

УДК 617.721.6-006.81-076

МОРФОСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

*В.В. Черных, Н.П. Бгатова, В.В. Макарова, Ю.С. Таскаева,
С.Р. Ноговицина, А.Н. Трунов, А.В. Еремина*

Наличие лимфатических каналов в структуре цилиарного тела и хориоидеи глаза человека и их роль в нарушении функционального состояния увеолимфатического пути оттока во многом определяют выраженность трофических и метаболических нарушений в механизмах развития глаукоматозного процесса и запуску порочного круга развития патологического процесса. Методами электронной микроскопии и иммуногистохимического анализа показаны типичные по строению кровеносные капилляры и сосуды, определены различные типы клеток стромы увеальной меланомы. Наличие в каналах внеклеточного матрикса локальных структур, окрашивающихся на маркеры кровеносных и лимфатических сосудов (CD31 и Podoplanin), свидетельствуют, что описанные эндотелиоподобные клетки могут быть структурной основой для опухолевых кровеносных и лимфатических сосудов.

Ключевые слова: лимфатическая система глаза; лимфатические маркеры; увеальная меланома.

УВЕАЛДЫК МЕЛАНОМАНЫН КЛЕТКАЛАРЫНЫН МОРФОЛОГИЯЛЫК ТҮЗҮМДҮК МҮНӨЗДӨМӨСҮ

*В.В. Черных, Н.П. Бгатова, В.В. Макарова, Ю.С. Таскаева,
С.Р. Ноговицина, А.Н. Трунов, А.В. Еремина*

Адамдын көзүнүн цилиардык бөлүгүнүн жана хориоидеясынын түзүмүндө лимфа каналдарынын болушу жана лимфа жолдорунун функционалдык абалынын бузулушунда алардын ролу глаукоматоздук процесстин өнүгүү механизмдеринде трофикалык жана метаболикалык бузулууларды жана аныктайт жана патологиялык процесстердин өнүгүүсүнүн башталышына алып келет. Электрондук микроскопия жана иммуногистохимиялык анализ ыкмалары менен типтүү түзүлүштөгү капиллярлары жана тамырлары көрсөтүлгөн, увеал меланомасынын стромасынын клеткаларынын ар түрдүү типтери аныкталды. Клеткадан тышкары матрикс каналдарында кан жана лимфа тамырларынын маркерлерине боёлгон (CD31 жана Podoplanin) локалдык түзүмдөрдүн, сүрөттөлгөн эндотелийге окшош клеткалардын болушу шишик кан жана лимфа тамырлары үчүн түзүмдүк негиз болушу мүмкүн экендигин билдирет.

Түйүндүү сөздөр: көздүн лимфа системасы; лимфа маркерлер; увеалдык меланома.

MORPHOSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF UVEAL MELANOMA CELLS

*V.V. Chernykh, N.P. Bgatova, V.V. Makarova, Yu.S. Taskaeva,
S.R. Nogovitsina, A.N. Trunov, A.V. Eremina*

The presence of lymphatic channels in the structure of the ciliary body and chorioidea of the human eye and their role in violation of the functional state of the uveolymphatic outflow pathway, in many respects determines the intensity of trophic and metabolic disorders in the mechanisms of glaucomatous process development and triggering the vicious circle of pathological process development. Electron microscopy and immunohistochemical analysis have shown the typical structure of blood capillaries and blood vessels, representing various types of stromal cells of uveal melanoma. The presence of local structural channels in the channel of the extracellular matrix that are stained for markers of blood and lymph vessels (CD31 and Podoplanin) leads to the fact that the described endothelial cells can be structural causes of tumor blood and lymph vessels.

Keywords: lymphatic system of the eye; lymphatic markers; uveal melanoma.

Введение. Пристальное внимание ученых, в последние годы изучающих офтальмологию, морфологию и патофизиологию органа зрения, обращено на лимфатическую систему, играющую значимую роль в процессах выведения ксенобиотиков, продуктов, возникающих в процессе жизнедеятельности клеток, развития деструктивно-воспалительного процесса, метаболических нарушений и поддержания гомеостаза организма [1, 2]. Однако единого мнения о наличии лимфатических структур в органе зрения (в хориоиде, цилиарном теле) в настоящее время нет, дискуссия, развернувшаяся в литературе, имеет своих сторонников и противников [3, 4].

Одним из значимых исследований, результаты которого свидетельствуют в пользу наличия лимфатического оттока, является работа [5], в которой было показано, что через 15 минут после введения люминесцентных наносфер в переднюю камеру глаза овец они выявлялись в просвете LYVE-1⁺-лимфатических каналов цилиарного тела. Через четыре часа после инъекции метку обнаруживали в шейном, заглоточном и подчелюстном лимфатических узлах. Эти данные указывают на присутствие лимфатических каналов в цилиарном теле глаза человека и на то, что жидкость и растворенные в ней вещества оттекают, по меньшей мере – частично, через лимфатическую систему.

Также большое количество новых исследований свидетельствуют о наличии лимфатических каналов в структуре цилиарного тела и хориоидеи глаза человека [6, 7] и их роли в степени структурированности и нарушении функционального состояния увеолимфатического путей оттока, который во многом определяет выраженность трофических и метаболических нарушений в механизмах развития глаукоматозного процесса и способствует запуску порочного круга развития патологического процесса. Основываясь на этих данных, при современном развитии морфологических исследований возникает вопрос о структуре увеальной меланомы и возможности новообразования лимфатических структур при ее развитии.

Цель исследования – изучить структуры клеток стромы увеальной меланомы при использовании ультраструктурного анализа

и молекулярных маркеров эндотелиоцитов кровеносных и лимфатических сосудов.

Материалы и методы. Были взяты фрагменты энуклеированных по медицинским показаниям глаз больных 11 глаз с диагнозом “меланома хориоидеи”. Энуклеация проводилась по медицинским показаниям. Всем пациентам обследованных групп диагноз ставился на основании стандартного офтальмологического обследования. У всех пациентов было получено информированное согласие на проведение операции, забор энуклеированного глаза, а также использование данных исследования в научных целях. Исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”, Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 года № 323 ФЗ “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации”, а также требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 № 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014) “О персональных данных” (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015).

Для морфологического изучения биологические образцы фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида (рН = 7,2), после фиксации образцы промывали проточной водой в течение нескольких часов, затем обезвоживали и выдерживали в смеси “этанол – ксилол” и в чистом ксилоле и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартному протоколу. Для иммуногистохимического окрашивания тканевые срезы депарафинизировали и регидратировали, проводили процедуру раскрытия антигена в цитратном буфере (рН 6,0) с использованием микроволновой печи. Далее, после блокирования неспецифического связывания, срезы гибридизировались первичными поликлональными антителами к CD31 (ab28364, Abcam, Великобритания) или моноклональными антителами к Podoplanin (MON-RTU1092 Monosan, Нидерланды) в течение ночи при +4 °С; затем, с соответствующими вторичными поликлональными антителами козла к IgG кролика и мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab205718 и ab6789, соответственно, все – Abcam, Великобритания)

в течение 1 часа при комнатной температуре. После гибридизации и трехкратной отмывки фосфатно-солевым буфером, срезы контрастировали раствором гематоксилина и заключали в монтирующую среду. Изображения тканевых срезов глаза получали с помощью светового микроскопа "Leica DME".

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

Результаты. При окрашивании препаратов увеальной меланомы гематоксилином и эозином в структуре опухоли наблюдали крупные сосуды, капиллярную сеть и оксифильно окрашенные тяжи внеклеточного матрикса (рисунок 1, А). При анализе клеток, находящихся в каналах внеклеточного матрикса между скоплениями опухолевых клеток, выявляли различные по ультраструктурной организации клетки стромы и их отростки (рисунок 1, Б). Не вызывали сомнений в клеточной принадлежности присутствующие в тяжах внеклеточного матрикса макрофаги, которые отличались хорошо развитым лизосомальным аппаратом (рисунок 1, В). Отмечали зрелые фибробласты с большим содержанием цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулаума и наличием коллагеновых фибрилл и волокон в окружающем внеклеточном матриксе (рисунок 1, Г). В то же время наблюдали фибробласты, различной степени дифференцированности.

Если фибробласты различались содержанием белок-синтетического аппарата, то группа

фрагментов клеток, наблюдаемых в каналах внеклеточного матрикса, характеризовалась низким содержанием органелл и наличием большого количества кавеол, заполнявших всю цитоплазму (рисунок 2, А). Кавеолы представляют собой небольшие инвагинации плазматической мембраны в форме колб, которые содержатся во многих типах клеток. Они отмечены в адипоцитах, фибробластах, эпителиальных клетках, но наибольшее их количество присутствует в сосудистых эндотелиальных клетках. Функции кавеол, наряду эндоцитозом и транцитозом, включают ремоделирование внеклеточного матрикса, миграцию клеток, передачу сигналов клетки, липидный обмен и регенерацию [8].

С одной стороны, фрагменты клеток с кавеолами в каналах внеклеточного матрикса, могли быть отростками опухолевых клеток, с другой – они содержали очень большое количество кавеол и имели структурные различия. Одни из этих клеток были окружены плотными тяжами внеклеточного матрикса (рисунок 2, Б), другие – свободно лежали в каналах между опухолевыми клетками (рисунок 2, В). Наблюдаемые нами клетки с кавеолами по ультраструктурной организации соответствовали описанным в ряде работ эндотелиоподобным клеткам [9]. Причем по данным авторов, характеризующих новообразование сосудов при увеальной меланоме [10], развитие кровеносных капилляров связано с формированием базальных пластинок внеклеточного матрикса, в которые погружены эндотелиальные клетки. Следовательно, наблюдаемые нами клетки с большим количеством кавеол в цитоплазме, окруженные плотными отложениями внеклеточного матрикса, могут представлять собой незрелые эндотелиальные клетки развивающихся кровеносных капилляров. Данное предположение косвенно подтверждается результатами иммуногистохимического окрашивания срезов увеальной меланомы на маркер эндотелиальных клеток кровеносных сосудов CD31, которое, наряду с типичными сформированными кровеносными капиллярами (рисунки 2, Г, Д) выявляло наличие узких петлеобразных структур в интерстиции опухолевых клеток, что, могло быть связано с новообразованием кровеносных сосудов (рисунок 2, Е).

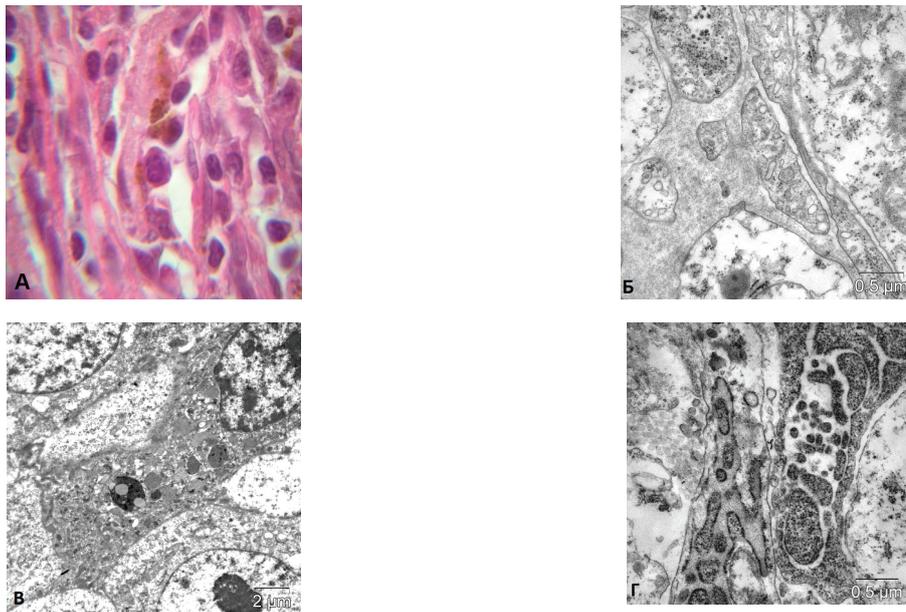


Рисунок 1 – Увеальная меланома. А – тяжи внеклеточного матрикса. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$. Б – фрагменты клеток стромы. В – ультраструктура макрофага. Г – зрелые фибробласты

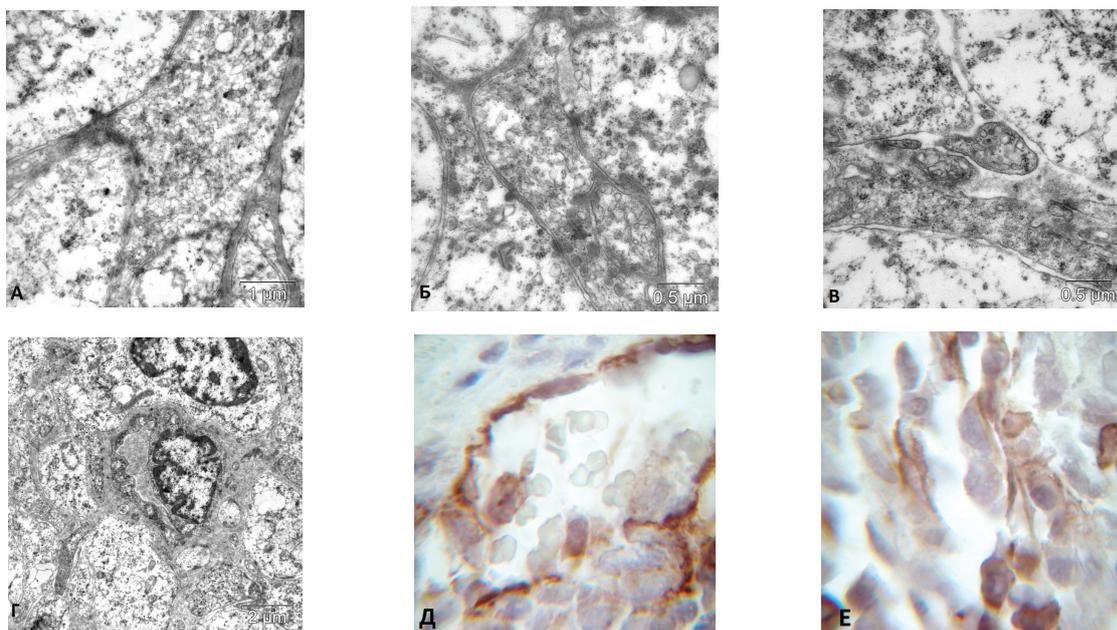


Рисунок 2 – Структура сосудистых клеток увеальной меланомы. А – клетка с большим содержанием кавеол в цитоплазме. Б – эндотелиоподобные клетки, окруженные плотным внеклеточным матриксом. В – эндотелиоподобные клетки, свободно лежащие в интерстиции. Г – кровеносный капилляр. Д – CD31+ – кровеносный сосуд. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия кровеносных сосудов CD31. Е – , CD31- – клетки формирующегося кровеносного капилляра. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия кровеносных сосудов CD31. Увеличение $\times 1000$

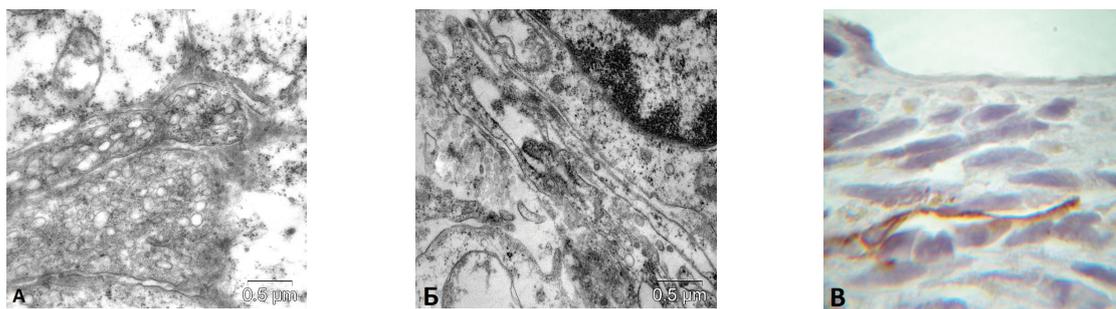


Рисунок 3 – Структура эндотелиоподобных клеток увеальной меланомы.

А – эндотелиоподобные клетки с округлыми формами. Б – ультраструктура сосуда, сходная со структурой лимфатического капилляра. В – Podoplanin⁺-клетки. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия лимфатических сосудов Podoplanin. Увеличение × 1000

Другой тип клеток с большим содержанием кавеол в цитоплазме, не ограниченных базальными пластинками, а расположенных свободно во внеклеточном матриксе, может представлять собой дифференцирующиеся эндотелиальные клетки лимфатических сосудов. Наблюдаемые нами округлые очертания данных клеток (рисунок 3, А) соответствуют имеющимся представлениям о слепо начинающихся лимфатических капиллярах [11]. К тому же во внеклеточном матриксе между скоплениями опухолевых клеток наблюдали структуры, сходные с лимфатическими капиллярами (рисунок 3, Б). Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелия лимфатических сосудов Podoplanin выявило наличие узких окрашенных структур среди опухолевых клеток, которые отсутствовали в условиях отрицательного контроля (рисунок 3, В).

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования показана ультраструктурная характеристика клеток стромы увеальной меланомы. Установлено, что в пространствах между скоплениями опухолевых клеток располагаются CD31⁺ – кровеносные капилляры и сосуды, имеющие типичную для данных сосудов ультраструктурную организацию. Обнаруженные эндотелиоподобные клетки с большим содержанием в цитоплазме кавеол могут представлять собой незрелые эндотелиальные клетки формирующихся кровеносных и лимфатических капилляров, о чем косвенно свидетельствует выявление в каналах внеклеточного матрикса структур, окрашивающихся на маркеры кровеносных и лимфатических сосудов (CD31

и Podoplanin). Трудности выявления лимфатических элементов в структурах глаза человека, обусловлены органо-специфичностью их строения, отсутствием однозначных молекулярных маркеров и требуют дальнейшего исследования с использованием дополнительных поверхностных и внутриклеточных маркеров для уточнения цитологической принадлежности данных клеток.

Литература

1. *Коненков В.И.* Лимфология / В.И. Коненков, Ю.И. Бородин, М.С. Любарский. Новосибирск: Манускрипт, 2012. 1104 с.
2. *Петренко В.М.* Функциональная анатомия лимфатической системы / В.М. Петренко. М.; Берлин: Директ Медиа, 2014. 116 с.
3. *Heindl L.M.* Sufficient evidence for lymphatics in the developing and adult human choroid? / L.M. Heindl, A. Kaser-Eichberger // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. Vol. 56. № 11. P. 6709–6710.
4. *Koina M., Baxter L., Adamson S. [et al.]* Evidence for Lymphatics in the Developing and Adult Human Choroid // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. Vol. 56. № 2. P. 1310–1327.
5. *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.
6. *Трунов А.Н.* Новые подходы к оценке выраженности воспалительных нарушений в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / А.Н. Трунов, Н.П. Бгатова, А.В. Еремина [и др.] // Аллергология и иммунология. 2016. Т. 17. № 2. С. 107–111.
7. *Черных В.В.* Лимфатические структуры органа зрения человека и их изменения при первичной открытоугольной глаукоме / В.В. Черных, Н.П. Бгатова. М.: Офтальмология, 2019. 80 с.

8. *Sohn J., Brick R.M., Tuan R.S.* From embryonic development to human diseases: The functional role of caveolae/caveolin // *Birth. Defects Res. C. Embryo Today*. 2016. Vol. 108. № 1. P. 45–64.
9. *Frontczak-Baniewicz M., Czajkowska D., Andrychowski J., Walski M.* The immature endothelial cell in human glioma. Ultrastructural features of blood capillary vessels // *Folia Neuro-pathol.* 2008. Vol. 46. № 1. P. 49–56.
10. *Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., Hendrix M.J.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry // *Am. J. Pathol.* 1999. Vol. 155. № 3. P. 739–752.
11. *Kerjaschki D.* The lymphatic vasculature revisited // *J. Clin Invest.* 2014. Vol. 124. № 3. P. 874–877.