

НОГОВИЦИНА
Сабина Робертовна

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ЦИРКУЛЯЦИИ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Научный руководитель:

Бгатова Наталия Петровна

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, заведующая
офтальмологическим отделением ГБУЗ НСО
«ГНОКБ»

Фурсова Анжела Жановна

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории стволовой клетки ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН

Майбородин Игорь Валентинович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск

Защита диссертации состоится « » _____ 2019 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117.

Тел./факс: (383) 333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте

http://centercem.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertacionnyj_sovet/

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук



Пальчикова Н. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. В научной литературе остается дискуссионным вопрос о существовании лимфатических сосудов в структурах глаза, так как глаз человека традиционно считается лишенным лимфатической системы, за исключением конъюнктивы, век и слезной железы, в которых наличие лимфатических сосудов является доказанным (Nakao S. et al., 2012). Благодаря появлению специфических молекулярных маркеров эндотелия лимфатических сосудов (Podoplanin, Prox-1, LYVE-1 и др.) стало возможным проведение исследований, ставящих под сомнение общепринятую ранее концепцию.

Интерес к выявлению лимфатических сосудов в органе зрения связан с тем, что в настоящее время до сих пор полностью не ясны механизмы циркуляции внутриглазной жидкости (ВГЖ). Согласно имеющимся представлениям, основными структурами глаза, связанными с водной динамикой тканевой жидкости, являются цилиарное тело (место продукции тканевой жидкости), трабекулярная сеть и увеосклеральный путь (Goel M. et al., 2010). Полагают, что внутриглазная жидкость выделяется эпителиальной выстилкой цилиарных отростков и оставляет переднюю камеру при обычном пути через трабекулярную сеть, Шлеммов канал и далее через водяные вены, эпи- и интрасклеральные венозные сплетения поступает в системный кровоток (Moustou A. T. et al., 2014). При увеосклеральном пути тканевая жидкость течет через основание радужной оболочки через интерстиций цилиарного тела в супрахориоидальное пространство, двигаясь в склеру. Было предположено, что жидкость проникает в ткани орбиты периокулярно (Johnson M., Erickson K., 2010). Тем не менее, окончательно дренаж жидкости из супрахориоидального пространства не понятен.

По мнению ряда авторов (Gupta N. et al., 2008; Yücel Y.N. et al., 2009; Kim M., et al., 2011), увеосклеральный отток может быть рассмотрен аналогично лимфодренажу тканевой жидкости в других органах. В связи с тем, что внеклеточная жидкость цилиарного тела богата белком, вполне вероятно, что дренаж этой жидкости должен осуществляться лимфатической системой (Kim M. et al., 2011), так как одной из ее функций является поддержание гомеостаза тканевой жидкости и транспорт белков. Существуют экспериментальные данные о наличии лимфатического дренажа глаза у кроликов, овец и приматов. При введении коллоидных растворов, меченных радиоактивным технецием и золотом, в стекловидное тело, переднюю камеру глаза и ретробульбарное пространство, через несколько часов метки обнаруживались вдоль оболочек зрительного нерва, в поверхностных и глубоких шейных лимфатических узлах, поднижнечелюстных узлах (Gruntzig J. et al., 1977; Sherman D. et al., 1993). При использовании флуоресцентных меток был показан путь миграции меченых макрофагов от глаза до шейных лимфатических узлов при хориоидальной неоваскуляризации, что свидетельствует о существовании взаимосвязи между глазным дном и шейными лимфоузлами (Nakao S. et al., 2013).

Особый интерес к выявлению лимфатической системы в органе зрения возник в связи с открытием лимфатической системы оболочек головного мозга (Iliff J. J. et al., 2012; Aspelund A. et al., 2015). Ранее головной мозг человека считался лишенным лимфатической системы, но последние исследования в этой области доказывают наличие путей взаимодействия между спинномозговой и тканевой жидкостью через лимфатическую систему, в которой транспорт молекул из интерстиция осуществляется по параваскулярным пространствам и отросткам астроцитов. Существуют данные, свидетельствующие о том, что лимфатическая система может также иметь потенциальную значимость для понимания патогенеза глаукомы (Wostyn P. et al, 2015), так как глаз, в частности, сетчатка и зрительный нерв, являются компонентами нервной системы.

В настоящее время имеются клинические сведения, показывающие положительное воздействие лимфотропных методов терапии при офтальмологических заболеваниях (Черных В.В. и др., 2008; Братко В.И. и др., 2013; Tam A.L. et al., 2013).

Сведения о лимфатическом дренаже глаза представляют интерес для понимания патогенеза глаукомы, механизмов развития воспалительных заболеваний органа зрения, а также для разработки новых, патогенетически обоснованных методов лечения.

Степень разработанности темы исследования. Существование дренажных связей между глазом и шейными лимфатическими узлами было продемонстрировано в экспериментах на животных в 60-90-х гг. XX века (Голубева К.И., 1961; Bill A., 1965; Gruntzig J. et al., 1977; Sherman D. et al., 1993), а исследования энуклеированных глаз человека методом наливов туши показали существование путей направленного тока жидкости между супрахориоидеей и оболочками зрительного нерва (Золотарев А.В. и др., 2008). Однако, до сих пор нет четких анатомических описаний структур, относящихся к лимфатическому дренажу глаза (Gruntzig J., Hollmann F., 2018). К настоящему времени имеются 3 работы, в которых при использовании иммуногистохимических маркеров эндотелиоцитов лимфатических сосудов выявлены лимфатические сосуды в цилиарном теле (Yucel Y.N. et al., 2009; Birke K. et al., 2010; Бородин Ю.И. и др., 2015). В 2015 году были опубликованы данные (Koina M.E. et al., 2015) о визуализации лимфатических сосудов в хориоидее глаза человека, которые были поставлены под сомнение (Heindl L.M. et al., 2015).

В настоящее время имеющиеся научные сведения о лимфатических сосудах в структурах глаза человека противоречивы, что, по-видимому, связано не только с методологическими и техническими сложностями, сопутствующими изучению органа зрения, но и с органоспецифическими особенностями лимфатических структур глаза, не позволяющими однозначно идентифицировать лимфатические сосуды общепринятыми методами. Литературные данные по этой теме являются неоднозначными, что повлекло за собой публикацию, свидетельствующую о необходимости принятия консенсуса по определению точных критериев лимфатических сосудов в органе зрения (Schroedl F. et al.,

2014). Согласно данному консенсусу, определение лимфатических сосудов в органе зрения должно подтверждаться использованием более чем одного маркера лимфатического эндотелия, сравнением с регионами, где существование лимфатических сосудов четко установлено (например, в конъюнктиве) и проведением ультраструктурного анализа.

Цель исследования: Выявить структурную организацию лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости.

Задачи исследования:

1. Методами световой и электронной микроскопии изучить ультраструктурную организацию интерстиция в склере, хориоиде и зрительном нерве глаза человека в условиях нормального внутриглазного давления и при терминальной стадии глаукомы.

2. Провести дифференциальное иммуногистохимическое выявление кровеносных и лимфатических сосудов в образцах конъюнктивы, склеры, хориоидеи и зрительного нерва глаза человека при использовании маркеров эндотелиальных клеток кровеносных сосудов (CD-31, CD-34) и эндотелиальных клеток лимфатических сосудов (Podoplanin, LYVE-1, Prox-1).

3. Провести иммуногистохимическое выявление фибробластов в образцах склеры, хориоидеи и зрительного нерва при использовании маркеров фибробластов (FGFR-1, TE-7, vimentin).

4. Исследовать ультраструктурную организацию эндотелиоцитов лимфатических сосудов конъюнктивы, фибробластов и клеток, имеющих рецепторы к маркерам эндотелиоцитов лимфатических сосудов (Podoplanin, LYVE-1, Prox-1).

5. Провести сравнительное морфометрическое исследование эндотелиоцитов лимфатических сосудов конъюнктивы, фибробластов и клеток, имеющих рецепторы к маркерам эндотелиоцитов лимфатических сосудов (Podoplanin, LYVE-1, Prox-1).

Научная новизна. Впервые в склере, хориоиде и зрительном нерве глаза человека показано, что интерстициальные пространства глаза ограничены волокнистыми структурами, фибробластами и их отростками, которые в условиях нормального внутриглазного давления имеют однонаправленное расположение. Выявленное увеличение размеров интерстициальных пространств и нарушение структуры волокнистого каркаса интерстициальных пространств при терминальной стадии глаукомы свидетельствует об участии интерстиция в несосудистой циркуляции ВГЖ.

При использовании молекулярных маркеров эндотелиоцитов кровеносных сосудов (CD-31, CD-34) и эндотелиоцитов лимфатических сосудов (Podoplanin, LYVE-1, Prox-1), в склере, хориоиде и зрительном нерве глаза человека проведено дифференциальное исследование кровеносных и лимфатических сосудов. Ультраструктурным исследованием показано, что выявленные лимфатические структуры не имеют типичного сосудистого

строения, а представлены каналами, ограниченными клетками, имеющими маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов.

Проведено сравнительное морфометрическое исследование эндотелиоцитов лимфатических капилляров десны и конъюнктивы человека, показавшее, что эндотелиоциты лимфатических капилляров конъюнктивы имеют типичную для лимфатических капилляров ультраструктурную организацию.

Впервые выявлены ультраструктурные особенности клеток, ограничивающих лимфатические каналы. Проведено сравнительное исследование данных клеток и эндотелиоцитов лимфатических капилляров конъюнктивы. С помощью морфометрического анализа показано, что клетки, имеющие маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов, имеют более развитую гранулярную эндоплазматическую сеть, чем эндотелиоциты лимфатических капилляров конъюнктивы, но достоверно меньшее содержание митохондрий и кавеол. По структуре и концентрации внутриклеточных органелл данные клетки в большей степени сходны с фибробластами.

Выявлено отсутствие достоверных различий в величинах объемной плотности митохондрий и кавеол исследованных клеток, имеющих маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов, с фибробластами хориоидеи и конъюнктивы, и достоверное меньшее содержание цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. Показано, что клетки, ограничивающие лимфатические каналы в хориоидее, склере и зрительном нерве глаза человека, положительно окрашиваются на маркеры фибробластов (FGFR-1, TE-7, vimentin).

Полученные результаты впервые позволили сделать заключение о наличии органоспецифических лимфатических каналов в структуре хориоидеи, склеры и зрительном нерве глаза человека, ограниченных фибробластоподобными клетками, имеющими маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе настоящего исследования результаты расширяют современные представления о наличии лимфатических структур в органе зрения человека. Данные о структурной организации интерстициальных пространств (прелимфатиков) в хориоидее, склере, зрительном нерве глаза человека и их изменение в условиях глаукомы свидетельствуют об участии интерстиция в несосудистой циркуляции ВГЖ. Факт наличия прелимфатических путей циркуляции ВГЖ и органоспецифических лимфатических каналов в хориоидее, склере, зрительном нерве и лимфатических лакун в надсосудистой пластинке позволит разработать новые, патогенетически обоснованные методы лечения офтальмологических заболеваний, в частности, глаукомы. Данные настоящего исследования могут быть использованы в преподавании на кафедрах гистологии, эмбриологии и цитологии, патологической анатомии, офтальмологии медицинских университетов и на медицинских факультетах классических университетов по курсу: частная гистология зрительного анализатора, лимфология, глаукома.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В склере, хориоиде и зрительном нерве глаза человека имеют место структурированные интерстициальные пространства, ограниченные коллагеновыми волокнами и фибробластами, являющиеся путями несосудистой циркуляции внутриглазной жидкости.

2. В структуре склеры, хориоидеи и зрительного нерва глаза человека расположены органоспецифические лимфатические каналы, выстланные фибробластоподобными клетками, имеющими маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов.

Апробация результатов работы. Результаты работы представлены и обсуждены на XIII Евразийском симпозиуме «Проблемы саногенного и патогенного эффектов эндо- и экзозекологического воздействия на внутреннюю среду организма» 05-09 июля 2016 г. (г. Чолпон-Ата, Киргизия); The International Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBIOMED-2016) 30-31 августа 2016 г. (г. Новосибирск); II Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» 28 октября 2016 года (г. Иркутск); II Международной морфологической научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины», посвященная памяти профессора М.А. Самотейкина, 14 декабря 2017г. (г. Новосибирск); The International Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBIOMED-2018) 21-22 августа 2018 г. (г. Новосибирск); XIII международной научно-практической конференции памяти академика Ю. И. Бородин «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» 20-21 ноября 2018 г. (г. Новосибирск).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований, 1 статья в журнале, цитируемом в Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, описание материала и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, содержащего 221 источник (57 отечественных и 164 зарубежных). Материалы диссертации изложены на 113 страницах компьютерного текста и иллюстрированы 23 рисунками и 1 таблицей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В качестве объекта исследования были взяты фрагменты энуклеированных по медицинским показаниям глаз пациентов Новосибирского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Для исследования были использованы образцы хориоидеи, склеры, зрительного нерва и конъюнктивы глаза человека.

Забор материала осуществляли сотрудники Новосибирского филиала ФГАУ НМИЦ МНТК Микрохирургия глаза имени академика С.Н.Федорова. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике и проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323 ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», а также требованиями Федерального закона от 27.07.2006 N 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014) "О персональных данных" (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015). Все пациенты дали письменное информированное согласие на исследование биологического материала и использование полученных данных в научных целях. Всем пациентам было проведено стандартное офтальмологическое обследование.

Энуклеацию проводили по медицинским показаниям: при терминальной стадии глаукомы (n=13) и при увеальной меланоме (n=17). При этом пациенты были разделены на 2 группы: группа пациентов с терминальной стадией глаукомы и группа контроля, которую составили пациенты с нормальным ВГД, энуклеация в которой проходила по поводу увеальной меланомы. Меланома хориоидеи располагалась постэкваториально, без распространения на смежные ткани. Для исследования использовали фрагменты глаза, максимально удаленные от области опухолевого роста. В данных образцах не было клеток воспаления или опухолевых клеток и участков фиброза, что дает основание использовать данные фрагменты глаза для исследования структуры сосудистого русла.

Критериями исключения из обеих групп являлись: острые заболевания глаз и обострения хронических заболеваний глаз, неоваскулярная глаукома, увеиты различной этиологии и локализации, тотальный гемофтальм, аутоиммунные процессы любой локализации, сахарный диабет 1 и 2 типов. Средний возраст пациентов составил $68,5 \pm 7,1$ лет. 22 пациента – мужчины, 8 – женщины.

Методы исследования. Для морфологического изучения фрагменты глаза фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Вейгерту - Ван Гизону и с использованием антител.

Использовали антитела к маркерам эндотелиальных клеток кровеносных сосудов (CD-31, CD-34) и лимфатических сосудов (LYVE-1, Podoplanin и Prox-1), к коллагену IV типа, являющегося маркером базальных мембран сосудов, к маркеру рецептора к фактору роста фибробластов FGFR-1 и к маркерам фибробластов TE-7 и vimentin. Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартной методике. Полученные препараты глаза изучали в световом микроскопе «LEICA DME» (Германия).

Для исследования в электронном микроскопе фрагменты глаза размером до 1 мм^3 фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере (pH=7,4),

дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом "LEICA DME" и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония). Работа проводилась на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Морфометрический анализ проводили на цифровых микрофотографиях с увеличением $\times 8000$ с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США). Проводили измерение размеров интерстициальных пространств в хориоиде, склере и зрительном нерве глаза человека в условиях нормального ВГД и при терминальной стадии глаукомы; за интерстициальные пространства принимали электронно-светлые пространства в строме соединительной ткани, ограниченные коллагеновыми волокнами, фибробластами и их отростками.

Для выявления возможных структурных отличий эндотелия лимфатических капилляров конъюнктивы от лимфатических сосудов другой локализации, нами были проанализированы цифровые микрофотографии лимфатических капилляров десны человека, полученные в разные годы сотрудниками кафедры терапевтической стоматологии НГМУ (Белокрылова Е.Г. и др., 2003; Петрова Т.Г. и др., 2008). Для проведения морфометрического исследования объемных плотностей оргanelл анализировали эндотелиальные клетки лимфатических капилляров десны, эндотелиальные клетки лимфатических капилляров конъюнктивы, клетки, ограничивающие лимфатические каналы в хориоиде, и фибробласты конъюнктивы (по 30 клеток на группу). В каждой группе определяли объемную плотность (V_v) гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрий и кавеол.

Морфометрический анализ проводили на цифровых микрофотографиях с увеличением $\times 8000$ с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США), используя открытую тестовую систему. Шаг тестовой системы составлял 75 нм.

Среднее значение (M - mean) и стандартное отклонение (SD – standard deviation) вычисляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США). Для сравнения независимых выборок применяли непараметрические методы. Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США) с использованием U -критерия Манна-Уитни. Уровень значимости достоверности различий был принят 95 % ($p < 0,05$).

На графиках для наглядности данные представлены в виде $M \pm SD$.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Структурная организация интерстициальных пространств в хориоидее, склере и зрительном нерве глаза человека. С помощью световой и трансмиссионной электронной микроскопии была изучена структурная организация интерстициальных пространств в сосудистой оболочке, склере и зрительном нерве глаза человека в условиях нормального ВГД и при терминальной стадии глаукомы.

В сосудистой оболочке в условиях нормального ВГД наблюдали структурированные интерстициальные пространства, ограниченные пучками коллагеновых волокон, эластическими волокнами, фибробластами и их отростками. Данные пространства имели однонаправленное расположение параллельно базальной пластинке и вдоль кровеносных сосудов (рис.1, А). На электронных микрофотографиях интерстициальные пространства представляли собой электронно-светлые пространства различной ширины, ограниченные коллагеновыми волокнами, фибробластами и их отростками (рис. 1, Б).

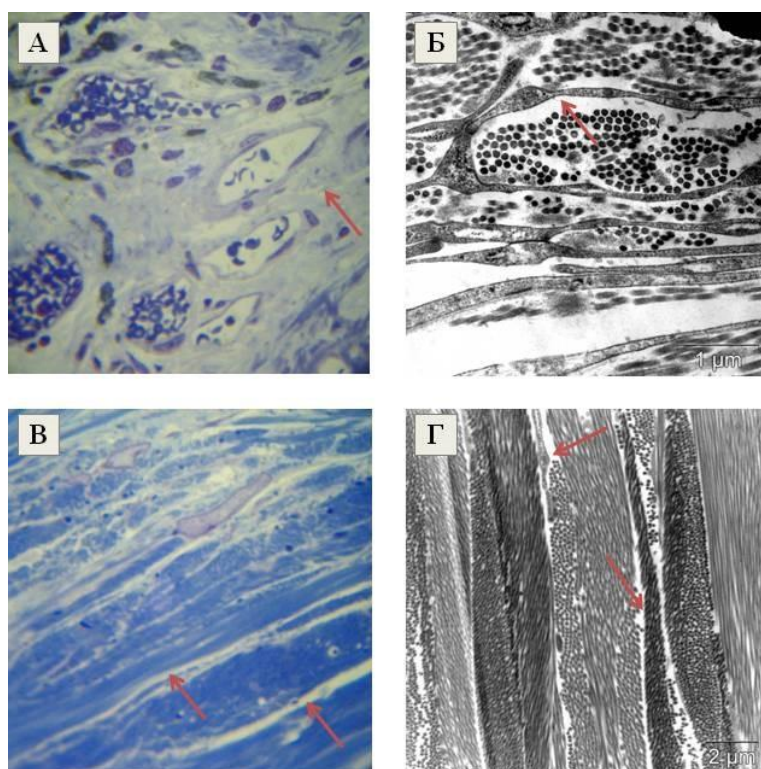


Рисунок 1. Интерстициальные пространства в структурах глаза человека в условиях нормального ВГД: **А** – в хориоидее, **В** – в склере. Окраска толуидиновым синим, увеличение $\times 400$. **Б** – Ультраструктура интерстициальных пространств в хориоидее, увеличение $\times 15000$. **Г** – в склере, увеличение $\times 8000$. Интерстициальные пространства указаны красными стрелками.

При изучении препаратов склеры выявляли структурированные интерстициальные пространства между пучками параллельно направленных коллагеновых волокон и отростками фибробластов (рис. 1, В). На электронных микрофотографиях

интерстициальные пространства представляли собой электронно-светлые щели в строме соединительной ткани склеры, ограниченные коллагеновыми волокнами, фибробластами и их отростками (рис. 1, Г). Интерстициальные пространства оболочек зрительного нерва также были ограничены коллагеновыми волокнами и отростками фибробластов.

При терминальной стадии глаукомы изменялось расположение волокнистых структур – при повышении внутриглазного давления пространственная организация волокон становилась хаотичной, параллельный ход волокон нарушался (рис. 2, А, Б), а размеры интерстициальных пространств увеличивались (рис. 3).

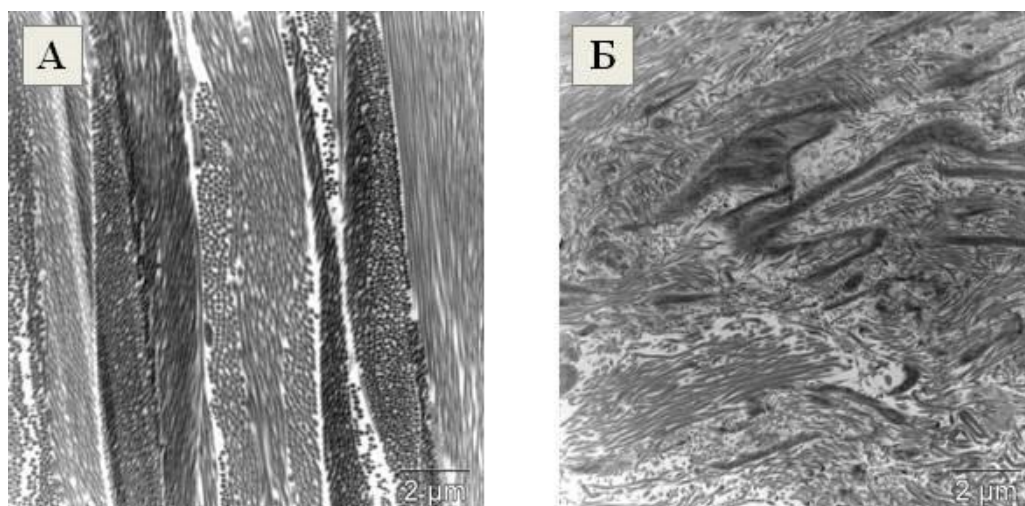


Рисунок 2. Интерстициальные пространства в склере в условиях нормального ВГД (А) и при терминальной стадии глаукомы (Б), увеличение $\times 8000$.

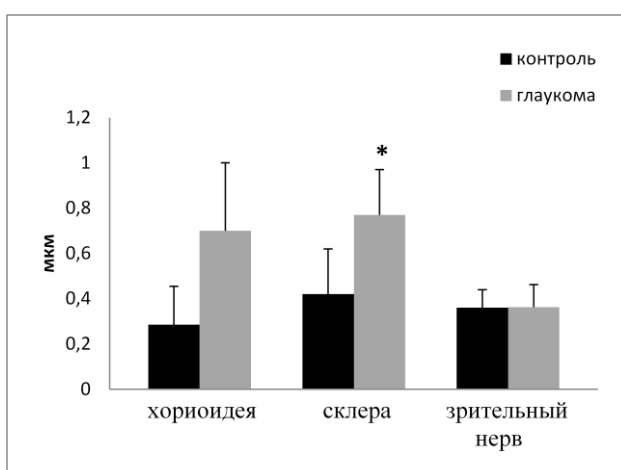


Рисунок 3. Сравнение размеров интерстициальных пространств в хориоидее, склере и оболочках зрительного нерва в условиях нормального ВГД (контрольная группа) и при терминальной стадии глаукомы.

* $p < 0,05$ относительно размеров интерстициальных пространств в контрольной группе.

Таким образом, в склере, хориоидее и зрительном нерве глаза человека выявлены структурированные интерстициальные пространства – прелимфатики, ограниченные коллагеновыми волокнами и фибробластами. Нарушение структуры волокнистого каркаса

интерстициальных пространств и увеличение их размеров при терминальной стадии глаукомы свидетельствует об их участии в несосудистой циркуляции ВГЖ.

Структурная организация лимфатических путей оттока в конъюнктиве, хориоидее, склере и зрительном нерве глаза человека

Структура лимфатических капилляров конъюнктивы. В соответствии со 2м критерием Консенсуса об определении лимфатических сосудов в органе зрения человека (Schroedl F., et al., 2014) мы в первую очередь исследовали лимфатические сосуды в конъюнктиве, где их существование не вызывает сомнений, для последующего сравнения с ними выявленных лимфатических структур в других отделах глаза.

При гистологическом изучении образцов конъюнктивы выявляли лимфатические капилляры, имеющие типичное строение: они образовывали узкие щели, в их просвете отсутствовали эритроциты (рис. 4, А). Лимфатические капилляры в конъюнктиве положительно окрашивались на маркер эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin (рис. 4, Б), и не окрашивались при использовании маркера эндотелиальных клеток кровеносных сосудов CD-31.

Эндотелиальные клетки лимфатических капилляров конъюнктивы имели типичную ультраструктуру, что подтвердилось сравнительным исследованием с эндотелиоцитами лимфатических капилляров десны (Ноговицина С.Р., 2017).

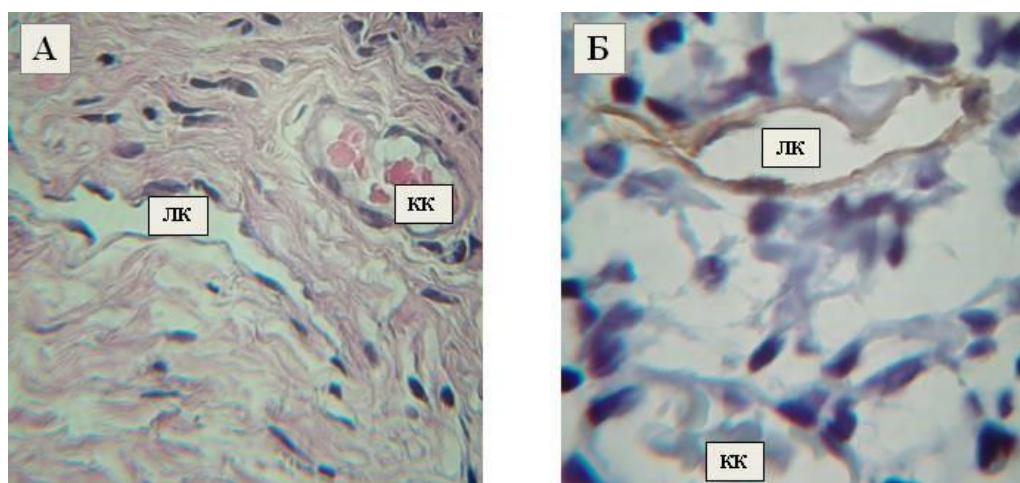


Рисунок 4. Строение конъюнктивы, А – окраска гематоксилином и эозином; увеличение x400. Б – ИГХ –выявление маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin, увеличение x900. КК – кровеносный капилляр, ЛК – лимфатический капилляр.

Структура хориоидеи. При гистологическом изучении образцов хориоидеи в хориокапиллярном слое были выявлены кровеносные капилляры, окруженные рыхлой соединительной тканью, пигментные клетки, а также каналы, напоминающие лимфатические. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелиальных клеток кровеносных сосудов CD-31 подтвердило, что лежащие рядом со слоем пигментных клеток сосуды являются кровеносными капиллярами. Они так же положительно

окрашивались на маркер коллагена IV типа, что свидетельствует о том, что данные сосуды имеют базальную мембрану.

При одновременном иммуногистохимическом исследовании фрагментов хориоидеи на маркеры эндотелия лимфатических сосудов в исследованных образцах наблюдали позитивно окрашенные лимфатические структуры. В хориоидее Podoplanin+ позитивно окрашенные структуры не были типичными сосудами, а были похожи на каналы. Исследование образцов хориоидеи с помощью других маркеров лимфатических сосудов (Prox-1, LYVE-1) подтвердило, что клетки, образующие выявленные нами каналы, экспрессируют маркеры эндотелия лимфатических сосудов (рис. 5, А, Б).

В переходной зоне между сосудистой оболочкой и склерой (надсосудистой пластинке) отмечали большие пространства, ограниченные удлинненными клетками – лакуны. Лакуны положительно окрашивались на маркер эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin.

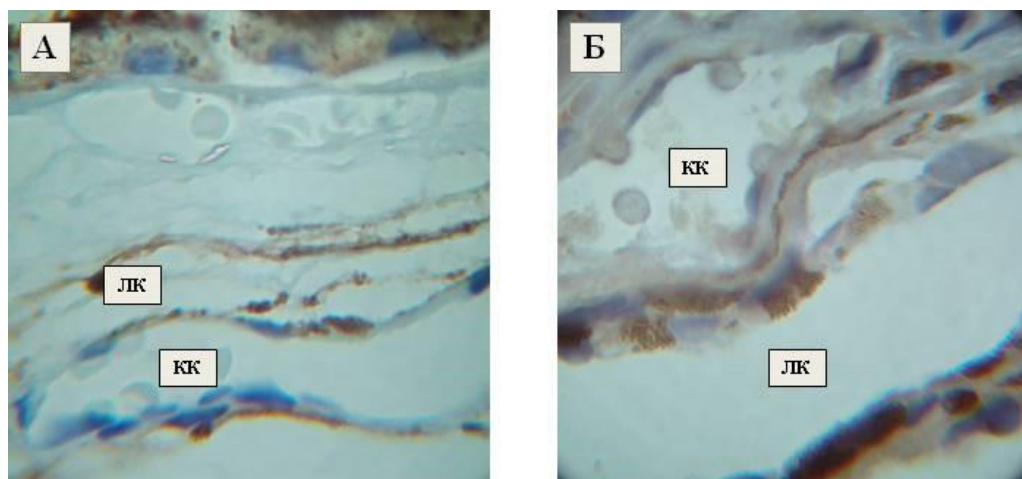


Рисунок 5. Иммуногистохимическое выявление маркеров лимфатических сосудов в хориоидее глаза человека. **А** – иммуногистохимическое выявление маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin, увеличение x400. **Б** – иммуногистохимическое выявление маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Prox-1, увеличение x900. КК – кровеносный капилляр, ЛК – лимфатический канал.

Структура склеры. При гистологическом изучении образцов склеры были выявлены плотно расположенные коллагеновые волокна, кровеносные капилляры, окруженные соединительной тканью, небольшое количество пигментных клеток, а также каналы, напоминающие лимфатические. При иммуногистохимическом окрашивании с помощью маркеров эндотелиальных клеток кровеносных сосудов в склере глаза человека выявляли CD-31-позитивные кровеносные сосуды (рис. 6, А), которые также положительно окрашивались на маркер коллагена IV типа, что свидетельствует о том, что данные сосуды имеют базальную мембрану. При иммуногистохимическом окрашивании с

использованием маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin окрашивались каналы, располагающиеся параллельно кровеносным сосудам (рис. 6, Б).

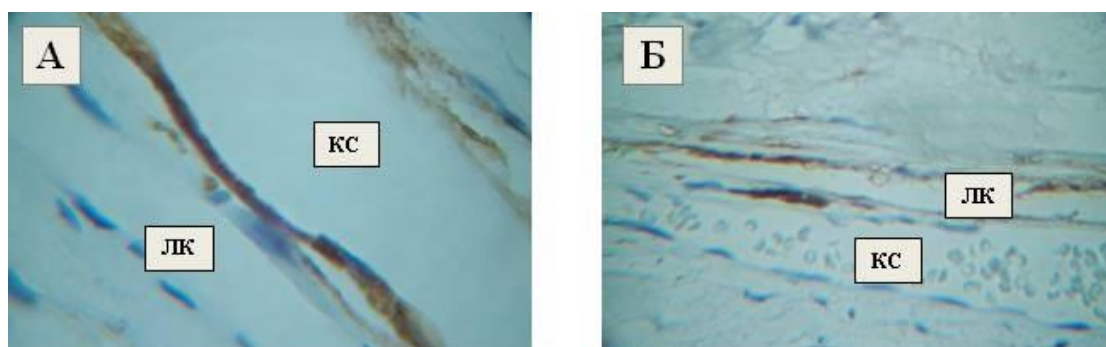


Рисунок 6. Кровеносные сосуды (КС) и лимфатические каналы (ЛК) в склере. **А** – иммуногистохимическое выявление маркера эндотелиальных клеток кровеносных сосудов CD–34, увеличение $\times 900$. **Б** – иммуногистохимическое выявление маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin, увеличение $\times 400$. КС – кровеносный сосуд, ЛК – лимфатический канал.

Структура оболочек зрительного нерва. При гистологическом изучении образцов зрительного нерва выявляли пучки нервных волокон, разделенные септами мягкой мозговой оболочки, а также твердую оболочку, образованную грубыми коллагеновыми волокнами (рис. 7, А). При иммуногистохимическом окрашивании с помощью маркеров эндотелиальных клеток кровеносных сосудов идентифицировали CD–31+позитивные кровеносные сосуды, а при использовании маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin выявляли позитивно окрашенные структуры в твердой оболочке зрительного нерва (рис.7, Б).

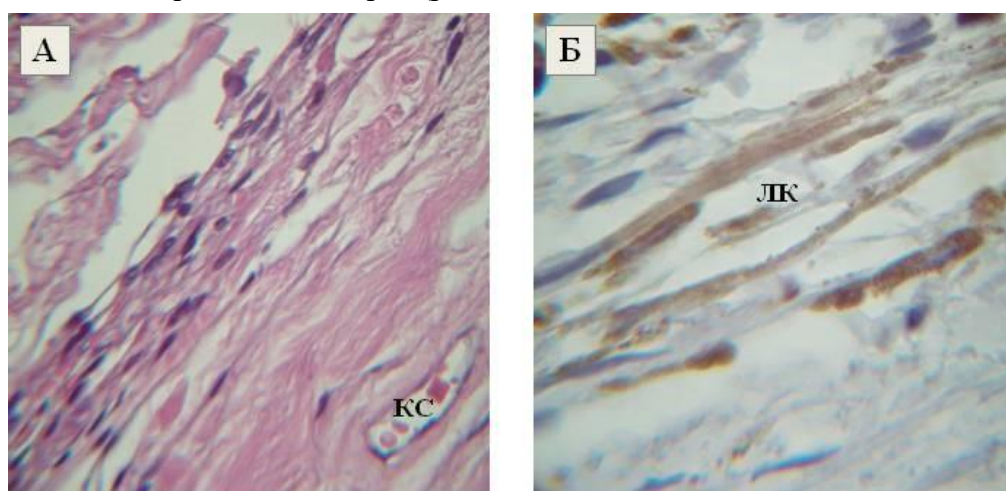


Рисунок 7. Структура зрительного нерва глаза человека. **А** – окрашивание гематоксилином и эозином, **Б** – иммуногистохимическое выявление маркера эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin, увеличение $\times 400$. КС – кровеносные сосуды, ЛК – лимфатический канал.

Таким образом, в хориоиде, склере и зрительном нерве глаза человека были выявлены лимфатические каналы, положительно окрашенные на маркеры эндотелиальных клеток лимфатических сосудов, но не имеющие типичной эндотелиальной выстилки.

Ультраструктурная организация клеток, выстилающих лимфатические каналы. Нами была изучена ультраструктурная организация клеток, образующих каналы в хориоиде и экспрессирующих маркеры эндотелиальных клеток лимфатических сосудов и их сравнение с типичными эндотелиоцитами лимфатических капилляров конъюнктивы.

При электронномикроскопическом исследовании образцов конъюнктивы глаза человека были выявлены лимфатические капилляры, имеющие типичное строение и известные морфологические критерии: отсутствие базальной мембраны, якорные филаменты, отсутствие эритроцитов в просвете сосуда (рис. 8, А). Электронномикроскопическое исследование хориоидеи показало, что структуры, экспрессирующие лимфатические маркеры, образованы клетками, не имеющими типичную для эндотелиоцитов лимфатических сосудов организацию (рис. 8, Б). Каналы в хориоиде были образованы клетками узкой вытянутой формы с длинными отростками, напоминающими по строению фибробласты.

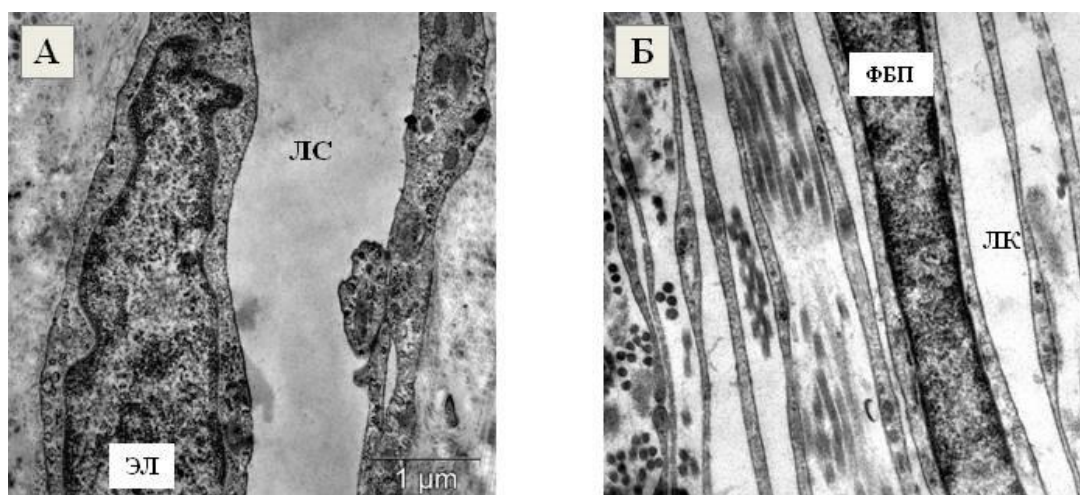


Рисунок 8. Ультраструктура лимфатического капилляра конъюнктивы (А), увеличение $\times 15000$, и лимфатического канала хориоидеи (Б), увеличение $\times 10000$. ЭЛ – эндотелиальная клетка лимфатического сосуда, ЛС – лимфатический сосуд конъюнктивы, ЛК – лимфатический канал хориоидеи, ФБП – фибробластоподобная клетка.

Данные клетки имели развитую гранулярную эндоплазматическую сеть, объемная плотность которой была на 33.8% больше, чем в эндотелиоцитах лимфатических капилляров конъюнктивы, однако меньшее содержание митохондрий (на 52.6%) и меньше кавеол (на 63%) (рис. 9).

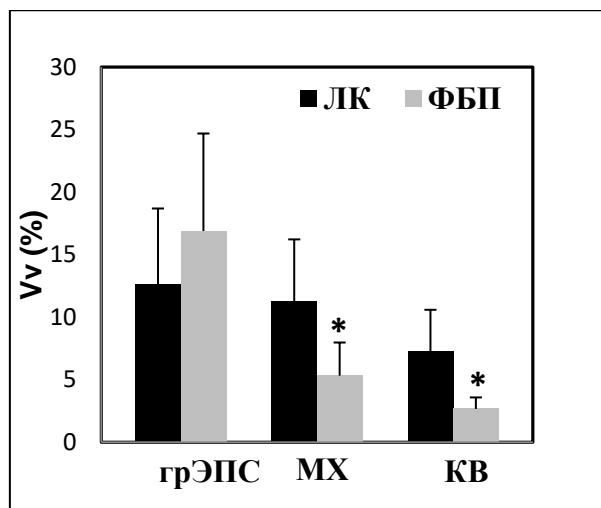


Рисунок 9. Результаты морфометрического исследования ультраструктурной организации лимфатических капилляров конъюнктивы и фибробластоподобных клеток, экспрессирующих лимфатические маркеры в хориоиде. Vv – объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы). ЛК – эндотелиоцит лимфатического капилляра. ФБП – фибробластоподобная клетка. грЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть. МХ – митохондрии. КВ – кавеолы. * $p < 0,05$ относительно соответствующей величины в эндотелии конъюнктивы

Выявленные особенности ультраструктурной организации клеток, ограничивающих каналы хориоидеи и экспрессирующих маркеры лимфатических сосудов, не позволяют идентифицировать их как эндотелиоциты лимфатических сосудов – по структуре и концентрации внутриклеточных органелл данные клетки в большей степени схожи с фибробластами (рис. 10).

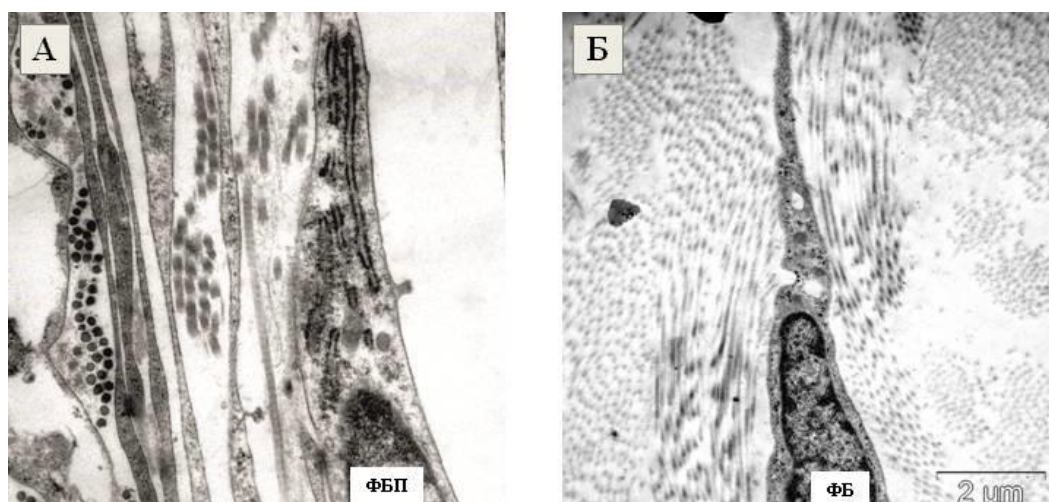


Рисунок 10. А – Фибробластоподобная клетка (ФБП), ограничивающая лимфатические каналы в хориоиде, увеличение $\times 15000$. Б – фибробласт (ФБ) конъюнктивы, увеличение $\times 10000$.

При морфометрическом исследовании объемной плотности органелл, содержащихся в клетках, образующих лимфатические каналы в хориоиде и фибробластов конъюнктивы, и статистической обработке полученных данных была показана достоверно меньшая объемная плотность гранулярного эндоплазматического ретикулума, и не было выявлено достоверных отличий в объемной плотности митохондрий и кавеол (рис. 11).

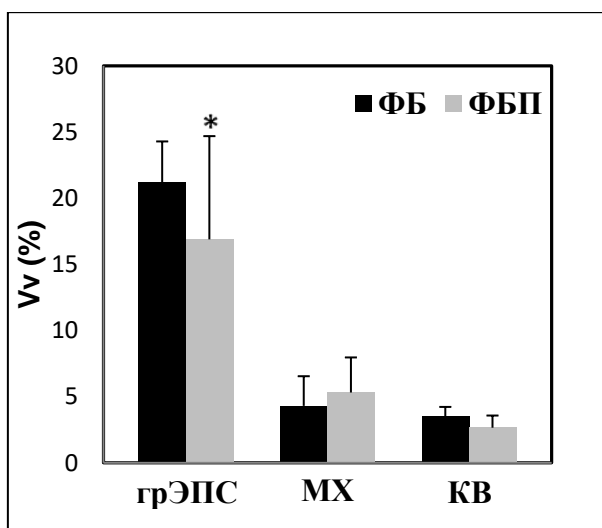


Рисунок 11. Результаты морфометрического исследования ультраструктурной организации фибробластов конъюнктивы и фибробластоподобных клеток, ограничивающих лимфатические каналы в хориоиде. Vv – объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы). ФБ – фибробласт. ФБП – фибробластоподобная клетка. грЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть. МХ – митохондрии. КВ – кавеолы. * $p < 0,05$ относительно соответствующей величины в фибробластах конъюнктивы.

Эти данные свидетельствуют, что клетки, ограничивающие лимфатические каналы являются не типичными эндотелиальными клетками лимфатических сосудов или фибробластами, а фибробластоподобными клетками, экспрессирующими маркеры лимфатического эндотелия.

Иммуногистохимическое выявление маркеров фибробластов. Для подтверждения гипотезы о том, что клетки, ограничивающие лимфатические каналы в хориоиде, относятся к дифферону фибробластов, было проведено иммуногистохимическое исследование образцов хориоидеи с помощью маркеров фибробластов FGFR-1, TE-7, vimentin. В результате было отмечено окрашивание тех же клеток, что и при окрашивании на маркеры эндотелия лимфатических сосудов (рис. 12).

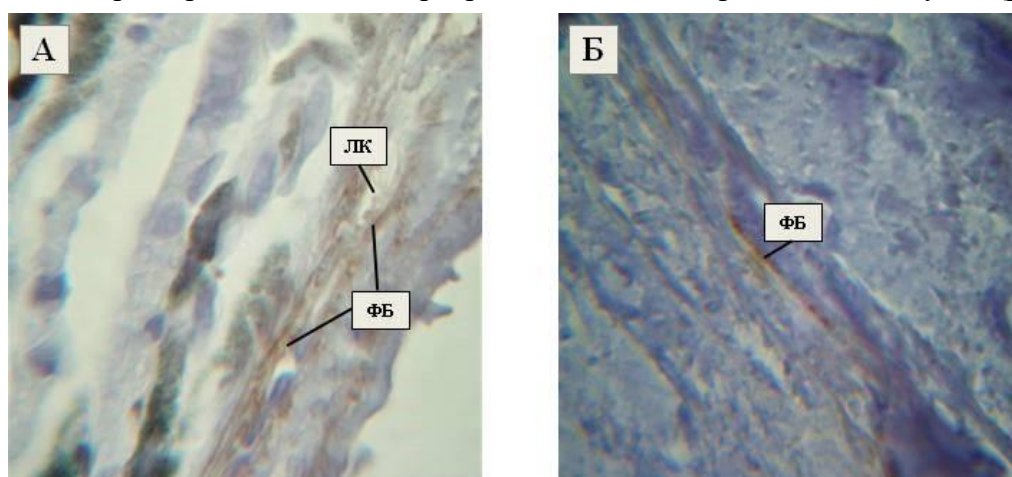


Рисунок 12. TE-7+позитивные фибробласты (ФБ). Иммуногистохимическое выявление маркера фибробластов TE-7 в хориоиде (А), в склере (Б) глаза человека, увеличение $\times 900$. ЛК – лимфатический канал, ФБ – фибробласт.

То есть на маркер эндотелиальных клеток лимфатических сосудов Podoplanin, Prox-1 и LYVE-1, окрашивались фибробласты, лежащие вдоль пигментных клеток и

образующие каналы рядом с кровеносными капиллярами и сосудами. Однако, не все клетки, выстилающие изучаемые нами каналы, окрашивались на маркеры фибробластов TE-7, vimentin, FGFR-1.

Исходя из полученных нами результатов следует, что неоднозначные данные о наличии лимфатической системы в органе зрения человека связаны с наличием в нем органоспецифических лимфатических каналов, не имеющих типичного лимфатического эндотелия, а ограниченных фибробластоподобными клетками, экспрессирующими специфические лимфатические маркеры.

ВЫВОДЫ

1. В склере, хориоиде и зрительном нерве глаза человека расположены структурированные интерстициальные пространства, ограниченные коллагеновыми волокнами и фибробластами. Выявленное увеличение размеров интерстициальных пространств и нарушение их структурированности при терминальной стадии глаукомы свидетельствует об участии интерстиция в несосудистой циркуляции внутриглазной жидкости.

2. Лимфатические пути оттока внутриглазной жидкости в склере, хориоиде и зрительном нерве глаза человека не имеют типичной сосудистой структуры, а представлены каналами, ограниченными клетками, имеющими маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов.

3. Клетки, выстилающие лимфатические каналы, имеют ультраструктурные отличия от эндотелиоцитов лимфатических капилляров конъюнктивы. В цитоплазме клеток, ограничивающих лимфатические каналы, обнаружены более развитая, чем в эндотелиоцитах лимфатических капилляров конъюнктивы, гранулярная эндоплазматическая сеть, но достоверно меньшее, чем в эндотелиоцитах лимфатических капилляров конъюнктивы, содержание митохондрий и микропиноцитозных везикул.

4. По структуре и концентрации внутриклеточных органелл клетки, ограничивающие лимфатические каналы, в большей степени сходны с фибробластами, но отличаются от ультраструктурной организации фибробластов меньшей объемной плотностью цистерн гранулярного эндоплазматического ретикула и меньшим содержанием коллагеновых волокон в микроокружении, то есть являются фибробластоподобными клетками.

5. Использование молекулярных маркеров фибробластов (FGFR-1, TE-7, vimentin) выявило наличие фибробластов в строме склеры, хориоиде и зрительного нерва глаза, которые располагались вдоль коллагеновых волокон, но не всегда маркировали клетки, ограничивающие лимфатические каналы.

6. В структуре хориоидеи, склеры и зрительного нерва глаза человека расположены органоспецифические лимфатические каналы, выстланные фибробластоподобными клетками, имеющими маркеры эндотелиоцитов лимфатических сосудов, что подтверждается иммуногистохимическими исследованиями с использованием

молекулярных маркеров фибробластов (FGFR–1, TE–7, vimentin) и маркеров эндотелиоцитов лимфатических сосудов Podoplanin, LYVE–1, Prox–1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Черных, В.В. Лимфатические структуры в цилиарном теле и хориоидеи глаза человека / В.В. Черных, Ю.И. Бородин, Н.П. Бгатова, **С.Р. Ноговицина**, И.А. Топорков, А.В. Еремина, А.Н. Трунов, В.И. Коненков // Современные технологии в офтальмологии. – 2016. – № 3. – С. 268-270.
2. **Ноговицина, С.Р.** Пути транспорта водянистой влаги в структурах глаза человека в норме и при глаукоме / **С.Р. Ноговицина**, Н.П. Бгатова, Ю.И. Бородин, В.В. Черных, А.Н. Трунов, В.И. Коненков // Хирургия, морфология, лимфология. – 2016. – т.13. – №25 (1–2). – С.96.
3. **Ноговицина, С.Р.** Экспрессия молекулярных лимфатических маркеров в сосудистой оболочке глаза человека / **С.Р. Ноговицина** // Бюллетень Восточно–Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. – 2016. – т.1. – №5 (111). – С. 114–116. (*Из перечня ВАК*)
4. Черных, В.В. Структурные элементы лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в хориоидеи глаза человека в норме и при глаукоме / В.В. Черных, Ю.И. Бородин, Н.П. Бгатова, А.Н. Трунов, Н.С. Ходжаев, **С.Р. Ноговицина**, А.В. Еремина, В.И. Коненков // Офтальмохирургия. – 2016. – № 3. – С. 11–16. (*Из перечня ВАК*)
5. **Nogovitsina, S.R.** Expression of the lymphatic markers (LYVE–1, Prox–1, Podoplanin) in human eyes / **S.R. Nogovitsina**, N.P. Bgatova, Yu.I. Borodin, V.V. Chernykh, A.N. Trunov, V.I. Konenkov // В книге: the International Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBioMed–2016) Abstracts. – 2016. – P.68.
6. **Ноговицина, С.Р.** Лимфатический дренаж сосудистой оболочки глаза человека в норме и при глаукоме / **С.Р. Ноговицина**, Н.П. Бгатова, Ю.И. Бородин, В.В. Черных, А.Н. Трунов, В.И. Братко, В.И. Коненков // В книге: Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям. Материалы материалы XII международной конференции, посвященной 25–летию Научно–исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии. – 2016. – С. 181–183.
7. Черных, В.В. Морфоструктурные изменения в собственно сосудистой оболочке глаза человека при первичной открытоугольной глаукоме / В.В. Черных, Н.С. Ходжаев, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина, **С.Р. Ноговицина**, А.Н. Трунов // Современные технологии в офтальмологии. – 2017. – № 3. – С. 92–93.
8. **Ноговицина, С.Р.** Ультраструктурная организация эндотелиоцитов лимфатических капилляров конъюнктивы глаза человека / **С.Р. Ноговицина** // В книге: Материалы II Международной морфологической научно–практической конференции

студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» / сост. А.П. Надеев. – Новосибирск: ИПЦ НГМУ. – 2017. – С. 156–158.

9. **Ноговицина, С.Р.** Лимфатические сосуды в оболочках зрительного нерва глаза человека / **С.Р. Ноговицина**, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина, А.Н. Трунов, В.В. Черных, В.И. Коненков, Ю.И. Бородин // Вестник Кыргызско–Российского славянского университета. – 2018. – Т. 18. – № 9. – С. 135–137.

10. Черных, В.В. Особенности структурной организации лимфатической системы глаза и их изменения при первичной открытоугольной глаукоме / В.В. Черных, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина, **С.Р. Ноговицина**, А.Н. Трунов // Вестник Кыргызско–Российского славянского университета. – 2018. – Т. 18. – № 6. – С. 105–108.

11. Бородин, Ю.И. Лимфатическая система глаза: обзор / Ю.И. Бородин, Н.П. Бгатова, **С.Р. Ноговицина**, А.Н. Трунов, В.И. Коненков, В.В. Черных // Вестник офтальмологии. – 2018. – Т. 134. – № 2. – С. 86–91. *(Из перечня ВАК)*

12. **Ноговицина, С.Р.** Структурная организация прелимфатических путей движения внутриглазной жидкости в органе зрения человека / **С.Р. Ноговицина**, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина, А.Н. Трунов, В.В. Черных, В.И. Коненков, Ю.И. Бородин // В книге: Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям. Материалы XIII международной научно–практической конференции памяти академика Ю.И. Бородина. – 2018. – С. 85–87.

13. **Ноговицина, С.Р.** Органоспецифические лимфатические структуры хориоидеи глаза человека / **С.Р. Ноговицина**, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина, А.Н. Трунов, В.В. Черных, Т.А. Агеева, В.И. Коненков, Ю.И. Бородин // В книге: Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям. Материалы XIII международной научно–практической конференции памяти академика Ю.И. Бородина. – 2018. – С. 87–88.

14. **Nogovitsina, S.** Detection of the lymphatic capillaries in the optic nerve sheath / **S. Nogovitsina**, N. Bgatova, Yu. Borodin, V. Chernykh, A. Trunov, A. Eremina, V. Konenkov // В книге: The international Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBioMed–2018) – 2018. – P. 104.

15. **Ноговицина, С.Р.** Ультраструктурная организация лимфатических капилляров конъюнктивы и лимфатических каналов хориоидеи / **С.Р. Ноговицина**, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина, А.Н. Трунов, В.В. Черных, В.И. Коненков // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т. 39. – № 3. – С. 21–27. *(Из перечня ВАК)*

16. Бгатова, Н.П. Сравнительная ультраструктурная характеристика лимфатических капилляров различной локализации / Н.П. Бгатова, Ю.С. Таскаева, В.В. Макарова, **С.Р. Ноговицина**, И.С. Гогаева, А.Д. Инешина // Сибирский медицинский вестник. – 2019. – № 2. – С. 4–10.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГД – внутриглазное давление

ВГЖ – внутриглазная жидкость

грЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть

КВ – кавеолы

КК – кровеносный капилляр

КС – кровеносные сосуды

ЛК – лимфатический канал

МХ – митохондрии

ФБ – фибробласт

ФБП – фибробластоподобная клетка

CD-31, CD-34 (cluster of differentiation 31, 34) – кластер дифференцировки 31, 34

FGFR-1 (Fibroblast growth factor receptor 1) – рецептор фактора роста фибробластов

LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) – рецептор гиалуронана 1 эндотелиальных клеток лимфатических сосудов

М (mean) – среднее значение

PROX-1 (Prospero Homeobox Protein 1) – гомеобоксодержащий фактор транскрипции

SD (standard deviation) – стандартное отклонение

Соискатель



С.Р. Ноговицина