Галина Владимировна (e-mail: galina-beznusenko@yandex.ru), *Миронов Александр Александрович* (e-mail: mironaaa@yandex.ru), лаборатория электронной микроскопии, Институт молекулярной онкологии, г. Милан, Италия; Via Adamello, 16, Milano, 20139

Шишло Владимир Константинович (e-mail: kisa0303@yandex.ru), научный отдел клинической лимфологии, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия постдипломного образования» РАН, 125993, Москва, ул. Поликарпова, 10/12

Казакова Татьяна Евгеньевна (e-mail: ttattyana@list.ru), кафедра экологии, ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет», 155908, г. Шуя, ул. Кооперативная, 24

данной гипотезе, проникновение экзосом происходит через эндотелиальную выстилку лимфоносных сосудов, то следует остановиться на строении их ЭЦ. Однако для того, чтобы было понятно дальнейшее изложение, следует определиться с терминами. Как в анатомической, так и гистологической номенклатурах имеются отдельно *Vas lymphaticum* — лимфатический сосуд (ЛС) и *Vas lymphocapillare* — ЛК. Однако в просвете ЛК уже содержится лимфа и, таким образом, ЛК также является лимфатическим (а по аналогии с кровеносным руслом — лимфоносным) сосудом. Поэтому мы в данной работе принимаем, что ЛК, лимфатический посткапилляр (ЛПК) и ЛС являются лимфоносными сосудами.

Известно, что внутреннюю поверхность стенки ЛК, ЛС, их внутрипросветные клапаны (рис. 1, в, е) и синусы лимфатического узла (см. рис. 1, ж, з) выстилают ЭЦ, образующие сплошной однослойный клеточный пласт. Длина ЭЦ колеблется от 5 до 175 мкм. В околоядерной зоне их толщина составляет 1–3 мкм, а минимальная толщина на периферии клетки достигает 20 нм.

Особенностью ЛК является наличие внутристеночных клапанов (см. ниже). Мы назвали так эти клапаны, чтобы отличать их от клапанов, прикрепленных к внутренней стенке ЛС, а также клапанов, расположенных на границе ЛК и ЛПК, которые мы назвали внутрипросветными клапанами (см. рис. 1, б).

ЭЦ ЛС чаще содержат одно ядро, иногда 2–3; встречаются также содержащие 10 ядер и более. Ядра овальной формы с большим диаметром располагаются вдоль оси сосуда, состав их органелл почти не отличается от такового у ядер ЭЦ кровеносных сосудов [18, 19]. ЭЦ контактируют друг с другом с помощью специализированных межклеточных соединений. Форма ЭЦ разнообразна.

На люминальной поверхности плазмолеммы имеется гликокаликс, который однако менее выражен, чем в кровеносных сосудах. Отсутствие непрерывного пояса плотных соединений в области контактов ЭЦ ЛК ставит под сомнение существование характерного для поляризованных клеток асимметричного распределения липидов и белков между люминальной и аблюминальной частями плазмолеммы [38]. Именно поэтому мы не

можем здесь использовать общепринятое в мировой литературе деление плазмолеммы поляризованных клеток на апикальный и базолатеральный домены, так как в ЭЦ ЛК поляризация плазмолеммы нарушена из-за слабого развития плотных соединений между ЭЦ. Поэтому мы вместо термина «апикальный» домен используем термин «люминальный» (обращенный в просвет сосуда) домен (поверхность), а вместо термина «базолатеральный» домен — «аблюминальный» домен (поверхность).

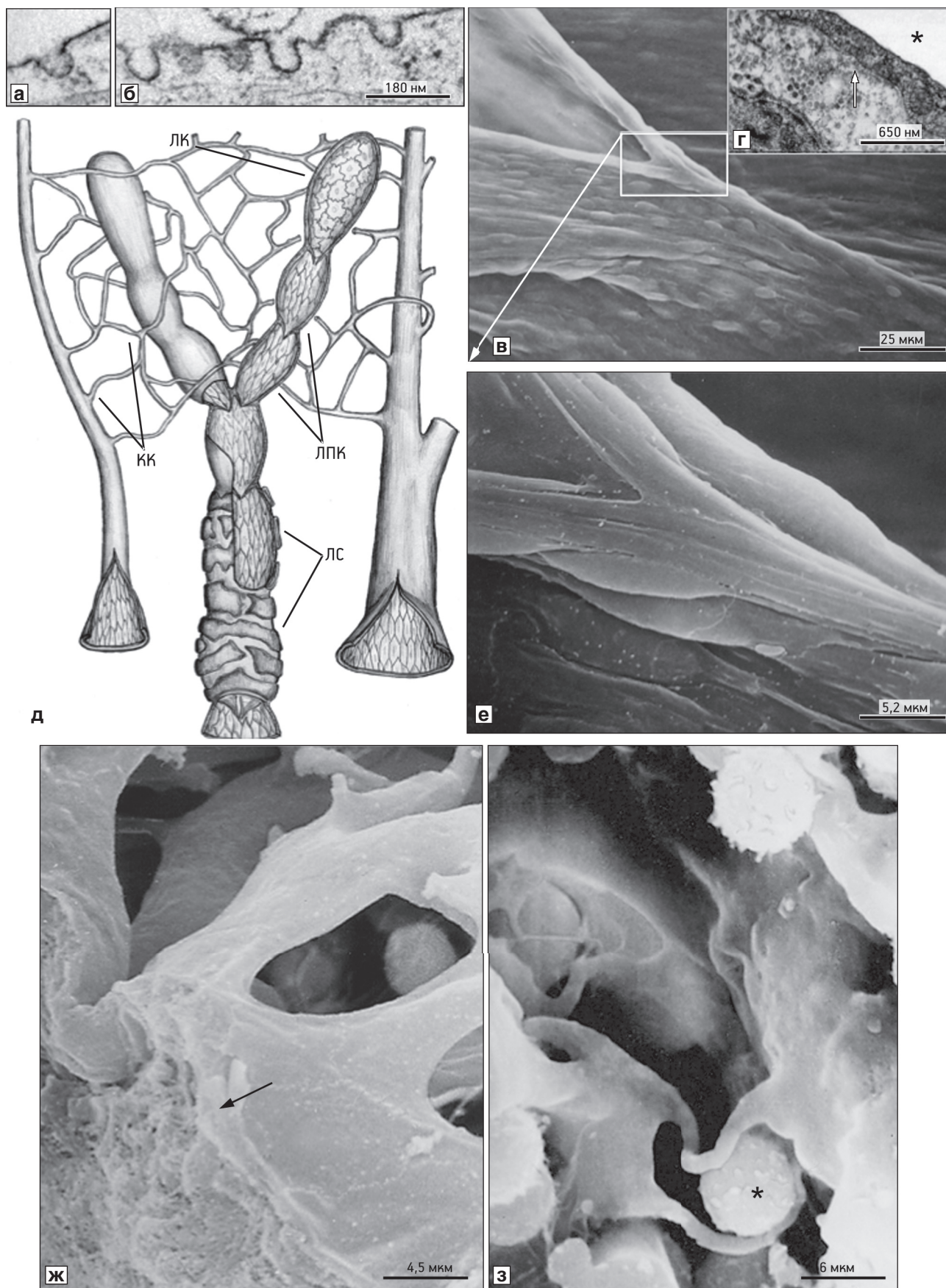
Отдельные участки аблюминальной плазмолеммы ЭЦ ЛК тесно связаны с окружающей соединительной тканью с помощью так называемых стропных, или фиксирующих, якорных филаментов. Они соединяются с коллагеновыми волокнами, расположенными вдоль ЛК (рис. 2, а) [18, 19]. В ЭЦ лимфоносного русла площади люминальной и аблюминальной поверхностей плазмолеммы практически равны.

Ультраструктурной особенностью ЭЦ ЛК и ЛС является наличие кавеол, которые выглядят как относительно небольшие (60–100 нм), колбовидные инвагинации на цитозольной поверхности люминальной и аблюминальной частях плазмолеммы. Одиночные кавеолы часто соединяются, образуя цепочки [69]. При большом увеличении на ультратонком срезе цитозольной поверхности кавеол видны «шпицы», которые содержат встроенный в липидный двойной слой белок кавеолин. «Шейка» кавеол окружена кольцом белка динамина. Мы не встретили трехмерного описания кавеол и кавеолосом в ЭЦ ЛС. После сверхбыстрого замораживания поджелудочной железы в ЭЦ ЛК островков не было найдено ни одной кавеолы с суженным отверстием в виде «шейки» [69]. Не обнаружено было кавеол с шейками в ЭЦ ЛК кишечной ворсинки, подготовленной подобным же образом (см. рис. 1, а, б).

Существование переноса интерстициальной жидкости в просвет ЛК и даже ЛС посредством эндотелиальных микровезикул и макромолекул с помощью кавеол до сих пор обсуждается в литературе. Эти механизмы рассматриваются в качестве основных при демонстрации трансцеллюлярного транспорта и проницаемости эндотелия ЛК [52, 53]. Остается неясным, каков уровень

Рис. 1. Организация лимфоносного русла.

а, б — кавеолы в эндотелиоцитах лимфатических капилляров (ЛК) после сверхбыстрого замораживания, отсутствие «шейки» у кавеол; в — нативный препарат клапана грудного протока (вид со стороны просвета протока); г — срез эндотелия грудного протока. Стрелка — базальная мембрана эндотелия; звездочка — просвет протока; д — схема структурной организации микроциркуляции в кровеносных и лимфоносных сосудах. ЛК — лимфатический капилляр; ЛПК — лимфатический посткапилляр; ЛС — лимфатический сосуд; КК — кровеносные капилляры; е — очерченный участок рисунка в; ж — нативный препарат подкапсульного щелевого синуса лимфатического узла. Стрелка — капсула узла; з — нативный препарат лимфатических синусов лимфатического узла; звездочка — лимфоцит. а, б, г — трансмиссионная электронная микроскопия (ЭМ); в, е–з — сканирующая ЭМ



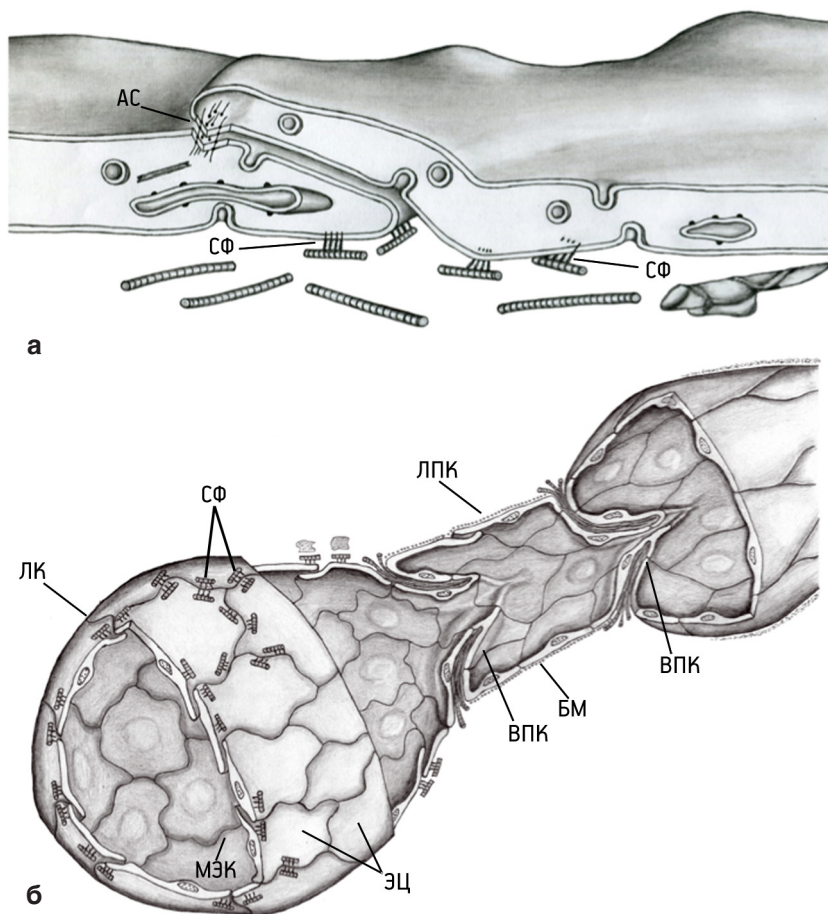


Рис. 2. Компоненты начальных отделов лимфатического русла.

а — схема косой контактной щели в лимфатическом капилляре (ЛК) кишечной ворсинки: АС — точечный адгезивный контакт; СФ — стропные филаменты; б — схема ЛК и лимфатического посткапилляра (ЛПК): ЭЦ — эндотелиоцит; СФ — стропные филаменты вдоль межклеточных щелей; МЭК — межэндотелиоцитарные черепицеобразные контакты с косо расположенной межклеточной щелью; ВПК — внутрипросветный клапан; БМ — базальная мембрана

ки, которые часто сливаются друг с другом [48].

С помощью «якорных» филаментов аблюминальной части плазмолеммы ЭЦ прикрепляются к фибриллярным элементам внеклеточного матрикса (см. рис. 2, а, б). Они направляются от полудесмосом ЭЦ и состоят, главным образом, из фибриллина. Последний взаимодействует через фокальные зоны адгезии с анкирином [46] и имеет с ним и с белками FAK (focal adhesion kinase) частичную колокализацию [46, 70].

Базальная мембрана (см. рис. 1, г; 2, б), отсутствующая в ЛК, но имеющаяся в ЛПК и ЛС, представляет собой волокнистую структуру толщиной 20–200 нм, состоящую из ламининов, коллагена IV типа, протеогликанов, гепарансульфатов и так называемых белков-нидогенов [68, 73]. Важно отметить, что все 4 класса белков базальной мембраны существуют в виде нескольких изоформ [47, 62]. Кроме того, базальная мембрана содержит: BM-40 (остеонектин, SPARC); fibulin-1 (BM-90) и -2; коллаген VIII, XV, XVIII типов; тромбоспондин-1 и -2 [7, 36, 47, 73].

Секреция компонентов базальной мембраны идет через аблюминальную часть плазмолеммы, в основном в момент созревания плотных межэндотелиоцитарных соединений. Однако в большинстве ЭЦ ЛС секреторные гранулы, содержащие белки внеклеточного матрикса, практически не встречаются. Пока также остается неясным, имеются ли в эндотелии ЛК и ЛС тельца Вейбеля — Палладе, заполненные фактором Виллебранда и некоторыми другими белками системы гемостаза [67].

Важную роль в функционировании и организации ЭЦ ЛС играют белки, специфически синтезируемые лимфатическими ЭЦ. В 1995 г. был открыт первый белок из семейства факто-

крупномолекулярных веществ переноса непосредственно через цитоплазму ЭЦ и насколько отличается трансэндотелиальный транспорт в лимфатических и кровеносных сосудах по способу его реализации.

В то же время, доказано, что участие кавеол в трансэндотелиальном транспорте макромолекул в кровеносном русле незначительно [37]. Например, клетки мухи дрозофилы не имеют белков кавеолинов, образующих кавеолы. Поэтому типичных кавеол у них нет. Мыши, у которых удален ген кавеолина-1, не содержат кавеол в эндотелии кровеносных капилляров (так ли это для эндотелия ЛС, не было проверено), однако существенной патологии у таких мышей не обнаружено. Особенно важно то, что распределение альбумина у этих мышей в просвете сосудов, интерстиции и спинномозговой жидкости идентично таковому у контрольных животных [63].

Таким образом, наиболее вероятно, что кавеолы не участвуют в переносе макромолекул через ЭЦ, в том числе и в ЛС, а транцитоз, если он вообще существует в ЭЦ ЛК и ЛС, осуществляется посредством механизма, основанного на слиянии и последующем разделении мембран («kiss-and-run») [65]. Этот феномен описан в энтероцитах, где есть связанные с апикальной и базолатеральной частями плазмолеммы трубч-

ров роста, регулирующий рост и строение ЛС [55, 65]. В ЭЦ ЛС отмечено повышенное содержание ряда белков: фактора транскрипции Prox-1 (prospero homeobox protein-1); рецептора гиалуронана LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan), молекул адгезии тромбоцитов к эндотелию PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule) [41, 44, 51], неурофилина-2 (Nrp-2), десмоплакина [40, 43], семафорина [26, 56–58] и некоторых других. Эти белки могут использоваться в качестве специфических маркеров ЭЦ лимфоносного русла. Маркером кровеносных сосудов является белок клеточной адгезии PECAM-1 [27, 49].

После открытия специфических для ЭЦ ЛС белков-маркеров они стали использоваться для изолирования и выращивания в культуре ткани чистых линий ЭЦ [23, 45]. Выявлена целая группа белков, отвечающих за лимфангиогенез. Их удаление или изменение состава и последовательностей аминокислот ведет к патологии ЛС [26, 50, 59, 62].

В ЛС обнаружен не весь набор белков плотных соединений, который встречается в эндотелии кровеносных сосудов, выявлены только окклюдин, клаудин и белок плотных контактов ZO-1 (zonula occludens-1) [31, 42]. На сколах мембран, выявленных с помощью метода металлических реплик, плотные соединения имеют вид немногочисленных, иногда коротких цепочек внутримембранных протеиновых частиц [1].

Лимфоносное русло. Ультраструктурной организации лимфатической системы посвящено много фундаментальных исследований, в том числе советских и российских исследователей [2–9, 11, 13, 14, 19, 20, 24, 28]. Далее мы рассмотрим, как устроено лимфоносное русло и каким образом функционирует каждый его отдел.

Интерстициальную жидкость в основном резорбируют ЛК (см. рис. 1, д), стенка которых состоит из одного слоя ЭЦ, которые в ЛК и ЛС в 3–4 раза крупнее, чем в кровеносных капиллярах, и относятся к эндотелию непрерывного типа [10]. Границы между ЭЦ в ЛК более извилисты, чем в других отделах лимфоносного русла, и хорошо импрегнируются нитратом серебра.

В стенке ЛК со стороны аблюминальной поверхности ЭЦ непрерывной базальной мембраны, перичитов и гладких миоцитов (ГМ) нет. Пористая и слабо развитая базальная мембрана имеется только в тех зонах, где встречаются плотные соединения; однако в зонах расположения якорных филаментов она отсутствует.

ЛПК — промежуточное звено между ЛК и отводящими ЛС. Как и ЛК, они относятся к лим-

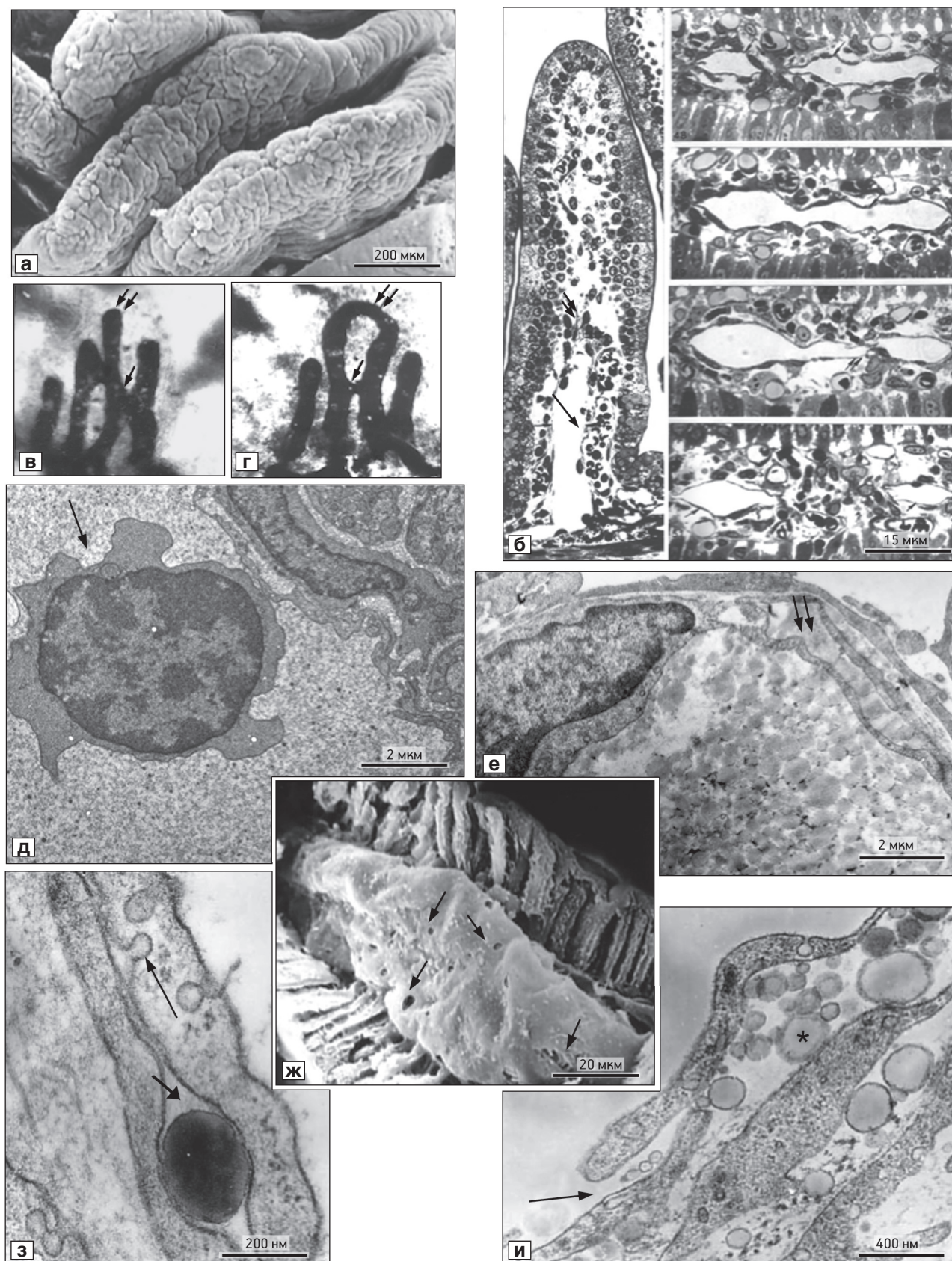
фоносным сосудам [2]. Впервые ЛПК были выделены В.В.Куприяновым и соавт. [6, 8]. Однако их существование признают не все [20, 21]. ЛПК идентифицируется как первый лимфоносный сосуд, содержащий внутрипросветные клапаны (см. рис. 1, в, е). Для ЛПК также характерны: извилистость контура их проекции; наличие чередующихся сужений и расширений просвета сосуда и боковых выпячиваний его стенки; образование «озер» в местах слияния нескольких ЛПК (см. рис. 2, б) [21].

Считается, что межэндотелиоцитарные контакты ЛПК «заперты» плотными соединениями [30], которые образуют непрерывный пояс, состоящий из одной или двух бороздок/гребешков на разных поверхностях скола [1]. В отличие от ЛК, эндотелий ЛПК имеет базальную мембрану, иногда выраженную уже на большем протяжении (см. рис. 2, б). Якорные филаменты обнаруживаются реже. В стенке ЛПК могут наблюдаться отдельные ГМ, хотя, в отличие от ЛС, они встречаются ещё очень редко [4].

ЛС образуются при слиянии нескольких ЛК и/или ЛПК. Часто границу между ЛПК и ЛС различить трудно (см. рис. 1, д). Диаметр ЛС достигает 1,5–2 мм. В просвете ЛС видны лимфоциты (рис. 3, д). Его стенка более толстая, чем у ЛПК за счет средней и наружной оболочек (чем проксимальнее расположен ЛС, тем больше в нем ГМ). Нередко ЛПК и ЛС формируют или древовидные структуры, или сосудистые сети [1]. В парietальной брюшине у собаки в концевых отделах лимфатического русла сетевидных конструкций почти нет [1]. Часто кажущееся наличие сплетения возникает в результате наложения проекций одного ЛС на другой. ЛС, выносящие лимфу из органа, как правило, имеют почти сплошной слой ГМ (см. рис. 1, д).

Приносящие ЛС несут лимфу к лимфатическим узлам, где она протекает по их синусам (см. рис. 1, ж, з) [22] и попадает далее в выносящие ЛС. Средняя оболочка ЛС может иметь как сплошной, так и прерывистый слой ГМ [18, 19]. Наружная оболочка ЛС не имеет четких границ с соединительнотканными прослойками внутри органов [68]. По выносящим ЛС лимфа оттекает в более крупные сосуды, лимфатические стволы и протоки, с обилием внутрипросветных клапанов (см. рис. 1, в, е).

Лимфа из грудного протока и правого лимфатического протока попадает, соответственно, в левый и правый венозные углы (или в одну из вен шеи, его образующих) через отверстие, имеющееся в клапане, который напоминает палец резиновой перчатки со щелевидным отверстием



на конце. Этот «пальцеподобный» клапан обычно подвешен к стенке венозного сосуда посредством двух брыжеек [34, 35]. Описание строения стенки лимфатических коллекторов и протоков хорошо освещено в литературе и не входит в нашу задачу [2, 13, 15–17, 22, 32–35]. Отметим лишь, что у некоторых млекопитающих расположенные эктопически (рядом со стенкой грудного протока) кардиомиоциты могут выполнять функцию «лимфатического сердца» [32, 33].

Внутристеночные клапаны. Г.Шмид-Шонбейн [72] первым постулировал существование системы клапанов на уровне стенки ЛК. В 2007 г. в ЛК трахеи был описан предсказанный Г.Шмидом-Шонбейном внутристеночный клапанный аппарат, ответственный за резорбцию интерстициальной жидкости. Внутристеночные клапаны в виде синусоидных межэндотелиоцитарных контактов в ЛК описаны пока только в одном органе — трахее и только на светооптическом уровне [31].

Клапаны устроены таким образом, что уплощенные выросты цитоплазмы двух контактирующих клеток попеременно наслаиваются на пласт цитоплазмы соседней клетки. Вначале идет вырост одной, затем в противоположном направлении оказывается вытянутым «язык» другого ЭЦ.

Судя по изображениям, полученным с помощью иммунофлюоресценции, в зонах, имеющих плоские выросты ЭЦ, межэндотелиоцитарные контакты лишены плотных соединений. В местах, где синусоида проходит через «нулевую точку» или ось X, обнаруживается концентрация белков, образующих плотные соединения. Там, где выросты ЭЦ накладываются друг на друга, выявлены белки PECAM [41] и LYVE-1. Эти белки имеют слабую адгезию по отношению друг к другу, поэтому люминальные уплощенные выросты обратимо «приклеиваются» к подлежащим участкам клеток [39]. Белки промежуточных соединений, например, β -кадгерин, ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule), белок плотных адгезионных контактов Jam-A (junctional adhesion molecules) и некоторые другие образуют изолиро-

ванные пятна в местах концентрирования белков LYVE-1 и PECAM [42].

Проиллюстрировать ультраструктурные механизмы, участвующие в образовании лимфы, возможно на примере ЛК кишечной ворсинки, где всасываются хиломикроны, имеющие сходные размеры с экзосомами. Поэтому ЛК в ворсинке наиболее приспособлен к постоянному всасыванию структур с диаметров более 50 нм (см. рис. 3, а–г).

При наличии жиров в просвете кишки они поглощаются апикальной частью плазмолеммы энтероцитов, переходят в просвет эндоплазматической сети, где формируются липидные частицы и капли, которые транспортируются через комплекс Гольджи к базолатеральной части плазмолеммы и поступают в межклеточное пространство [66, 71]. В интерстиций кишечной ворсинки попадают липидные капли, транспортированные через комплекс Гольджи, секретированные в межклеточное пространство, а потом прошедшие через базальную мембрану энтероцитов.

Мы сопоставили строение межэндотелиоцитарных контактов ЛК кишечной ворсинки (у них отсутствуют внутрипросветные клапаны, поэтому данный сосуд является именно ЛК) с контактами в ЛС подслизистой основы кишки, где наличие внутрипросветных клапанов доказано и, следовательно, данный участок лимфатического русла образован ЛПК и ЛС (образцы готовили так, как описано в статье [60]).

Обнаружено 3 типа межэндотелиоцитарных контактов в ЛК ворсинок тощей кишки: 1) контакты, где есть только плотные соединения (рис. 4, а, б); 2) контакты, где есть только адгезивные «бляшки» (так как нет сплошных «лент» на серийных срезах) (см. рис. 4, в, г); 3) контакты, где нет специализированных мембранных структур (см. рис. 4, д).

Коллагеновые фибриллы и якорные филаменты располагаются, главным образом, около межэндотелиоцитарных контактов, где нет плотных соединений, хотя бывают (редко) и там в зонах синусоидных контактов. Якорные фила-

Рис. 3. Структуры ворсинки тощей кишки.

а — нативный препарат ворсинки со стороны просвета кишки; б — слева продольный срез кишечной ворсинки. Стрелка — лимфатический капилляр; справа — поперечные серийные полутонкие срезы кишечной ворсинки на разных ее уровнях, расстояние между срезами — 6 мкм; в, г — лимфатические капилляры (две стрелки) кишечной ворсинки и их анастомозы (стрелка), заполненные массой Герота после её инъекции в стенку кишки; г — дугообразный лимфатический капилляр (две стрелки) на верхушке кишечной ворсинки и анастомоз (стрелка) в средней ее части; д — лимфоцит (стрелка) в просвете лимфатического сосуда; е — интерстиций кишечной ворсинки после кормления крысы, липидные капли (две стрелки); ж — нативный препарат кишечной ворсинки тощей кишки; часть энтероцитов удалена, стрелки — поры в базальной мембране эпителия ворсинки тощей кишки; з — хиломикрон (толстая стрелка) в контакте; кавеолы с четкой шейкой в эндотелиоците (тонкая стрелка) после химической фиксации; и — открытый контакт (стрелка), заполненный хиломикронами (звездочка). а, ж — сканирующая электронная микроскопия; б — об.60 (водная иммерсия), ок.12,5. Окраска толудиновым синим; в, г — об.20, ок.12,5; д, е, з, и — трансмиссионная электронная микроскопия

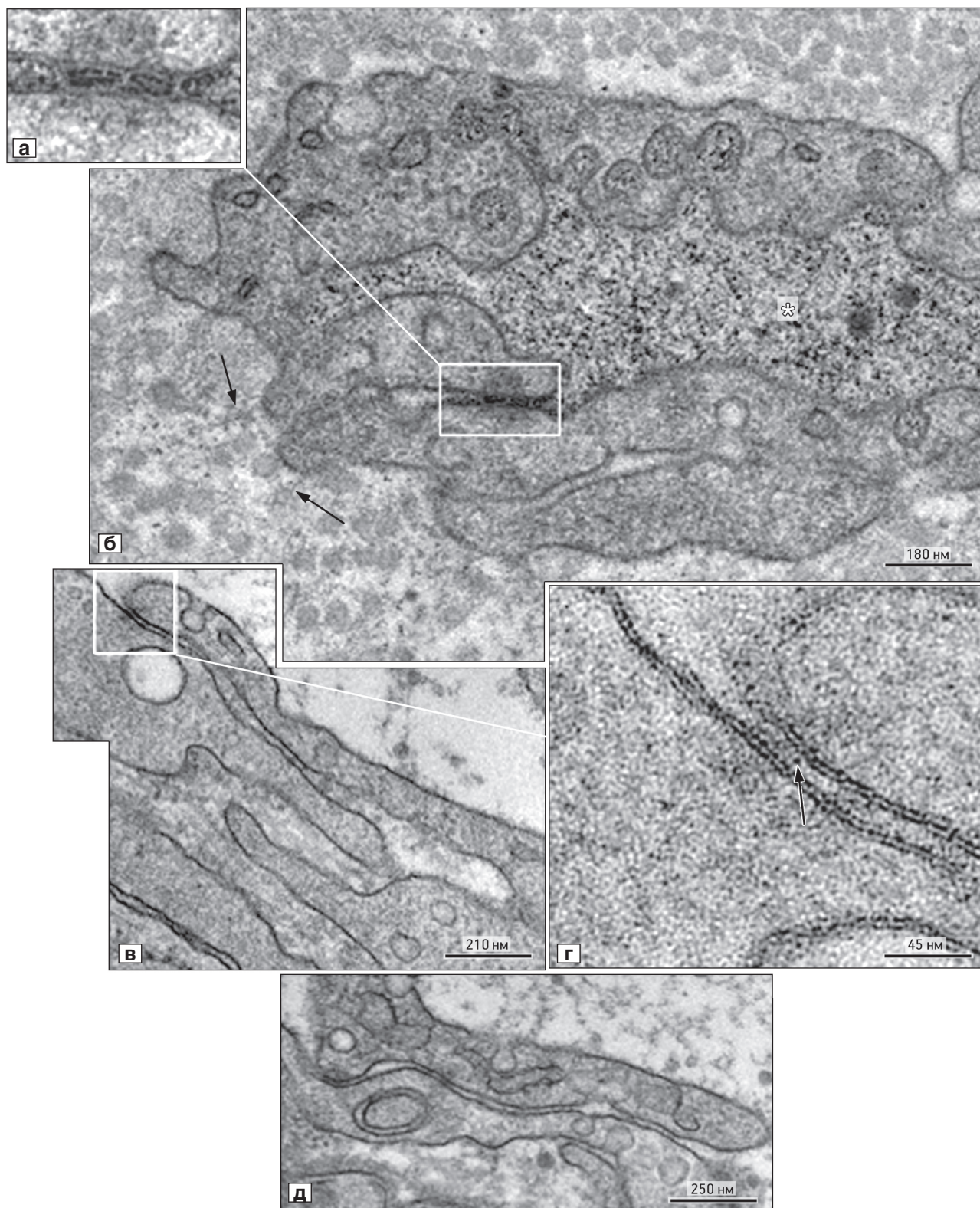


Рис. 4. Межэндотелиоцитарные контакты в лимфатическом капилляре (ЛК) кишечной ворсинки мыши.

а — плотное межэндотелиоцитарное соединение; б — межэндотелиоцитарный контакт, включающий плотное соединение, представленное на рис. а; просвет ЛК — звездочка, стропные филаменты — стрелки; в — межэндотелиоцитарное адгезивное соединение; г — межэндотелиоцитарное адгезивное соединение (стрелка), очерченное квадратом на рис. в; д — межэндотелиоцитарный контакт, не имеющий специализированных соединений. Трансмиссионная электронная микроскопия

менты расположены на аблюминальной поверхности ЭЦ ЛК и идут от конечного края подлежащей клетки (но не от «языка», покрывающего данную клетку с люминальной поверхности другого ЭЦ). «Язык» прикреплен к люминальной поверхности точечными адгезивными соединениями, что удерживает клапан от выворачивания.

Участки аблюминальной части плазмолеммы в начале межэндотелиоцитарного контакта в большинстве случаев соединены стропными филаментами с окружающими коллагеновыми фибриллами или эластическими волокнами (см. рис. 4, б). Напротив, в ЛС, расположенных в подслизистой основе и серозной оболочке тонкой кишки, межэндотелиоцитарные контакты всегда содержат плотные соединения.

Факт, что после сверхбыстрого замораживания под высоким давлением подавляющее большинство кавеол в ЭЦ ЛК не имеют узкой шейки (см. рис. 1, а, б), свидетельствует о том, что они не могут отщепляться от плазмолеммы и играют незначительную роль в обеспечении трансэндотелиального транспорта.

Изучение ЛК кишечных ворсинок после кормления животных подсолнечным маслом показало [5], что липидные капли всасываются через межэндотелиоцитарные соединения ЛК, где нет плотных соединений (см. рис. 3 е, з, и). Сканирующая электронная микроскопия продемонстрировала, что после сдувания энтероцитов с базальной мембраны в ней обнаруживаются крупные поры (по-видимому, для прохода хиломикронов) (см. рис. 3, ж).

На серийных электронно-микроскопических срезах видно [29, 30], что щель контакта идет косо от концевой «языка» подлежащей клетки до конца люминального «языка» накрывающей клетки. Описаны даже каналы, соединяющие полость брюшины и просвет ЛС [30]. На рисунках G.Azzali [29] также видно точечное, слабо выраженное, адгезивное соединение между верхушкой цитоплазматического плоского отростка (т. е. пластинки, накрывающей межэндотелиоцитарный контакт) и подлежащим ЭЦ.

Между тем, исследования проницаемости стенок ЛК и ЛС дали противоречивые результаты. Обычно при введении трайсера (видимого под световым или обнаруживаемого под электронным микроскопом вещества) в интерстиций он захватывается ЛК, накапливается в нём, а затем перемещается в ЛПК [1]. Однако нередко захваченный трайсер хорошо выявлялся в цепочках ЛПК, в то время как его накопление в ЛК не обнаруживалось. Учитывая, что ЛПК в составе лимфатических сетей явно преобладают, а суммарная пло-

щадь их резорбирующей поверхности в 2–8 раз превосходит площадь поверхности ЛК, было сделано предположение, что ЛПК также участвуют в резорбции белка, поступающего в интерстициальное пространство [1]. Мы не можем отрицать вклад ЛПК в резорбцию белков, но не согласны с их участием в резорбции экзосом и других крупных частиц типа хиломикронов: в них для этого нет соответствующих структур.

Процесс образования лимфы может быть разделен на стадии.

I стадия. Происходит сдавливание ткани: сокращение кишечной ворсинки или стенки кишки, мышц, внешнее давление на подкожную основу, дыхательные движения. При этом давление передается в просвет ЛК, и его содержимое давит на внутрипросветный клапан, отделяющий ЛК от ЛПК; клапан открывается, и лимфа из ЛК уходит в ЛПК (рис. 5, а).

II стадия. Прекращение давления (происходит расслабление мышц и т. д.). За счет эластичности тканей орган возвращается к своей первоначальной форме. Стропные филаменты, прикрепленные к эластическому каркасу, тянут аблюминальную часть плазмолеммы ЭЦ в разные стороны, и в просвете ЛПК создается давление ниже, чем в интерстиции. Поэтому давление в ЛПК закрывает внутрипросветный клапан, отделяющий ЛК и ЛПК (см. рис. 5, б).

Известно, что в ЛК и ЛС до уровня лимфатического узла гидростатическое давление внутри их просвета немногим выше атмосферного. Напротив, гидростатическое давление в интерстиции равно атмосферному или чуть ниже его (1–5 мм вод. ст.) [70]. Интерстициальная жидкость давит на аблюминальную поверхность тонкого пласта ЭЦ, который сверху косо накрывает межэндотелиоцитарное соединение. Его основание растягивается стропными филаментами, тем самым пласт отклеивается от подлежащего пласта цитоплазмы ЭЦ, так как «склеивание» белков LYVE-1 и PECAM непрочно. Пласты друг от друга отходят, образуя канал, через который проникает в просвет взвесь интерстициальной жидкости со всеми ее компонентами. Однако люминально расположенный пласт сохраняет свою ориентацию и не сдвигается, так как он имеет точечное адгезивное соединение с аблюминальным пластом.

III стадия. Новое сдавливание ткани ведет к тому, что поступившая в просвет ЛК «взвесь» давит на внутрипросветный клапан, и он открывается. Содержимое ЛК перемещается в ЛПК. Внутриворочные клапаны закрываются и не позволяют лимфе вытекать из ЛК обратно в

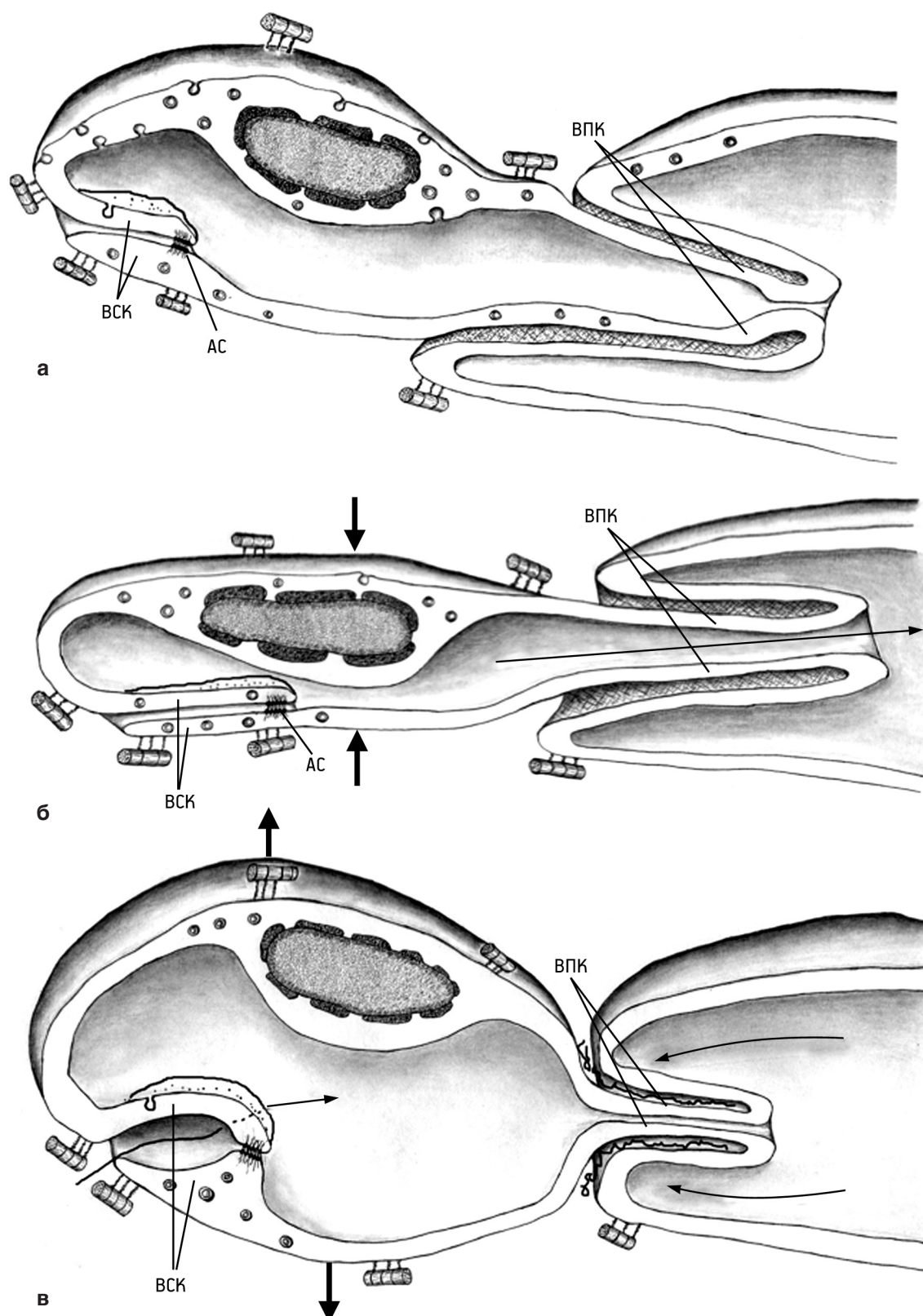


Рис. 5. Схема работы внутристеночного клапана лимфатического капилляра (ЛК).

а — внутрипросветный клапан (ВПК) в спокойном состоянии; внутристеночный клапан (ВСК) в области косого межэндотелиоцитарного контакта; адгезивное соединение (АС); б — ЛК сдавливается противоположно направленными силами (стрелки), лимфа выходит из ЛК в лимфатический посткапилляр (ВПК). ВСК закрыт; в — сдавленный участок ткани возвращается в исходное положение (разнонаправленные толстые стрелки) за счет эластичности соединительнотканного каркаса органа; давление в просвете ЛК понижается, что приводит к обратному движению лимфы (длинные стрелки справа) и закрытию ВПК. Одновременно стенки межэндотелиоцитарного контакта отходят друг от друга под давлением интерстициальной жидкости, которая проникает (длинная стрелка) через щель контакта в просвет ЛК, вовлекая за собой взвесь из интерстиция

интерстиций [70]. Давление внутри просвета как бы придавливает люминальные «языки» цитоплазмы ЭЦ к подлежащим клеткам и ведет к их легкому «склеиванию». Люминальный пласт ЭЦ снова занимает правильное положение и «склеивается» с нижележащим аблюминальным пластом за счет взаимодействия белков контакта LYVE-1 и PECAM. Далее все повторяется (см. рис. 5, в).

Периодические изменения окружающего интерстициального давления обеспечивают также движение лимфы по ЛС, не имеющим в своем составе ГМ, но обладающими внутрисосудными клапанами, которые в этом процессе играют основную роль [12]. С другой стороны — ГМ стенок лимфатических коллекторов и протоков способны сокращаться и проталкивать порцию лимфы в более проксимальный лимфангион [74].

Агрегаты белков, инородные агенты и мембранные структуры по лимфоносным сосудам попадают в лимфатические узлы. Следовательно, внутрисосудные клапаны ЛК способствуют доставке информации о чужеродных агентах и мутированных белках в центры иммунного контроля, где находятся клетки, которые отвечают за иммунный ответ. При возникновении опухоли, как только клетка перерождается, она начинает усиленно выделять экзосомы в ткань. После того как информация о перерождении обработана в лимфатическом узле, туда подрастают ЛК, которые растут быстрее, чем кровеносные капилляры [75]. Вот почему в подавляющем числе случаев метастазирование рака происходит в ближайшие лимфатические узлы, расположенные по ходу лимфотока [64]. Образование экзосом с их последующей резорбцией в ЛК может быть новым неизвестным ранее механизмом иммунного контроля организма.

Заключение. Таким образом, за последние годы наши знания о молекулярных и ультраструктурных механизмах функционирования ЛК и ЛС существенно обогатились. Описаны внутрисосудные клапаны в ЛК трахеи и ЛК кишечной ворсинки, обеспечивающие активное поступление интерстициальной жидкости в просвет ЛК. Идентификация внутрисосудных клапанов и механизмов их функционирования позволяет по-новому взглянуть на проблемы переноса генетической информации, иммунного контроля внутренней среды организма и развития опухолей. На очереди полная расшифровка молекулярных механизмов образования и транспорта лимфы и развития лимфатической системы в онтогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Банин В.В. Механизмы обмена внутренней среды. М.: Изд-во РГМУ, 2000.

2. Выренков Ю.Е., Калашникова Н.А., Харитонов А.Ю. Особенности строения лимфатического посткапилляра // Вестн. лимфологии. 2008. № 1. С. 17–22.
3. Выренков Ю.Е., Шишло В.К., Миронов А.Н., Миронов В.А. Микрорельеф внутренней поверхности грудного протока собак // Арх. анат. 1988. Т.95, вып. 9. С.31–35.
4. Жданов Д.А., Шахламов В.А. Сравнительное электронно-микроскопическое исследование строения стенок кровеносных и лимфатических капилляров // Арх. анат. 1964. Т.75, вып. 10. С.13–18.
5. Карелина Н.Г. Морфогенез, микроскопическая анатомия и ультраструктура ворсинок тощей кишки (экспериментально-морфологическое исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1994.
6. Куприянов В.В., Банин В.В., Король А.П. Структура и функция лимфатических посткапилляров (механизм сопряжения процессов интерстициального транспорта и лимфатической резорбции) // Арх. анат. 1989. Т.96, вып. 6. С.31–49.
7. Куприянов В.В., Бородин Ю.И., Караганов Я.Л., Выренков Ю.Е. Микролимфология. М.: Медицина, 1983.
8. Куприянов В.В., Миронов В.А., Миронов А.А. Базальная мембрана сосуда эндотелия // Успехи соврем. биол. 1985. Т.100, № 2. С.243–256.
9. Лобов Г.И., Орлов Р.С., Костикова М.А. Активные и пассивные механические свойства стенки лимфангиона // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1989. Т.78. С.218–226.
10. Миронов А.А., Миронов В.А. Микроангиоархитектоника (внутриорганные кровеносные русла). Иваново: Изд-во ИГМИ, 1990.
11. Петренко В.М. Конституция лимфатической системы // Бюл. Сибирск. отд. РАМН. 2012. Т.32, № 2. С.29–35.
12. Петунов С.Г., Орлов Р.С., Кривченко А.И. Регуляторные механизмы транспорта лимфы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2010. Т.9, № 3. С.4–14.
13. Сапин М.Р., Борзяк Э.И. Внеорганные пути транспорта лимфы. М.: Медицина, 1982.
14. Сапин М.Р., Этинген Л.Е. Иммунная система человека. М.: Медицина, 1996.
15. Сесорова И.С. Морфофункциональные особенности регенерации эндотелия грудного протока (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1995.
16. Сесорова И.С., Лазоренко Т.В. Оценка состояния эндотелиального монослоя после резэндотелизации участка криоповреждения грудного протока // Морфология. 2009. Т.136, вып. 6. С.57–61.
17. Сесорова И.С., Миронов А.А. Морфология эндотелия клапанного аппарата грудного протока // Вестн. лимфологии. 2009. № 2. С.17–19.
18. Фильченков А.А. Лимфангиогенез и метастазирование опухолей // Онкология. 2009. Т.11, № 2. С.94–103.
19. Шахламов В.А. Капилляры (электронно-микроскопическое исследование). М.: Медицина, 1971.
20. Шахламов В.А., Цамерян А.П. Очерки по ультраструктурной организации лимфатической системы. Новосибирск: Наука, 1982.
21. Шведавиченко А.И., Бочаров В.Я. О лимфатическом посткапилляре // Морфология. 2007. Т.131, вып. 2. С.81–83.

22. Шишло В.К., Миронов А.А. Лимфо- и гемомикроциркуляторное русло лимфатического узла по данным сканирующей электронной микроскопии // *Арх. анат.* 1990. Т.99, № 11. С.35–43.
23. Шишло В.К., Сесорова И.С., Миронов А.А. Филогенез и онтогенез лимфатической системы // *Вестник лимфологии.* 2013. № 4. С.10–17.
24. Этинген Л.Е. Библиография отечественных работ по лимфатической системе. Душанбе: Дониш, 1988.
25. Alders M., Hogan B.M., Gjini E. et al. Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41, № 12. P. 1272–1274.
26. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease // *Nat. Med.* 2011. Vol. 17, № 11. P. 1371–1380.
27. Alitalo K., Tammela T., Petrova T.V. Lymphangiogenesis in development and human disease // *Nature.* 2005. Vol. 438, № 7070. P. 946–953.
28. Aspelund A., Antila S., Proulx S.T. et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules // *J. Exp. Med.* 2015. Vol. 212, № 7. P. 991–999.
29. Azzali G. The lymphatic vessels and the so-called «lymphatic stomata» of the diaphragm: a morphologic ultrastructural and three-dimensional study // *Microvasc. Res.* 1999. Vol. 57, № 1. P. 30–43.
30. Azzali G., Vitale M., Arcari M.L. Ultrastructure of absorbing peripheral lymphatic vessel (ALPA) in guinea pig Peyer's patches // *Microvasc. Res.* 2002. Vol. 64, № 2. P. 289–301.
31. Baluk P., Fuxe J., Hashizume H. et al. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels // *J. Exp. Med.* 2007. Vol. 204, № 10. P. 2349–2362.
32. Bannykh S.I., Bannykh G.V., Mironov A.A. The tunica media of the thoracic duct contains a heterogeneous population of muscle cells // *Acta. anat.* 1994. Vol. 150. P. 186–190.
33. Bannykh S.I., Mironov A.A.Jr., Bannykh G.V., Mironov A.A. Regeneration of the endothelium in the canine and feline thoracic duct // *Tissue Cell.* 1994. Vol. 26, № 6. P. 807–816.
34. Bannykh S.I., Mironov A.A.Jr., Bannykh G.V., Mironov A. The morphology of valves and valve-like structures in canine and feline thoracic duct // *Anat. Embryol.* 1995. Vol. 192. P. 265–274.
35. Bannykh S.I., Sesorova I.S., Mironov A.A. Jr. et al. The valvular apparatus and tissue organization of the endothelium of the thoracic duct // *Morfologiya.* 1996. Vol. 109, № 1. P. 40–50.
36. Bazigou E., Xie S., Chen C. Integrin- α 9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis // *Dev. Cell.* 2009. Vol. 17, № 2. P. 175–186.
37. Bussmann J., Bos F.L., Urasaki A. et al. Arteries provide essential guidance cues for lymphatic endothelial cells in the zebrafish trunk // *Development.* 2010. Vol. 137, № 16. P. 2653–2657.
38. Cao X., Surma M.A., Simons K. Polarized sorting and trafficking in epithelial cells // *Cell Res.* 2012. Vol. 22, № 5. P. 793–805.
39. D'Amico G., Jones D.T., Nye E. et al. Regulation of lymphatic-blood vessel separation by endothelial Rac1 // *Development.* 2009. Vol. 136, № 23. P. 4043–4053.
40. Ebata N., Nodasaka Y., Sawa Y. et al. Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels // *Microvasc. Res.* 2001. Vol. 61, № 1. P. 40–48.
41. Ebata N., Sawa Y., Nodasaka Y. et al. Immunoelectron microscopic study of PECAM-1 expression on lymphatic endothelium of the human tongue // *Tissue Cell.* 2001. Vol. 33, № 3. P. 211–218.
42. Földi M. Convincing evidence for the pumping activity of lymphatics // *Acta Physiol (Oxf.).* 2006. Vol. 186, № 4. P. 319.
43. François M., Caprini A., Hosking B. et al. Sox18 induced development of the lymphatic vasculature in mice // *Nature.* 2008. Vol. 45, № 7222. P. 643–647.
44. Francois M., Harvey N.L., Hogan B.M. The transcriptional control of lymphatic vascular development // *Physiology (Bethesda).* 2011. Vol. 26, № 3. P. 146–155.
45. Gashev A.A., Davis M.J., Gasheva O.Y. et al. Methods for lymphatic vessel culture and gene transfection // *Microcirculation.* 2009. Vol. 16, № 7. P. 615–628.
46. Gerli R., Solito R., Weber E., Aglianó M. Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics // *Lymphology.* 2000. Vol. 33, № 4. P. 148–157.
47. Hallmann R., Horn N., Selg M. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85, № 3. P. 979–1000.
48. He W., Ladinsky M.S., Huey-Tubman K.E. et al. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography // *Nature.* 2008. Vol. 455, № 7212. P. 542–546.
49. Hermans K., Claes F., Vandevelde W. et al. Role of syneclin in lymphatic development in zebrafish and frogs // *Blood.* 2010. Vol. 116, № 17. P. 3356–3366.
50. Hogan B.M., Bos F.L., Bussmann J. et al. Ccbe1 is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41, № 4. P. 396–398.
51. Hong Y.K., Harvey N., Noh Y.H. et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate // *Dev. Dyn.* 2002. Vol. 225, № 3. P. 351–357.
52. Hu G., Place A.T., Minshall R.D. Regulation of Endothelial Permeability by Src Kinase Signaling: Vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules // *Chem. Biol. Interact.* 2008. Vol. 171. P. 177–189.
53. Hu G., Vogel S.M., Schwartz D.E. et al. Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveola-mediated pulmonary vascular hyperpermeability // *Circ. Res.* 2008. Vol. 102. P. 120–131.
54. Isola A.L., Chen S. Exosomes: The Messengers of Health and Disease // *Curr Neuroparmacol.* 2016. Aug 25. [Epub ahead of print]. (В печати).
55. Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T. et al. Expression of the fmslike tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 3566–3570.
56. Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K. et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins // *Nat. Immunol.* 2004. Vol. 1, № 1. P. 74–80.
57. Karkkainen M.J., Saaristo A., Jussilaet L. et al. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 12677–12682.
58. Karpanen T., Wirzenius M., Mäkinen T. et al. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation // *Am. J. Pathol.* 2006. Vol. 169, № 2. P. 708–718.
59. Kesler C.T., Liao S., Munn L.L., Padera TP. Lymphatic vessels in health and disease // *Rev. Syst. Biol. Med.* 2013. Vol. 5, № 1. P. 111–124.

60. Kolpakov V., Polishchuk R., Bannykh S. et al. Atherosclerosis prone branch regions in human aorta: Microarchitecture and cell composition of intima // *Atherosclerosis* 1996. Vol. 122. P. 173–187.
61. Kowal J., Tkach M., Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes // *Curr. Opin Cell Biol.* 2014. Vol. 29, P. 116–125.
62. Küchler A.M., Gjini E., Peterson-Maduro J. et al. Development of the zebrafish lymphatic system requires VEGFC signalling // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16, № 12. P. 1244–1248.
63. Le Lay S., Kurzchalia T.V. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1746, № 3. P. 322–333.
64. Leong S.P. The role of the lymphovascular system in cancer metastasis // *Lymphology.* 2011. Vol. 44, № 1. P. 42–44.
65. Mironov A.A., Beznoussenko G.V. The kiss-and-run model of intra-Golgi transport // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13, № 6. P. 6800–6819.
66. Mironov A.A., Weidman P., Luini A. Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules // *J. Cell Biol.* 1997. Vol. 138. P. 481–484.
67. Norrmén C., Ivanov K.I., Cheng J. et al. FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1 // *J. Cell. Biol.* 2009. Vol. 185, № 3. P. 439–457.
68. Poschl E., Schlotzer-Schrehardt U., Brachvogel B. et al. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development // *Development.* 2004. Vol. 131, № 7. P. 1619–1628.
69. Richter T., Floetenmeyer M., Ferguson C. et al. High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveolacytoskeleton interactions // *Traffic.* 2008. Vol. 9, № 6. P. 893–909.
70. Rossi A., Weber E., Sacchi G. et al. Mechanotransduction in lymphatic endothelial cells // *Lymphology.* 2007. Vol. 40, № 3. P. 102–113.
71. Sabesin, S. M., Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine // *J. Lipid Res.* 1977. Vol. 18. P. 496–511.
72. Schmid-Schönbein G.W. The second valve system in lymphatics // *Lymphat. Res. Biol.* 2003. Vol. 1, № 1. P. 25–29.
73. Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins // *Eur. J. Biochem.* 1989. Vol. 180. P. 487–502.
74. Zawieja D.C. Contractile physiology of lymphatics // *Lymphat. Res. Biol.* 2009. Vol. 7, № 2, P. 87–96.
75. Zheng W., Aspelund A., Alitalo K. Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications // *J. Clin. Invest.* 2014. Vol. 124, № 3. P. 878–887.

Поступила в редакцию 12.10.2015
Получена после доработки 28.11.2016

ULTRASTRUCTURAL BASIS OF THE PROCESS OF LYMPH FORMATION

*N.R.Karelina¹, I.S.Sesorova², G.V.Beznusenko³,
V.K.Shishlo⁴, V.V.Sesorov², T.E.Kazakova⁵,
A.A.Mironov³*

The paper contains the concise review of the structure of the various parts of lymphatic bed, together with the new data on the structure, molecular organization and function of the endothelial cells lining the lymphatic bed vessels. The role of caveolae and intramural lymphatic valves in the trans-endothelial transport is evaluated. On the example of the inter-endotheliocyte junctions in the lymphatic capillaries of the intestinal villus, the structural details are described that provide a new insight of the processes of the interstitial fluid and macromolecules during lymph formation. An active mechanism of the interstitial fluid resorption and lymph formation is validated. The hypothesis is proposed that the organization of lymphatic capillaries described is dictated by the necessity of antigen presentation to the immunocompetent cells in the lymph node.

Key words: *lymphatic system, lymphatic vessels, ultrastructure*

¹ Department of Anatomy, St. Petersburg State Pediatric Medical University; ² Department of Anatomy, Ivanovo State Medical Academy; ³ The FIRC Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy; ⁴ RAS Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow; ⁵ Department of Ecology, Ivanovo State University