

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**ЛИМФАТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА
ЧЕЛОВЕКА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Елизаровой Инны Владимировны

Научный руководитель

доцент, док. биол. наук _____ О. В. Семячкина – Глушковская
(подпись, дата)

Зав. кафедрой человека и животных,

доцент, док. биол. наук _____ О. В. Семячкина – Глушковская
(подпись, дата)

Саратов 2024

Введение. Лимфатическая система выполняет важную функцию дренажа тканей, транспортируя по лимфе метаболиты, ненужные соединения и токсины, которые необходимо вывести из организма, а также иммунные клетки. В центральной нервной системе (ЦНС) дренажные процессы протекают также интенсивно, как и в периферических тканях. Мозг активно обменивается с кровью питательными соединениями и выделяет ненужные метаболиты, используя дренажные пути, которые тесно связаны с периферической лимфатической системой.

Открытие менингеальных лимфатических сосудов в головном мозге человека не является новым событием в нейронауке. Они были обнаружены в 17 веке итальянским анатомом Пауло Масканьи. Однако на тот момент его открытие не было признано из-за того, что никто в мире не смог повторить исследование анатома.

В 40-х годах прошлого столетия была попытка воспроизвести эксперимент Масканьи в работах Лекко, который также обнаружил лимфатические сосуды в оболочках мозга у 7 пациентов, умерших от гидроэнцефалии. Позже, в 1979 году Принеас впервые, используя электронную микроскопию, обнаружил лимфатические капилляры в тканях головного мозга людей, умерших от болезни Альцгеймера и рассеянного склероза. И только в 2015 году, используя современные технологии визуализации тканей мозга грызунов и человека, а также маркеры лимфатического эндотелия, было подтверждено открытие Масканьи.

Однако, до сих пор остается общепринятое мнение, что в тканях головного мозга нет лимфатических сосудов. Это связано с тем, что оболочки мозга не относятся к его тканям. Именно поэтому открытие менингеальных лимфососудов не позволяет ответить на вопрос: “присутствует ли лимфатическая система в тканях головного мозга”. Открытия Принеаса не были приняты научной общественностью в связи с тем, что он не применял специфических маркеров лимфатического эндотелия. Тем не менее за последние 100 лет накоплено достаточно научных результатов,

свидетельствующих об активных дренажных процессах в центральной нервной системе. Обнаружение лимфатических сосудов в тканях головного мозга человека является недостающим звеном в картине понимания иммунной системы мозга.

Поскольку в тканях головного мозга отсутствует лимфатическая система, в нейронауке возникла глимфатическая теория. Она объясняет, что жидкость с растворенными в ней веществами, перемещается вдоль периваскулярного пространства артерий к периваскулярному пространству вен. Важную роль в теории отводят аквапориновым каналам, располагающиеся на астроцитах, которые являются движущей силой жидкости в глиальных пространствах.

Однако уже с самого начала существования глимфатической теории были понятные ошибки с точки зрения биохимии и физиологии.

Целью работы является поиск признаков присутствия лимфатических структур в тканях головного мозга человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить присутствие лимфатических сосудов в тканях головного мозга человека с применением специфических маркеров лимфатического эндотелия, включая LYVE-1;
2. Исследовать лимфатические структуры в тканях головного мозга человека с применением иммуногистохимического метода двойного окрашивания на основе применения CD31 и LYVE-1;
3. Осуществить конфокальную визуализацию лимфатических структур в головном мозге человека при помощи флуоресцентных маркеров LYVE-1 и PROX-1;
4. Провести статистический анализ числа лимфососудов в тканях головного мозга человека.

Структура и объем работы. Работа включает в себя обозначения и сокращения, введение, 3 главы, выводы и список использованных источников.

Работа проиллюстрирована 2 таблицами, 15 рисунками. Список использованных источников включает в себя 60 наименований.

Основное содержание работы. Данная работа выполнена на базе лаборатории “Умного сна” кафедры физиологии человека и животных медицинского центра Саратовского Государственного Университета Н. Г. Чернышевского.

Объект исследования

Эксперименты проводились на биоптатах тканей головного мозга пациентов, умерших от ВЖК (n=34). В контрольную группу вошли пациенты, умершие от сердечной недостаточности и развития легочной эдемы (n=8). Средний возраст пациентов составил 42 года.

Образцы головного мозга человека были взяты в Саратовской городской клинической больнице № 1 им. Ю.Я. Гордеева. Все образцы мозга были получены в течение первых 2-3 часов после смерти из-за правил сертификации смерти мозга, немедленно зафиксированы и сохранены в 10%-ном растворе формалина. Проведение исследований было одобрено этической комиссией со всеми регалиями ФГБОУ ВО Саратовский Государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Минздрава России по протоколу № 13 от 30.06.2021.

Иммуногистохимический анализ. Для маркировки лимфатических сосудов применяли LYVE-1 (lymphaticvesselendothelialreceptor 1) и белок гомеобокса 1 (Prox1-Prosperohomeoboxprotein 1). Для отличия лимфатических от церебральных сосудов применяли маркер CD31. Для детекции макрофагов в лимфатических сосудах использовали маркер CD68. Чтобы отличить макрофаги от лимфатических сосудов, использовали аналогичный протокол двойного окрашивания. На первом этапе использовалось разведенное кроличье антитело против CD68 (ab201973, Abcam, Великобритания, 1:500) с визуализацией хромогена DAB (коричневый цвет). На втором этапе использовали антитело против Lyve-1 с визуализацией хромогена АЕС (красный цвет).

Для проведения иммуногистохимического анализа проводили забор тканей головного мозга и готовили свободно-плавающие срезы. Мозговые оболочки фиксировали 4%-ным PFA (параформальдегид). После фиксации мозг подвергали криозащите с использованием 20% сахарозы в PBS (10 мл/мозг мыши) в течение 48 часов при 400С. Мозги замораживали в гексане и охлаждали до -32-360С. Криосрезы (14 мкм) теменной коры собирали на предметных стеклах poly-L-Lys, Polysine (Menzel-Glaser, Германия) с использованием криотома (Thermo Scientific Microm HM 525, Германия) и жидкости для фиксации образца Tissue-Tek (Sakura Finetek, США). Срезы головного мозга обрабатывали в соответствии со стандартным протоколом ИГХ соответствующими первичными и вторичными антителами. Неспецифическую активность блокировали 2-часовой инкубацией при комнатной температуре с 10% BSA (альбумин бычьей сыворотки) в 0,2% растворе Triton X-100 в PBS. Солюбилизацию клеточных мембран проводили в течение 1-часовой инкубации при комнатной температуре в 1% растворе Triton X-100 в PBS промывочном фосфатно-солевом буфере.

Флуоресцентные маркеры были подобраны таким образом, чтобы обеспечить максимально контрастное изображение лимфатических сосудов и минимизировать спектральное наложение каналов для кровеносных и лимфатических сосудов.

Инкубацию с первичными антителами в разведении 1:500 проводили в течение ночи при 4°C: с антителами кролика к Lyve-1 (1:500; ab219556; Abcam, Биомедицинский кампус Кембридж, Кембридж, Великобритания); антителами мыши к CD31 (1:500; ab187377; Abcam, Биомедицинский кампус Кембридж, Великобритания). Кембридж, Великобритания) и мышинные антитела к антигликофору А (GPA) (1:500; ab7503; Abcam, Биомедицинский кампус Кембриджа, Кембридж, Великобритания). На всех этапах образцы промывали 3-4 раза с 5-минутной инкубацией в промывочном растворе. Затем применяли соответствующие вторичные антитела (козий анти-мышинный IgG (H+L) Alexa Four 555 и козий анти-кроличий IgG (H+L) Alexa Four 488; Invitrogen,

Молекулярные образцы, Юджин, Орегон, США). На заключительном этапе срезы переносили в стекло и на срез наносили 15 мкл монтирующей жидкости (50%-ный глицерин в PBS с DAPI в концентрации 2 мкг/мл). Препарат накрывали покровным стеклом и проводили конфокальную микроскопию.

Исследование ИГХ проводили на парафиновых срезах, используя стандартный протокол двойного иммуногистохимического окрашивания с моноклональными антителами к Lyve1 (ab219556, Abcam, Биомедицинский кампус Кембриджа, Кембридж, Abcam, Великобритания, 1:500), CD-31 (ab187377, Abcam, Биомедицинский кампус Кембриджа, Кембридж, Abcam, Великобритания, 1:500), CD-68 (ab201973, Abcam, Биомедицинский кампус Кембриджа, Кембридж, Abcam, Великобритания, 1:500).

Первоначально эндогенную пероксидазу блокировали добавлением 0,3% перекиси водорода к срезам в течение 10 мин с последующей промывкой срезов в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS). Выделение антигена проводили с использованием микроволновой печи в буфере Trilogy, неспецифическое фоновое окрашивание блокировали в PBS, содержащем 0,5% BSA и 0,5% казеина, в течение 10 мин, после чего срезы промывали в PBS в течение 5 мин. Чтобы отличить кровеносные сосуды от ЛЭ, использовали протокол двойного окрашивания. Срезы инкубировали с первым разведенным мышинным антителом против CD31 (ab187377, Abcam, Великобритания, 1:500) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем срезы промывали в PBS. Иммуногистохимическую реакцию визуализировали с помощью HiDef. Детектирующая полимерная система HPR (марка Cell, США) с визуализацией хромогена DAB (коричневый цвет). На втором этапе использовали кроличье антитело против Lyve-1 (ab219556, Великобритания, 1:500) с визуализацией хромогена AEC (красный цвет). Затем срезы окрашивали гематоксилином в течение 1 мин, промывали в воде и, наконец, помещали в монтажную среду.

На первом этапе исследования был поставлен вопрос о выявлении лимфатических сосудов непосредственно в тканях головного мозга пациентов, умерших от внутрижелудочкового кровоизлияния (ВЖК). Для этого

использовали иммуногистохимический анализ с двумя маркерами, такими как LYVE-1 для маркировки лимфатического эндотелия и CD31 для маркировки сосудистого эндотелия. Результаты показали, что в тканях мозга пациентов LYVE-1 и CD31 сосуды экспрессируют указанные маркеры отдельно и не принадлежат друг другу. В области отёка, связанных с ВЖК, располагаются в непосредственной близости друг к другу LYVE-1- и CD31- экспрессирующие сосуды.

Поскольку CD68 может экспрессироваться как на макрофагах, так и на лимфатическом эндотелии, данный маркер применяют для выявления лимфатического эндотелия. CD68 экспрессируется внутри LYVE-1-сосуда, то есть макрофаг находится в лимфососуде, что является характерным признаком для лимфатической сети. Также выявлено, что CD68 экспрессируется вокруг CD31-экспрессирующих сосудов. Таким образом, результаты ИГХ анализа тканей головного мозга человека позволили выявить наличие лимфоподобных структур, имеющие признаки лимфатических сосудов, а именно экспрессия LYVE-1 и наличие стенки тканей головного мозга пациентов, умерших от ВЖК. Отметим, что в мозге пациентов из контрольной группы LYVE-1-экспрессирующие структуры не были выявлены, что может быть связано с их малыми размерами, развитием вазогенного отёка при ВЖК могло способствовать заполнению жидкостью лимфатических структур, что позволило их визуализировать с помощью маркера.

Конфокальная микроскопия. Для конфокальной визуализации ЛЖ и ЛЭ в головном мозге человека использовали протокол иммуногистохимического (ИГХ) анализа с двумя маркерами лимфатических эндотелиальных клеток, такими как Lyve-1 (ab219556; Abcam, BiomedicalCampusCambridge, Кембридж, Великобритания, 1:500) и Prox-1 (NBP1-30045; NovusBiologicals, Литтлтон, США, 1:500), для маркера эндотелия крови CD31 (ab187377; Abcam, BiomedicalCampusCambridge, Кембридж, Великобритания, 1:500) и для маркера макрофагов CD68 (ab 201973, Abcam, BiomedicalCampusCambridge, Cambridge, Великобритания, 1:500). Флуоресцентные маркеры были

подобраны таким образом, чтобы обеспечить максимально контрастное изображение лимфатических сосудов и минимизировать спектральное наложение каналов для кровеносных и лимфатических сосудов.

Для визуализации лимфатической системы использовали многоканальные флуоресцентные изображения препарата головного мозга, полученные методом конфокальной и двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии с помощью микроскопа A1R MP (Nikon, Япония). Микроскоп позволяет получать изображения головного мозга живых животных, а также препаратов головного мозга животных и человека.

В основе этого метода лежит флуоресцентная микроскопия селективного планарного освещения, с применением просветленных препаратов головного мозга. Преимуществом микроскопии селективного планарного освещения является получение изображений больших областей головного мозга. Однако невысокая числовая апертура объектива затрудняет визуализацию малых кровеносных сосудов и капилляров. В отличие от кровеносных сосудов, лимфатические сосуды имеют меньшие размеры, поэтому их визуализация требует использования объективов с высокой числовой апертурой, не менее 0,75. Рабочий отрезок объективов с такой числовой апертурой не превышает 1,5, что делает использование методов микроскопии селективного планарного освещения нецелесообразным. По этой причине основным источником данных о тонкой структуре лимфатических сосудов были изображения, полученные методом двухфотонной микроскопии.

На втором этапе для конфокальной визуализации лимфатических сосудов и ЛЭ в головном мозге человека использовали протокол иммуногистохимического анализа с двумя маркерами лимфатических эндотелиальных клеток, такими как Lyve-1 и Prox-1, для маркера макрофагов CD68, DAPI для окраски дцДНК. Для отличия лимфатических от церебральных сосудов применяли маркер CD31. Внимание было сосредоточено на исследовании коры головного мозга, которая покрыта тремя слоями мозговых оболочек с сетью условных лимфатических сосудов. Были проанализированы

две области человеческого мозга в постцентральной извилине теменной доли и в нижней затылочной извилине. Для визуализации лимфатических структур необходимо применение двойных маркеров на лимфатический эндотелий. LYVE-1 может экспрессироваться не только на стенках ЛЭ, но и на кровеносных сосудах. Для того, чтобы исключить ошибки в эксперименте, использовался PROX-1, который экспрессируется на ядрах лимфатических структур. Таким образом, была применена колокализация маркеров. Благодаря этому методу была выявлена характерная форма клиновидного листа лимфатических капилляров.

Кроме того, были обнаружены просветленные сосуды, экспрессирующие Lyve-1/Prox-1, видны отчетливые стенки, состоящие из одного эндотелиального слоя. Колокализация с двумя маркерами лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) ясно показала, что экспрессия основного фактора транскрипции LEC, Prox-1, наиболее удачна с белком Lyve-1, а также с DAPI, который указывает, на то, что в клетках действительно содержатся ядра, находящиеся в тканях головного мозга.

Метод конфокальной микроскопии позволил идентифицировать лимфатические элементы, экспрессирующие Lyve-1/Prox-1 в 8 из 34 головного мозга пациентов, умерших от ВЖК, а также в 3 из 8 головного мозга контрольной группы с застойной сердечной недостаточности и развитием отека легких.

Статистический анализ. Весь статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и SPSS 17.0 для Windows. Нормальность распределения по группам проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для непараметрического распределения данных значимость различий между конкретными группами определялась с использованием критерия Манна-Уитни (U/Z-критерий) с вычислением медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей Q (25-75), максимума и минимума. В этом методе медианные различия были определены при $Z \geq 1,96$ при уровне значимости $p < 0,05$ (с вероятностью более 95%).

На третьем этапе исследования, чтобы выяснить присутствие лимфатических структур в головном мозге человека, проводилась обработка данных в следующих группах: 1) контрольная группа включала неповрежденный мозг, полученный от пациентов, умерших от застойной сердечной недостаточности и развития отека легких (n=8); 2) группа, где пациенты умерли после первичных и вторичных внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК), n=34.

По итогу анализа, в контрольной группе у трёх пациентов, умерших от застойной сердечной недостаточности с развитием отека легких, иммуногистохимическое окрашивание тканей коры головного мозга выявило положительные элементы Lyve-1/Prox-1. У 8 пациентов, умерших от ВЖК, обнаружили положительные элементы Lyve-1/Prox-1. Количество лимфатических сосудов было выше в группе ВЖК по сравнению с контрольной.

Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга, окрашенных на CD31 и Lyve-1, показал, что структуры Live-1+ были идентифицированы вдоль CD31+ капилляров, артериол и венул с увеличенным периваскулярным пространством (ПВП). Размер ПВП и среднее количество структур Live-1+ в ПВП были значительно выше в группе ВЖК по сравнению с контрольной. Диаметр лимфатических сосудов не оценивался из-за их ограниченного числа в исследуемых образцах.

Выводы: 1.С использованием маркёров лимфатического (LYVE-1) и сосудистого (CD31) эндотелия установили их экспрессию отдельно друг от друга, что свидетельствует о том, что LYVE-1 экспрессируется на лимфоидных структурах, а CD31 на кровеносных сосудах. Таким образом было выявлено наличие лимфоидных структур, располагающихся рядом с кровеносными сосудами в тканях головного мозга человека;

2.С использованием маркёра макрофагов CD68 было показано присутствие этих иммунных клеток внутри LYVE-1-лимфатических структур, что является дополнительным свидетельством их принадлежности к

лимфатической системе, а также доказывает, что CD68 и LYVE-1 экспрессируются отдельно друг от друга. Это исключает принадлежность LYVE-1 к макрофагам, которые тоже могут его экспрессировать;

3. Конфокальная визуализация подтвердила присутствие лимфоидных структур в головном мозге у пациентов, умерших от ВЖК, а также от застойной сердечной недостаточности и развития отека легких.

4. Использование двойных маркеров позволяет заключить, что обнаруженные LYVE-1/PROX-1 позитивные сосуды относятся к лимфатическим структурам, поскольку оба маркера располагаются на лимфатическом, но не в кровеносном эндотелии.

5. На большом количестве статистического анализа биопсии тканей головного мозга людей, умерших от ВЖГ, сделан вывод о наличии лимфоидных структур, экспрессирующих LYVE-1, которые относятся к лимфатической системе, расположенной вдоль кровеносных сосудов головного мозга человека.