

УДК 617.713-007.17-002.2-018.2

Экспрессия фактора роста соединительной ткани при хронических дистрофических заболеваниях роговицы

Семак Г. Р.¹, Захарова В. А.¹, Жерко И. Ю.²

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

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

Реферат. В статье отражены современные представления о характере экспрессии фактора роста соединительной ткани в эксплантах роговиц пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы и об изменении экспрессии на фоне применения инъекционной формы 1%-го натрия гиалуроната.

В проспективное исследование были включены 37 пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы (ХДЗР): кератопатиями в исходе кератитов (20 случаев) и эндотелиально-эпителиальной дистрофией (ЭЭД) (17 случаев). Пациенты каждой из групп были разделены на 2 подгруппы в зависимости от протокола лечения. Первая подгруппа в предоперационном периоде получала курс инъекций 1%-го низкомолекулярного натрия гиалуроната (3 еженедельные инъекции) (ГК+), вторая подгруппа не получала дополнительного лечения (ГК-). Всем включенным в исследование пациентам была выполнена сквозная кератопластика по показаниям. С целью анализа характера экспрессии фактора роста соединительной ткани (ФРСТ) выполнено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование эксплантов роговиц.

В группе с ХДЗР в исходе кератитов при визуальной оценке гистологических препаратов отмечалась тенденция к более выраженной экспрессии ФРСТ в группе ХДЗР. Однако при проведении программного анализа параметры позитивности и интенсивности экспрессии ФРСТ были сопоставимы с контролем. Также не выявлено статистически значимых различий позитивности и интенсивности эпителиальной и стромальной экспрессии ФРСТ на фоне применения натрия гиалуроната. В группе наследственных ЭЭД позитивность экспрессии ФРСТ в строме роговицы была сопоставима с таковой группы контроля и статистически значимо снижалась на фоне применения натрия гиалуроната в предоперационном периоде. Схожая динамика наблюдалась в группе приобретенных ЭЭД.

При эндотелиально-эпителиальной дистрофии применение 1%-го натрия гиалуроната способствует снижению экспрессии фактора роста соединительной ткани как в кератоцитах, так и эндотелии, что приводит к замедлению процессов трансформации эндотелиальных клеток с обретением ими иммунофенотипа фибробластов и фиброзирования стромы и клинически проявляется уменьшением отека, фиброза и увеличением прозрачности роговицы.

Ключевые слова: дистрофия роговицы, иммуногистохимия, фактор роста соединительной ткани, кератопластика.

Введение. Роговица — передняя прозрачная часть фиброзной оболочки глазного яблока. Прозрачность роговицы обеспечивается особой структурой стромы, состоящей из роговичных пластин и сложным комплексом взаимодействий белков и протеогликанов. Нарушение структуры стромы ведет к помутнению и снижению зрения вплоть до слепоты, что и происходит при хронических дистрофических заболеваниях роговицы (ХДЗР).

Фактор роста соединительной ткани (ФРСТ) — основной молекулярный регулятор процессов заживления, в том числе в тканях роговицы. ФРСТ взаимодействует с большим количеством рецепторов, цитокинов и факторов роста, дисбаланс которых может приводить к патологическому фиброзированию. Показано, что ФРСТ участвует в патогенезе заболеваний органа зрения за счет модуляции фиброза и неоваскуляризации через увеличение экспрессии матриксных металлопротеаз и фактора роста эндотелия сосудов [1].



Гиалуроновая кислота способна замедлять процессы фиброобразования за счет регуляции процессов воспаления: снижения экспрессии трансформирующего фактора роста $\beta 1$, интерлейкина-6. Описано применение гиалуроновой кислоты в гинекологии, урологии, абдоминальной хирургии и нейрохирургии для профилактики образования спаек в послеоперационном периоде [2].

В офтальмологии гиалуроновая кислота различной молекулярной массы широко используется в катарактальной хирургии и хирургии роговицы, капли с гиалуроновой кислотой успешно применяются для лечения болезни сухого глаза. В последнее время ведется активное изучение возможностей использования регенеративных свойств гиалуроновой кислоты в офтальмологии.

Нами в клиническом исследовании было установлено положительное влияние субконъюнктивального введения низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на течение как болезни сухого глаза (увеличение показателей пробы Ширмера, времени разрыва слезной пленки, повышение качества жизни пациентов по данным определения индекса OSDI), так и кератопатии (увеличение степени прозрачности роговицы, уменьшение количества конъюнктивальных сосудов) при ХДЗР различной этиологии [3].

Цель работы — установление характера экспрессии фактора роста соединительной ткани в эксплантах роговиц пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы, а также изменение экспрессии на фоне применения инъекционной формы 1%-го натрия гиалуроната.

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

В проспективное исследование были включены 37 пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы (ХДЗР): кератопатиями в исходе кератитов (20 случаев) и эндотелиально-эпителиальной дистрофией (ЭЭД) (17 случаев), обратившиеся в 2017–2019 гг. для обследования и последующего лечения УЗ «3-я городская клиническая больница имени 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. Пациенты с признаками острой инфекции глазной поверхности из исследования исключались.

Пациенты каждой из групп были разделены на 2 подгруппы в зависимости от протокола лечения. Первая подгруппа в предоперационном периоде получала курс инъекций 1%-го низкомолекулярного натрия гиалуроната (3 еженедельные инъекции) (ГК+), вторая подгруппа не получала дополнительного лечения (ГК–). Контроль состояния глазной поверхности (биомикроскопия) осуществлялся перед каждой инъекцией. Исследуемые группы с учетом этиологии ХДЗР были сопоставимы по основным клинико-демографическим критериям.

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

Нозологическая форма	Число случаев	Число полей зрения ($\times 40$)
Контроль	3	18
Кератиты (ГК+)	10	60
Кератиты (ГК–)	10	60
Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ГК+)	9	54
Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ГК–)	8	48
Всего	40	240

С целью анализа характера экспрессии фактора роста соединительной ткани (ФРСТ) выполнено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием первичных моноклональных антител к ФРСТ (в разведении 1:800 с демаскировкой в буфере pH 9,0 в течение 1,5 мин). В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «ДАКО», 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 Motic Easy Scan с последующим программным анализом экспрессии маркера в

материале ткани роговицы с использованием Aperio Image Scope v12.4.0.5043. Рассчитывались следующие параметры: Позитивность экспрессии (ПЭ) (отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей $\times 100\%$), 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 интервалов (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. Во всех группах 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 с некоторым снижением интенсивности экспрессии в группах ХДЗР с ГК+ при визуальной оценке гистологических препаратов (рисунок 1).

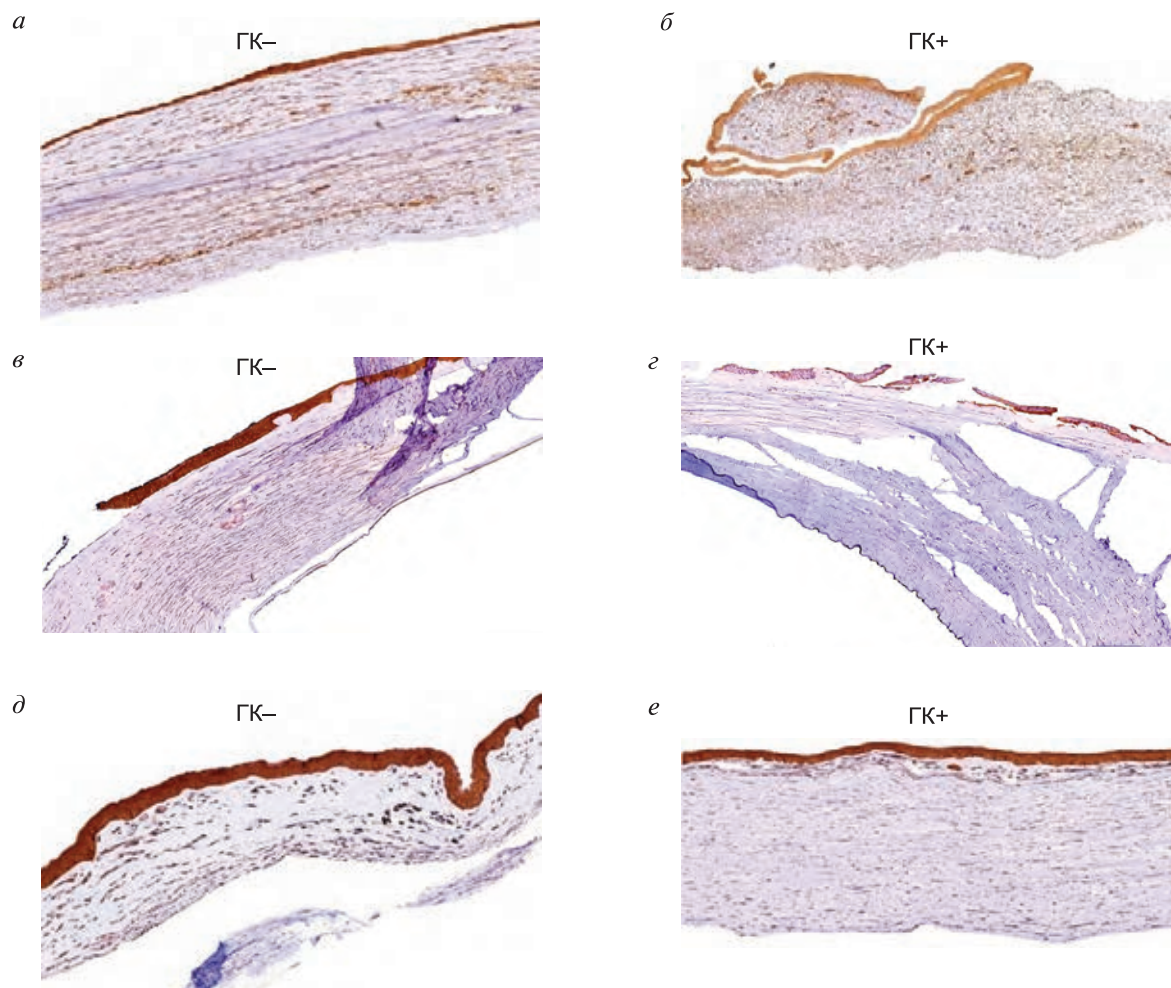


Рисунок 1 — Характер экспрессии ФРСТ в эпителии роговицы при ХДЗР в исходе кератитов (а, б) и при врожденных (в, г), и приобретенных (д, е) формах ЭЭД

Иммуноморфологическая характеристика экспрессии молекулярных маркеров в группе с ХДЗР в исходе кератитов. В группе с ХДЗР в исходе кератитов при визуальной оценке гистологических пре-

паратов отмечалась тенденция к более выраженной экспрессии ФРСТ в группе ХДЗР. Однако при проведении программного анализа параметры позитивности и интенсивности экспрессии ФРСТ были сопоставимы с таковыми в группе ХДЗР и контрольных эксплантах роговицы. Также не выявлено статистически значимых различий позитивности и интенсивности эпителиальной и стромальной экспрессии ФРСТ на фоне применения натрия гиалуроната (таблица 2).

Таблица 2 — Дисперсионный анализ ПЭ и ИИ экспрессии молекулярных маркеров в тканях роговицы при ХДЗР в исходе кератитов

Показатель	Контроль	ГК–	ГК+
Позитивность экспрессии ФРСТ в строме, %			
Me [МКР]	17,0 [15,0; 19,0]	22,0 [14,0; 30,0]	23,0 [12,0; 34,0]
Контроль	–	$p = 0,29$	$p = 0,183$
	–	$p = 0,94$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в строме			
Me [МКР]	176,96 [163,37; 180,32]	174,3 [162,33; 182,95]	176,65 [165,08; 181,83]
Контроль	–	$p = 0,82$	$p = 0,86$
	–	$p = 0,94$	
Позитивность экспрессии ФРСТ в эпителии, %			
Me [МКР]	–	96,0 [91,0; 98,0]	91,0 [71,0; 93,0]
Контроль	–	–	–
	–	$p = 0,09$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в эпителии			
Me [МКР]	–	80,7 [62,62; 134,0]	206,64 [204,61; 207,56]
Контроль	–	–	–
	–	$p = 0,59$	

Иммуноморфологическая характеристика экспрессии молекулярных маркеров в группе наследственных ЭЭД. В группе наследственных ЭЭД позитивность экспрессии ФРСТ в строме роговицы была сопоставима с таковой группы контроля и статистически значимо снижалась на фоне применения натрия гиалуроната в предоперационном периоде. Интенсивность экспрессии ФРСТ при ЭЭД была значимо ниже, чем в контрольных эксплантах и еще больше снижалась после применения натрия гиалуроната (таблица 3).

Таблица 3 — Дисперсионный анализ ПЭ и ИИ экспрессии молекулярных маркеров в тканях роговицы при наследственных формах ЭЭД

Показатель	Контроль	ГК–	ГК+
Позитивность экспрессии ФРСТ в строме, %			
Me [МКР]	17,0 [15,0; 19,0]	19,0 [15,0; 27,0]	9,0 [9,0; 11,0]
Контроль	–	$p = 0,33$	$p = 0,0049^*$
	–	$p = 0,00025^*$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в строме			
Me [МКР]	176,96 [163,37; 180,32]	188,15 [184,69; 194,68]	194,98 [193,97; 198,14]
Контроль	–	$p = 0,0006^*$	$p = 0,002^*$
	–	$p = 0,00044^*$	
Позитивность экспрессии ФРСТ в эпителии, %			
Me [МКР]	–	83,0 [44,5; 89,0]	92,0 [91,0; 95,0]
Контроль	–	–	–
	–	$p = 0,013^*$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в эпителии			
Me [МКР]	–	183,0 [153,83; 196,13]	158,99 [157,98; 161,39]
Контроль	–	–	–
	–	$p = 0,17$	

* Различия достоверны.



Иммунморфологическая характеристика экспрессии молекулярных маркеров в группе приобретенной ЭЭД. Схожая динамика наблюдалась в группе приобретенной ЭЭД. Позитивность и интенсивность стромальной экспрессии в группе приобретенной ЭЭД были сопоставима с таковыми группы контроля и статистически значимо снижались на фоне терапии натрием гиалуронатом. Статистически значимых различий в показателях эпителиальной экспрессии выявлено не было (таблица 4).

Таблица 4 — Дисперсионный анализ ПЭ и ИИ экспрессии молекулярных маркеров в тканях роговицы при приобретенных формах ЭЭД.

Показатель	Контроль	ГК–	ГК+
Позитивность экспрессии ФРСТ в строме, %			
Ме [МКР]	17,0 [15,0;19,0]	23,0 [15,0; 33,5]	13,0 [13,0; 15,0]
Контроль	–	$p = 0,15$	$p = 0,07$
	–	$p = 0,026^*$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в строме			
Ме [МКР]	176,96 [163,37;180,32]	175,38 [159,12;182,85]	194,32 [192,56;196,12]
Контроль	–	$p = 0,8$	$p = 0,007^*$
	–	$p = 0,002^*$	
Позитивность экспрессии ФРСТ в эпителии, %			
Ме [МКР]	–	85,0 [75,0;90,0]	92,0 [79,0;93,0]
Контроль	–	–	–
	–	$p = 0,42$	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в эпителии			
Ме [МКР]	–	177,0 [158,54;186,53]	173,51 [165,39;181,75]
Контроль	–	–	–
	–	$p = 0,22$	

* Различия достоверны.

Фактор роста соединительной ткани играет роль в процессах клеточной адгезии, миграции, пролиферации, ангиогенеза, заживления, а также участвует в патогенезе заболеваний, ассоциированных с фиброзом, и прогрессии опухолей. Считается, что ФРСТ может взаимодействовать с TGF- β , потенцируя процесс фиброобразования, усиливая продукцию внеклеточного матрикса [4]. При этом TGF- β является наиболее важным регулятором экспрессии ФРСТ [5].

Процесс заживления осуществляется за счет привлечения иммунных клеток к месту поражения, активации поврежденных эпителиальных клеток, секретирующих профибротические и провоспалительные цитокины. Под воздействием этих медиаторов эпителиальные и мезенхимальные клетки дифференцируются в миофибробласты, продуцирующие компоненты экстрацеллюлярного матрикса. В условиях длительного воспаления данный процесс не получает обратного развития, что приводит к патологическому фиброзированию [6].

В роговице процесс заживления во многом зависит от целостности базальной мембраны эпителия. Неповрежденная базальная мембрана препятствует проникновению TGF- β , ФРСТ и других факторов роста в строму. При нарушении целостности базальной мембраны ростовые факторы проникают в строму, стимулируя трансформацию кератоцитов в менее прозрачные миофибробласты. Кроме того, миофибробласты синтезируют коллаген 1-го и 3-го типов, нарушающий упорядоченность роговичных пластин, формируя таким образом помутнения роговицы. В некоторых случаях после восстановления целостности базальной мембраны миофибробласты подвергаются апоптозу, а кератоциты повторно заселяют переднюю строму и реабсорбируют дезорганизованные элементы матрикса, тем самым восстанавливая нормальную морфологию коллагеновых пластинок и прозрачность роговицы [7].

Согласно полученным нами результатам при иммуногистохимическом исследовании было выявлено статистически значимое снижение стромальной экспрессии ФРСТ при ЭЭД любой этиологии после применения 1%-го низкомолекулярного натрия гиалуроната, что клинически проявлялось увеличением прозрачности роговицы на фоне терапии. При ХДЗР на фоне кератитов дополнительное

предоперационное применение низкомолекулярного натрия гиалуроната не приводила к значимому снижению экспрессии ФРСТ, что может быть связано с предшествующим повреждением боуеновой мембраны.

Заключение. При эндотелиально-эпителиальной дистрофии применение 1%-го натрия гиалуроната способствует снижению экспрессии фактора роста соединительной ткани как в кератоцитах, так и эндотелии, что приводит к замедлению процессов трансформации эндотелиальных клеток с обретением ими иммунофенотипа фибробластов и фиброзирования стромы и клинически проявляется уменьшением отека, фиброза и увеличением прозрачности роговицы.

Литература

1. Ramazani, Y. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics / Y. Ramazani // Matrix. Biol. — 2018. — Aug.; 68–69. — P. 44–66. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.03.007. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29574063
2. Goa, K. L. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing / K. L. Goa, P. Benfield // Drugs. — 1994. — Vol. 47(3). — P. 536–66. DOI: 10.2165/00003495-199447030-00009. PMID: 7514978.
3. Семак, Г. Р. Механизмы действия гиалуроново́й кислоты при лечении болезни «сухого» глаза на фоне хронических дистрофических заболеваний роговицы / Г. Р. Семак, А. В. Людчик, И. Ю. Жерко // Офтальмология. Восточная Европа. — 2019. — Т. 9, № 2 — С. 264–271.
4. 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.
5. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis / S. Sonnylal [et al.] // Arthritis Rheum. — 2010. — Vol. 62(5). — P. 1523–1532. DOI:10.1002/art.27382
6. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics / Y. Ramazani [et al.] // Matrix. Biol. — 2018. Aug; 68–69. — P. 44–66. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.03.007.
7. Wilson, S. E. Corneal epithelial basement membrane: Structure, function and regeneration / S. E. Wilson, A. A. M. Torricelli, G. K. Marino // Exp. Eye. Res. — 2020. — May; 194. — P. 108002. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108002. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32179076; PMCID: PMC7217741.

Expression of connective tissue growth factor in cornea dystrophies

Semak G.¹, Zakharava V.¹, Zherka I.²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

²State Institution «Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named A. A. Aleksandrov», Minsk, Republic of Belarus

The article describes the current understanding of the nature of connective growth factor expression in corneal explants of patients with chronic dystrophic corneal diseases and changes in expression against the background of using an injectable form of 1% sodium hyaluronate.

The prospective study included 37 patients with cornea dystrophies: keratopathies resulting from keratitis (20 cases) and endothelial epithelial dystrophy (17 cases). Patients in each of the groups were divided into 2 subgroups depending on the treatment protocol. The first subgroup in the preoperative period received injections of 1% low molecular weight sodium hyaluronate, the second subgroup did not receive additional treatment. All patients included in the study underwent penetrating keratoplasty. An immunohistochemical study of corneal explants was performed.

In the group with dystrophy in the outcome of keratitis, the parameters of positivity and intensity of connective tissue growth factor expression were comparable to the control. Also, there were no statistically significant differences in the positivity and intensity of epithelial and stromal expression after sodium hyaluronate application. In the group of hereditary endothelial epithelial dystrophy, the positivity of connective tissue growth

factor expression in the corneal stroma was comparable to that of the control group and statistically significant decreased after sodium hyaluronate application in the preoperative period. A similar dynamics was observed in the group of acquired endothelial epithelial dystrophy.

In endothelial epithelial dystrophy 1% sodium hyaluronate application helps to reduce the expression of connective tissue growth factor both in keratocytes and endothelium, which leads to a slowdown in the transformation of endothelial cells into fibroblasts immunophenotype and corneal fibrosis.

Keywords: corneal dystrophy, immunohistochemistry, connective tissue growth factor, keratoplasty.

Поступила 28.06.2021

