

УДК 617.7: 617.72: 611.423.

Структурные элементы лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в хориоидеи глаза человека в норме и при глаукоме

В.В. Черных¹, Ю.И. Бородин², Н.П. Бгатова², А.Н. Трунов^{1, 3}, Н.С. Ходжаев⁴,
С.Р. Ноговицина², А.В. Еремина¹, В.И. Коненков²

¹ Новосибирский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

² ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии», Новосибирск;

³ ФГБНУ «НИИ экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск;

⁴ ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Выявить и изучить структурную организацию лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в хориоидеи глаза человека в норме и при ПОУГ.

Материал и методы. В качестве объекта были взяты фрагменты хориоидеи энуклеированных по плановым медицинским показаниям глаз (n=7), включая при терминальной стадии глаукомы (n=2). Структура хориоидеи исследована методами иммуногистохимии и электронной микроскопии.

Результаты. В структуре хориоидеи были выявлены лимфатические каналы и лимфатические лакуны. Лимфатические каналы располагаются в сосудисто-капиллярной пластинке и сосудистой пластинке и ограничены Podoplanin+, Prox-1+, LYVE-1+-эндотелиоподобными клетками, фибробластами и пигментными клетками. Лимфатические лакуны расположены в надсосудистой пластинке и выстланы эндотелиоподобными клетками и фибробластами. Морфометрическое исследование показало возрастание объемных плотностей

эпителия, интерстициальных пространств и сосудов хориоидеи, связанное с отеком и набуханием стромы хориоидеи при терминальной стадии глаукомы.

Выводы. Сосудистая оболочка глаза содержит лимфатические структуры, вероятно, входящие в лимфодренажную структуру глаза и участвующие в оттоке ВГЖ. Наблюдаемый при терминальной стадии ПОУГ отек и набухание стромы хориоидеи, возрастание объемных плотностей эпителия, интерстициальных пространств и сосудов хориоидеи свидетельствуют о нарушении лимфатического дренажа глаза, развивающегося с начальных стадий глаукоматозного процесса и приводящего к нарушению оттока ВГЖ через протективную лимфатическую систему.

Ключевые слова: прелимфатики, органоспецифические лимфатические капилляры, хориоидея. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

Офтальмохирургия. – 2016. – № 3. – С. 11-16.

ABSTRACT

The elements of intraocular fluid lymphatic outflow pathways in choroid in norm and in glaucoma patients

V.V. Chernykh¹, Yu. I. Borodin², N.P. Bgatova², A.N. Trunov^{1, 3}, N.S. Khodjayev⁴, S.R. Nagovitsyna², A.V. Eremina¹, V.I. Konenkov²

1 The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, the Novosibirsk Branch;

2 The Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk;

3 The Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk;

4 The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

Purpose. To detect and study the structure of aqueous humor lymphatic outflow pathways in choroid in normotensive patients and patients with primary open-angle glaucoma (POAG).

Material and methods. Choroid fragments of seven human eyes (including two eyes with terminal glaucoma) enucleated on medical indications were studied. The structure of the choroid

was investigated using immunohistochemistry and electron microscopy.

Results. Lymphatic channels and lymphatic lacunae were revealed in the choroid structure. Lymphatic channels were detected in choriocapillary and vascular layers and were limited by Podoplanin+, Prox-1+, LYVE-1+ endothelium-like cells, fibroblasts and pigment cells. Lymphatic lacunae were located in suprachoroid layer and covered with endothelium-like cells and fibroblasts. Morphometric study showed an increase of the volume density of epithelium, interstitial spaces and choroid vessels related to edema and swelling of the choroidal stroma in the terminal stage of glaucoma.

Conclusions. Human choroid contains lymphatic structures that are probably a part of the ocular lymphatic drainage system and participate in the aqueous humor outflow. Choroidal edema and swelling, the increase of the volume density of epithelium, interstitial spaces and choroid vessels in the terminal POAG stage indicate the lymphatic drainage dysfunction beginning from initial stages of glaucoma and lead to an aqueous humor outflow alteration through the protective lymphatic system.

Key words: *prelymphatics, the organ-specific lymphatic capillaries, choroid.* ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.– 2016.– No. 3.– P. 11-16.

В последние годы пристальное внимание ученых, изучающих морфологию органа зрения, направлено на выявление структурных элементов лимфатической системы, оценку её роли в оттоке внутриглазной жидкости, утилизации токсических продуктов метаболизма и клеточной деструкции.

При исследовании процессов лимфангиогенеза в эмбриогенезе человека было показано, что формирование сосудистой оболочки у плодов 8-40 недель гестации проходит три стадии: дифференциации гемопозитических стволовых клеток, васкулогенеза и ангиогенеза, при этом васкулогенез происходит независимо от VEGF (165) [5].

При выявлении экспрессии маркера лимфатических сосудов D2-40 (podoplanin) в органе зрения плода 10-38 недель гестации были определены лимфатические сосуды в конъюнктиве, роговице, трабекулярной сети, оболочке зрительного нерва. Также podoplanin-положительные структуры выявляли в сосудистой оболочке и в переднем сегменте глаза. Тем не менее, наличие лимфатических сосудов в интраокулярных структурах остается предметом дискуссии [6].

В то же время при определении экспрессии LYVE-1 в сосудистой оболочке глаза было показано, что в хориоиде человека содержится большое количество LYVE-1 положительных макрофагов, которые, по предположению авторов, вовлечены

в метаболизм гиалуроновой кислоты или участвуют в формировании временных лимфатических сосудов при воспалении [10].

Представляет интерес морфологическое исследование сосудистой оболочки глаз плодов человека (8-25 недель гестации) и взрослых (17-74 лет) с помощью использования специфических лимфатических маркеров – LYVE-1, podoplanin, VEGF-C, VEGFR-3. Анализ полученных данных позволил сделать заключение, что в хориоиде находится система слепо начинающихся начальных лимфатических сегментов, которые идеально подходят для рециркуляции внеклеточной жидкости и иммунного надзора [8]. Кроме того, показано наличие лимфатических структур в цилиарном теле глаза человека [2, 3, 9, 11, 13].

Тем не менее, в настоящее время вклад лимфатических структур органа зрения в отток ВГЖ остается до конца не изученным. В то же время имеются данные, что после введения люминесцентных наносфер в переднюю камеру глаза овец через 4 часа они обнаруживаются в шейном, заглоточном и подчелюстном лимфатических узлах. Эти результаты свидетельствуют о наличии лимфатических каналов в органе зрения и, в определенной степени, служат доказательством того, что жидкость и растворенные в ней вещества оттекают из структур глаза, по меньшей мере, частично, через лимфатическую систему [7].

По мнению ряда исследователей, открытие увеолимфатического пути оттока ВГЖ является важным для понимания механизмов развития глаукоматозного процесса и ряда других заболеваний глаза [4, 12]. Отток внутриглазной жидкости через лимфатические структуры позволяет рассматривать данный путь как процесс, направленный на утилизацию продуктов метаболизма и клеточной деструкции [1, 3]. Однако дискуссия относительно существования лимфатических путей оттока и классификации «лимфатических сосудов» в структурах глаза человека продолжается [11].

Вышеизложенное позволило сформулировать цель настоящего исследования.

ЦЕЛЬ

Выявить и изучить структурную организацию лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в хориоидеи глаза человека в норме и при ПОУГ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были взяты фрагменты хориоидеи энуклеированных по плановым медицинским показаниям глаз. Энуклеация проводилась по поводу заболеваний, не влияющих на структурную организацию хориоидеи (n=5) и при терминальной стадии глаукомы (n=2).

Для корреспонденции:

Трунов Александр Николаевич, докт. мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе Новосибирского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. E-mail: trunov1963@yandex.ru

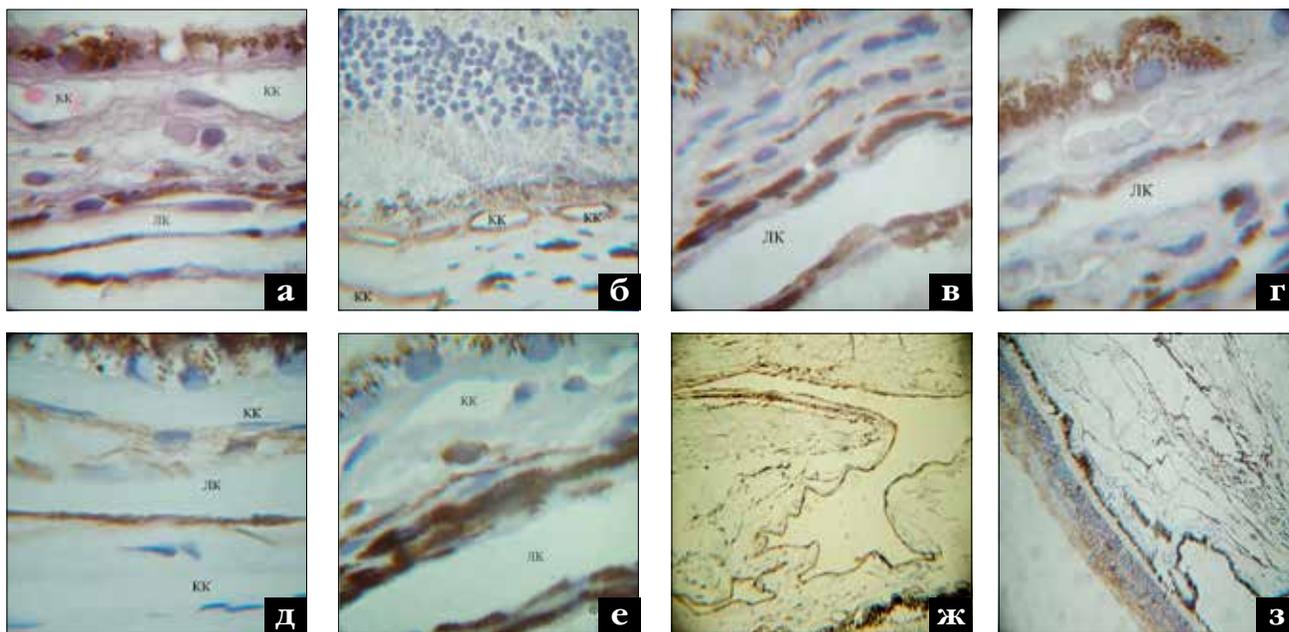


Рис. 1. Сосудистое русло хориоидеи: а) структура хориокапиллярной пластинки. КК – просвет кровеносного капилляра, ЛК – просвет лимфатического канала. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 10х90; б) CD34+–кровеносные сосуды. ИГХ выявление маркера кровеносных сосудов CD34. Ув. 10х90; в) Prox-1+–лимфатический сосуд. ИГХ выявление маркера лимфатических сосудов Prox-1. Ув. 10х90; г) LYVE-1+–лимфатический сосуд. ИГХ выявление маркера лимфатических сосудов LYVE-1. Ув. 10х90; д) Podoplanin+–лимфатический сосуд. ИГХ выявление маркера лимфатических сосудов Podoplanin. Ув. 10х90; е) FGFR+–фибробласты. ИГХ выявление маркера рецептора к фактору роста фибробластов FGFR. Ув. 10х90; ж) CD34+–кровеносные сосуды на границе склеры и хориоидеи. ИГХ выявление маркера кровеносных сосудов CD34. Ув. 10х90; з) Podoplanin+–лимфатические сосуды на границе склеры и хориоидеи. ИГХ выявление маркера лимфатических сосудов Podoplanin. Ув. 10х90

У всех пациентов было получено информированное согласие на проведение операции и забор тканей глаза, а также использование данных исследования в научных целях.

Для морфологического изучения образцы сосудистой оболочки фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обрабатывали по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и с использованием антител.

Все этапы иммуногистохимической 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, 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).

Для исследования в электронном микроскопе образцы хориоидеи размером до 1 мм³ фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1% растворе OsO₄ 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 уранилцетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония).

Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США). Определяли объемные плот-

ности эпителиального слоя, капилляров, сосудов, лакун и интерстиция хориоидеи в условиях нормы и при глаукоме.

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием пакета программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Значимость различий оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни, при уровне достоверности 95% (p<0,05). Данные представляли в виде средних значений (M) и стандартных отклонений (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ

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 явля-

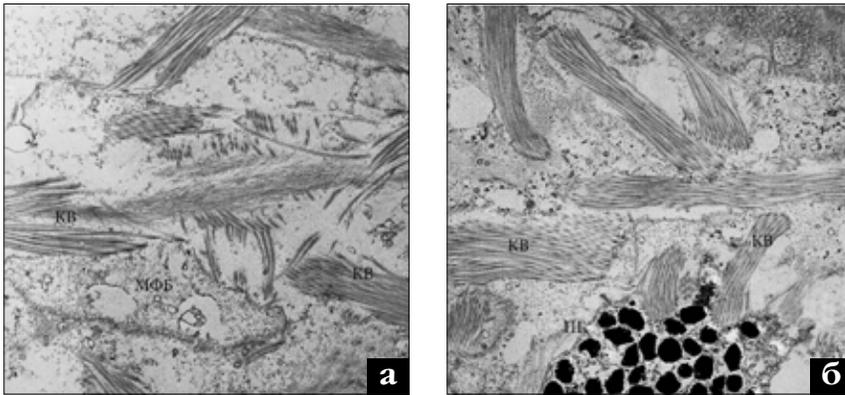


Рис. 2. Структура стромального каркаса хориоидеи. KB – пучки якорных коллагеновых волокон, МФБ – миофибробласт, ПГ – пигментная клетка: а) разнонаправленное расположение пучков коллагеновых волокон. Ув. x8000; б) якорные коллагеновые волокна вокруг пигментной клетки. Ув. x8000

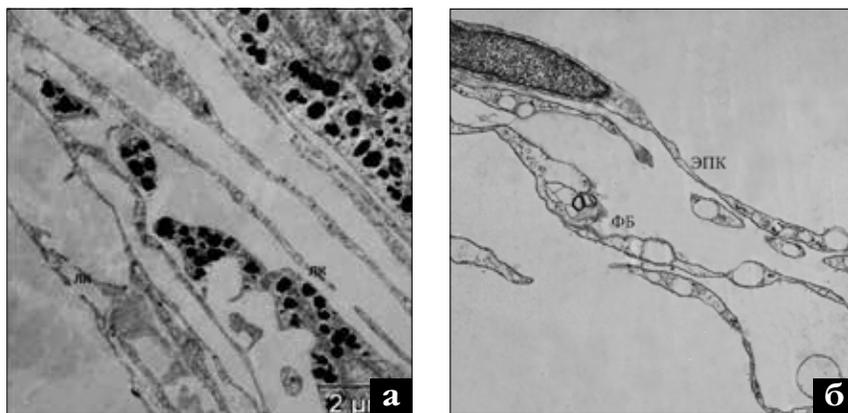


Рис. 3. Лимфатические каналы (ЛК) и структура лимфатических лакун хориоидеи (а). ЭПК – эндотелиоподобная клетка, ФБ – фибробласт (б). Ув. x8000

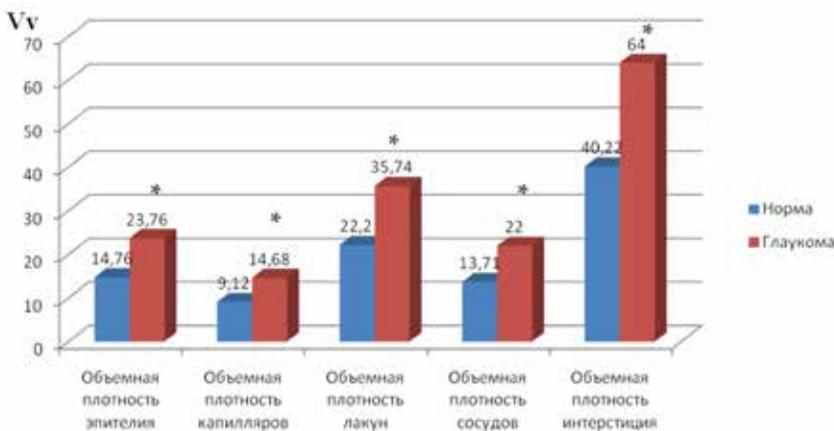


Рис. 4. Объемные плотности структур хориоидеи в норме и при глаукоме

ются кровеносными капиллярами (рис. 1б).

При иммуногистохимическом 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 сосуда-

ми. Следовательно, данные каналы можно отнести к лимфатическим (рис. 1в, з, д).

При иммуногистохимическом окрашивании на маркер фибробластов и миофибробластов маркировались клетки, расположенных вдоль лимфатических каналов и которые часто определялись в структуре выстилки лимфатических каналов. Было выявлено, что лимфатические каналы могут быть ограничены как клетками, окрашивающимися на маркер эндотелия лимфатических сосудов Prox-1 и LYVE-1, так и фибробластами, миофибробластами и пигментными клетками (рис. 1е).

Имуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия кровеносных сосудов CD34 показало образование кровеносной капиллярной сети на границе склеры и хориоидеи (рис. 1ж). При окрашивании на маркер эндотелия лимфатических сосудов Podoplanin на границе склеры и хориоидеи были выявлены и лимфатические структуры (рис. 1з).

При исследовании в электронном микроскопе было определено, что строма хориокапиллярной пластинки пронизана пучками коллагеновых волокон, которые связаны с миофибробластами и пигментными клетками и, вероятно, играют роль каркаса, препятствующего значительному изменению размера данной части оболочки (рис. 2а, б).

Электронно-микроскопическое исследование подтвердило, что лимфатические каналы располагаются между кровеносными капиллярами и кровеносными сосудами и образованы как эндотелиоподобными клетками, так и фибробластами, их отростками, миофибробластами и сопровождаются пигментными клетками (рис. 3а).

В переходной зоне между сосудистой оболочкой и склерой отмечали большие пространства, ограниченные удлинненными клетками – так называемые «лакуны», которые предположительно рассматривают как лимфатические структуры. Лимфатические лакуны выстланы эндотелиоподобными клетками и фибробластами, которые неплотно контактируют между собой и не связаны пучками якорных фи-



Рис. 5. Структура хориоидеи в норме и при терминальной стадии глаукомы. ЛК – лимфатический канал, КК – кровеносный капилляр: а) хориоидея в норме. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 10х40; б) набухание стромы хориоидеи при терминальной стадии глаукомы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 10х40; в) хориоидея в норме. ИГХ выявление маркера кровеносных сосудов CD34. Ув. 10х40; г) терминальная стадия глаукомы. Расширение просветов кровеносных сосудов. ИГХ выявление маркера кровеносных сосудов CD34. Ув. 10х40; д) хориоидея в норме. ИГХ выявление маркера лимфатических сосудов Podoplanin. Ув. 10х40; е) терминальная стадия глаукомы. Расширение просвета лимфатического канала. ИГХ выявление маркера лимфатических сосудов Podoplanin. Ув. 10х40

ламентов, которые бы ограничивали значительные изменения их просветов (рис. 3б).

При морфометрическом анализе структуры хориоидеи при терминальной стадии глаукомы отмечали увеличение толщины хориоидеи на 61% по сравнению с нормой, что было следствием отека и набухания компонентов стромы хориоидеи. При этом пропорционально возросли объемные плотности структур сосудистой оболочки, таких как эпителиальный слой, капилляры, сосуды и интерстициальные пространства (рис. 4). Увеличивались размеры просветов кровеносных сосудов и лимфатических каналов (рис. 5).

Отмечали набухание и увеличение размеров перикапиллярных пространств (рис. 6а), набухание стромы хориокапиллярной пластинки и нарушение связи якорных коллагеновых волокон с миофибробластами и пигментными клетками (рис. 6б). Наблюдали набухание клеток, выстилающих лимфатические каналы, и увеличение интерстициальных пространств (рис. 7а, б).

Наблюдается отек, набухание структурных компонентов и утолщение сосудистой оболочки глаза при терминальной стадии глаукомы можно рассматривать как нарушение лимфатического дренажа органа зрения.

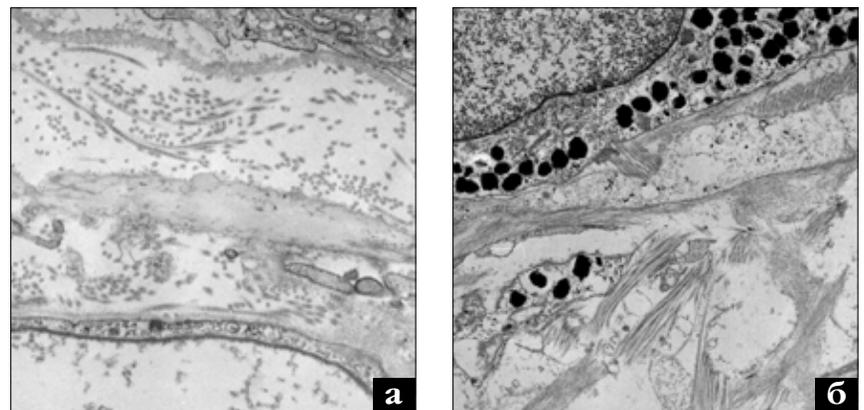


Рис. 6. Набухание перикапиллярных пространств (а) и нарушение связи якорных коллагеновых волокон с пигментными клетками (б). Ув. х8000

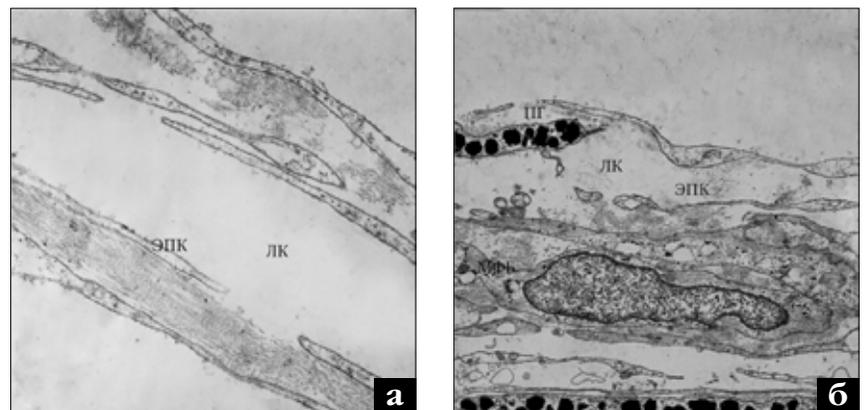


Рис. 7. Структура лимфатических каналов хориоидеи при глаукоме: а) лимфатический канал (ЛК), выстланный набухшими эндотелиоподобными клетками (ЭПК). Ув. х8000; б) увеличение интерстициальных пространств и набухание клеток, выстилающих лимфатический канал (ЭПК), пигментной клетки (ПГ) и миофибробласта (МФБ). Ув. х8000

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании показано наличие лимфатических каналов и лимфатических лакун в хориоиде глаза человека. Лимфатические каналы располагаются в сосудисто-капиллярной пластинке и сосудистой пластинке и ограничены Podoplanin+, Pгох-1+, LYVE-1+-эндотелиоподобными клетками, фибробластами и пигментными клетками. Лимфатические лакуны расположены в надсосудистой пластинке и выстланы эндотелиоподобными клетками и фибробластами.

Выявленные при терминальной стадии первичной открытоугольной глаукомы отек и набухание стромы хориоидеи, возрастание объемных плотностей эпителия, интерстициальных пространств и сосудов хориоидеи свидетельствуют о нарушении лимфатического дренажа глаза, развивающегося с начальных стадий глаукоматозного процесса и приводящего к нарушению оттока ВГЖ через протективную лимфатическую систему. Нарушение лимфатического дренажа способствует накоплению в органе зрения избыточного количества биологически активных молекул, токсичных продуктов метаболизма и клеточной деструкции. Это приводит

к постоянной активации деструктивно-воспалительного процесса, фиброзу и склерозированию трабекулярной зоны шлеммова канала, что обуславливает нарушение оттока ВГЖ и формирование порочного круга развития патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородин Ю.И., Коненков В.И., Любарский М.С. Лимфология. – Новосибирск, 2011. – 566 с.
2. Бородин Ю.И., Бгатова Н.П., Черных В.А. и др. Структура лимфатических капилляров ресничного тела глаза человека // Морфология. – 2015 – Т. 148, № 6. – С. 43-47.
3. Черных В.В., Бородин Ю.И., Бгатова Н.П. и др. Роль лимфатической системы в увеосклеральном оттоке внутриглазной жидкости // Офтальмохирургия. – 2015. – № 2. – С. 74-79.
4. Alm A., Nilsson S.F. Uveoscleral outflow-a review // Exp. Eye Res. – 2009. – Vol. 88, № 4. – P. 760-768.
5. Chan-Ling T., Dabstrom J.E., Koina M.E. Evidence of hematopoietic differentiation, vasculogenesis and angiogenesis in the formation of human choroidal blood vessels // Exp. Eye Res. – 2011. – Vol. 92. – P. 361-376.
6. Herwig M., Münstermann K., Klarmann-Schulz U. et al. Expression of the lymphatic marker Pdpn (D2-40) in human fetal eyes // Exp. Eye Research. – 2014. – Vol. 127. – P. 243-251.

7. Kim M., Johnston M.G., Gupta N. et al. A model to measure lymphatic drainage from the eye // Exp. Eye Res. – 2011. – Vol. 93, № 5. – P. 586-591.

8. Koina M.E., Baxter L., Adamson S.J. et al. Evidence for lymphatics in the developing and adult human choroid // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2015. – Vol. 56, № 2. – P. 1310-1327.

9. Nakao S., Hafezi-Moghadam A., Isbibashi T. Lymphatics and Lymphangiogenesis in the Eye // J. Ophthalmol. – 2012. – Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317234>.

10. Schroedl F., Brehmer A., Neububer W.L. et al. 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. – Vol. 49, № 12. – P. 5222-5229.

11. Schroedl F., Kaser-Eichberger A., Schlereth S.L. et al. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2014. – Vol. 55, № 10. – P. 6440-6442.

12. Yücel Y.H., Johnston M.G., Ly T. et al. Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: a novel «uveolymphatic» outflow pathway // Exp. Eye Res. – 2009. – Vol. 89, № 5. – P. 810-809.

13. Yücel Y. Discovery of lymphatics in the human eye and implications // Canadian Journal of Ophthalmology // Can. J. Ophthalmol. – 2010. – Vol. 45, № 2. – P. 115-117.

Поступила 15.06.2016

НОВОЕ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

ООО «Издательство «Офтальмология»»

Электронная версия www.eyepress.ru

РЕФЕРАТИВНО-
ИНФОРМАЦИОННЫЙ
ЖУРНАЛ