

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**АНАТОМИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА И ЕГО
ОБОЛОЧЕК**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Климовой Марии Максимовны

Научный руководитель:

доцент, док. биол. наук _____

О.В. Семячкина-Глушковская

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук _____

О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Открытие лимфатических сосудов в оболочках мозга повлекло за собой смену научных представлений о механизмах дренажа в головном мозге и поддержании гомеостаза. Долгое время центральная нервная система (ЦНС) считалась лишенной лимфатической сети, однако, ученые выяснили, что она имеет свою собственную систему выведения метаболитов и токсинов, а также уникальные механизмы регуляции баланса спинномозговой жидкости (СМЖ) и интерстициальной жидкости. В 2012 году была создана глимфатическая теория, объясняющая принцип движения жидкостей и метаболитов [1]. Согласно этой теории, метаболиты и токсины передвигаются из периваскулярных пространств (ПВП) через глию, выполняющей функции лимфатических сосудов. Глимфатическая теория подверглась критике со стороны нейрофизиологов ввиду отсутствия доказательства прохождения крупных молекул через глию, в то время, как движение соединений по ПВП является установленным фактом [2]. Таким образом, на данный момент научно доказано, что в совокупности менингеальная и периферическая лимфатические системы образуют проводящие пути вывода метаболитов и токсинов из мозга.

В последнее время накопились свидетельства, что лимфатическая система ЦНС не пассивная иммунная сеть, а орган с высоким уровнем иммунного ответа [3-6]. Несмотря на то, что мозг лишен «классической» лимфатической системы, в ЦНС пациентов с различными неврологическими заболеваниями были обнаружены третичные лимфатические органы (ТЛО) [7]. ТЛО – структуры, подобные лимфатическим узлам, которые развиваются на фоне хронических воспалений. Они играют важную роль во взаимодействии между сосудистой системой воспаленного мозга и белками лимфатических структур [6]. Присутствие лимфатических сосудов – характерная черта ТЛО в периферических тканях [7]. Однако, они не были открыты в ТЛО воспаленного мозга.

Лимфатические сосуды обнаружены в твердой оболочке человека, грызунов и *zebrafish* [8]. Несмотря на то, что твердая оболочка не является

частью ЦНС, она вместе с остальными менингеальными оболочками покрывает головной и спинной мозг. Впервые лимфатические капилляры в ЦНС были обнаружены и описаны Prineas в 1979 [9]. Он исследовал 5 человеческих мозгов с различными неврологическими заболеваниями и наблюдал тонкостенные каналы, которые по морфологическому строению и ультраструктуре схожи с лимфатическими капиллярами в периферических тканях. Однако, Prineas идентифицировал лимфатические капилляры с помощью электронной микроскопии без специальных маркеров лимфатических эндотелиальных клеток. Это делает спорным его исследование, поэтому существование лимфатической системы в головном мозге человека остается актуальным вопросом.

Целью данной работы явилось изучение присутствия лимфатических сосудов в тканях мозга человека с применением специфических маркеров лимфатического эндотелия, а также конфокального и иммуногистохимического анализа экспрессии белков лимфатического эндотелия в условиях нормы и патологии. Для этого были поставлены следующие задачи:

- 1) Провести идентификацию лимфатических структур с применением маркеров лимфатического эндотелия, таких как Lyve-1 и Prox-1, а также маркера эндотелия кровеносных сосудов CD31 с применением конфокального и иммуногистохимического анализа экспрессии указанных белков в контрольной группе, включающей пациентов, умерших от инфаркта миокарда, и в экспериментальной группе, включающей ткани мозга после развития внутрижелудочковых геморрагий;
- 2) Провести анализ присутствия макрофагов в лимфатических структурах, меченных Lyve-1 и Prox-1 с дополнительной маркировкой макрофагов антителами к белку CD68 и с применением конфокального и иммуногистохимического методов;
- 3) Провести теоретический анализ лимфатических механизмов дренажа тканей мозга человека.

Материал исследования

Образцы аутопсии головного мозга и мозговых оболочек человека (средний возраст 65 лет) были получены на кафедре патологической анатомии Саратовского государственного медицинского университета. Все полученные образцы фиксировали и хранили в 10% растворе формалина. Исследование проводилось в следующих группах: 1) в контрольную группу включен мозг без повреждений, полученный от пациентов, умерших от хронической сердечной недостаточности и развития отека легких ($n = 7$); 2) экспериментальная группа включала мозг, полученный от пациентов, умерших от первичных и вторичных внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК), $n = 34$.

В таблице в приложении А содержится описание истории смерти пациентов, взятых в исследование.

Для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания использовали два классических маркера лимфатических эндотелиальных сосудов. 1) рецептор гиалуроновой кислоты эндотелия лимфатических сосудов 1 (Lyve1) и 2) белок гомеобокса 1 (Pgox1). Для отличия лимфатических капилляров от церебральных кровеносных сосудов применяли маркер (CD31). Схема функциональной значимости маркеров представлена в обзоре [62].

Структура работы

Диплом изложен на 55 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Обозначения и сокращения, Введение, Основная часть, Выводы, Список использованных источников и Приложения. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

1. Обзор литературы, который в себя включает: историю изучения лимфатической системы, физиологию, морфологию и анатомию лимфатических сосудов, циркуляцию спинномозговой и интерстициальной жидкостей в головном мозге, периваскулярный транспорт жидкостей в ЦНС и его роль в неврологических заболеваниях, а также заболевания мозга, связанные с нарушениями дренажной с очистительной функции мозга.

2. Материалы и методы исследований, в которых рассматривались материалы исследований, методы исследований соответственно.
3. Результаты исследований выявили, что лимфатические структуры в мозге пациентов с внутрижелудочковыми кровоизлияниями имеют типичные характеристики первичных лимфатических капилляров. Полученные результаты способствуют пересмотру знаний о роли церебральных лимфатических капилляров мозга в регуляции водного баланса в ЦНС и очищении тканей мозга от токсичных веществ и метаболитов, а также о его иммунных защитных процессах в условиях патологии.

Научная новизна

Впервые в мире открыты лимфатические сосуды тканей мозга человека, соответствующие морфологическим и ультраструктурным характеристикам лимфатической системы. Показано, что в тканях мозга человека первичные лимфатические капилляры экспрессируют классические белки, типичные для лимфатического эндотелия, такие как Lyve-1 и Prox-1. Лимфатические капилляры выполняют функцию переноса иммунных клеток, в частности макрофагов. На основе полученных пионерских результатов по присутствию лимфатических капилляров в тканях мозга впервые разработана новая научная концепция дренажа тканей мозга и выведения из центральной нервной системы токсинов по лимфатическим путям, что кардинально меняет мировоззрение о механизмах очищения тканей мозга от метаболитов и ненужных молекул. Это открывает перспективы для развития прорывных технологий для нейрореабилитационной медицины, направленных на лечение заболеваний мозга, связанных с нарушением его лимфодренажной функции.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Первичные лимфатические капилляры проходят вдоль церебральных кровеносных сосудов;

- 2) Первичные лимфатические капилляры экспрессируют Lyve1/Prox1;
- 3) Первичные лимфатические капилляры имеют один эндотелиальный слой с недифференцированной базальной мембраной и отсутствием гладкой мускулатуры;
- 4) Лимфатические эндотелиальные клетки имеют волнообразную форму;
- 5) В первичных лимфатических капиллярах присутствуют иммунные клетки (макрофаги).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Конфокальная микроскопия лимфатических капилляров с применением метода двойной колоколизации

В исследовании тканей мозга пациентов с ВЖК использовали 2 маркера лимфатического эндотелия Lyve1 и Prox1 для идентификации лимфатической структуры и CD 31 для маркирования кровеносных сосудов. С помощью конфокальной микроскопии были идентифицированы структуры, которые экспрессируют указанные маркера лимфатического эндотелия, колоколизированные друг с другом (Рисунок 4). Были обнаружены структуры, подобные лимфатическим капиллярам, в форме «дубового листа», что соответствует их классической структуре. Таким образом, были выявлены характерные признаки для лимфатических капилляров в тканях мозга пациентов с ВЖК: экспрессия и колоколизация Lyve1 и Prox1 и характерная форма «дубового листа».

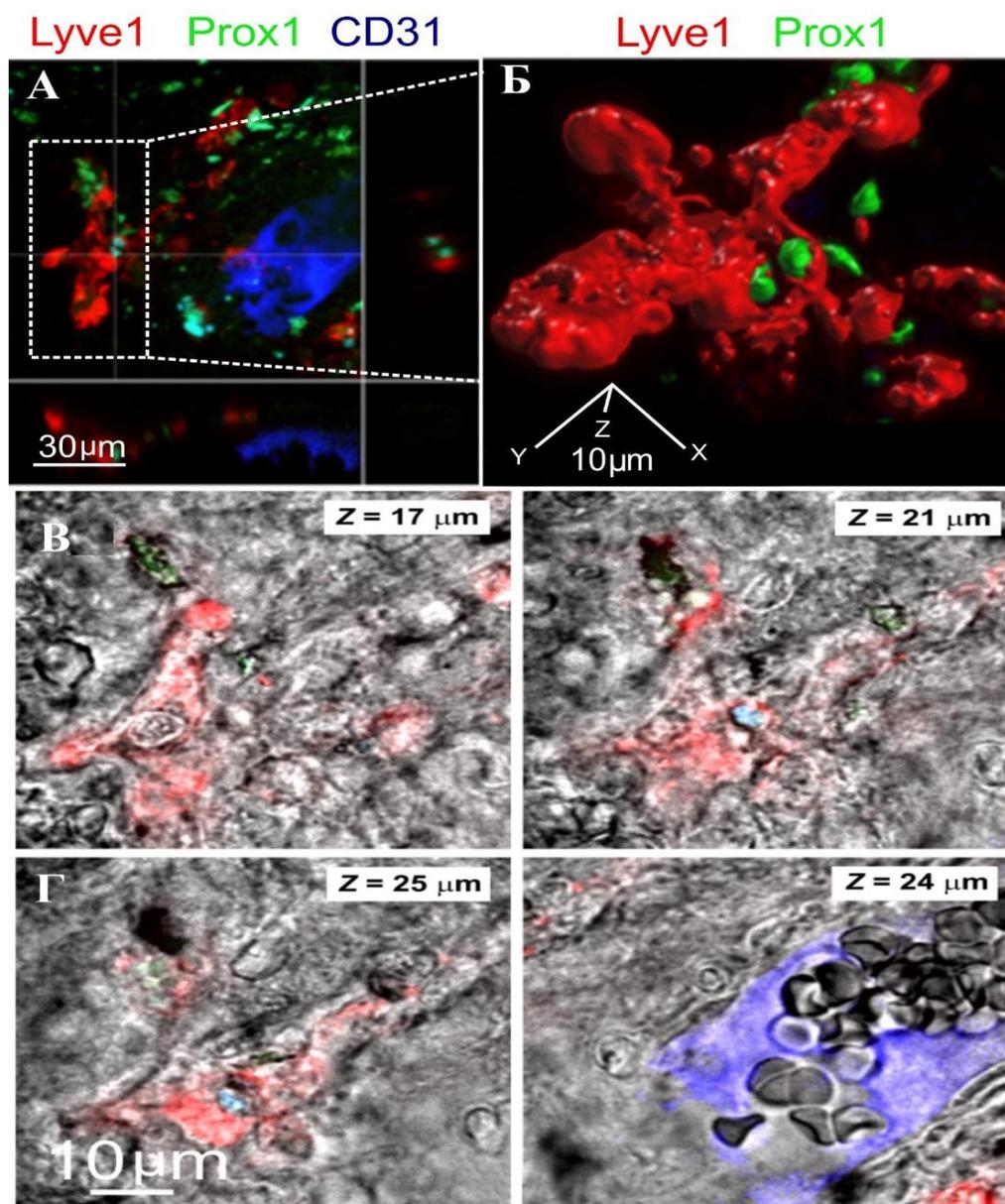


Рисунок 4 – Конфокальное изображение лимфатических капилляров, меченных Lyve1 (красный) и Prox1 (зеленый), а также кровеносного сосуда, меченного CD31 (А, Б). Z стэки сняты на глубине 17, 21, 25 мкм. В-Г – Изображения в проходящем свете (серый цвет), лимфатических капилляров волнообразной формы (красный), полученные при глубине z стека 17, 21, 25 мкм. Изображение кровеносного сосуда (синий цвет), снятое на глубине 24 мкм

На рисунке 5 показано конфокальное изображение лимфатических капилляров вдоль церебральной вены с одновременной экспрессией Lyve1 и Prox1.

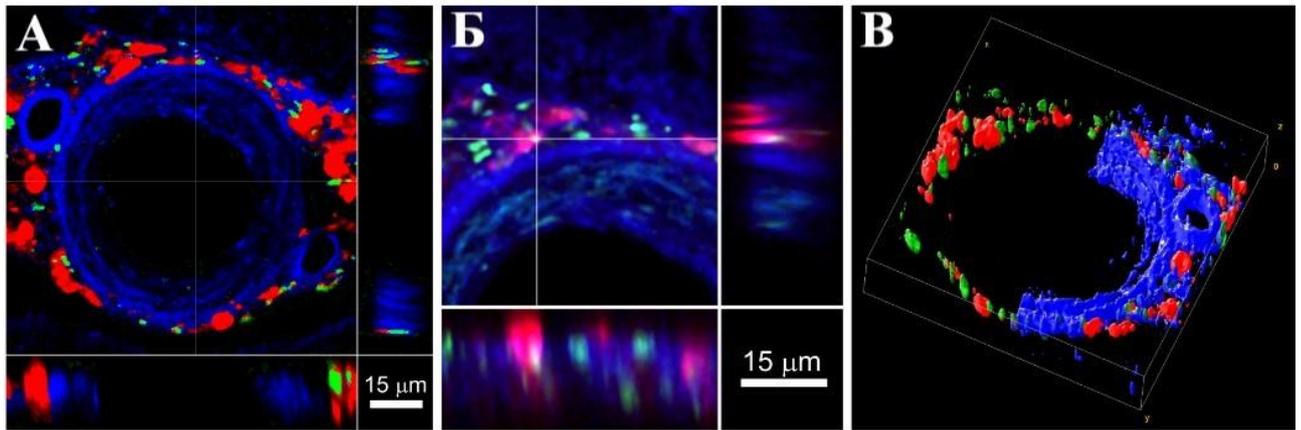


Рисунок 5 – Лимфатические сосуды в периваскулярном пространстве белого вещества пациентов с ВЖК. А – Иммуногистохимическое окрашивание двумя маркерами лимфатического эндотелия Lyve-1 (красный цвет) и Prox 1 (зеленый цвет) и маркером кровеносного эндотелия CD-31 (синий) в поперечной проекции; Б - z-стэки изображения А (масштаб 70 мкм); В - 3D реконструкция области интереса, обозначенной на изображении А (масштаб 70 мкм)

На следующем этапе провели исследование ультраструктуры лимфатических капилляров с помощью электронной микроскопии (Рисунок 6). На рисунке 6 показаны лимфатические капилляры, имеющие характерные признаки ультраструктуры лимфатических сосудов в виде отсутствия базальной мембраны и гладкой мускулатуры, а также большого расстояния между белками плотных контактов. Ультраструктура лимфатических капилляров в тканях мозга соответствовала таковой в мозговой оболочке (Рисунок 7).

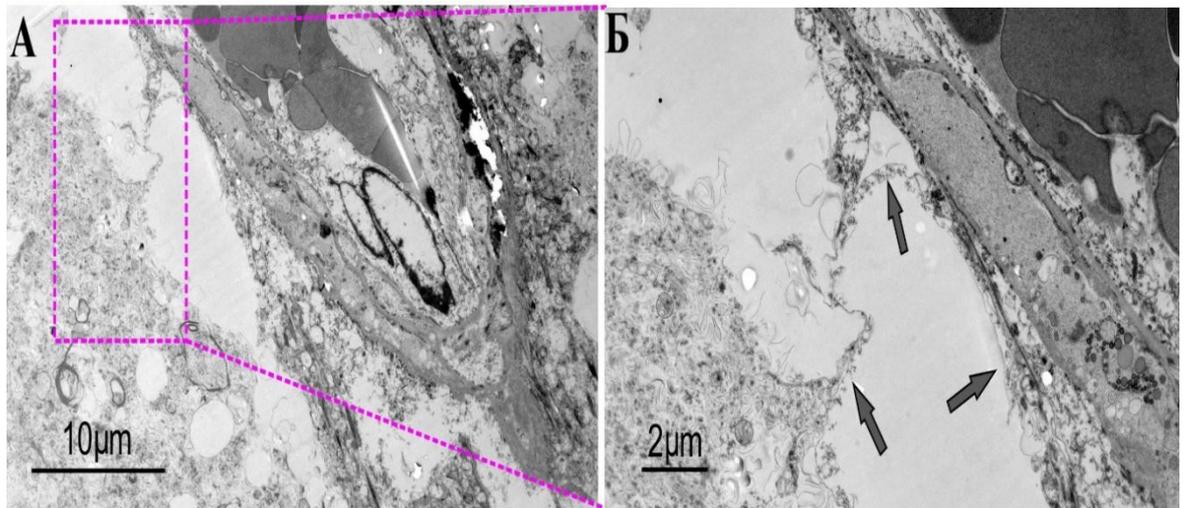


Рисунок 6 – Идентификация первичных лимфатических капилляров в головном мозге человека с ВЖК. А – Трансмиссионная электронная микроскопия лимфатических капилляров, Б – увеличенное изображение области интереса с изображения А. Стрелками обозначены лимфатические капилляры

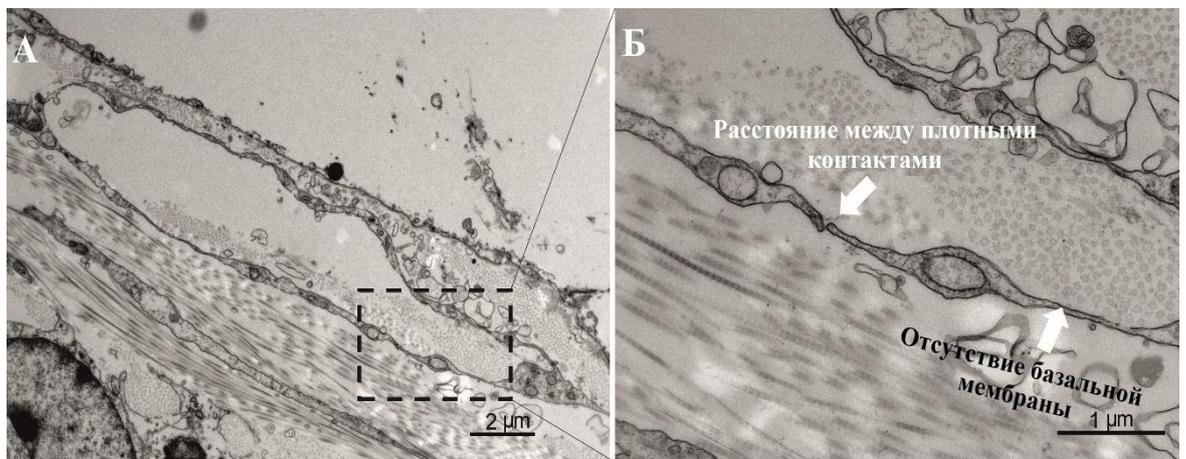


Рисунок 7 – Трансмиссионная электронная микроскопия ультраструктуры менингеальных лимфатических сосудов

Исследование расположения лимфатических сосудов в тканях мозга позволило выявить, что они присутствуют в местах развития периваскулярной эдемы. Результат гистологического анализа тканей мозга пациентов с ВЖК отражает присутствие лимфатических структур в увеличенных ПВП, которые возникают при повреждении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при развитии ВЖК. Геморагии в головном мозге в совокупности с открытым ГЭБ создают в

тканях мозга избыточное давление интерстициальной жидкости, что в итоге приводит к увеличению ПВП (Рисунок 8).

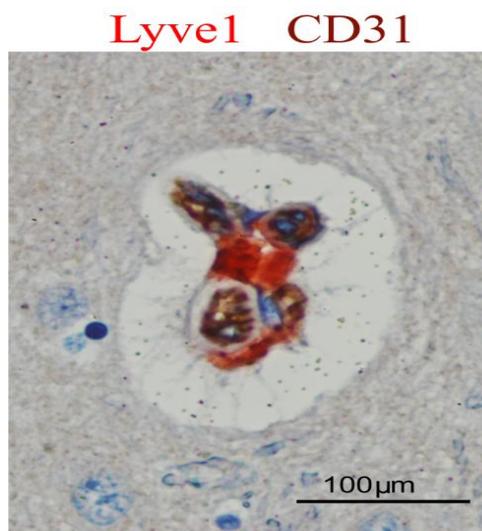


Рисунок 8 – Гистологическое изображение лимфатического капилляра и увеличенного периваскулярного пространства в срезе головного мозга человека с ВЖК, окрашенного Lyve1(красный) CD31 (бурый)

В таблице 1 приведены количественные показатели объема ПВП, а также экспрессии CD31, CD68 and Lyve-1 структур в тканях головного мозга людей с ВЖК и контрольной группы. Результаты сравнительного анализа показали, что объем ПВП людей с ВЖК выше в 52 раза (26 мкм (10-42) [13,5-27] против 0,5 мкм (0-4)[1-2] = 52). У пациентов с ВЖК отмечается высокое число макрофагов и лимфатических структур, экспрессирующих Lyve1 (10,5 (5-90) [8-18] против 0,0000); (2 (0-8)[0-3,75] против 1 (0-3)[0-3].

Таблица 1 – Количественный анализ периваскулярного пространства, CD31, CD68 and Lyve-1 структур

Группы число образцов	Диаметр CD31- положительных кровеносных сосудов (μм)	Количество CD68 положительных макрофагов в периваскулярном пространстве)	Диаметр Lyve1- положительных структур (μм)	Количество Lyve1- положительных структур	Размер периваскулярного пространства, μм

Me (Min-Max) Q [25-75]					
Группа с ВЖК n=8	20 (11 - 80) [14-30]	2 (0-8) [0-3,75]	10,5 (5-90) [8-18]	3 (1-6) [2-4,5]	26 (10-42) [13,5-27]
Контроль ная группа n=7	13 (10-15) [10-14]	1 (0-3) [0-3]	0,0000	0,0	0,5 (0-4) [1-2]
Критерий Манна-Уитни	Z= 0,75 p=0,61	Z= 0,56 p=0,91	Z=1,06 p=0,205	Z=1,91 p=0,001	Z= 2,58 p=0,0001

Для исследования лимфатических структур рекомендовано использование двойного маркирования в силу причин, что лимфатические сосуды закладываются из церебральных вен, и поэтому могут экспрессировать белки, характерные для кровеносных сосудов, например CD-31 [63].

В свою очередь церебральные вены могут экспрессировать Lyve-1 [64]. Кроме того, макрофаги также экспрессируют Lyve-1, который является маркером лимфатического эндотелия. В силу этих причин для исключения экспрессии Lyve-1 на макрофагах проводили исследование экспрессии Lyve-1 и CD68 (маркера макрофагов) в их колоколizations с использованием конфокальной микроскопии и иммуногистохимического анализа.

На рисунках 9, 10 показано, что Lyve-1 экспрессируется исключительно на эндотелии лимфатических сосудов и не принадлежит к макрофагам. CD68 экспрессируется только на макрофагах, которые наблюдаются внутри лимфатических капилляров.

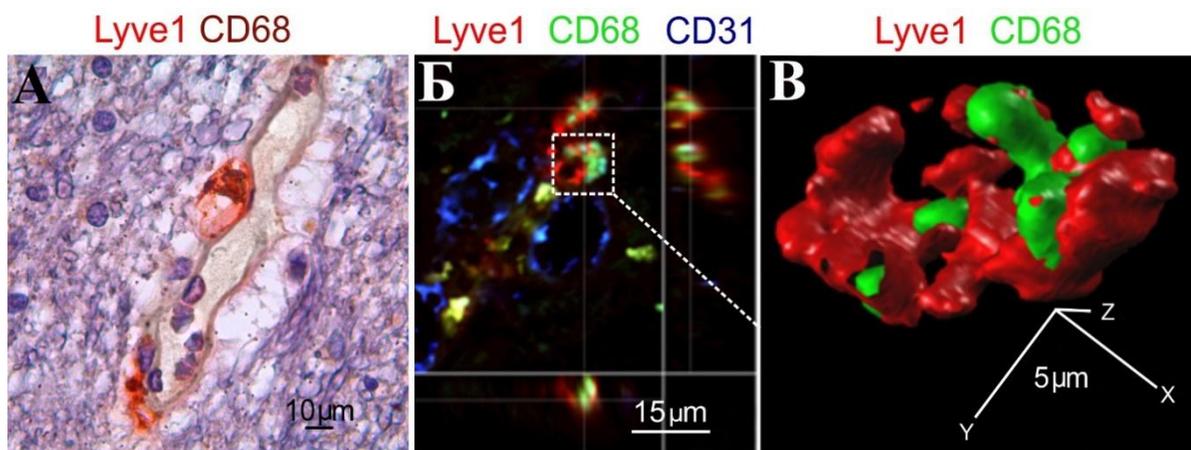


Рисунок 9 – Визуализация макрофагов в лимфатических капиллярах. А – Гистологическое изображение лимфатического сосуда, меченного Lyve-1 (красный) с макрофагами CD68 (бурый) внутри него; Б – Конфокальное изображение лимфатического капилляра, на котором отображена экспрессия CD-31 (синий), Lyve-1 (красный) и CD68 (зеленый); В – 3D реконструкция области интереса из изображения Б

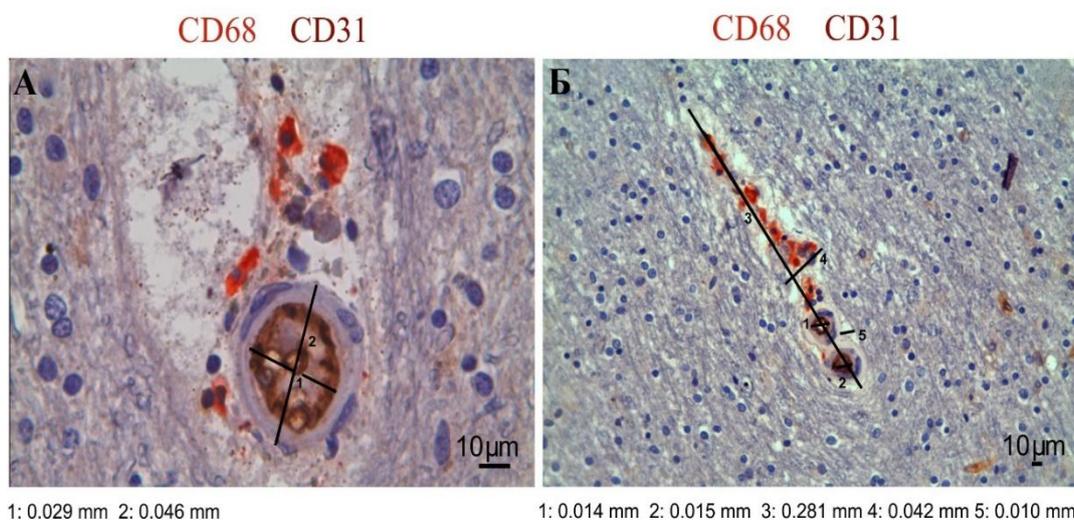


Рисунок 10 – Иммуногистохимическое окрашивание CD68-макрофагов (красный) и маркер кровеносных сосудов CD31 (бурый) в области вазогенного отека в тканях мозга пациентов с ВЖК

Важной характеристикой экспрессии маркера лимфатического эндотелия Prox 1 является его присутствие в ядре, поскольку данный белок тесно связан с хромосомами [65].

Рисунок 11 отражает данные конфокальной микроскопии экспрессии Prox 1 (зеленый) на ядрах, меченных Dapi (голубой) лимфатического эндотелия.

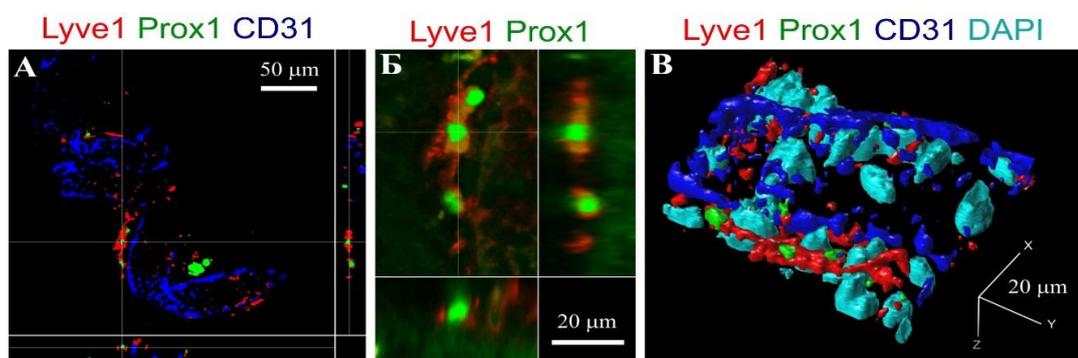


Рисунок 11 – Идентификация первичных лимфатических сосудов в тканях мозга пациентов с ВЖК. А- Иммуногистохимическая окраска двумя маркерами лимфатического эндотелия Lyve1 (красный) и Prox1 (зеленый) и маркером кровеносных сосудов CD-31 (синий) в продольной проекции. Б - z-стэки изображения А; В - 3D реконструкция области интереса, отмеченной на изображении А

3.2 Моделирование дренажной функции мозга

Пути мозговых жидкостей, которые обеспечивают своевременное выведение метаболитических отходов активно обсуждаются уже долгое время. На данный момент наиболее обсуждаемая – предложенная в 2012 году лимфатическая гипотеза [66-68]. Некоторые предположения этой теории были подтверждены экспериментально и могут относиться к доказанным фактам. К таковым относятся – существование направленного потока спинномозговой жидкости в ПВП пиальных артерий, а также важная роль сосудистых пульсаций [69-70].

В то же время отсутствуют общие ключевые положения. Конкретно, работа не раскрывает направленного потока в паренхиме мозга, а математический подсчет характеристик перистальтического транспорта показывает, что он слишком слаб для создания потока [71, 72]. Также существуют противоречивые взгляды на подходы к расчету градиента давления [73, 74].

Следует отметить, что были предложены разные схемы потока жидкостей в тканях мозга, отличные от глимфатической гипотезы. В работах Weller поднимался вопрос об оттоке интерстициальной жидкости через межклеточное пространство стенок сосудов, как изображено на рисунке 12 А [4]. Глимфатическая теория объясняет движение интерстициальной жидкости путем диффузии (Рисунок 12 Б, В), однако общего мнения насчет дренажных путей паренхимы мозга пока не существует.

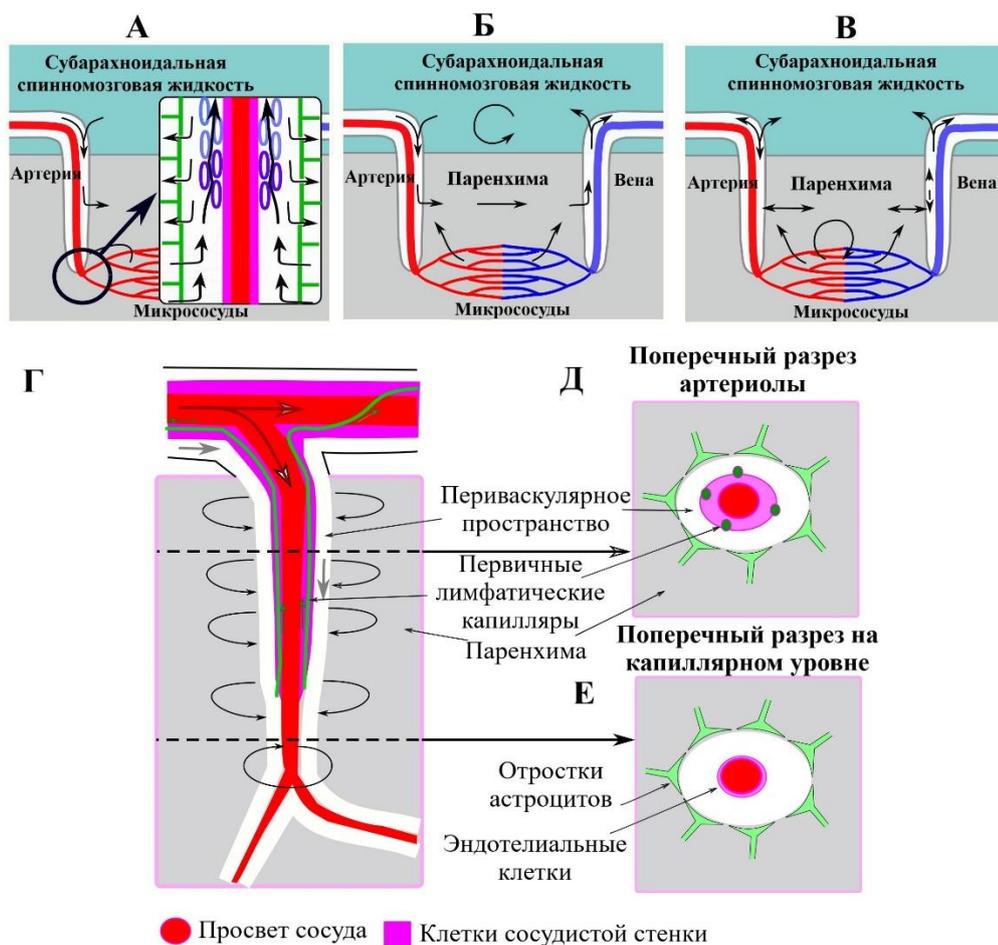


Рисунок 12 – Возможные пути движения интерстициальной жидкости к паренхиме мозга. А – Теория Веллера; Б, В – глимфатическая теория; Г, Д, Е – изображения, основанные на предположении о движении интерстициальной жидкости по лимфатическим капиллярам

В то же время в работах Mestre, Raghunandan приводятся экспериментальные доказательства направленного потока интерстициальной жидкости к паренхиме в ПВП артериальных сосудов. В этих работах показаны траектории движения частиц в ПВП за счет пульсации сосудов. Однако роль пульсации артерий в продвижении различных соединений в ПВП мозга пока остаются плохо изучены и единого мнения об этих процессах не существует.

Присутствие лимфатических капилляров, предназначенных для оттока жидкости через стенку сосудов переносит идеи Weller на новый уровень, замещая отток жидкости через межклеточное пространство гладкомышечных клеток сосудов на движение жидкости по обнаруженным каналам.

Важно отметить, что эффективность дренажа определяется низким сопротивлением сосудов, так как градиент давления между СМЖ и лимфатическими сосудами в менингеальных оболочках крайне мал. Обнаруженные лимфатические капилляры имеют диаметр около 10 микрон. Если предположить, что поперечный размер межклеточной щели в стенке сосуда 0,2 микрон, подсчет с помощью формулы течения Хагена-Пуазейля в круглой трубке и тонком плоском канале показывает, что течение жидкости по лимфатическим капиллярам будет в 20-500 раз выше, чем в узкой щели, предполагая одинаковую площадь поперечного сечения и градиент давления [75].

В схеме движения жидкостей и дренажа в паренхиме мозга, показанной на рисунке 12 Г, Д, Е, пульсации артериальных сосудов играют ключевую роль в передвижении СМЖ из ПВП в паренхиму мозга и в обратном направлении. Таким образом, объемный поток через паренхиму отсутствует или, по крайней мере, очень мал по сравнению с потоком в ПВП, а перенос метаболитических отходов из паренхимы в ПВП ускоряется процессом комбинированного действия пульсирующего переноса (адвекции) и диффузии.

Количественная оценка вклада такого пульсирующего потока в процесс дренажа требует специального модельного исследования, которое выходит за рамки данной работы. Здесь мы проиллюстрировали только принципиальную возможность использования предлагаемого механизма, используя простую

физическую модель, состоящую из 9 отсеков, как показано на рисунке 13 А. Каждое из 9 отсеков описывается тем же набором уравнений, что и на рисунке 13 Б. Желаемая структура моделируемой системы задается как локальными параметрами для каждого отсека, так и его связями с соседними элементами модели. Детали этой модели и обоснование зависимостей для R_{ij} и K_{ij}^{diff} приведены в [76].

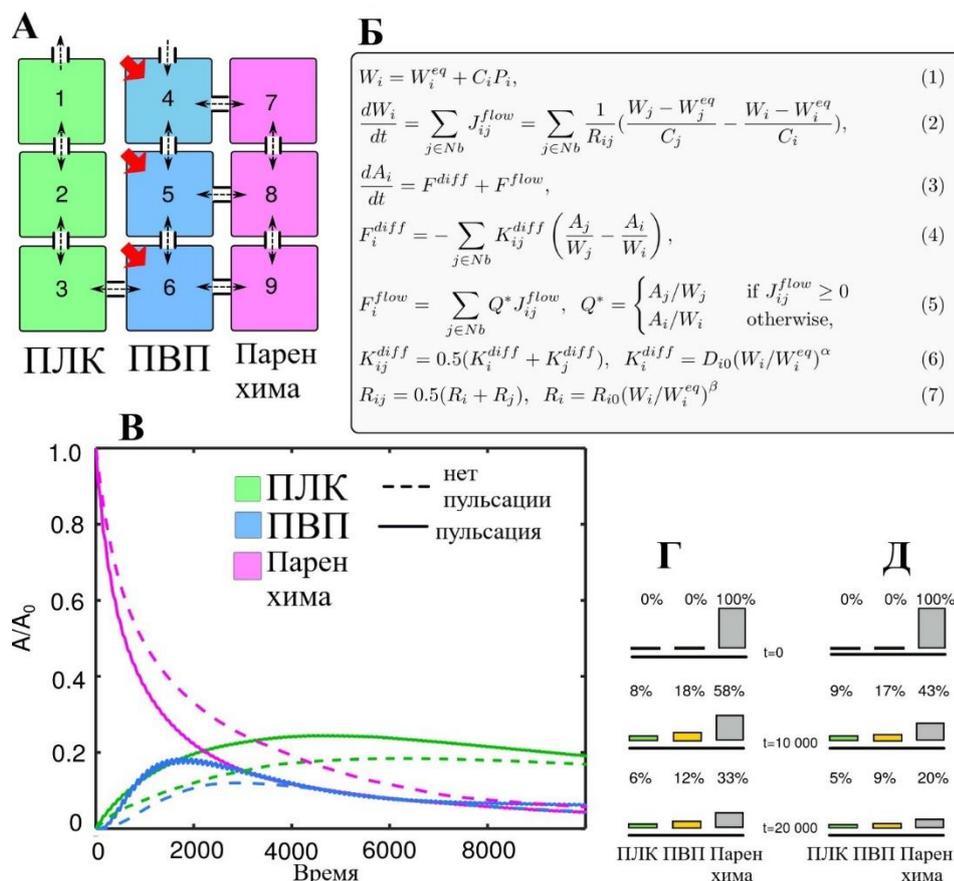


Рисунок 13 – Моделирование дренажа тканей мозга на основе пульсации артерии. А – Направление движения интерстициальной жидкости в мозге; Б – уравнения для каждого отдела модели; В - смоделированное вымывание вещества, первоначально введенного в паренхиму мозга (1,0 при $t = 0$), без (штриховые линии) и с (сплошные линии) артериальной пульсацией; Г, Д - Гистограммы, показывающие распространение модельного вещества во времени между первичными лимфатическими капиллярами (ПЛК), периваскулярным пространством и паренхимой

В ходе моделирования исходные условия были установлены таким образом, что вещество А (которое представляет собой «метаболические отходы») загружается в паренхиму (отсеки 7,8,9). Чтобы учесть затрудненное сцепление между ПВС и паренхимой, как обратное гидродинамическое сопротивление $1 / R_{ij}$, так и скорость диффузии K_{ij}^{diff} на стыках элементов 4-7, 5-8 и 6-9 были уменьшены в 10 раз по сравнению с соединением между однотипными элементами, такими как 1-2, 2-3, 3-6, 4-5, 5-6, 7-8, 8-9. На рисунке 13 В, Г, Д мы сравнили два случая: когда объем ПВП 4,5,6 был постоянным и когда объем ПВП периодически снижался, что имитировало эффект артериальной пульсации.

Результаты моделирования позволили заключить, что наличие пульсации способно ускорить вымывание метаболических остатков из паренхимы в условиях, когда основной поток при дренировании не проходит через паренхиму.

ВЫВОДЫ

В целом исследования выявили, что лимфатические структуры в мозге пациентов с внутрижелудочковыми кровоизлияниями имеют типичные характеристики первичных лимфатических капилляров:

- 6) первичные лимфатические капилляры проходят вдоль церебральных кровеносных сосудов;
- 7) экспрессируют Lyve1/Prox1;
- 8) имеют один эндотелиальный слой с недифференцированной базальной мембраной и отсутствием гладкой мускулатуры;
- 9) лимфатические эндотелиальные клетки имеют волнообразную форму;
- 10) присутствуют иммунные клетки (макрофаги).

Присутствие лимфатических капилляров в головном мозге человека являются важным открытием и недостающим звеном в концепции дренажа ЦНС. Полученные результаты способствуют пересмотру знаний о роли церебральных лимфатических капилляров мозга в регуляции водного баланса в ЦНС и очищении тканей мозга от токсичных веществ и метаболитов, а также о его иммунных защитных процессах в условиях патологии.

Дальнейшее исследование функций церебральных лимфатических капилляров может быть революционным шагом на пути переоценки базовых понятий нейроиммунологии и этиологии заболеваний головного мозга, связанных с нарушением функций церебральной лимфатической системы. Открытие церебральных лимфатических капилляров также является важным этапом для создания и развития прорывных технологий в области терапевтической модуляции процессов лимфатического освобождения тканей мозга от токсинов.