ЭКСПРЕССИЯ CD68 В СКЛЕРАЛЬНЫХ ЛОСКУТАХ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ПЕРВИЧНОЙ ГЛАУКОМЫ

С.В. Айдагулова¹, А.К. Лазарева², А.В. Волчек¹, Е.А. Ташлыкова², В.В. Черных²

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации;

²ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирский филиал

Воспалительный компонент патогенеза глаукомы и ускоренной облитерации хирургически создаваемых путей оттока внутриглазной жидкости является предметом научных дискуссий. Цель – провести иммуногистохимическое исследование экспрессии маркера CD68 в резецированных склеральных лоскутах пациентов с шестью формами первичной глаукомы (врожденная, ювенильная, закрытоугольная, простая открытоугольная, пигментная и псевдоэкссфолиативная). Выполнена полуколичественная оценка клеточных инфильтратов. При сравнительном светооптическом исследовании обнаружены пигментная имбиция и мононуклеарная клеточная инфильтрация варьирующей интенсивности. По данным морфометрического исследования, наиболее многочисленные клеточные инфильтраты отмечены при пигментной, наименьшие – при врожденной глаукоме. Наиболее многочисленные CD68-позитивные клетки выявлены при закрытоугольной и пигментной глаукомах.

Ключевые слова: CD68-позитивные макрофаги, плотная волокнистая соединительная ткань, склеральный лоскут, первичная глаукома, иммуногистохимия.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-4(72)-106-109

CD68 EXPRESSION IN SCLERAL FLAPS IN DIFFERENT FORMS OF PRIMARY GLAUCOMA

S.V. Aidagulova¹, A.K. Lazareva², A.V. Volchek¹, E.A. Tashlykova², V.V. Chernyh²

¹FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation;

²The Novosibirsk branch of FSAI «NMRC «ISTC «Eye Microsurgery» named after academician S.N. Fedorov»

The inflammatory component of the pathogenesis of glaucoma and accelerated obliteration of the surgically created pathways of the intraocular fluid outflow is the subject of scientific discussion. The goal is to carry out an immunohistochemical study of the expression of the macrophage marker CD68 in resected scleral flaps in patients with 6 forms of primary glaucoma (congenital, juvenile, angle-closure, simple open-angle, pigmentary and pseudoexfoliative). A semi-quantitative assessment of cell infiltrates was performed. In a comparative light-optical study, pigmentary imbibition and mononuclear cell infiltration of varying intensity were found. According to a morphometric study, the most numerous cellular infiltrates were revealed in pigmentary glaucoma, the minimal one were found in congenital glaucoma. The most numerous CD68-positive cells were detected in angle-closure and pigmentary glaucoma.

Key words: CD68-macrophages, dense fibrous connective tissue, scleral flap, primary glaucoma, immunohistochemistry.

К глаукоме относят группу заболеваний глаз, характеризующихся постоянным или периодическим повышением внутриглазного давления за пределы толерантного уровня, что сопровождается развитием трофических расстройств в путях оттока внутриглазной жидкости и зрительном нерве с неуклонным сужением полей зрения [1]. Глаукома остается одной из ведущих причин неизлечимой утраты зрительных функций ввиду хронического прогрессирующего течения патологического процесса, и лишь хирургическое лечение является эффективным методом снижения внутриглазного давления, хотя его длительность не прогнозируема [10].

Воспалительная, в том числе иммунная, компонента патогенеза глаукомы и ускоренной облитерации создаваемых хирургически путей оттока внутриглазной жидкости по-прежнему является предметом научных исследований. В последние годы при глаукоме выявлены различные изменения в периферической врожденной и адаптивной иммунной системе [3]. Кроме того, увеличение количества клеток воспалительного инфильтрата

при глаукоме по сравнению с нормотензивными пациентами с офтальмопатологией косвенно установлено по их цитокинпродуцирующему потенциалу, оцениваемому с помощью иммуноферментного анализа внутриглазной жидкости пациентов [2].

По данным иммуногистохимического анализа образцов из банка глаз без глаукомы, большинство клеток инфильтрата склеры являются макрофагами, экспрессирующими панель общих лейкоцитарных и более специфичных маркеров, свойственных антиген-презентирующим клеткам; наибольшее их количество локализуется в эписклере – наружном слое склеры [9]. При этом иммуногистохимическая визуализация макрофагальных клеток при различных формах глаукомы в операционном материале является весьма трудной задачей.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Провести иммуногистохимическое исследование экспрессии маркера CD68 в резецированных склеральных лоскутах пациентов с 6 разными формами первичной глаукомы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен операционный материал склеры (ее среднего слоя), полученный при проведении проникающих и непроникающих гипотензивных операций у 60 пациентов в возрасте от 2 мес. до 87 лет, ($53,6 \pm 24,8$) лет, с 6 разными формами первичной глаукомы: закрытоугольная глаукома (ПЗУГ), врожденная (ПВГ), пигментная (ПГ), простая открытоугольная (ПОУГ), псевдоэкзофиативная (ПЭГ) и ювенильная (ПЮГ) – по 10 образцов в каждой группе, из них ПВГ, ПГ и ПЮГ являются очень редко встречающимися.

Образцы размерами около 5 x 6 мм и толщиной около 1 мм фиксировали в 4%-м параформальдегиде и после стандартной гистологической проводки заливали в гистомикс. На парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином в сочетании с реакцией Перлса (на гемосидерин), при увеличении 480 выполняли обзорное гистологическое исследование и, условно разделив каждый образец на проксимальную зону (прилежащую к юкстаканаликулярной ткани) и дистальную, оценивали полуколичественно клеточные инфильтраты (макрофаги, лимфоциты) с помощью методики [4]: 0 баллов – нет клеток, 1 балл – от 1 до 3 клеток, 2 балла – от 3 до 10 клеток и 3 балла – более 10 клеток. Результаты обрабатывали статистически с помощью критерия Краскелла – Уоллиса. Достоверными считали различия, если $p \leq 0,05$.

Поскольку подавляющее большинство клеток в инфильтрате склеры представлено макрофагами [9], выполняли иммуногистохимическое изучение экспрессии маркера макрофагов CD68 с помощью первичных антител производства «Абсам» (каталожный номер ab213363) в разведении 1:100 по стандартному протоколу, рекомендуемому фирмой-производителем. Продукты реакции визуализировали диаминобензидином, ядра клеток докрашивали гематоксилином. Светооптическое исследование проводили с помощью универсального микроскопа Axio Scope.A1 с фотокамерой AxioCam MRc5 (C.Zeiss). Количество клеток, содержащих продукты реакции, подсчитывали с помощью компьютерной программы Zen blue (C.Zeiss, 2012) и выражали в абсолютных значениях.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГАУ МНТК НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова (протокол № 5 от 18.12.2013). Пациентами подписано информированное согласие на хирургическое лечение и использование результатов исследования в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном светооптическом исследовании проксимальных и дистальных отделов склеральных лоскутов при разных формах глаукомы обнаружены структурные изменения

постшлеммальной дренажной системы глаза с различной выраженностью пигментной имbibции (гранулы меланина), сопровождающиеся варьированием мононуклеарной клеточной инфильтрации (рис. 1).

По данным сравнительного морфометрического исследования 6 групп, наиболее многочисленные клеточные инфильтраты вблизи Шлеммова канала отмечены в склеральных лоскутах при ПГ ($p = 0,0033$), наименьшие – при ВГ, что достоверно отличалось от всех остальных групп. При ПГ достоверно преобладало количество клеток инфильтрата проксимальной и дистальной склеры ($p = 0,0005$), что можно интерпретировать как ответную реакцию на многочисленные гранулы меланина. При сравнении ПЮГ и ПОУГ не выявлено достоверных отличий по выраженности клеточной инфильтрации в проксимальной и дистальной зонах; также не отличались между собой показатели ПВГ и ПЗУГ. При ПГ в сравнении с ПЭГ количество мононуклеарных клеток инфильтрата было достоверно более высоким в проксимальной ($p = 0,0033$) и дистальной склере ($p = 0,0080$).

Рис. 1. Полуколичественная оценка (в баллах) клеточных инфильтратов в проксимальных (а) и дистальных (б) участках резецированных склеральных лоскутов при разных формах глаукомы. Критерий Краскелла – Уоллиса

В связи с высокой плотностью волокнистой соединительной ткани склеры изучена экспрессия

маркера CD68 в образцах у 3 пациентов каждой из 6 групп с первичной глаукомой – и открыто-, и закрытоугольной. На фоне плотных коллагеновых волокон склеры выявлена гетерогенность продуктов иммуногистохимической реакции (рис. 2), в целом соответствующая плотности клеточных инфильтратов при изучении срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. CD68-позитивные клетки локализовались вблизи элементов дренажной системы глаза (коллекторных канальцев и водяных вен), при этом наиболее многочисленные – при ЗУГ и ПГ.

Рис. 2. Экспрессия CD68 на парафиновых срезах склеральных лоскутов, резецированных в ходе выполнения антиглаукомных операций при 6 формах первичной глаукомы:

а – ЗУГ, б – ПВГ, в – ПГ, г – ПОУГ, д – ПЭГ, е – ПЮГ. Двухшаговый непрямой иммунопероксидазный метод, визуализация продуктов реакции диаминобензидином, докраска ядер гематоксилином. Ув. 650

Содержание меченых клеток (в том числе их фрагментов, учитываемых при компьютерном анализе изображения) на препаратах представлено на рис. 3: при ЗУГ 23, 28 и 30; при ПВГ 7, 8, 10; при ПГ 30, 35, 38; при ПОУГ 13, 16, 23; при ПЭГ 17, 19, 23; при ПЮГ 4, 5, 6. Следует отметить, что в связи с трудностью выполнения иммуногистохимической методики (в основном из-за отклеивания срезов от специальных предметных стекол при нагревании в кислом цитратном буфере) получено малое количество иммуноокрашенных образцов, и это не позволило провести статистический анализ.

Рис. 3. Численная плотность CD68-позитивных клеток в склеральных лоскутах при первичной глаукоме

Склера представлена плотной волокнистой соединительной тканью, в которой доминируют матрикс-продуцирующие клетки и коллаген I типа, наряду с этим встречаются моноклеарные инфильтраты, состоящие из макрофагов, меланофагов, лимфоцитов и других клеток, которые приурочены к дренажной системе глаза. Наличие клеток иммунной системы продемонстрировано в 10 образцах склеры пациентов из банка данных [9].

CD68 – гликопротеин, гомолог макросиалина, преимущественно экспрессированный на мембране поздних эндосом моноцитов крови и тканевых макрофагов, а также лимфоцитов. CD68 играет роль в фагоцитарной активности тканевых макрофагов, как во внутриклеточном лизосомальном метаболизме, так и в межклеточных взаимодействиях. Активированные макрофаги, в свою очередь, влияют на фенотип фибробластов и их биосинтетическую активность [7].

Макрофаги мезенхимного происхождения широко распространены в тканях различных органов [8]. Так, наряду с костномозговыми макрофагами, в головном мозге млекопитающих определяются микроглиальные клетки [5]. В стекловидном теле определяются гиалоциты, которые, помимо фагоцитарной функции в патологических условиях, также способны к секреции компонентов межклеточного матрикса [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продemonстрирована роль CD68-позитивных макрофагов в патоморфогенезе первичной глаукомы. В резецированных склеральных лоскутах при ПГ и ЗУГ, по сравнению с другими формами глаукомы, выявлено наибольшее количество макрофагов, в том числе меланофагов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Егоров Е.А., Астахов Ю.С., Еричев В.П. / Egorov E.A., Astahov Ju.S., Erichev V.P. Национальное руководство по глаукоме: для практикующих врачей / Nacional'noe rukovodstvo po glaukome: dlja praktikujushhih vrachej [National Glaucoma Guide: for practitioners]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 456 с.

2. Черных В.В., Коненков В.И., Ермакова О.В., Орлов Н.Б., Обухова О.О., Еремина А.В., Трунов А.Н. / Chernyh V.V., Konenkov V.I., Ermakova O.V., Orlov N.B., Obuhova O.O., Eremina A.V., Trunov A.N. Содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой / Soderzhanie citokinov i faktorov rosta vo vnutriglaznoj zhidkosti u pacientov s pervichnoj otkrytougol'noj glaukomoj [The content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid in patients with primary open-angle glaucoma] // Бюллетень Сибирской Медицины / Bjulleten' Sibirskoj Mediciny [Bulletin of Siberian Medicine]. – 2019. – Т. 18 (1). – С. 257–265.

3. Bell K., Und Hohenstein-Blaul N.V.T., Teister J., Grus F. Modulation of the immune system for the treatment of glaucoma // Curr. Neuropharmacol. – 2018. – Vol. 16 (7). – P. 942–958.

4. Disep B., Innes B.A., Cochrane H.R. Immunohistochemical characterization of endometrial leucocytes in endometritis // Histopathology. – 2004. – Vol. 45 (6). – P. 625–632.

5. Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M.F., Conway S.J., Ng L.G., Stanley E.R., Samokhvalov I.M., Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages // Science. – 2010. – Vol. 330 (6005). – P. 841–845.

6. Gomez-Nicola D., Schettters S.T., Perry V.H. Differential role of CCR2 in the dynamics of microglia and perivascular macrophages during prion disease // Glia. – 2014. – Vol. 62. – P. 1041–1052.

7. Harrell C.R., Simovic Markovic B., Fellabaum C., Arsenijevic A., Djonov V., Arsenijevic N., Volarevic V. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases // Adv. Exp. Med. Biol. – 2018. – Vol. 1089. – P. 47–57.

8. Margeta M.A., Lad E.M., Proia A.D. CD163+ macrophages infiltrate axon bundles of postmortem optic nerves with glaucoma // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2018. – Vol. 256 (12). – P. 2449–2456.

9. Schlereth S.L., Kremers S., Schrödl F., Cursiefen C., Heindl L.M. Characterization of antigen-presenting macrophages and dendritic cells in the healthy human sclera // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2016. – Vol. 57 (11). – P. 4878–4885.

10. Vranka J.A., Staverosky J.A., Reddy A.P., Wilmarth P.A., David L.L., Acott T.S., Russell P., Raghunathan V.K. Biomechanical rigidity and quantitative proteomics analysis of segmental regions of the trabecular meshwork at physiologic and elevated pressures // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2018. – Vol. 59. – P. 246–259.

Контактная информация

Айдагулова Светлана Владимировна – д. б. н., профессор, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Новосибирский государственный медицинский университет, e-mail: s.aydagulova@gmail.com