

И.В. Василенко, К.П. Павлюченко, Е.В. Мухина, А.А. Селезнев

Роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе неоваскулярной глаукомы

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького

Ключевые слова: неоваскулярная глаукома, эндотелиальная дисфункция, синтетазы оксида азота.

Проведен анализ гистологических препаратов 22 энуклеированных глазных яблок у больных с НВГ, развившейся вследствие ишемического тромбоза сосудов сетчатой оболочки (10 глаз) и у пациентов с сахарным диабетом (12 глаз). Изучали состояние эндотелия с помощью иммуногистохимического исследования моноклональными антителами CD31, CD34, экспрессию эндотелиальной, индуцибельной синтетазы оксида азота. Выявлено, что в эндотелии сосудов сосудистой и сетчатой оболочек в глазах с терминальной неоваскулярной глаукомой, развившейся вследствие диабетической и посттромботической ретинопатии очагово утрачена экспрессия маркера сосудистого эндотелия CD31, не экспрессируется iNOS и eNOS. Установлено, что в сложном многофакторном патогенезе неоваскулярной глаукомы значимым звеном является эндотелиальная дисфункция сосудов сетчатки и сосудистой оболочки, а именно, она поддерживает гипоксию заднего отрезка глаза, способствуя прогрессированию неоваскуляризации.

Роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі неоваскулярної глаукоми

І.В. Василенко, К.П. Павлюченко, О.В. Мухіна, О.О. Селезньов

Проведено аналіз гістологічних препаратів 22 енуклеюваних очних яблук у хворих з неоваскулярною глаукомою, що розвинулася внаслідок ішемічного тромбозу судин сітчастої оболонки (10 очей) і у пацієнтів з цукровим діабетом (12 очей). Вивчали стан ендотелію за допомогою імуногістохімічного дослідження моноклональними антитілами CD 31, CD 34, експресію ендотеліальної, індукційної синтетази оксиду азоту. Виявлено, що в ендотелії судин судинної і сітчастої оболонки в очах з термінальною неоваскулярною глаукомою, що розвинулася внаслідок діабетичної і посттромботичної ретинопатії осередково втрачена експресія маркера судинного ендотелію CD 31, не експресується iNOS і eNOS. Встановлено, що в складному патогенезі багаточинника неоваскулярної глаукоми значущою ланкою є ендотеліальна дисфункція судин сітківки і судинної оболонки, а саме, вона підтримує гіпоксію заднього відрізка ока, сприяючи прогресуванню неоваскуляризації.

Ключові слова: неоваскулярна глаукома, ендотеліальна дисфункція, синтетази оксиду азоту.

Патологія. – 2009. – Т.6, №2. – С. 96-98

Role of endothelial dysfunction in neovascular glaucoma pathogenesis

I. Vasilenko, K. Pavlyuchenko, O. Mukhyna, O. Seleznev

The investigation of histologic specimens of 22 enucleated eyeballs in patients with neovascular glaucoma which was caused by ischemic thrombosis of retina vessels (10 eyeballs) and in patients with diabetes mellitus (12 eyeballs) was performed. The state of endothelium was studied by immunohistochemical method using monoclonal antibodies CD31, CD34, expression of endothelial, inducible nitric oxide synthetase was studied. It was revealed that in endothelium of vessels of choroid and retina in eyes with terminal neovascular glaucoma which developed due to diabetic postthrombotic retinopathy expression of vascular endothelium marker CD31 is focally lost, iNOS and eNOS are not expressed. It is established that in complex multifactor pathogenesis of neovascular glaucoma endothelial dysfunction of choroid and retina is significant link viz it supports hypoxia of posterior part of the eye promoting progress of neovascularization.

Key words: neovascular glaucoma, endothelial dysfunction, nitrogen oxide synthetase.

Pathologia. 2009; 6(2): 96-98

Неоваскулярная глаукома (НВГ) является одной из наиболее тяжелых форм глаукоматозного процесса. Тяжесть клинического течения, широкое распространение, высокий процент инвалидности делает НВГ одной из наиболее серьезных проблем офтальмологии. Ишемия сетчатки является ведущим звеном в патогенезе НВГ, возникающей на фоне диабетической, посттромботической ретинопатии, и пусковым фактором для синтеза вазопрولیферативных факторов – эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (bFGF, aFGF) и других, что в свою очередь обуславливает неоваскуляризацию [1,2,3]. Исследования показывают, что основными морфологическими признаками неоваскуляризации в условиях ретиальной гипоксии являются деление и миграция эндотелиальных клеток кровеносных сосудов [4,5,6].

В последнее десятилетие значительно расширились научные сведения об эндотелии как о важнейшем регуляторе сосудистых регенераторных, иммунных и эндокринных процессов [7,8]. Установлено, что оксид

азота (NO) – мощный эндогенный вазодилататор и ингибитор агрегации тромбоцитов. NO синтезируется в эндотелиальных клетках из аминокислоты L-аргинин под влиянием NO-синтетазы. В тканях глаза выявлены все изоформы NO-синтетазы (NOS): эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS), макрофагальная, или индуцибельная (iNOS). Проведенные нами ранее исследования показывают, что прогрессирование неоваскуляризации радужки у больных НВГ происходит на фоне достоверного снижения уровня стабильных метаболитов NO в слезной жидкости, плазме крови и достоверного повышения уровня эндотелина-1 в плазме крови [9]. Мы полагаем, что направленные воздействия на систему генерации NO будут способствовать улучшению хориоидального и ретиального кровотока, а, значит, и замедлению вазопрولیферативных процессов. Все это явилось основанием для изучения морфологических основ эндотелиальных дисфункций у больных НВГ.

Цель данного исследования – оценить морфологические изменения эндотелия сосудов глаза, экспрессию

eNOS, iNOS в тканях глаза при неоваскулярной глаукоме, развившейся вследствие посттромботической и диабетической ретинопатии.

Материал и методы

Проведен анализ гистологических препаратов 22 энуклеированных глазных яблок у больных с терминальной, развившейся вследствие ишемического тромбоза сосудов сетчатой оболочки (10 глаз) и у пациентов с сахарным диабетом (12 глаз) за период с 2005 по 2008 год. Энуклеированные глазные яблоки фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в парафин. Изготавливали серию гистологических срезов толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином, коллагеновые волокна выявляли окраской по ван Гизону для оценивания выраженности склероза. Ставилась PAS-реакция, обнаруживающая нейтральные мукополисахариды соединительной ткани и гликоген.

Для морфологической оценки сосудистого русла мы применили иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание препаратов на 2 маркера эндотелиальных клеток: CD31 и CD34 [10]. Так, CD31 является трансмембранным гликопротеидом, который участвует в адгезии различных клеток крови к эндотелию, поэтому он также обозначается как тромбоцитарно-эндотелиальная молекула адгезии 1.

(PECAM-1). CD34 также является трансмембранным гликопротеидом, однако его роль в клеточных взаимодействиях пока не определена. Кроме эндотелиальных клеток, он также экспрессируется некоторыми клетками соединительной ткани и гладкими миоцитами. Таким образом, окраска на CD31 и CD34 позволяет четко визуализировать эндотелиальные клетки, тогда как в препаратах, окрашенных обычными гистохимическими методиками, иногда это сделать затруднительно.

Предназначенные для ИГХ-окрашивания срезы помещали на позитивно заряженные стекла Super Frost Plus (Menzel, Германия). После депарафинизации выполняли регенерацию антигенных свойств ткани путем кипячения стекол со срезами в Tris-EDTA буфере (pH 9.0) в микроволновой печи. После этого наносили первичные моноклональные мышинные антитела к CD31 (клон JC70A, DAKO, Дания), CD34 (клон QBEnd-10, DAKO), а также кроличьи поликлональные антитела к iNOS и eNOS (оба антитела фирмы Thermo Scientific – LabVision, США). Первичные антитела визуализировали с помощью полимерной системы детекции 3 поколения DAKO Advance, в которой в качестве метки используется пероксидаза хрена, и хромогена DAB+ (DAKO, Дания). Окрашенные срезы анализировали с помощью микроскопа Olympus BX-40 (Япония), фотографировали с помощью цифровой камеры Olympus DP-50 и микроскопа Olympus AX-70 Provis (Япония).

Результаты и обсуждение

При патоморфологическом исследовании энуклеированных глаз по поводу болевой терминальной НВГ выявляли картину далеко зашедшего патологического процесса, при котором первичные изменения породили развитие вторичных изменений и привели глаз к функциональной гибели. Определялась атрофия сосудистой оболочки, склероз с истончением ее почти на всем протяжении, с уменьшением просветов сосудов, которые на большом протяжении не были видны (рис. 1, см. цв.

вкладку 8). В сетчатой оболочке на большем протяжении слои сохранялись, но очагово выявлялась ее атрофия, дистрофия, вплоть до некроза ганглиозных клеток (рис. 2, см. цв. вкладку 8).

Во всех случаях в участках атрофии и склероза сосудистой оболочки на значительном протяжении экспрессия CD31 в эндотелии отсутствовала, даже при хорошо различимом просвете сосудов (рис. 3а, см. цв. вкладку 8). В единичных сосудах сосудистой оболочки, в которых склероз был слабо выражен, имелась очаговая прерывистая экспрессия CD31 (рис. 3б, см. цв. вкладку 8). Видно, что эндотелиальные клетки резко вытянуты, с уплощенными ядрами, но без окраски цитоплазмы эндотелиальных клеток. Нередко наблюдались тяжи молодых эндотелиальных клеток, мелкие скопления в них склеенных эритроцитов, адгезия их к стенке сосудов. Так, исчезновение экспрессии маркера эндотелия CD31 в сосудах сосудистой и сетчатой оболочек объясняются необратимыми структурными повреждениями эндотелиальных клеток. Проводя сравнительные морфологические исследования экспрессии маркеров сосудистого эндотелия CD31 и CD34, установлено, что экспрессия CD34 на значительном протяжении была сохранена в сосудах сосудистой оболочки (рис. 4, см. цв. вкладку 8). На срезах, окрашенных на CD34 хорошо видно, что эндотелиальные клетки резко вытянуты, толщина клеток очень мала, ядра уплощены. Нередко встречалась пролиферация эндотелия с формированием тяжей молодых эндотелиальных клеток без просвета или с узким просветом со скоплением в них склеенных эритроцитов. Обращали на себя внимание очаги хронического воспаления. Так, на серийных срезах 11 энуклеированных глаз по поводу терминальной НВГ в цилиарном теле имелись очаги воспаления с вариацией выраженности от слабой до умеренной. В этих очагах обнаруживались множественные сосуды с расширенными просветами, а также новообразованные сосуды, эндотелий которых экспрессировал CD31 и CD34. Определялся в основном уплощенный эндотелий, выступающий расширенные сосуды щелевидной формы или даже тяжи эндотелиальных клеток, в мелких новообразованных сосудах эндотелий набухший, вплоть до кубического. В сосудистой оболочке только в одном случае, ближе к углу передней камеры, встречался скудный лимфоцитарный инфильтрат, свидетельствовавший о хроническом воспалении.

Имуногистохимические исследования показали, что существует тесная взаимосвязь между структурными изменениями эндотелиальных клеток и уровнем активности синтетаз оксида азота. При сопоставлении серийных срезов, окрашенных на CD31, CD34, iNOS и eNOS мы установили, что синтетазы оксида азота не экспрессировались эндотелиальными клетками в тех же сосудах, в которых отсутствовала экспрессия CD31. Так, при исследовании экспрессии синтетаз оксида азота в эндотелиальных клетках сосудистой и сетчатой оболочек мы обнаружили, что количество как индуцибельной, так и эндотелиальной синтетаз было резко снижено, по крайней мере, настолько, что не определялось иммуногистохимическим методом (рис. 5-6, см. цв. вкладку 8), (рис. 7, 8).

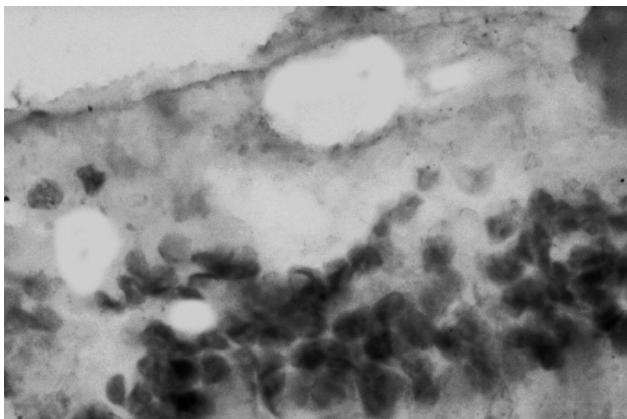


Рис. 7. Отсутствие в эндотелии сосудов сосудистой оболочки эндотелиальной синтазы оксида азота. ИГХ-окраска с ПАТ к eNOS, x300.

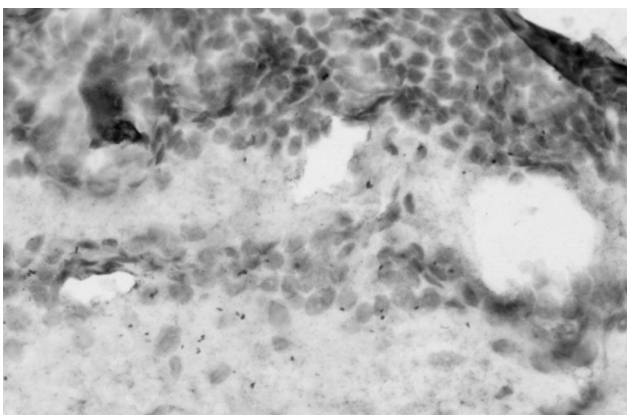


Рис. 8. Отсутствие в эндотелии сосудов сосудистой оболочки индуцибельной синтазы оксида азота. ИГХ-окраска с ПАТ к iNOS, x230.

В то же время, в эндотелии сосудов склеры, фибробластах стромы мы обнаружили вариабельную экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота. В некоторых сосудах она не определялась, в других – была слабо выражена, однако уровень экспрессии в эндотелиоцитах конкретного сосуда был одинаковым (рис. 9, см. цв. вкладку 8). Анализ морфологических исследований показал, что индуцибельная синтаза оксида азота активно экспрессировалась во всех сосудах склеры, независимо от их калибра, особенно в участках хронического воспаления (рис. 10, см. цв. вкладку 8). Продукция iNOS при НВГ является мощным модулятором воспаления.

Таким образом, проведенные морфологические исследования установили, что в сосудистой и сетчатой оболочках при терминальной НВГ имеется дисфункция эндотелия. В процессе развития НВГ происходит морфологическая и функциональная перестройка сосудов в сосудистой и сетчатой оболочках. Повреждение эндотелия в условиях ишемии при диабетической и посттромботической ретинопатии приводит к снижению в них активности eNOS и нарушению NO-зависимых процессов. Недостаток NO приводит к снижению кро-

вотока, ухудшению микроциркуляции. В результате происходит повышение агрегации и адгезии тромбоцитов, повышение внутрисосудистой коагуляции, снижению фибринолитической активности крови, увеличение миграции и пролиферации гладкомышечных клеток. Таким образом, нарастает ишемия сетчатки, которая способствует выработке вазопротеративных факторов и прогрессированию неоваскуляризации.

Выводы

1. В эндотелии сосудов сосудистой и сетчатой оболочек в глазах с терминальной неоваскулярной глаукомой, развившейся вследствие диабетической и посттромботической ретинопатии утрачена экспрессия маркера сосудистого эндотелия CD31, не экспрессируется iNOS и eNOS.

2. В патогенезе неоваскулярной глаукомы значимым звеном является эндотелиальная дисфункция сосудов сетчатки и сосудистой оболочки, которая поддерживает гипоксию заднего отрезка глаза и способствует прогрессированию неоваскуляризации.

3. Полученные результаты являются основанием для разработки принципиально новых подходов к лечению неоваскулярной глаукомы и ее профилактике. Использование донаторов оксида азота на ранних стадиях развития неоваскулярной глаукомы будет способствовать улучшению хориоидального и ретинального кровотока, а значит, уменьшению гипоксии заднего отрезка глаза и снижению выработки вазопротеративных факторов.

Литература

1. Schultz G.S., Grant M.B. Neovascular growth factors // Eye.—1991.—Vol.5, N2.—P.170-180.
2. Simmorre-Pinatel V., Guerrin M., Chollet P. et al. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.—1994.—Vol.35, N9.—P.3393-3400.
3. Кривошеина О.П. Проллиферативная витреоретинопатия: факторы патогенеза и закономерности развития // Вестник офтальмологии.—2003.—№3.—С.47-50.
4. Koyama N., Watanabe S., Tessura M. et al. Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor // J. Cell. Physiol.—1994.—Vol.158.—P.1-6.
5. Kubota T., Tawara A., Hata Y. et al. Neovascular tissue in the intertrabecular spaces in eyes with neovascular glaucoma // Br. J. Ophthalmol.—1996.—Vol.80, N8.—P.750-754.
6. Nork T.M., Tso M.O.M., Duvall J., Hayreh S.S. Cellular mechanisms of iris neovascularization secondary to retinal vein occlusion // Arch. Ophthalmol.—1989.—Vol.107, N6.—P.581-586.
7. Малая Л.Т., Корж А.Н., Балковая Л.Б. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы.—Харьков: Торсинг, 2000.—432 с.
8. Behrendt D., Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical application // Am. J. Cardiol.—2002.—Vol.21.—P.40L-48L.
9. Павлюченко К.П., Мухина Е.В., Зяблицев С.В. Клинико-патогенетическое значение эндотелиальной дисфункции и возможности ее коррекции у больных неоваскулярной глаукомой // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей.—Вип. 12, №2.—С.235-242.
10. Puztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues // J. Histochem. Cytochem.—2006.—Vol.54, N4.—P.385-395.

Сведения об авторах:

Василенко И. В., д.мед.н, профессор, зав. каф. патологической анатомии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького. Павлюченко К. П., д.мед.н, профессор, зав. каф. глазных болезней, Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького. Мухина Е. В. — к.м.н., врач отделения микрохирургии глаза Донецкого областного клинического медицинского территориального объединения. Селезнев А. А., к.м.н., доцент каф. патологической анатомии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Адрес для переписки:

Василенко Инна Васильевна, 83003 г.Донецк, пр. Ильича, 16, Донецкий национальный медицинский университет им.М.Горького, кафедра патологической анатомии, тел. 8 (062) 295-63-33