

## РОЛЬ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ДИСТРОФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РОГОВИЦЫ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

**Жерко И. Ю.**

**Научные руководители: канд. мед. наук, доцент Г. Р. Семак,  
канд. мед. наук, доцент С.К. Клецкий\*,  
канд. мед. наук, доцент В. А. Захарова\***

*Кафедра глазных болезней, \*кафедра патологической анатомии  
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Ключевые слова:** кератит, болезнь сухого глаза, иммуногистохимия, сквозная кератопластика

**Резюме.** В статье представлены результаты гистологического и иммуногистохимического исследования 28 дисков роговицы, полученных при сквозной субтотальной кератопластике.

**Resume.** The article presents the results of a histological and immunohistochemical study of 28 corneal discs obtained with continuous subtotal keratoplasty.

**Актуальность.** В настоящее время, морфологическое исследование органов и тканей человека широко применяется в различных областях медицины. Целый ряд диагнозов в гастроэнтерологии, гепатологии, гинекологии, урологии, онкологии требует морфологической верификации. Морфологическое исследование в офтальмологии успешно применяется в научных целях и практически не применяется в повседневной работе. В то же время, по данным офтальмологических отделений УЗ «3 Городская клиническая больница им. Е.В. Клумова», около 20% пациентов нуждаются в повторной кератопластике в связи с тяжестью патологического процесса. Потенциально этот процент может быть ниже при использовании морфологического исследования дисков удалённых роговиц [1].

**Цель:** выяснить целесообразность применения морфологического исследования для постановки диагноза и модификации терапии у пациентов с заболеваниями роговицы.

**Материал и методы.** Были исследованы 28 дисков роговицы, полученных при проведении сквозной кератопластики (8 – исходы кератитов различной этиологии, 7 – ЭЭД, 4 – кератоконус, 6 – болезнь трансплантата, 3 – контроль (донорская роговица)). Операции были выполнены одним хирургом на базе УЗ «3 Городская клиническая больница им. Е.В. Клумова» в 2017 и 2018 годах. Диагноз выставлялся клинически на основании клинико-лабораторных данных. Морфологическое исследование проводилось на базе кафедры патологической анатомии БГМУ. Препараты дисков роговицы исследовались при окраске гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа, по Массону, MSB и описывались согласно разработанному протоколу. Проводилось иммуногистохимическое окрашивание препаратов (Таблица 1).

Таблица 1 – Антитела, использованные в иммуногистохимическом исследовании

Первичное антитело	Функция молекулы	Источник
CD44	Молекула клеточной адгезии и миграции. Участвует в регенерации.	мышь
TGF-β	Контроль пролиферации и клеточной дифференцировки	мышь
CD3	Корецептор Т-клеточного рецептора	кролик
CD8	Корецептор Т-клеточного рецептора	мышь
MMP9	Ремоделирование структуры внеклеточного матрикса	мышь
CD20	Корецептор В-клеточного рецептора	мышь
CD34	Молекула клеточной адгезии	мышь

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 3-х полях зрения (объектив 10), а также в 6 полях зрения (объектив 40) с разрешением 2048x1536 пикселей при помощи микроскопа Leica с цифровой камерой Levenhuk C-Series.

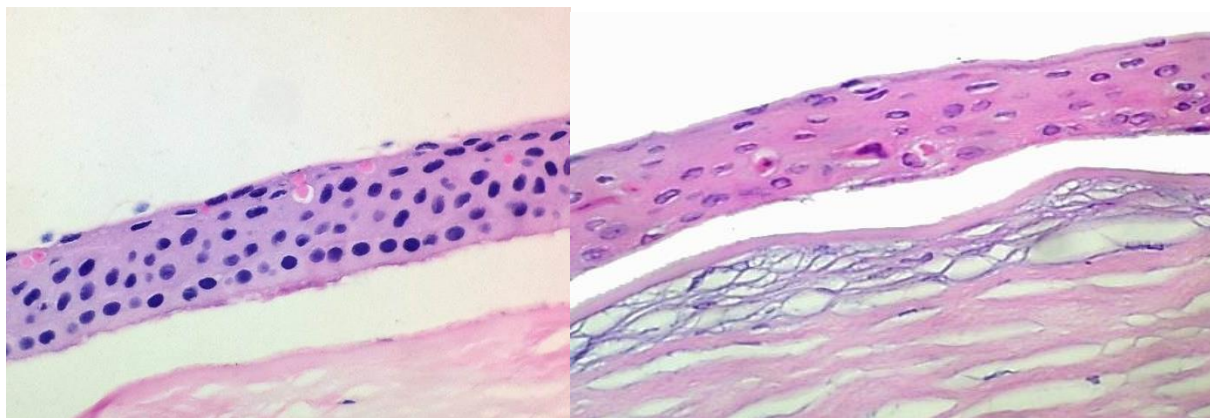
ИГХ реакция в материале оценивалась отдельно в эпителии, кератоцитах и эндотелии роговицы с использованием программного обеспечения для морфометрии WCIF ImageJ и Aperio Image Scope.

Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0. Уровень статистической значимости устанавливался  $p < 0,05$ . Сравнение независимых выборок по количественным признакам проводилось с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и Манна-Уитни (U-критерий) с целью парного сравнения выборок.

### Результаты и их обсуждение.

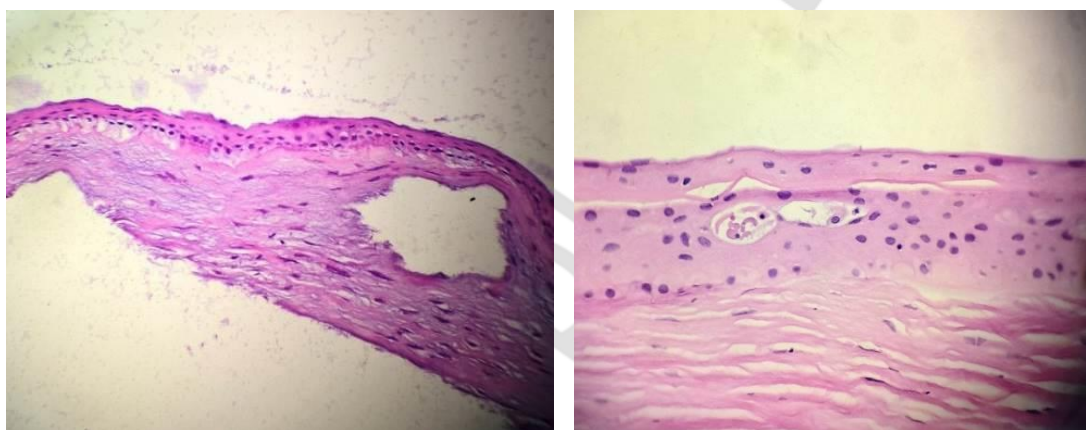
#### *Результаты гистологического исследования.*

В опытной группе, вне зависимости от патологии, потребовавшей трансплантации роговицы, выявлялись апоптотические тельца в эпителии роговицы (рисунок 1) и мукоидное набухание передних слоёв стромы (рисунок 2). Эти признаки могут быть характерны для болезни сухого глаза, сопровождающий любой патологический процесс, затрагивающий передний отрезок глазного яблока [2].



**Рис. 1,2.** – Апоптоз клеток эпителия роговицы. Формирование булл, мукоидное набухание переднего слоя стромы. Окр. гематоксилином-эозином

В группе Кератиты достоверно чаще по сравнению с другими группами выявлялись буллы (отслойка эпителия от Боуменовой мембраны) и интраэпителиальные кисты с тканевым детритом (рисунок 3,4).

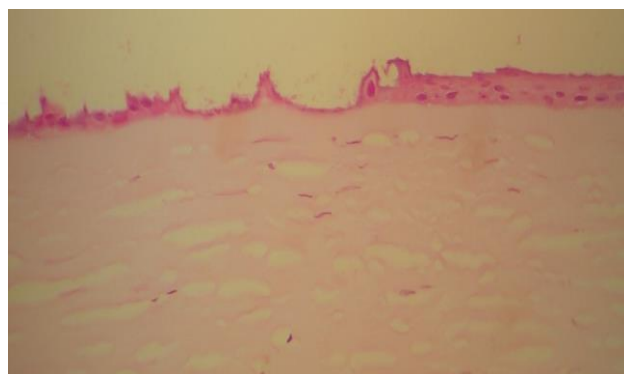
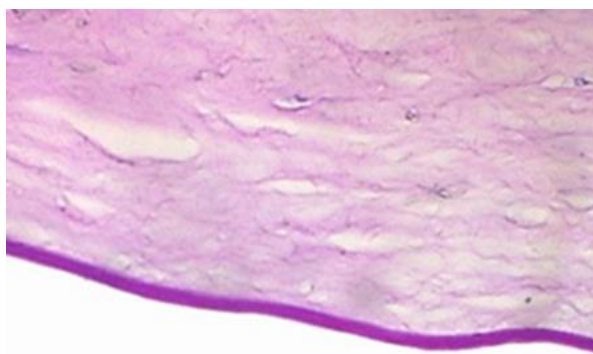


**Рис. 3,4** – Формирование булл. Интраэпителиальные кисты. Окр. гематоксилином-эозином.

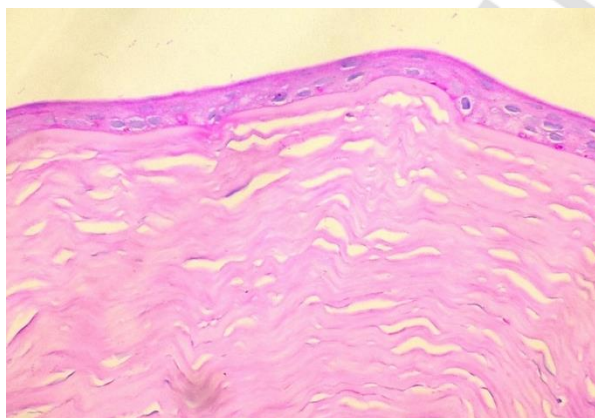
Так же характерным были формирование фиброзно-сосудистого паннуса и васкуляризация стромы роговицы.

При эпителиально-эндотелиальной дистрофии достоверно чаще выявлялись утолщение десцеметовой мембраны и истончение роговичного эпителия с сохранением 1-3 слоёв (рисунок 5,6).

При кератоконусе выявлялись разрывы боуменовой мембраны, истончение роговичного эпителия, нарушение структуры стромы (рисунок 7).



**Рис. 5,6.** –Утолщение десцеметовой мембраны, отсутствие эндотелия. Окр. Реактивом Шиффа. Истончение роговичного эпителия с сохранением 1-3 слоёв.Окр. гематоксилином-эозином.



**Рис. 7** –Разрыв боуменовой мембраны. Истончение роговичного эпителия. Окр. гематоксилином-эозином

#### *Результаты иммуногистохимического исследования*

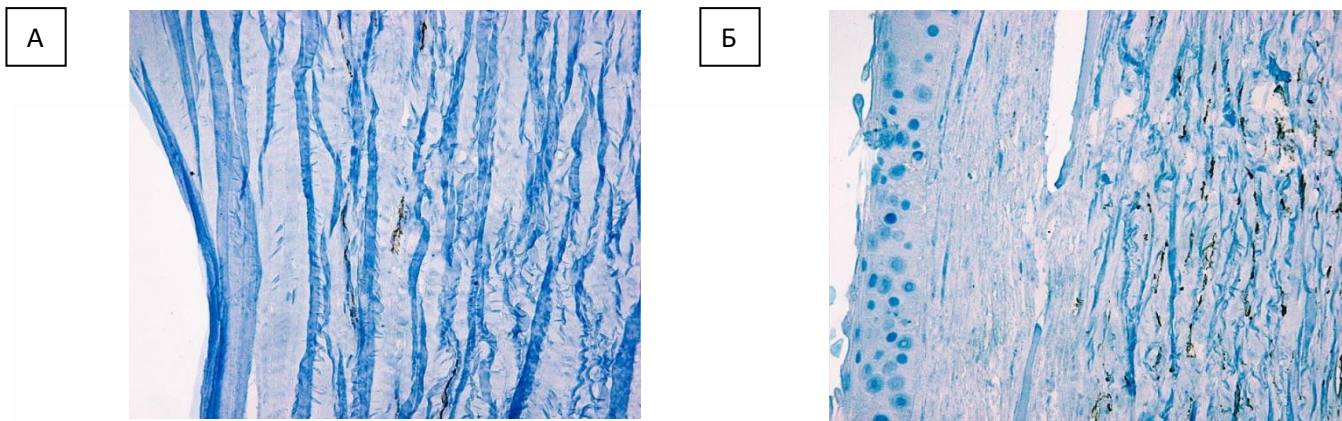
Экспрессия **CD34** обнаруживалась в виде четко окрашенных в коричневый цвет эндотелиальных клеток в очагах неоангиогенеза – в эндотелия стенок сосудов и отдельно расположенных эндотелиальных клеток (рисунок 8).

Экспрессия стандартной молекулы **CD 44** в ткани роговицы обнаруживалась в виде цитоплазматического и, преимущественно, мембранного окрашивания базального слоя эпителия роговицы и эндотелиальных клеток (рисунок 9). По сравнению с препаратами нормальной роговицы в группе «Кератиты» выявлялась стромальная экспрессия CD44. При этом повышение уровня его экспрессии в строме ассоциировалось с отёком стромы и образованием булл.

**ММР9** выявлялась в виде цитоплазматического окрашивания эпителиоцитов в группе контроля и опытной группе. При этом уровень экспрессии был выше в опытной группе. Кроме того, в группе Кератиты фермент выявлялся и в строме роговицы.

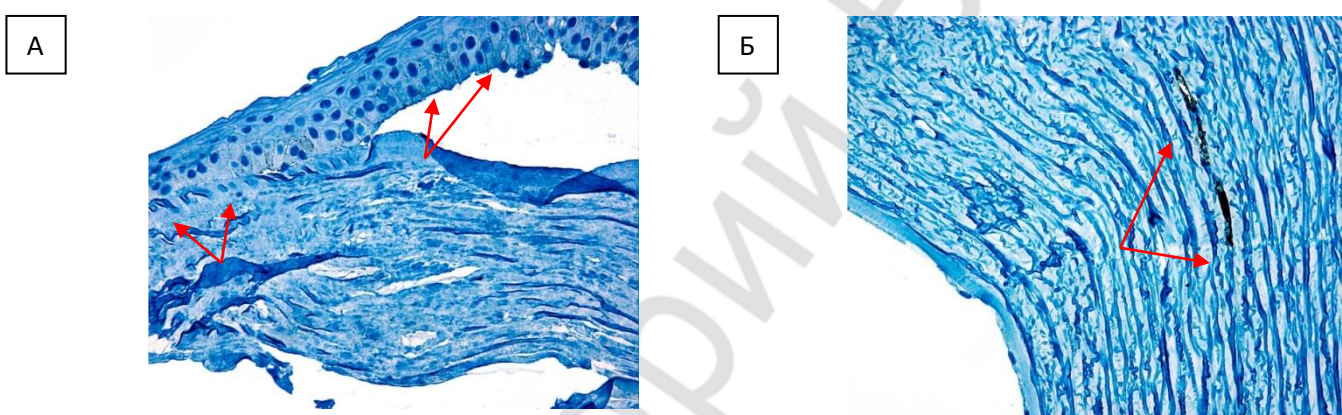
Экспрессия **ТФРβ** выявлялась в образцах контроля роговицы и опытных образцах в виде цитоплазматического и ядерного окрашивания преимущественно эндотелия сосудов.

Маркеры Т-лимфоцитов **CD3** и **CD8** и В-лимфоцитов **CD20** обнаруживалась в виде четкого мембранного окрашивания соответствующих популяций лимфоцитов в опытной группе, что является характерным для воспалительного поражения роговицы.



ИГХМ с использованием Ат к CD34. Видны единичные (А) и многочисленные (Б) сосуды и отдельные иммунореактивные эндотелиальные клетки. Хромоген диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера.

**Рис. 8** – Экспрессия CD34 в ткани роговицы. Объектив х40.



ИГХМ с использованием Ат к CD44. Видны иммунореактивные эпителиальные (А – слабое мембранное окрашивание клеток базального слоя эпителия) и эндотелиальные (Б) клетки.

Хромоген диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера.

**Рис. 9** – Экспрессия CD44 в ткани роговицы. Объектив х40.

### Выводы:

1. Для заболеваний роговицы по сравнению с нормальной структурой характерно образование интраэпителиальных и субэпителиальных кист, кератоз и акантоз роговичного эпителия, отек стромы и вакуолизация эпителиоцитов, формирование субэпителиального фиброзно-сосудистого паннуса. Иммуногистохимически выявляется увеличение экспрессии маркеров Т- и В-лимфоцитов в эпителии и строме, увеличение очагов неангиогенеза (CD34), повышение уровня экспрессии MMP9, появление стромальной экспрессии CD44 и MMP9.

2. Гистологическое и иммуногистохимическое исследования позволяют получить дополнительную информацию о патологическом процессе, приведшем к трансплантации роговицы.

3. Данные морфологического исследования, могут способствовать более эффективному ведению пациентов в послеоперационном периоде.

### Литература

1. Bernard E. McCarey. Review of Corneal Endothelial Specular Microscopy for FDA Clinical Trials of Refractive Procedures, Surgical devices and New Intraocular Drugs and Solutions.-2008
2. Бржевский В.В., Сомов Е.Е. Роговично-конъюнктивальный кератит: диагностика, клиника, лечение. СПб.: Сага, 2002. 142 с.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ