

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ КАПИЛЛЯРОВ КОНЬЮНКТИВЫ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ КАНАЛОВ ХОРИОИДЕИ

Сабина Робертовна НОГОВИЦИНА¹, Наталия Петровна БГАТОВА¹,
Алена Викторовна ЕРЕМИНА², Александр Николаевич ТРУНОВ²,
Валерий Вячеславович ЧЕРНЫХ², Владимир Иосифович КОНЕНКОВ¹

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Фёдорова Минздрава России,
Новосибирский филиал
630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

Целью работы было сравнительное изучение ультраструктурной организации лимфатических структур в хориоидеи и конъюнктиве глаза человека. **Материал и методы.** Образцы хориоидеи и конъюнктивы глаза человека изучали методами иммуногистохимического анализа с использованием специфических антител к маркерам эндотелиоцитов кровеносных и лимфатических сосудов, электронно-микроскопического исследования, морфометрии и статистического анализа. **Результаты и их обсуждение.** При одновременном иммуногистохимическом окрашивании образцов конъюнктивы и хориоидеи с использованием антител к маркерам лимфатических сосудов (LYVE-1, Prox1, подоплантин) в структуре конъюнктивы обнаруживали позитивно окрашенные типичные лимфатические сосуды, а в хориокапиллярном слое хориоидеи и переходной зоне между хориоидеей и склерой положительно окрашивались каналы, ограниченные узкими вытянутыми клетками, фибробластами и пигментными клетками. Электронно-микроскопическое исследование выявило, что клетки, экспрессирующие лимфатические маркеры и образующие лимфатические каналы в хориоидеи, имеют ультраструктурную организацию, отличную от типичных эндотелиоцитов лимфатических сосудов конъюнктивы: не имеют стропных филаментов, содержат большую объемную плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и меньшую объемную плотность митохондрий и микропиноцитозных везикул. Полученные данные свидетельствуют, что лимфатические пути оттока внутриглазной жидкости в хориоидеи глаза человека имеют органоспецифические особенности строения.

Ключевые слова: конъюнктивa, хориоидея, лимфатический эндотелий, лимфатические каналы.

Благодаря появлению специфических молекулярных маркеров эндотелия лимфатических сосудов (подоплантин, Prox1, LYVE-1 и др.) стало возможным проведение исследований, ставящих под сомнение общепринятую ранее концепцию, что глаз является алимфатической структурой. Впервые лимфатические капилляры в цилиарном теле глаза были выявлены Y.N. Yücel [14], что вызвало большой интерес среди ученых и повлекло за собой массу попыток подтвердить или опровергнуть факт наличия компонентов

лимфатической системы в различных структурах глаза. Существуют данные об экспрессии клетками хориоидеи специфических маркеров эндотелия лимфатических сосудов [6, 11]. Ранее в сосудистой оболочке глаза нами были продемонстрированы лимфатические каналы в хориокапиллярном слое и широкие лимфатические лакуны в переходной зоне между хориоидеей и склерой [1, 2]. Однако клетки, ограничивающие данные каналы, по структуре не были похожи на эндотелиоциты лимфатических сосудов. Для до-

Ноговицина С.Р. – младший научный сотрудник лаборатории ультраструктурных исследований, e-mail: nogovitsina.niikel@gmail.com

Бгатова Н.П. – д.б.н., проф., зав. лабораторией ультраструктурных исследований, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Еремина А.В. – к.м.н., научный сотрудник, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Трунов А.Н. – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Черных В.В. – д.м.н., проф., директор, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Коненков В.И. – д.м.н., проф., академик РАН, научный руководитель

казательства того факта, что лимфатические пути оттока внутриглазной жидкости в хориоиде имеют органоспецифические особенности строения, было выполнено данное исследование.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение ультроструктурной организации клеток, экспрессирующих лимфатические маркеры в хориоиде, и эндотелиоцитов лимфатических сосудов конъюнктивы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной в настоящем исследовании цели были взяты фрагменты энуклеированных по медицинским показаниям глаз больных с диагнозом «меланома хориоидеи» ($n = 11$, возраст $64,5 \pm 1,2$ года). Меланома хориоидеи располагалась постэкваториально, без распространения на смежные ткани и не влияла на структурную организацию глаза; для исследования были использованы фрагменты хориоидеи, максимально удаленные от области опухолевого роста. В данных образцах структурная организация хориоидеи была не изменена: не было клеток воспаления или опухолевых клеток и участков фиброза, что позволяет сделать вывод о достоверности полученных результатов. В связи с тем, что энуклеация исходно здоровых глаз человека для научных целей невозможна по этическим причинам, выбор объекта является приемлемым для изучения сосудистого русла хориоидеи глаза человека.

Для морфологического изучения биологические образцы хориоидеи и конъюнктивы фиксировали в 4%-м растворе нейтрального формалина, обрабатывали по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и с использованием антител. Все этапы иммуногистохимической (ИГХ) реакции (депарафинизация, демаскировка, инкубация с первичными антителами и т.д.) проводили по стандартной методике. Использовали моноклональные антитела к маркерам эндотелиоцитов кровеносных сосудов CD34 («Novocastra», Германия), лимфатических сосудов LYVE-1 («Abcam», Великобритания), подоплантин («Monosan», Нидерланды) и Prox1 («Covance», Германия). Полученные препараты глаза изучали в световом микроскопе «Leica DME» («Leica Microsystems», Германия).

Для исследования в электронном микроскопе фрагменты хориоидеи и конъюнктивы глаза фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 ч в 1%-м растворе OsO_4 на фосфат-

ном 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» («Leica Microsystems»), окрашивали толудиновым 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» («JEOL», Япония).

Работа проводилась на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Морфометрический анализ (измерение объемных плотностей органелл клеток: митохондрий, гранулярного эндоплазматического ретикулума, микропиноцитозных везикул) выполняли с помощью компьютерной программы Image J («Wayne Rasband», США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили, вычисляя среднеарифметическое значение (M), стандартное отклонение (SD), и представляли в виде $M \pm SD$. Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали, используя U-критерий Манна – Уитни, при уровне достоверности 95 % ($p < 0,05$).

Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323 ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», а также требованиями Федерального закона от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014) «О персональных данных» (с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 01.09.2015). У всех пациентов получено информированное согласие на операции, забор энуклеированного глаза, а также использование данных исследования в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При гистологическом изучении образцов хориоидеи в хориокапиллярном слое выявлены кровеносные капилляры, окруженные рыхлой соединительной тканью, пигментные клетки, а также каналы, напоминающие лимфатические

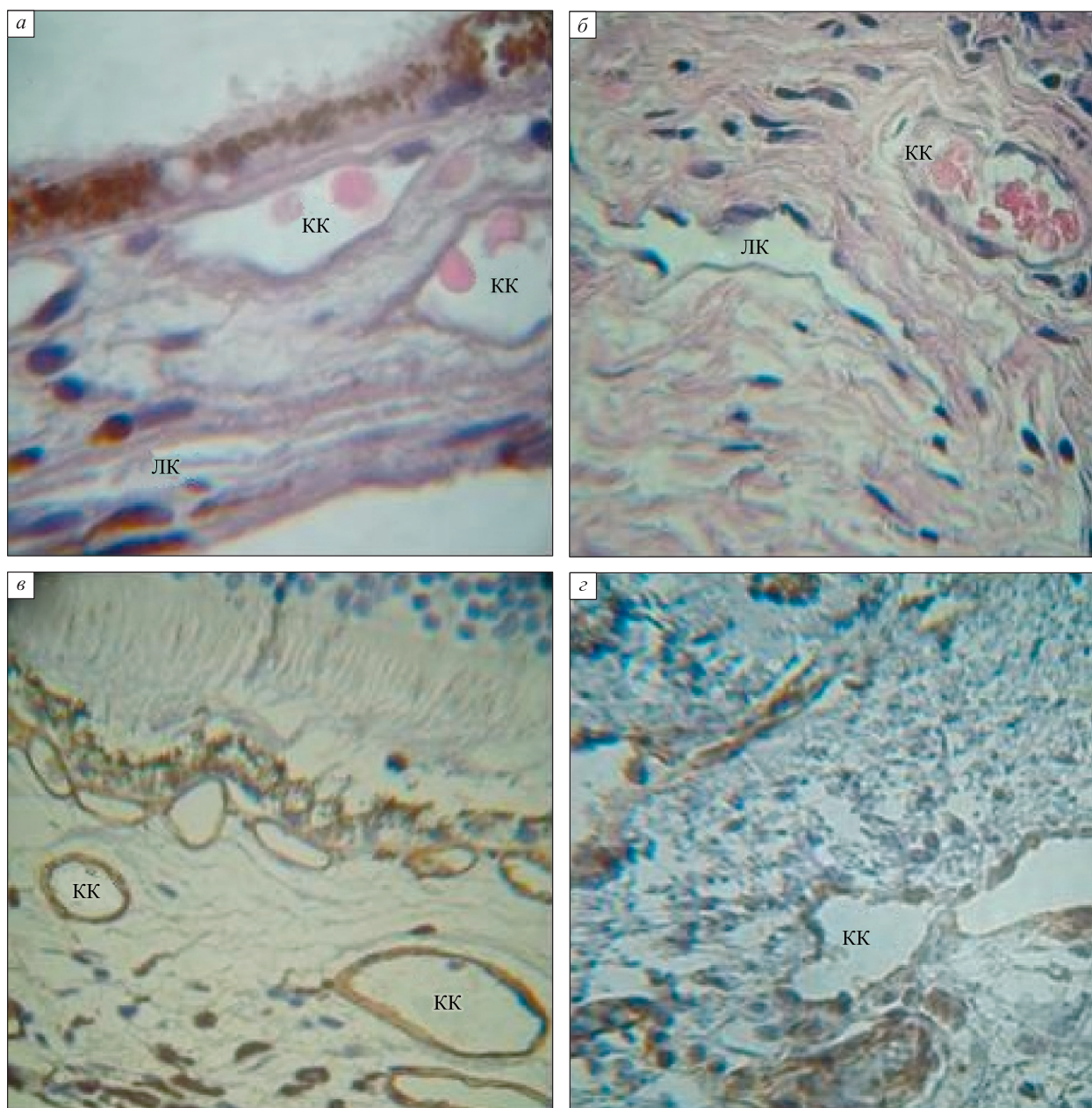


Рис. 1. Локализация кровеносных и лимфатических сосудов в хориоиде и конъюнктиве глаза человека. Ув. $\times 400$. Здесь и на рис. 2, 3 КК – кровеносный капилляр, ЛК – лимфатический канал. а – хориоидея, окраска гематоксилином и эозином; б – конъюнктив, окраска гематоксилином и эозином; в – CD31-позитивные кровеносные сосуды хориоидеи; г – CD31-позитивные кровеносные сосуды конъюнктивы глаза человека

(рис. 1, а). Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия кровеносных сосудов CD31 подтвердило, что лежащие рядом со слоем пигментных клеток сосуды являются кровеносными капиллярами (рис. 1, в). В структуре субэпителиального слоя конъюнктивы различали рыхлую соединительную ткань, лимфатические сосуды, а также кровеносные сосуды (рис. 1, б), которые также положительно окрашивались на маркер CD31 (рис. 1, г).

При одновременном иммуногистохимическом исследовании фрагментов конъюнктивы и хориоидеи на маркеры эндотелия лимфатических сосудов в исследованных образцах наблюдали позитивно окрашенные лимфатические структуры. В субэпителиальном слое конъюнктивы выявляли подоплатин-позитивные лимфатические сосуды (рис. 2, а). В хориоидеи также обнаруживали положительно окрашенные на подоплатин структуры, но они не были типичными сосудами,

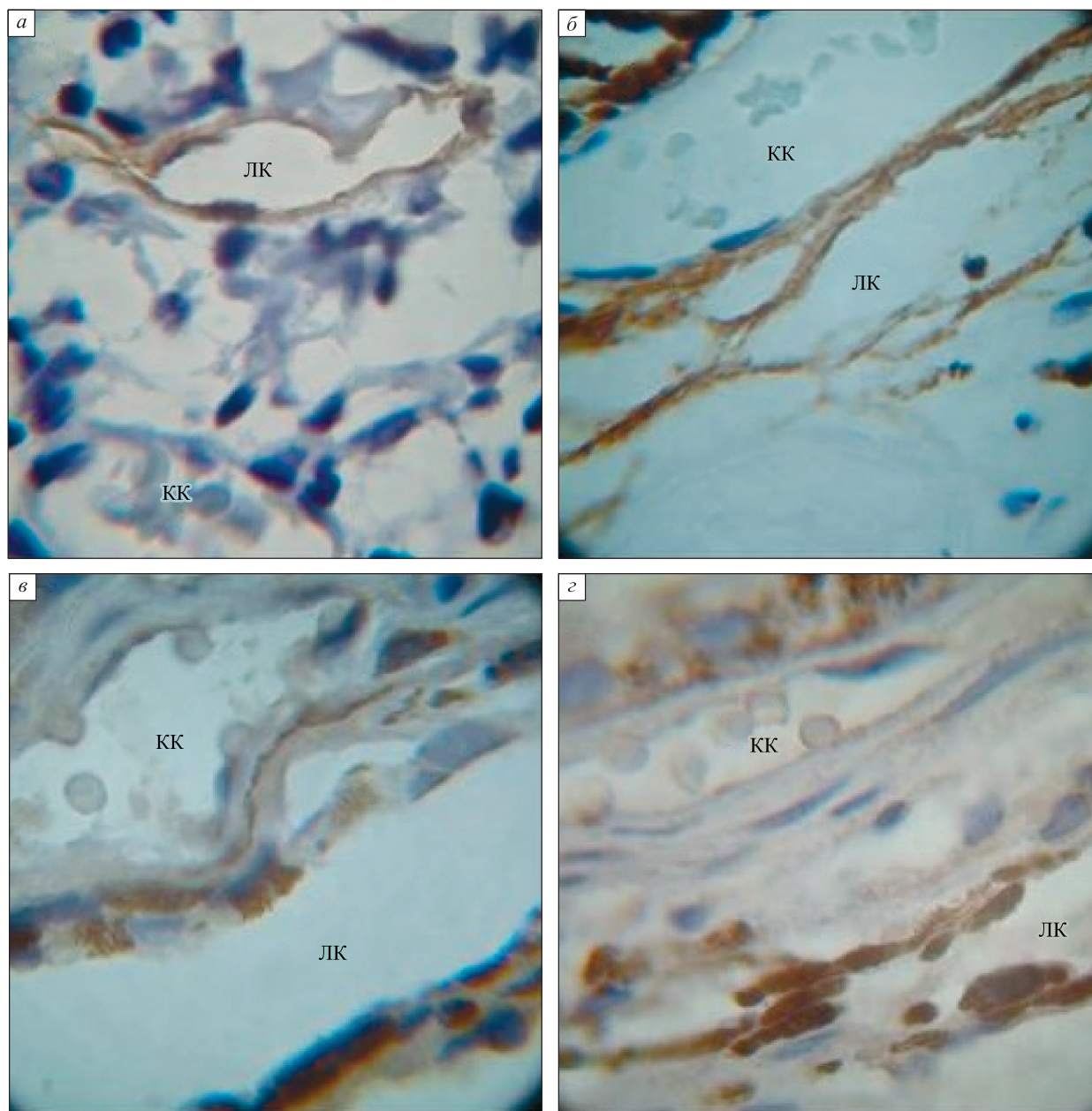


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление лимфатических сосудов в хориоиде и конъюнктиве глаза человека. Ув. $\times 900$, масляная иммерсия. а – подопланин-позитивные лимфатические капилляры конъюнктивы, иммуногистохимическое выявление с докраской гематоксилином; б – подопланин-позитивный лимфатический канал хориоидеи, иммуногистохимическое выявление; в – Prox1-позитивный лимфатический канал хориоидеи, иммуногистохимическое выявление; г – LYVE-1-позитивный лимфатический канал хориоидеи, иммуногистохимическое выявление

а были похожи на каналы (рис. 2, б). Исследование образцов хориоидеи с помощью других маркеров лимфатических сосудов (Prox1, LYVE-1) подтвердило, что клетки, образующие выявленные нами каналы, экспрессируют маркеры эндотелия лимфатических сосудов (рис. 2, в, г).

При электронно-микроскопическом исследовании образцов конъюнктивы глаза человека обнаружены лимфатические капилляры, имеющие

типичное строение и известные морфологические критерии: отсутствие базальной мембраны, якорные филаменты, отсутствие эритроцитов в просвете сосуда (рис. 3, а). Электронно-микроскопическое исследование хориоидеи показало, что структуры, экспрессирующие лимфатические маркеры, образованы клетками, не имеющими типичную для эндотелиоцитов лимфатических сосудов организацию (рис. 3, б). Каналы в хори-

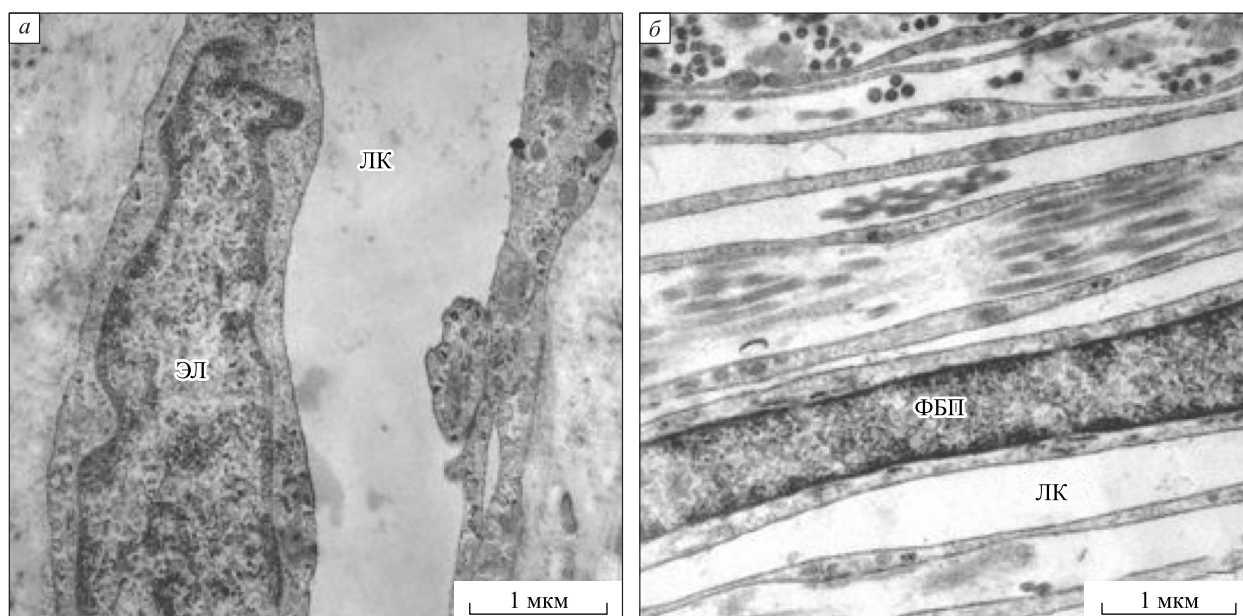


Рис. 3. Ультраструктурная организация клеток, выстилающих лимфатический капилляр (а) и лимфатический канал (б) хориоидеи глаза человека. Ув. $\times 1500$. ЭЛ – эндотелиоцит, ФБП – фибробластоподобная клетка

Таблица

Результаты морфометрического исследования ультраструктурной организации эндотелиоцитов лимфатических капилляров конъюнктивы и фибробластоподобных клеток, экспрессирующих лимфатические маркеры в хориоидеи

Параметр	Эндотелий лимфатических капилляров конъюнктивы	Фибробластоподобные клетки лимфатических каналов хориоидеи
Гранулярная эндоплазматическая сеть, Vv	$12,63 \pm 6,07$	$16,9 \pm 7,8^*$
Митохондрии, Vv	$11,25 \pm 4,98$	$5,33 \pm 2,65^*$
Микропиноцитозные везикулы, Vv	$7,23 \pm 3,37$	$2,67 \pm 0,92^*$

Примечание. Vv – объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы); * – отличие от величины соответствующего показателя эндотелия конъюнктивы статистически значимо при $p < 0,05$.

оидеи были образованы клетками узкой вытянутой формы с длинными отростками, по строению напоминающими фибробласты. Данные клетки имели развитую гранулярную эндоплазматическую сеть, объемная плотность которой была на 33,8 % ($p < 0,05$) больше, чем в эндотелиоцитах лимфатических капилляров конъюнктивы, однако объемные плотности митохондрий и микропиноцитозных везикул были меньше на 52,6 и 63 % ($p < 0,05$) соответственно (таблица). Выявленные особенности ультраструктурной организации клеток, выстилающих каналы хориоидеи и экспрессирующих маркеры лимфатических сосудов, не позволяют идентифицировать их как эндотелиоциты лимфатических сосудов – по структуре и концентрации внутриклеточных органелл они в большей степени являются фибробластоподобными клетками.

ОБСУЖДЕНИЕ

Факт наличия собственной лимфатической системы в конъюнктиве не вызывает сомнений. Исследование лимфатической системы конъюнктивы с помощью световой и электронной микроскопической ферментативной гистохимии [10] продемонстрировало морфологические признаки конъюнктивальных лимфатиков: прерывистая базальная пластинка, тонкие и нерегулярные стенки, якорные филаменты и аттенуированная цитоплазма эндотелиальных клеток. Ряд исследований показывает положительное иммуногистохимическое окрашивание капилляров конъюнктивы на специфические маркеры эндотелия лимфатических сосудов [4, 5, 8]. Полученные нами данные согласуются с общепринятыми научными представлениями о строении лимфатиче-

ских сосудов конъюнктивы и ультроструктурной организации эндотелиоцитов конъюнктивальных лимфатиков.

Научные данные о наличии лимфатической системы в хориоиде глаза человека не так однозначны. Интерес ученых к вопросу о существовании лимфатики в хориоиде обуславливается участием сосудистой оболочки в дренаже внутриглазной жидкости по увеосклеральному пути и возможной ролью лимфатической системы в этом процессе. Известно существование лимфатических лакун и лимфатических капилляров в сосудистой оболочке птиц [9]. М.Е. Koina et al. в 2015 г. опубликовали данные, демонстрирующие наличие лимфатических сосудов в хориоиде глаза человека [6], однако в ответ вышла статья S. Nakao et al. [7], опровергающая результаты коллег. Последующие исследования хориоиде с использованием панели нескольких лимфатических маркеров, в соответствии с консенсусом об определении лимфатических структур в органе зрения [12], выявили одиночные положительно окрашенные клетки, но классические лимфатические сосуды отсутствовали, в связи с чем авторы сделали вывод, что в норме хориоиде является алимфатической структурой [13]. В то же время в условиях воспаления в хориоиде показано большое количество одиночных LYVE-1-позитивных макрофагов, возможно, участвующих в метаболизме гиалуроновой кислоты и хориоидальной неоваскуляризации [11]. Несмотря на наличие работ, отвергающих гипотезу о существовании лимфатических сосудов в сосудистой оболочке глаза, интерес к изучению данного вопроса сохраняется. Появляются данные о наличии «нетрадиционных лимфатиков» в хориоиде глаза человека [3].

Имеющиеся сведения противоречивы, что, по-видимому, связано не только с методологическими и техническими сложностями, сопутствующими изучению органа зрения, но и с некими органоспецифическими особенностями лимфатических структур глаза, не позволяющими однозначно идентифицировать лимфатику общепринятыми методами. Более детальное дальнейшее исследование хориоиде с помощью иммуногистохимических методов, а также использование электронной микроскопии, ультроструктурного анализа, иммуноэлектронной гистохимии позволит расширить наши представления о строении сосудистой оболочки глаза, а изучение роли лимфатической системы в процессах воспаления, опухолевого метастазирования и дренажа внутриглазной жидкости внесет значительный вклад в понимание патогенеза некоторых офтальмологических заболеваний, например глаукомы, и, как следствие, разработку новых методов лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лимфатические каналы хориоиде имеют ультроструктурную организацию, отличную от лимфатических капилляров конъюнктивы, что, вероятно, связано с органоспецифическими особенностями строения лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в сосудистой оболочке. Органоспецифичность лимфатических структур хориоиде может быть объяснением трудности в идентификации компонентов лимфатической системы в органе зрения человека и требует дальнейшего изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черных В.В., Бгатова Н.П. Лимфатические структуры глаза и увеолимфатический (метаболический) путь оттока внутриглазной жидкости. Ч. 1 // Глаукома. 2018. 17. (1). 3–13.
2. Черных В.В., Бородин Ю.И., Бгатова Н.П., Трунов А.Н., Ходжаев Н.С., Ноговицина С.Р., Еремина А.В., Коненков В.И. Структурные элементы лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в хориоиде глаза человека в норме и при глаукоме // Офтальмохирургия. 2016. (3). 11–16.
3. Alexander J.S., Becker F. Evidence for nontraditional lymphatics in the choroid // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. 56. (2). ID 1328.
4. Chen L., Cursiefen C., Barabino S., Zhang Q., Dana M. Novel expression and characterization of lymphatic vessel endothelial hyaluronate receptor 1 (LYVE-1) by conjunctival cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. 46. (12). ID 4536.
5. Herwig M., Münstermann K., Klarmann-Schulz U., Schlereth S.L., Heindl L.M., Loeffler K.U., Müller A.M. Expression of the lymphatic marker podoplanin (D2-40) in human fetal eye s // Exp. Eye Res. 2014. 127. 243–251.
6. Koina M.E., Baxter L., Adamson S.J., Arfuso F., Hu P., Madigan M.C., Chan-Ling T. Evidence for lymphatics in the developing and adult human choroid // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. 56. (2). 1310–1327.
7. Nakao S., Zandi S., Kohno R., Sun D., Nakama T., Ishikawa K., Yoshida S., Enaida H., Ishibashi T., Hafezi-Moghadam A. Lack of lymphatics and lymph node-mediated immunity in choroidal neovascularization // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. 54. (6). ID 3830.
8. Nakao S., Hafezi-Moghadam A., Ishibashi T. Lymphatics and lymphangiogenesis in the eye // J. Ophthalmol. 2012. 2012. ID 783163.

9. Nickla D.L., Wallman J. The multifunctional choroid // *Prog. Retin. Eye Res.* 2010. 29. (2). 144–168.
10. Sherman D.D., Gonnering R.S., Wallow I.H., Lemke B.N., Doos W.G., Dortzbach R.K., Lyon D.B., Bindley C.D. Identification of Orbital Lymphatics // *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.* 1993. 9. (3). 153–169.
11. Schroedl F., Brehmer A., Neuhuber W.L., Kruse F.E., May C.A., Cursiefen C. The normal human choroid is endowed with a significant number of lymphatic vessel endothelial hyaluronate receptor 1 (LYVE-1)-positive macrophages // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. 49. (12). 5222–5229.
12. Schroedl F., Kaser-Eichberger A., Schleret S.L., Bock F., Regenfuß B., Reitsamer H.A., Lütty G.A., Maruyama K., Chen L., Lütjen-Drecoll E., Dana R., Kerjaschki D., Alitalo K., de Stefano M.E., Junghans B.M., Heindl L.M., Cursiefen C. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014. 55. (10). 6440–6442.
13. Schrödl F., Kaser-Eichberger A., Trost A., Strohmaier C., Bogner B., Runge C., Motloch K., Bruckner D., Laimer M., Heindl L., Reitsamer H. Lymphatic markers in the adult human choroid // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015. 56. (12). 7406–7416.
14. Yücel Y.H., Johnston M.G., Ly T., Patel M., Drake B., Gümüş E., Fraenkl S.A., Moore S., Tobbia D., Armstrong D., Horvath E., Gupta N. Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: A novel «uveolymphatic» outflow pathway // *Exp. Eye Res.* 2009. 89. (5). 810–819.

ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF THE LYMPHATIC CAPILLARIES IN CONJUNCTIVA AND THE LYMPHATIC CHANNELS IN HUMAN CHOROID

Sabina Robertovna NOGOVITSINA¹, Nataliya Petrovna BGATOVA¹,
Alena Victorovna EREMINA², Aleksandr Nikolaevich TRUNOV²,
Valeriy Vyacheslavovich CHERNYKH², Vladimir Iosifovich KONENKOV¹

¹ Research Institute for Clinical and Experimental Lymphology –
Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

² S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution of Minzdrav of Russia, Novosibirsk Branch
630071, Novosibirsk, Kolkhidskaya str., 10

The aim of this work was a comparative study of the ultrastructural organization of lymphatic structures in the choroid and conjunctiva of the human eye. Material and methods. Samples of the choroid and conjunctiva of the human eye, obtained perioperatively, were studied by immunohistochemical analysis using specific antibodies to endothelial cells markers of blood and lymphatic vessels, and electron microscopic studies, morphometric processing and statistical analysis of the results were performed. Results and discussion. Within simultaneous immunohistochemical staining of conjunctiva and choroid samples using antibodies to markers of lymphatic vessels (LYVE-1, Prox1, podoplanin) the positively stained typical lymphatic vessels have been revealed in the conjunctiva structure and positively stained channels with narrow elongated cells, fibroblasts and pigment cells in choriocapillary layer of the choroid and the transition zone between choroid and sclera. Electron microscopic study revealed that cells expressing lymphatic markers and forming lymphatic channels in the choroid have an ultrastructural organization that is differ from typical lymphatic vascular endothelial cells: they do not have stropic filaments, contain a greater volume density of the granular endoplasmic reticulum membranes, and a lower volume density of mitochondria and micropinocytotic vesicles. The data obtained indicate that the lymphatic pathways of the intraocular fluid outflow in the human eye choroid have organ-specific structural features.

Key words: conjunctiva, choroid, lymphatic endothelium, lymphatic channels.

Nogovitsina S.R. – junior research of the laboratory of ultrastructural research, e-mail: nogovitsina.nikel@gmail.com

Bgatova N.P. – doctor of biological sciences, professor; head of the laboratory of ultrastructural research,
e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Eremina A.V. – candidate of medical sciences ictorovna, research, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Trunov A.N. – doctor of medical sciences, professor, deputy director for science work, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Chernykh V.V. – doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Konenkov V.I. – doctor of medical sciences, professor, academician of the RAS, scientific adviser