

УДК [617.713-007.17-002.2+617.7-007.681]-018.2:575.117.2

## Анализ экспрессии люмикана, окклюдина, фактора роста соединительной ткани, белка плотных контактов при хронических дистрофических заболеваниях роговицы на фоне глаукомы

Семак Г. Р.<sup>1</sup>, Захарова В. А.<sup>1</sup>, Жерко И. Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное учреждение «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** В исследовании была поставлена цель установить характер экспрессии люмикана, окклюдина, фактора роста соединительной ткани, белка плотных контактов в эксплантах роговиц пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы на фоне глаукомы.

В проспективное исследование были включены пациенты с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы: кератопатиями в исходе кератитов, врожденной и приобретенной эндотелиально-эпителиальной дистрофией, ожоговой болезнью, болезнью трансплантата с глаукомой и нормальным внутриглазным давлением. Всем включенным в исследование по показаниям выполнялась кератопластика. Выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием первичных моноклональных антител к люмикану, фактору роста соединительной ткани, окклюдину, белку плотных контактов 1.

По сравнению с дистрофией на фоне нормального внутриглазного давления, при ХДЗР на фоне глаукомы наблюдалось достоверное снижение позитивности экспрессии окклюдина (88,0 [73,0; 93,0], 75,5 [67,5; 82,0], соответственно,  $p = 0,019$ ) и индекса интенсивности экспрессии белка плотных контактов в эпителии (80,7 [78,2; 82,69], 111,87 [78,22; 139,63], соответственно,  $p = 0,015$ ).

Неблагоприятное влияние повышенного внутриглазного давления на течение хронических дистрофических заболеваний роговицы, вероятно, в большей мере связано с ассоциированным применением гипотензивных препаратов, что приводит к повреждению эпителия роговицы и выражается в изменении экспрессии окклюдина.

**Ключевые слова:** дистрофия роговицы, кератопластика, иммуногистохимия, окклюдин, глаукома.

**Введение.** Хронические дистрофические заболевания роговицы (ХДЗР) — группа дистрофических заболеваний различной этиологии, сопровождающихся снижением прозрачности роговицы и нарушением гомеостаза в тканях глазной поверхности. Такие процессы часто приводят к кератопластике из-за критического снижения зрения. Однако и в случае пересадки роговицы удовлетворительного результата удается достичь не всегда.

Одним из важных неблагоприятных факторов выживаемости трансплантата является повышенное внутриглазное давление. Во-первых, гипертензия приводит к необходимости применять гипотензивные препараты, в том числе содержащие консерванты. Во-вторых, изменение внутриглазного давления изменяет биомеханические свойства роговицы, способствуя развитию стромального и эпителиального отека [1].

Также ранее в клиническом исследовании нами было показано более тяжелое течение ХДЗР на фоне глаукомы [2]. Кроме того, было выявлено увеличение экспрессии MMP9 и TGFβ1 в эпителии и строме роговицы при ХДЗР на фоне глаукомы. Это свидетельствует о более активных процессах воспаления и фиброобразования в тканях роговицы при наличии повышенного внутриглазного давления.



Изменение биомеханических свойств роговицы на фоне офтальмогипертензии может способствовать активации процесса образования соединительной ткани, а длительные инстилляци гипотензивных препаратов потенциально неблагоприятно влияют на роговичный эпителий. Люмикан и фактор роста соединительной ткани (ФРСТ) — важные компоненты процесса воспаления, регенерации и образования соединительной ткани [3], а окклюдин и белок плотных контактов (TJP1) являются структурными компонентами межклеточных соединений в эпителии [4].

**Цель работы** — установление характера экспрессии люмикана, окклюдина, фактора роста соединительной ткани, белка плотных контактов в эксплантах роговиц пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы на фоне глаукомы.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на базе кафедр офтальмологии и патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет».

В проспективное исследование были включены пациенты с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы (ХДЗР): кератопатиями в исходе кератитов, врожденной и приобретенной эндотелиально-эпителиальной дистрофией, ожоговой болезнью, болезнью трансплантата с глаукомой и нормальным внутриглазным давлением, обратившиеся в 2017–2019 гг. для обследования и последующего лечения в УЗ «3-я городская клиническая больница им. Е. В. Клумова».

Клинико-лабораторное обследование включало: визометрию, биомикроскопию, тонометрию, тест Ширмера I, LIPCOF-тест, определение времени разрыва слезной пленки, оптическую когерентную томографию переднего отрезка глазного яблока. Всем включенным в исследование пациентам была выполнена сквозная кератопластика по показаниям. В качестве контроля использовались экспланты роговиц нормального строения (таблица 1)

Таблица 1 — Структура материала для анализа морфологических и иммуногистохимических признаков

Вид дистрофии	Глаукома + <i>n</i> случаев ( <i>n</i> полей зрения)	Глаукома – <i>n</i> случаев ( <i>n</i> полей зрения)
В исходе кератита	2 (12)	16 (96)
ЭЭД приобретенная	4 (24)	7 (42)
ЭЭД врожденная	–	7 (42)
Ожоговая болезнь	–	3 (18)
Болезнь трансплантата	5 (30)	7 (42)
Всего	11 (66)	40 (240)

Проводилось гистологическое исследование удаленных дисков роговицы с окрашиванием срезов гематоксилином и эозином. С целью анализа характера экспрессии эпителиальных и стромальных маркеров выполнено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием первичных моноклональных антител к люмикану, фактору роста соединительной ткани, окклюдину, белку плотных контактов 1. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «DAKO», в качестве хромогена — диаминобензидин (ДАБ). Позитивный контроль — ткани и органы, рекомендованные производителем, негативный — исключение первичного антитела.

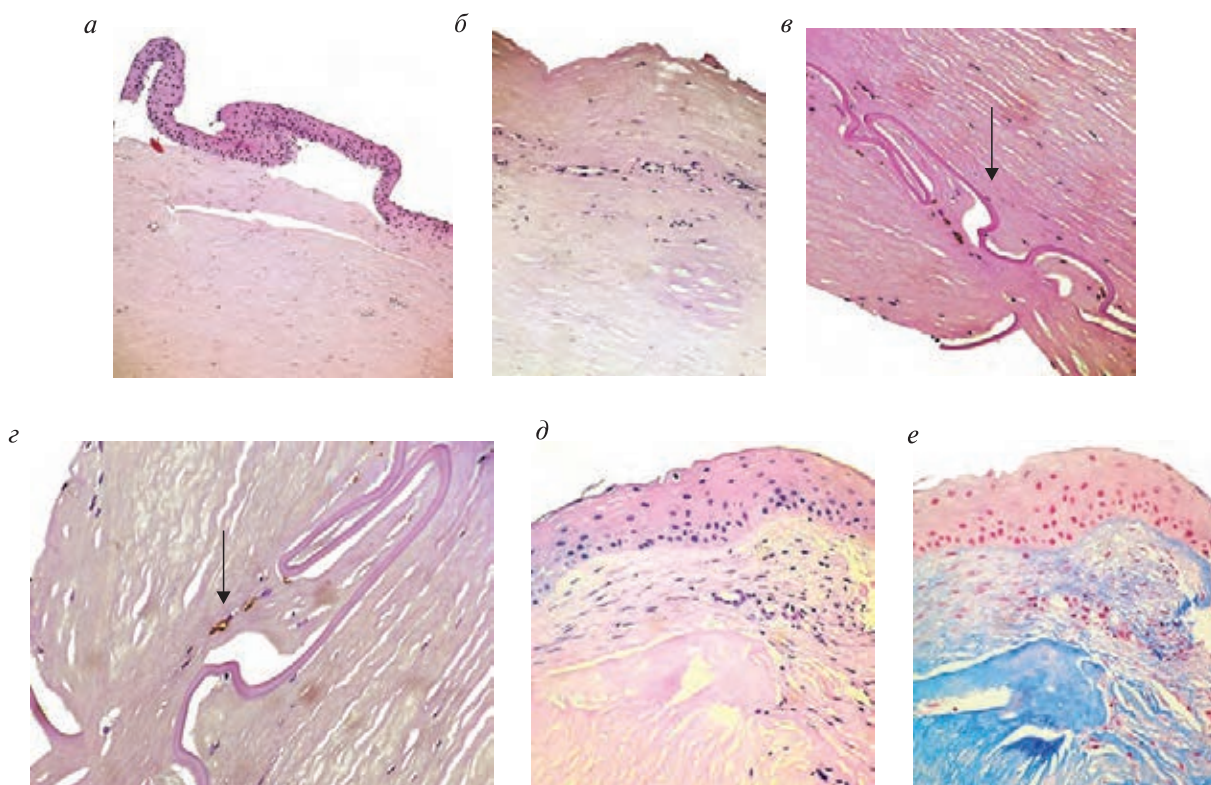
Для морфометрического анализа выполняли сканирование препаратов с применением цифрового слайд-сканера MotiEasyScan с последующим программным анализом экспрессии маркера в материале ткани роговицы с использованием AperioImageScore v12.4.0.5043. Рассчитывались следующие параметры: позитивность экспрессии (ПЭ) (отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей ×100 %), индекс интенсивности экспрессии в иммунопозитивных участках (ИИ) (отношение суммы интенсивностей пикселей с высокой, средней, низкой интенсивностью к числу позитивных пикселей).

Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Анализ проводился отдельно для каждой из нозологий. Полученные результаты обработаны статистически с вычислением медианы (Me), межквартильного размаха (МКР — 25 % и 75 % процентиля) и 95%-го доверительного интервала (ДИ), максимального и минимального значения. Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро — Уилка (W). Уровень статистической значимости — 0,05. Сравнение независимых выборок по количественным признакам проводилось с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных



ANOVA и определением критериев Манна – Уитни (U-критерий) с целью парного сравнения выборок.

**Результаты и их обсуждение.** При окраске гематоксилин-эозином дисков роговиц с кератопатией на фоне глаукомы выявлялись преимущественно тяжелые поражения. В эпителии определялись массивная отслойка эпителия с формированием булл, апоптотические тела в значительном количестве, истончение роговичного эпителия, формирование субэпителиального фиброзно-сосудистого паннуса. В строме наблюдались обильная васкуляризация, отслойка глубоких слоев стромы роговицы с десцеметовой мембраной, отек. Морфологическая картина отражает более тяжелое клиническое течение кератопатии на фоне глаукомы и офтальмогипертензии (рисунок).



**Рисунок — Морфологическая картина роговицы при кератопатии:**

***a* — отслойка эпителия с формированием булл; *б* — склерокорнея; *в* — передняя синехия между стромой роговицы и стромой радужной оболочки (десцеметова мембрана указана стрелкой); *г* — скопления меланина в передней синехии (указано стрелкой), окраска гематоксилин-эозин, ув. 65; *д, е* — формирование фиброзно-сосудистого паннуса (*д* — окраска гематоксилин-эозином, ув.130; *е* — окраска по Массону)**

Экспрессия люмикана, ФРСТ, белка плотных контактов и окклюдина выявлялась в тканях нормальных роговиц, а также в группах эксплантов с дистрофическими заболеваниями на фоне нормального или повышенного внутриглазного давления. Люмикан имел цитоплазматический паттерн экспрессии в эпителии с преобладанием окрашивания базальных кератиноцитов. В строме люмикан выявлялся в кератоцитах и соединительнотканых волокнах, клетках воспалительного инфильтрата с отсутствием или фоновым окрашиванием боуменовской и десцеметовой мембран. Экспрессия ФРСТ была выражена в эпителии роговицы с окрашиванием как базальных, так и поверхностных эпителиальных клеток, в строме роговицы ФРСТ экспрессировался очагово в кератоцитах и эндотелии. Экспрессия окклюдина и белка плотных контактов была выражена в эпителии роговицы с окрашиванием как базальных, так и поверхностных эпителиальных клеток. Белок плотных контактов также экспрессировался в эндотелии роговицы и фокусах неоваскуляризации.

По сравнению с дистрофией на фоне нормального внутриглазного давления, при ХДЗР на фоне глаукомы наблюдалось достоверное снижение позитивности экспрессии окклюдина (88,0 [73,0; 93,0], 75,5 [67,5; 82,0], соответственно,  $p = 0,019$ ) и индекса интенсивности экспрессии белка плотных кон-

тактов в эпителии (80,7 [78,2; 82,69], 111,87 [78,22; 139,63], соответственно,  $p = 0,015$ ). В уровнях и интенсивностях экспрессии других маркеров различий не наблюдалось либо они были статистически не значимы (таблица 2).

Таблица 2 — Дисперсионный анализ позитивности и индекса интенсивности экспрессии молекулярных маркеров в тканях роговицы при ХДЗР различной этиологии на фоне нормального (Глаукома–) и повышенного (Глаукома+) внутриглазного давления

Показатель	Глаукома–	Глаукома+
Коэффициент экспрессии люмикана в эпителии, %		
Me [МКР]	99,0 [97,0; 99,0]	98,0 [0,0; 100,0]
	$p = 0,22$	
Индекс интенсивности экспрессии люмикана в эпителии		
Me [МКР]	109,66 [83,77; 133,99]	109,09 [92,92; 128,68]
	$p = 0,99$	
Коэффициент экспрессии люмикана в строме, %		
Me [МКР]	95,0 [92,0; 97,0]	95,0 [94,0; 96,0]
	$p = 0,05^*$	
Индекс интенсивности экспрессии люмикана в строме		
Me [МКР]	120,58 [105,66; 137,24]	113,23 [96,31; 134,89]
	$p = 0,24$	
Коэффициент экспрессии окклюдина в эпителии, %		
Me [МКР]	88,0 [73,0; 93,0]	75,5 [67,5; 82,0]
	$p = 0,019^*$	
Индекс интенсивности экспрессии окклюдина в эпителии		
Me [МКР]	174,39 [152,58; 185,94]	185,97 [177,62; 188,05]
	$p = 0,024^*$	
Коэффициент экспрессии ФРСТ в строме, %		
Me [МКР]	20,0 [14,0; 30,5]	16,0 [14,0; 23,0]
	$p = 0,11$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в строме		
Me [МКР]	180,23 [165,73; 189,50]	178,4 [170,46; 183,13]
	$p = 0,23$	
Коэффициент экспрессии TJP1 в эпителии, %		
Me [МКР]	93,0 [83,0; 97,0]	94,5 [92,0; 96,0]
	$p = 0,42$	
Индекс интенсивности экспрессии TJP1 в эпителии		
Me [МКР]	111,87 [78,22; 139,63]	80,7 [78,2; 82,69]
	$p = 0,015^*$	

\* Различия достоверны при  $p < 0,05$ .

Неблагоприятное влияние повышенного внутриглазного давления на течение ХДЗР может объясняться как изменением биомеханических свойств роговицы, так и усилением повреждения тканей роговицы компонентами гипотензивных препаратов.

Окклюдин является белком комплекса плотных контактов. При этом он относится к группе мембранных белков и регулирует межклеточный транспорт малых гидрофильных молекул и нейтрофилов [3].

Препараты, снижающие внутриглазное давление и входящие в их состав консерванты, могут прямо или косвенно влиять на развитие дистрофии роговичного эпителия и глазной поверхности.

Гипотензивными препаратами первой линии являются  $\beta$ -блокаторы или простагландины, эффект усиливается ингибиторами карбоангидразы. Долгосрочное применение капель вызывает уменьшение времени разрыва слезной пленки. Также было отмечено значимое уменьшение плотности

бокаловидных клеток и увеличение патологической кристаллизации муцина у пациентов, постоянно принимавших 0,5 % тимолол [5]. Простагландины являются медиаторами воспаления. В эксперименте на мышах было показано снижение экспрессии окклюдина в роговичном эпителии при воздействии латанопроста при одновременном повышении экспрессии провоспалительных матриксных металлопротеаз 3 и 9 [6].

Консерванты, содержащиеся во многих каплях многократного применения, обладают выраженной цитотоксичностью. Их разделяют на две группы — детергентные консерванты и окислительные.

Бензалкония хлорид (БАХ) — четвертичное аммонийное соединение, обладающее поверхностно-активными свойствами. БАХ увеличивает проникновение препаратов местного применения через роговицу посредством повышения проницаемости роговичного эпителиального барьера. В то же время БАХ стимулирует экспрессию провоспалительных цитокинов и рецепторов на поверхности глаза и увеличивает инфильтрацию воспалительными клетками, вызывает утрату бокаловидных [7]. Вызываемое БАХ разрушение бокаловидных клеток конъюнктивы запускает каскад процессов, приводящих к повреждению поверхности глаза и другим побочным эффектам, включая нестабильность слезной пленки, повышенный риск изъязвления роговицы, обнажение нервных окончаний, приводящее к повышению чувствительности. Утрачивается поверхностный дифференцированный эпителий, что может приводить к изменению барьерной функции, повреждению муцинового слоя и соединений между эпителиальными клетками [7]. Токсическое воздействие консерванта на эпителий роговицы и конъюнктивы тем больше, чем дольше продолжается лечение. Особенно это выражено у пожилых людей на фоне сахарного диабета, патологии щитовидной железы, приема  $\beta$ -блокаторов, антиаритмических средств, антидепрессантов, цитостатиков [6]. Длительное применение капель с консервантами вызывает и поддерживает хроническое воспаление в тканях переднего отрезка глаза, что ведет к развитию и прогрессированию БСГ.

Снижение позитивности экспрессии окклюдина в эпителии на фоне глаукомы может отражать неблагоприятное влияние гипотензивных препаратов на ткани роговицы.

**Заключение.** Неблагоприятное влияние повышенного внутриглазного давления на течение хронических дистрофических заболеваний роговицы, вероятно, в большей мере связано с ассоциированным применением гипотензивных препаратов, что приводит к повреждению эпителия роговицы и выражается в изменении экспрессии окклюдина. Как при лечении хронических дистрофических заболеваний роговицы, так и в периоперационном периоде кератопластики необходимо по возможности избегать длительного назначения гипотензивных препаратов, снижая внутриглазное давление оперативным путем.

### Литература

1. Central corneal thickness and corneal hysteresis associated with glaucoma damage / N. G. Congdon [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* — 2006. — May. 141(5). — P. 868–75. DOI: 10.1016/j.ajo.2005.12.007. Epub 2006 Mar. 9. PMID: 16527231.
2. Семак, Г. Р. Влияние внутриглазного давления на биомеханические свойства и прозрачность роговицы / Г. Р. Семак, И. Ю. Жерко // *Офтальмология. Восточная Европа.* — 2019. — Т. 9, № 3. — С. 345–355.
3. Jun, J. I. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets / J. I. Jun, L. F. Lau // *Nat. Rev. Drug. Discov.* — 2011. — Vol. 10(12). — P. 945–963. Doi:10.1038/nrd3599. Published 2011 Dec 1.
4. Anderson, J. M. Physiology and function of the tight junction / J. M. Anderson, C. M. Van Itallie // *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* — 2009. — Aug. 1(2). — P. a002584. DOI: 10.1101/cshperspect.a002584. PMID: 20066090; PMCID: PMC2742087.
5. How ocular surface disease impacts the glaucoma treatment outcome / S. Kaštelan [et al.] // *Biomed. Res. Int.* — 2013. — P. 696328. DOI: 10.1155/2013/696328. Epub 2013 Oct 9. PMID: 24224176; PMCID: PMC3809958.
6. 0.005 % Preservative-Free Latanoprost Induces Dry Eye-Like Ocular Surface Damage via Promotion of Inflammation in Mice / *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2018. — Jul. 2. — Vol. 59(8). — P. 3375–3384. DOI: 10.1167/iovs.18–24013. PMID: 30025085.
7. Holló, G. Fixed-combination intraocular pressure-lowering therapy for glaucoma and ocular hypertension: advantages in clinical practice / G. Holló, F. Topouzis, R. D. Fechtner // *Expert. Opin. Pharmacother.* — 2014. — Aug. 15(12). — P. 1737–47. DOI: 10.1517/14656566.2014.936850. Epub 2014 Jul 5. PMID: 24998246.



## Lumican, occludin, connective tissue growth factor, tight junctions protein expression in chronic cornea dystrophies with glaucoma

*Semak G.<sup>1</sup>, Zakharava V.<sup>1</sup>, Zherka I.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>State Institution «Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named A. A. Alexandrov», Minsk, Republic of Belarus*

The study set a goal of the expression patterns of lumican, occludin, connective tissue growth factor, tight junctions protein in corneal explants of patients with chronic cornea dystrophies with glaucoma.

The prospective study included patients with chronic cornea dystrophies: keratopathies due to keratitis, congenital and acquired endothelial-epithelial dystrophy, cornea graft rejection with glaucoma, and normal intraocular pressure. All included in the study underwent keratoplasty according to indications. An immunohistochemical study was performed using primary monoclonal antibodies to lumican, connective tissue growth factor, occludin, and tight junction protein 1.

Compared with dystrophy with normal intraocular pressure, there was a significant decrease in the positivity of occludin expression (88.0 [73.0; 93.0], 75.5 [67.5; 82.0], respectively,  $p = 0.019$ ) and the intensity index of tight junctions protein expression in the epithelium (80.7 [78.2; 82.69], 111.87 [78.22; 139.63], respectively,  $p = 0.015$ ) in dystrophies with glaucoma.

The adverse effect of increased intraocular pressure on the course of chronic dystrophic diseases of the cornea is probably more associated with the of antihypertensive drugs application, which leads to damage to the corneal epithelium and is expressed in a change of occludin expression.

**Keywords:** corneal dystrophy, keratoplasty, immunohistochemistry, occludin, glaucoma.

*Поступила 21.06.2021*