

С.Р. Ноговицина

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В СОСУДИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

ФГБУ «Научно-исследовательский клинической и экспериментальной лимфологии»,
Новосибирск, Россия

Целью работы было выявление лимфатических путей оттока в сосудистой оболочке глаза человека. Проведено иммуногистохимическое исследование хориоидеи с использованием антител к специфическим лимфатическим и кровеносным эндотелиальным маркерам. Выявлены Prox-1+, LYVE-1+, и Podoplanin+ каналы и лакуны, ограниченные эндотелиоподобными клетками и фибробластами. Положительное окрашивание на маркеры лимфатических сосудов и отсутствие их окрашивания на маркер кровеносных сосудов CD34 дает основание считать выявленные структуры лимфатическими.

Ключевые слова: сосудистая оболочка глаза, лимфатические каналы и лакуны

EXPRESSION OF MOLECULAR LYMPHATIC MARKERS IN HUMAN CHOROID

S.R. Nogovitsina

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russia

The purpose of this study was to research lymphatic outflow tract in the human choroid. Using a light microscopy and immunohistochemistry, structure of the choroid was investigated. We used antibodies against lymphatic endothelial-specific markers Prox-1, LYVE-1, Podoplanin, endothelial blood vessels marker CD34 and fibroblasts growth factor receptor FGFR. The choroid was found to contain lymphatic canals in choroidal stroma and a layer of choriocapillaris, and lymphatic lacunae in the suprachoroid lamina, limited endothelium-like cells, positively stained for markers of lymphatic vessels Prox-1, LYVE-1, Podoplanin, and fibroblasts and pigment cells. These endothelium-like cells were shown positive Prox-1, LYVE-1 and Podoplanin staining and negative CD34 staining; therefore we consider that these canals and lacunae are lymphatic structures.

Key words: choroid, lymphatic lacunae, lymphatic channels

ВВЕДЕНИЕ

Структура и функции сосудистой оболочки глаза представляют большой интерес для исследователей в связи с тем, что хориоидея играет важную роль в дренаже внутриглазной жидкости (ВГЖ) [1] и в патогенезе глаукомы [3]. Наличие лимфатической системы в собственно сосудистой оболочке глаза является спорным вопросом. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии были показаны лимфатические структуры в сосудистой оболочке глаза обезьян и птиц [2, 5, 6, 11]. В настоящее время с открытием специфических эндотелиальных маркеров лимфатических сосудов, таких как Prox-1, LYVE-1, Podoplanin, появилась возможность исследования структур, которые ранее считались алимфатическими. Однако для получения статистически значимого результата необходимо использование как минимум двух лимфатических маркеров [10]. Целью данного исследования было выявление лимфатических путей оттока ВГЖ в хориоидею.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были взяты фрагменты хориоидеи энуклеированных по медицинским показаниям глаз пациентов ($n = 5$) из Новосибирского филиала ФГБУ МНТК Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова. Забор материала осуществлялся сотрудниками МНТК Микрохирургия глаза. Были взяты фрагменты глаз у пациентов с терминальной стадией глаукомы и не затронутые

опухолевым процессом фрагменты хориоидеи при увеальной меланоме. Средний возраст пациентов составил $64,5 \pm 1,2$. Для морфологического изучения биологические образцы фиксировали в 10%-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 [12]. Использовали моноклональные антитела к маркерам эндотелиоцитов кровеносных сосудов CD34 (Novocastra, Германия), лимфатических сосудов LYVE-1 (Abcam, Англия), Podoplanin (Monosan, Нидерланды) и Prox-1 (Covance, Германия), к маркеру рецептора к фактору роста фибробластов FGFR (Abcam, Англия). Полученные препараты глаза изучали в световом микроскопе «Leica DME» (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При окрашивании хориоидеи гематоксилином и эозином в структуре хориокапиллярной пластинки выявляли пигментные клетки, кровеносные капилляры, коллагеновые волокна, фибробласты и каналы, похожие на лимфатические (рис. 1а). Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия кровеносных сосудов CD34 подтвердило, что лежащие рядом со слоем пигментных клеток сосуды являются кровеносными капиллярами (рис. 1б). При иммуноги-

стохимическом окрашивании на маркеры эндотелия лимфатических сосудов Prox-1, LYVE-1 и Podoplanin окрашивались клетки и их отростки, лежащие вдоль пигментных клеток и образующие каналы рядом с кровеносными капиллярами и сосудами. Следовательно, данные каналы можно отнести к лимфатическим каналам (рис. 1в, г). При иммуногистохимическом окрашивании на маркер фибробластов и миофибробластов маркировались клетки, расположенные вдоль лимфатических каналов. Было выявлено, что лимфатические каналы могут быть ограничены как клетками, окрашивающимися на маркер эндотелия лимфатических сосудов Prox-1, Podoplanin и LYVE-1, так и фибробластами, миофибробластами и пигментными клетками (рис. 1д). В переходной зоне между сосудистой оболочкой и склерой отмечали большие пространства, ограниченные удлинёнными клетками – так называемые «лакуны», которые предположительно рассматривают как лимфатические структуры. Лимфатические лакуны были выстланы эндотелиоподобными клетками и фибробластами (рис. 1е).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Наличие лимфатической системы в собственной сосудистой оболочке глаза обсуждается. Так, по

данным литературы, при изучении глаз плода человека 10–38 недель гестации выявлены Podoplanin-положительные структуры в хориоиде, но однозначные доказательства определения лимфатических сосудов в интраокулярных структурах плода человека отсутствуют [4]. Исследование экспрессии LYVE-1 в сосудистой оболочке глаза показало наличие большого количества LYVE-1-положительных макрофагов, но типичных лимфатических сосудов обнаружено не было. Авторы полагают, что макрофаги участвуют в формировании временных лимфатических сосудов в условиях воспаления [9]. При использовании флуоресцентных меток был показан путь миграции меченых макрофагов от глаза до шейных лимфатических узлов при хориоидальной неоваскуляризации. Результаты исследования свидетельствуют о взаимосвязи между глазным дном и шейными лимфоузлами [8]. Исследование сосудистой оболочки глаз плода человека (8–25 недель гестации) и взрослых (17–74 лет) с помощью иммуногистохимического метода (использование лимфатических маркеров LYVE-1, Podoplanin, D2-40, Endomucin, VEGF-C, VEGFR-3, PECAM-1, CD34, CD39) выявило систему слепо оканчивающихся начальных лимфатических сегментов, по-видимому, играющую роль в циркуляции ВГЖ и в иммунном надзоре [7].

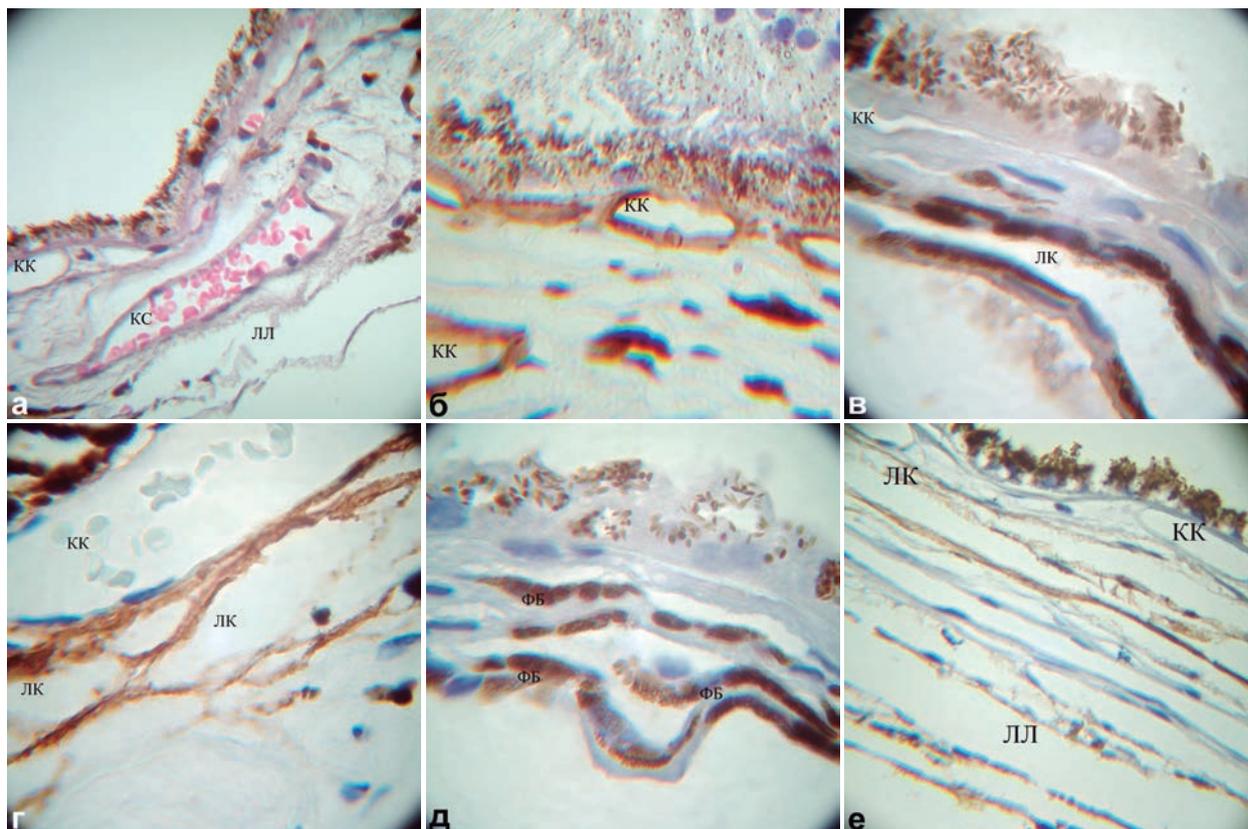


Рис. 1. Структура хориоидеи (окраска гематоксилином и эозином): **а** – структура хориокапиллярной пластинки (ув. 10×90); **б** – CD34+–кровеносные сосуды, ИГХ-выявление маркера кровеносных сосудов CD34 (ув. 10×90); **в** – Prox-1+–лимфатический сосуд, ИГХ-выявление маркера лимфатических сосудов Prox-1 (ув. 10×90); **г** – Podoplanin+–лимфатический сосуд, ИГХ-выявление маркера лимфатических сосудов Podoplanin (ув. 10×90); **д** – FGFR+–фибробласты, ИГХ-выявление маркера рецептора к фактору роста фибробластов FGFR (ув. 10×90); **е** – лимфатические лакуны в надсосудистой пластинке, ИГХ-выявление маркера лимфатических сосудов Podoplanin (ув. 10×40); **КК** – кровеносный капилляр; **КС** – кровеносный сосуд; **ЛЛ** – лимфатическая лакуна; **ЛК** – лимфатический капилляр; **ФБ** – фибробласты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В структуре хориоидеи глаза человека выявлены лимфатические каналы и лимфатические лакуны. Лимфатические каналы располагаются в сосудисто-капиллярной пластинке и сосудистой пластинке и ограничены Prox-1+-, LYVE-1+- и Podoplanin+-эндотелиоподобными клетками, фибробластами и пигментными клетками. В переходной зоне между хориоидеей и склерой выявлены лимфатические лакуны, выстланные Prox-1+- LYVE-1+- и Podoplanin+-эндотелиоподобными клетками и фибробластами. Если будущими исследованиями будет подтверждено участие лимфатических структур хориоидеи в циркуляции ВГЖ, то методы клинической лимфологии (лимфостимуляция, лимфокоррекция, лимфопротекция) могут быть использованы в офтальмологии.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Alm A, Nilsson FE (2009). Uveoscleral outflow: A review. *Exp. Eye Res.*, (88), 760-768.
2. De Stefano ME, Mugnaini E (1997). Fine structure of the choroidal coat of the avian eye. Lymphatic vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, (38), 1241-1260.
3. Goharian I, Sehi M (2014). Is there any role for the choroid in glaucoma? (Sep 26).
4. Herwig MC, Münstermann K, Klarmann-Schulz U, Schlereth SL, Heindl LM, Loeffler KU, Müller AM (2014). Expression of the lymphatic marker podoplanin (D2-40) in human fetal eyes. *Exp. Eye Res.*, (127), 243-251.
5. Junghans BM, Crewther SG, Crewther DP, Pirie B (1997). Lymphatic sinusoids exist in chick but not in rabbit choroid. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.*, 25 (1), 103-105.
6. Krebs W, Krebs IP (1988). Ultrastructural evidence for lymphatic capillaries in the primate choroid. *Arch. Ophthalmol.*, (106), 1615-1616.
7. Koina ME, Baxter L, Adamson SJ, Arfuso F, Hu P, Madigan MC, Chan-Ling T (2015). Evidence for lymphatics in the developing and adult human choroid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 56 (2), 1310-1327.
8. Nakao S, Zandi S, Kohno R et al. (2013). Lack of lymphatics and lymph node-mediated immunity in choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 54 (6), 3830. doi:10.1167/iovs.12-10341.
9. Schroedl F, Brehmer A, Neuhuber WL, Kruse FE, May CA, Cursiefen C (2008). 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.*, 49 (12), 5222-5229.
10. Schroedl F, Kaser-Eichberger A, Schlereth S et al. (2014). Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 55 (10), 6440-6442. doi:10.1167/iovs.14-15638.
11. Sugita A, Inokuchi T (1992). Lymphatic sinus-like structures in choroid. *Jpn J. Ophthalmol.*, 36 (4), 436-442.
12. Yücel Y, Johnston M, Ly T, Patel M, Drake B, Gümüş E, Fraenkl S, Moore S, Tobbia D, Armstrong D, Horvath E, Gupta N (2009). Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: A novel "uveolymphatic" outflow pathway. *Exp. Eye Res.*, 89 (5), 810-819.

Сведения об авторах Information about the authors

Ноговицина Сабина Робертовна – младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский клинической и экспериментальной лимфологии» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; e-mail: nogovitsina.niikel@gmail.com)
Nogovitsina Sabina Robertovna – Junior Research Officer of Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (630060, Novosibirsk, Timakov str., 2; e-mail: nogovitsina.niikel@gmail.com)