

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ «КЛАССИЧЕСКИХ» И «СКРЫТЫХ» ХОРИОИДАЛЬНЫХ НЕОВАСКУЛЯРНЫХ МЕМБРАН ПРИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

УДК 617.735

ГРНТИ 76.29.56

БАК 14.01.07

© У.Р. Алтынбаев, И.Н. Серезжин, Л.Р. Алтынбаева

Медико-санитарная часть ОАО «Татнефть», Альметьевск

✧ Проведена сравнительная оценка морфологических особенностей и пролиферативной активности «классических» и «скрытых» хориоидальных неоваскулярных мембран (ХНМ) у пациентов с влажной формой возрастной макулярной дегенерации сетчатки. Установлено, что пролиферативная активность ХНМ зависит от типа мембраны. Наличие высокой отслойки пигментного эпителия у пациентов со «скрытой» ХНМ, может быть обусловлено наличием в субретинальном пространстве плотного аваскулярного рубца.

✧ **Ключевые слова:** трансформирующий фактор роста-b1; ядерный антиген пролиферирующих клеток; хориоидальная неоваскулярная мембрана; возрастная макулярная дегенерация.

ВВЕДЕНИЕ

В экономически развитых странах возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является ведущей причиной необратимой слепоты у пациентов старше 65 лет [7, 8]. «Влажная» форма ВМД, характеризующаяся развитием хориоидальной неоваскулярной мембраны (ХНМ) и фиброзными проявлениями, приводящими к резкой потере центрального зрения, развивается в 10 % случаях [3]. В настоящее время ХНМ подразделяют на «классические», расположенные преимущественно над слоем пигментного эпителия сетчатки, и «скрытые» или «окультные» мембраны, локализующиеся под слоем пигментного эпителия. Ключевую роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и экспрессии генов всех основных типов клеток, вовлеченных в патогенез различных фиброзных заболеваний, играет TGF-β. Действуя через стимуляцию выработки сосудистого эндотелиального фактора роста, TGF-β оказывает влияние на увеличение сосудистой проницаемости и является одним из основных медиаторов образования фиброваскулярного рубца в исходе субретинального неоваскулярогенеза, а также тесно связан с фиброгенезом в терминальной стадии заболевания [1]. Однако, несмотря на большое количество исследований, иммуноморфологические особенности влажных форм ВМД раскрыты недостаточно: не изучена пролиферативная активность различных типов («классическая», «скрытая») ХНМ и морфологическая основа высокой отслойки пигментного эпителия (ПЭ) у больных со «скрытой» ХНМ.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить иммуногистохимические особенности «классических» и «скрытых» ХНМ у больных с влажной формой ВМД.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 15 пациентов с влажной формой ВМД, которым выполнена витрэктомия с удалением ХНМ. В зависимости от типа ХНМ пациенты распределялись на 2 группы: 1 группу составили 10 больных с «классической» ХНМ, 2 группу — 5 больных со «скрытой» ХНМ. Морфологические исследования проведены в лаборатории морфологии и гистохимии Всероссийского центра глазной и пластической хирургии профессором, д. б. н. Муслимовым С. А. и к. б. н. Ивановой О. И.

Для гистологического исследования биоптаты ХНМ фиксировали в 10 %-м нейтральном растворе формалина. Ткани обрабатывали по общепринятой методике и заливали в парафин. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином по Ван-Гизону и по Маллори. Иммуногистохимические исследования проводили с помощью непрямого стрептовидин — биотинного метода на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с минимальной площадью 1 см².

Для оценки пролиферативной активности ХНМ использовались моноклональные антитела к TGF-b1 — transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста-b1) и определение ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA — proliferative cells nuclear antigen), TGF-b1, как известно, экспрессируется многими клетками соединительной ткани и играет ведущую роль в ее восстановлении. Экспрессия клетками этого цитокина инициирует миграцию нейтрофилов, макрофагов, моноцитов, фибробластов, индуцирует ангиогенез, кроме того TGF-b1 стимулирует экспрессию генов и стимуляцию белков внеклеточного матрикса. Следовательно, является одним из основных факторов, участвующих в развитии поствоспалительного фиброза [9].

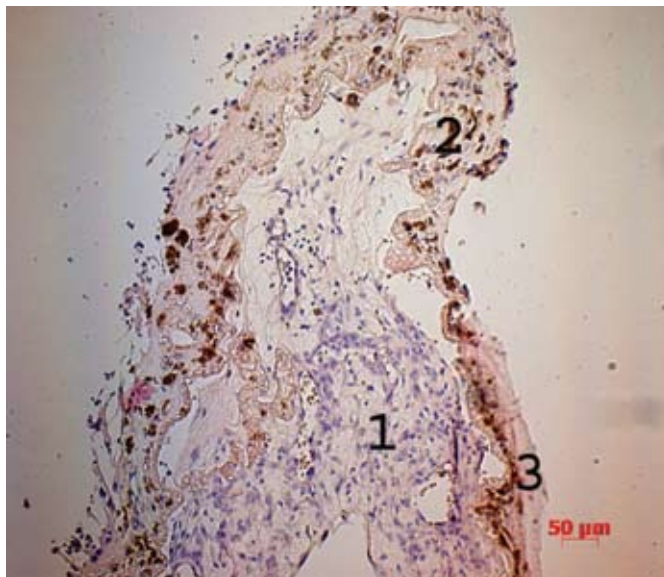


Рис. 1. Структура «классической» ХНМ: 1 — фиброваскулярная мембрана, 2 — слой клеток ПЭ с мембраной Бруха, 3 — слой фоторецепторов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: окуляр $\times 10$, объектив $\times 12,5$

Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA — proliferative cells nuclear antigen) присутствует в клетках во время активных фаз клеточного цикла (s) и отсутствует в фазе g0 (покоящихся клетках), свидетельствует об интенсивном клеточном размножении. Также, известно, что ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) в интерфазных ядрах встречается при репаративном синтезе ДНК после повреждения клеток [4, 5, 6].

Докраска препаратов осуществлялась гематоксилином. Микроскопические исследования проводились с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия).

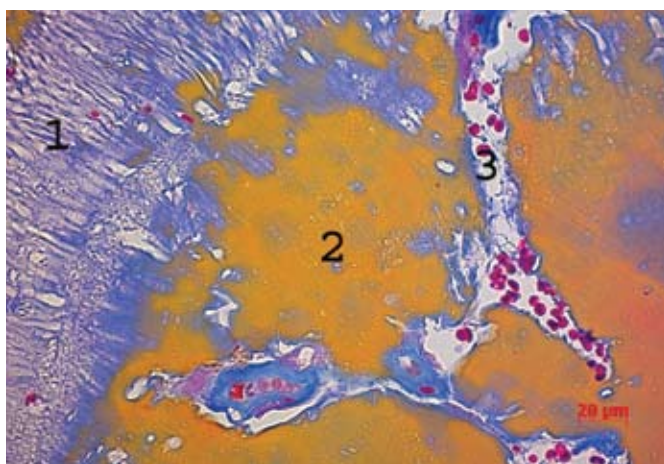


Рис. 2. Липидно-белковые отложения в гистоконтакте с «классической» ХНМ: 1 — слой сегментов фоторецепторов, 2 — белково-липидный компонент, 3 — сеть кровеносных сосудов. Окраска по Маллори. Увеличение: окуляр $\times 10$, объектив $\times 12,5$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

На гистологических препаратах у пациентов с «классической» ХНМ (1 группа) наблюдался гистоконтакт, состоящий из слоя клеток пигментного эпителия с мембраной Бруха, фиброваскулярной мембраны, слоя сегментов фоторецепторов и иногда фрагментов хориоидеи (рис. 1).

Мембрана Бруха выглядела набухшей, гомогенизированной с явлениями зернистого распада, иногда наблюдалась ее отслойка от базальной части клеток ПЭ. Между ее внутренним коллагеновым слоем и базальной мембраной ПЭ в некоторых препаратах определялись рыхлые базальные ламеллярные отложения, представляющие собой мягкие друзы, пронизанные тонкими, новообразованными капиллярами.

Клетки ПЭ были дезориентированными, разрозненными и разрушенными, в их цитоплазме обнаружены липофусциновые гранулы. Наблюдались признаки миграции клеток ПЭ в толщу фиброзного компонента неоваскулярной мембраны.

Новообразованная фиброваскулярная мембрана представляла собой рыхлую волокнистую соединительную ткань, где фиброзный компонент преобладал над васкулярным. Тонкие рыхлые разнонаправленные коллагеновые волокна были инфильтрированы клетками соединительной ткани — макрофагами и фибробластическими клетками. Среди клеток фибробластического ряда, определялись мезенхимные клетки, фибробласты. Макрофаги были представлены как фагоцитарными формами, так и сидерофагами, цитоплазма которых содержала сидерин (белок деградации эритроцитов), и участвовали в утилизации эритроцитов. Помимо прочего, выявлялись и лимфоциты, что свидетельствовало о наличии иммунного напряжения в ткани.

В слое сегментов фоторецепторов выявлялись их патологические изменения в виде набухания, гомогенизации, а в отдельных препаратах, измененные наружные сегменты фоторецепторов были инфильтрированы мигрировавшими клетками ПЭ. В 2 препаратах у пациентов с «классической» ХНМ между слоем фоторецепторов и сосудистой обнаруживались липидно-белковые отложения, окрашивающиеся по Маллори в ярко-оранжевый цвет (рис. 2). Кроме того, в некоторых препаратах в субретинальном пространстве наблюдались кровоизлияния из новообразованных сосудов, прорастающих из сосудистой оболочки через поврежденный слой клеток ПЭ.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов «классической» ХНМ в 80 % случаев выявлялась активная экспрессия клетками соединительной ткани и эндотелиоцитами кровеносных сосудов антител к PCNA и TGF- β 1. При этом в 5 препаратах

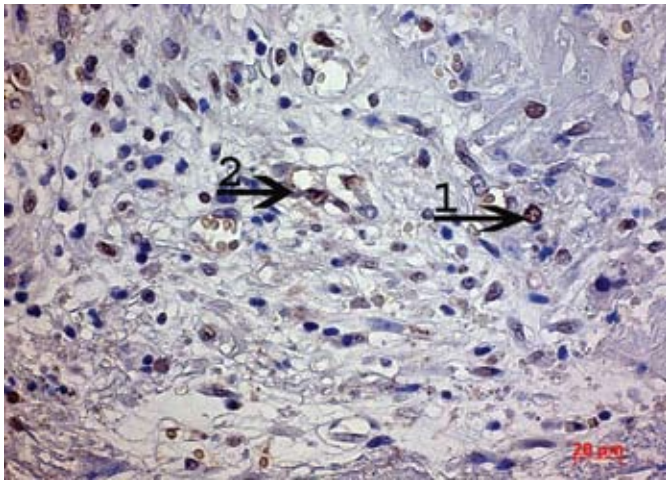


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция к PCNA. Положительная реакция клеток к антигену PCNA (коричневая окраска ядер). 1 — соединительнотканнные клетки, 2 — эндотелиальные клетки гемокapилляров. Докраска гематоксилином. Увеличение: окуляр $\times 10$, объектив $\times 12,5$

(50 %) антитела определялись к PCNA и TGF- $\beta 1$ (рис. 3), в 2 (20 %) — только к TGF- $\beta 1$ и в 1 препарате (10 %) только к PCNA.

В препаратах со «скрытой» ХНМ (2-я группа) выявлялся комплекс тканей, состоящий из слоя клеток ПЭ с мембраной Бруха, фиброваскулярной мембраны и слоя сегментов фоторецепторов.

Слой клеток ПЭ был дезорганизован. Сами клетки были как в состоянии разрушения, так и выявлялась их гиперплазия и миграция в толщу рыхлой волокнистой соединительной ткани, составляющей ХНМ. В цитоплазме клеток ПЭ выявлялись липофусциновые отложения. Мембрана Бруха была, соответственно, патологически изменена: набухшая, фрагментарно прерывалась, между ее внутренним коллагеновым слоем и базальной мембраной ПЭ выявлялись эозинофильные (белковые), диффузные отложения.

В субретинальном пространстве обнаруживалась фибрированная неоваскулярная мембрана. Она состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани с различным количеством разнонаправленных кровеносных сосудов. Их просвет был расширен и свободен. Строма мембраны была инфильтрирована клетками соединительной ткани: фибробластами, макрофагами, а также мигрирующими единичными клетками ПЭ. Также выявлялись скопления лимфоцитов возле слоя клеток ПЭ, что свидетельствовало об иммунном напряжении. В 2 препаратах у пациентов со «скрытой» ХНМ, которая сочеталась с высокой отслойкой пигментного эпителия (рис. 4), ХНМ представляла собой плотную соединительную ткань, в которой отсутствовали кровеносные сосуды. При этом инфильтрация клетками соединительной ткани была скудная, выявлялись

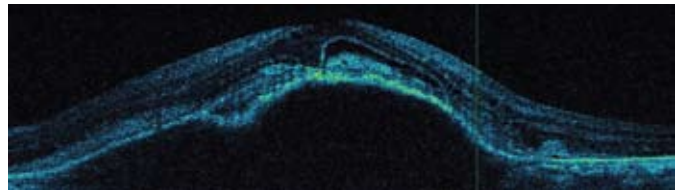


Рис. 4. Пациент Ю., 64 года. Оптическая когерентная томография макулы со «скрытой» ХНМ и высокой отслойкой пигментного эпителия сетчатки

фибробластоподобные клетки, то есть в субретинальном пространстве был сформирован плотный аваскулярный рубец (рис. 5).

В одном препарате со «скрытой» ХНМ между слоем клеток ПЭ и фоторецепторами наблюдались белково-липидные отложения, окрашивающиеся по Маллори в ярко-оранжевый цвет.

Пролиферативная активность «скрытых» ХНМ была менее выражена, так положительная реакция на антитела к PCNA и TGF- $\beta 1$ выявлялась в 2 случаях (40 %), отрицательная в 3 случаях (60 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гистологическая картина ХНМ у больных с влажной формой ВМД не зависит от ее типа и представляет собой фиброваскулярную ткань с различными соотношениями фиброзного и васкулярного компонентов.

«Классическая» ХНМ характеризуется более высокой пролиферативной активностью, чем «скрытая», что во многом обуславливает её деструктивный рост в слоях сетчатки, часто сопровождающемся кровоизлияниями в субретинальное пространство.

Наличие высокой отслойки пигментного эпителия у пациентов с влажной формой ВМД, может быть обусловлено наличием в субретинальном пространстве плотного аваскулярного рубца без признаков пролиферативной активности.

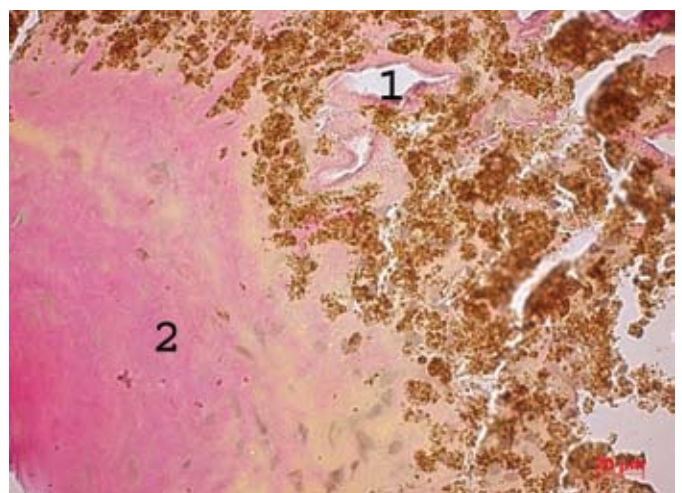


Рис. 5. Гистологическая картина «скрытой» ХНМ, тот же пациент. 1 — слой клеток ПЭ, 2 — плотная волокнистая соединительная ткань. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение: окуляр $\times 10$, объектив $\times 12,5$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будзинская М. В., Гурова И. В. Субретинальная неоваскулярная мембрана при возрастной макулярной дегенерации // Вестн. офтальмол. — 2006. — № 4. — С. 49–54.
2. Пальцев, М. А., Иванов А. А. Межклеточные взаимодействия // М.: Медицина. — 1995. — 224 с.
3. Туманова, А. Л., Еременко А. И. Микроэлементозы и их влияние на возникновение и клинику диабетических, атеросклеротических и сосудистых нейроретинопатий — Краснодар, 2002. — 228 с.
4. Bravo R., MacDonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. // EMBO J. — 1985. — Mar, 4(3). — P. 655–661.
5. Celis J.E., Madsen P. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair // FEBS Lett. — 1986. — Dec. 15, 209(2). — P. 277–283.
6. Celis J.E., Madsen P., Nielsen S., Celis A. Nuclear patterns of cyclin (PCNA) antigen distribution subdivide S-phase in cultured cells — some applications of PCNA antibodies // Leuk. Res. 1986. — 10(3). — P 237–249.
7. Klein R. Prevalence of age-related maculopathy // The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology. — 1992. — Vol. 99. — P. 933–942.
8. Liebowitz H.M., Krueger D.E., Maunder L.R., Milton R.C. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy,

macular degeneration and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973–1975. // Surv. Ophthalmol. — 1980. — Vol. 24. — P. 335–610.

9. Rodemann, H.P. The underlying cellular mechanism of fibrosis // Kidney Int Suppl. — 1996. — Vol. 54. — P.32–36.

IMMUNOMORPHOLOGICAL FEATURES OF “CLASSIC” AND “OCCULT” CHOROIDAL NEOVASCULAR MEMBRANES IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Altynbayev U.R., Serezhin I.N., Altynbayeva L.R.

✧ **Summary.** A comparative evaluation of morphological features and proliferative activity of “classic” and “occult” choroidal neovascular membranes (CNM) in patients with the wet form of age-related macular degeneration was carried out. It was found that the CNM proliferative activity depends on the membrane type. The presence of a high pigment epithelium detachment in patients with “occult” CNM may be due to the presence of a solid avascular scar in the subretinal space.

✧ **Key words:** transforming growth factor-b1; proliferating cell nuclear antigen; choroidal neovascular membrane; age-related macular degeneration.

Сведения об авторах:

Алтынбаев Урал Рифович — к. м. н., врач офтальмологического отделения МСЧ ОАО «Татнефть». 423450, Республика Татарстан, Альметьевск, ул. Радищева, д. 67.
E-mail: uralaltynbaev@rambler.ru.

Сережин Игорь Николаевич — д. м. н., заведующий офтальмологическим отделением МСЧ ОАО «Татнефть». 423450, Республика Татарстан, Альметьевск, ул. Радищева, д. 67.
E-mail: serejine@mail.ru.

Алтынбаева Лиана Римовна — к. м. н., врач офтальмологического отделения МСЧ ОАО «Татнефть». 423450, Республика Татарстан, Альметьевск, ул. Радищева, д. 67.
E-mail: uralaltynbaev@rambler.ru.

Altynbayev Ural Rifovich — PhD in medicine. 423450, Tatarstan, Almetyevsk, Radishcheva St., 67.
E-mail: uralaltynbaev@rambler.ru.

Serezhin Igor Nikolayevich — MD. 423450, Tatarstan, Almetyevsk, Radishcheva St., 67.
E-mail: serejine@mail.ru.

Altynbayeva Liana Rimovna — PhD in medicine. 423450, Tatarstan, Almetyevsk, Radishcheva St., 67.
E-mail: uralaltynbaev@rambler.ru.