

УДК 617.713

## Роль факторов роста в формировании и прогрессировании птеригиума

Т.Н. Юрьева<sup>1</sup>, А.Г. Щуко<sup>2</sup>, В.Р. Порядин<sup>1</sup>, Ю.К. Батороев<sup>3</sup>, С.В. Кузьмин<sup>1</sup><sup>1</sup> Иркутский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, Иркутск;<sup>2</sup> Иркутский государственный медицинский университет;<sup>3</sup> ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования Минздрава России», Иркутск

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Определение роли факторов роста – эпидермального и вазопротерогенных белков – в патогенезе прогрессирующего птеригиума на основе данных иммуногистохимических и морфологических исследований тканей.

**Материал и методы.** Исследование включало основную группу пациентов с прогрессирующим птеригиумом III–IV стадии (30 глаз, 28 чел.), средний возраст – 57±7 лет. Во всех случаях выполнялась операция удаления птеригиума по Чермаку с лечебной целью и для дальнейшего морфологического и иммуногистохимического исследования ткани птеригиума. Клиническая оценка послеоперационного состояния проводилась в ранний послеоперационный период и через 6 и 12 мес. после операции. Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием моноклональных антител и системой визуализации (фирма DAKO, Дания): CD 31 (клон JC70A), CD 34 ClassII (клон QBEnd 10), васкулярный эндотелиальный ростовой фактор VEGF (клон VG1), эпидермальный фактор роста ЭФР (клон DAK-H1-WT). Интенсивность окраски объектов оценивалась колориметрическим показателем по 4-балльной шкале и отражала количественное содержание исследуемых факторов. Для гистологического исследования удаленный птеригиум с тканями роговицы и конъюнктивы окрашивали гематоксилин-эозином с последующим анализом и микрофотографированием.

Офтальмохирургия. – 2013. – № 4. – С. 60-64.

### ABSTRACT

#### The role of growth factors in the formation and progression of pterygium

T.N. Iureva<sup>1</sup>, A.G. Shchuko<sup>2</sup>, V.R. Poryadin<sup>1</sup>, Y.K. Batoroev<sup>3</sup>, S.V. Kuzmin<sup>1</sup><sup>1</sup> The Irkutsk Branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Irkutsk;<sup>2</sup> The Irkutsk State Medical University;<sup>3</sup> The Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk

**Purpose.** To determine a role of epidermal growth factors and vasal proliferative proteins in the pathogenesis of progressive pterygium based on data of immunohistochemical and morphological studies of tissues.

**Material and methods.** The study included a main group of patients with primary pterygium of the progressive stage III-IV

**Results and discussion.** Pterygium in structure-functional relationship is characterized by disturbed homeostasis of tissues of conjunctiva and cornea, expressed in change of epithelial-stromal relationships, disorganization of fibrous structures of connective tissue, disturbances in microcirculatory bed. As a result of conducted immunohistochemical study in all cases of main group was revealed expression of growth factors. Expression of epidermal factor was diagnosed in 27 objects with indicator (++) and 3 objects with indicator (+). CD31 expression was revealed: ++++ – in 28 objects, in 1 object – +++ and in 1 object – ++. CD34 expression was revealed: ++++ – in 26 objects, in 4 objects – ++. VEGF expression was revealed in all 30 objects – ++++. In control group described above changes were not observed, i.e. expression of epidermal and vascular growth factors was not determined.

**Conclusion.** Thus, analysis of features of growth of conjunctival epithelium, angiogenesis in tissues of pterygium and underlying cornea allows to suppose, that key factor of pathological process is primary growth of conjunctival epithelium with accompanying growth of vascular network. Degree of expression of epidermal and vasoproliferative factors of growth in pterygium may serve as prognostic sign of relapse of pterygium.

**Key words:** pterygium, immunohistochemistry, monoclonal antibodies, growth factors, relapse. ■

(30 eyes, 28 patients), the mean age was 57±7 years. The surgical procedure the pterygium removal was performed according to the Cermak method in all cases for therapeutic purposes and for a further morphological and immunohistochemical study of pterygium tissue. The clinical assessment of postoperative condition was carried out in the early postoperative period and

in 6 and 12 months after surgery. The immunohistochemical study was made with the use of monoclonal antibodies and the visualization system (the DAKO company, Denmark): CD 31 (clone JC70A), CD 34 ClassII (clone QBEnd 10), Vascular Endothelial Growth Factor VEGF (clone VG 1), Epidermal growth factor EGF (clone DAK-H1-WT). The intensity of coloration of objects was estimated by colorimetric index on a 4-point scale and reflected the quantity of the studied factors. For histological examination the removed pterygium with the tissues of the cornea and conjunctiva was stained with hematoxylin-eosin with a subsequent analysis and a micro-photographing.

**Results and discussion.** The pterygium concerning the structure and function is characterized by an impaired homeostasis of the tissues of the conjunctiva and cornea, expressed in a change of epithelial-stromal relations, disorganization of the fibrous structures of connective tissue, violations in the microcirculatory bed. As a result of the immunohistochemical research, the expression of growth factors was identified in all cases of main group. The expression of epidermal factor was diagnosed in 27

objects with the index (++) and 3 objects with the index of (+). The CD31 expression was revealed: ++++ in 28 objects, in 1 object +++, and in 1 object ++. CD34 expression was revealed: ++++ in 26 objects, in 4 objects ++. The VEGF expression was revealed: ++++ in all 30 objects. In the control group the above-described changes were not revealed, that is the expression of epidermal and vascular growth factors were determined.

**Conclusion.** Thus, the analysis of the peculiarities of growth of the conjunctive epithelium, angioarchitectonique in the tissues of the pterygium and underlying cornea allows assuming that the starting factor of the pathological process is the primary growth of conjunctive epithelium with the accompanying growth of vasculature. The expressive level of epidermal and vasoproliferative growth factors in pterygium can serve as a prognostic sign of pterygium recurrence. The identification of VEGF expression can be a condition on the use of anti-VEGF therapy in the prevention of recurrence.

**Key words:** *pterygium, immunohistochemistry, monoclonal antibodies, growth factors, recurrence.* ■

Ophthalmosurgery.- 2013.- No. 4.- P. 60-64.

**П**теригиум является заболеванием глазной поверхности и представляет собой крыловидную складку слизистой оболочки, сращенную с роговицей [2, 10]. Первоначально птеригиум был описан как дегенеративное изменение конъюнктивы с сопутствующей патологией Боуменовской мембраны и эластозом, развивающимся под действием избыточного УФ-излучения [4, 16]. Рост птеригиума только у человека и именно с носовой стороны объясняется уникальным строением и положением глазного яблока, а также открытым Soroneo M. в 1991 г. феноменом периферийной фокусировки света [7, 13]. Было выяснено, что у пациентов с определенной морфологией глазного яблока падающий свет фокусируется на лимбе, преимущественно с носовой стороны, вызывая альтерацию лимбальных стволовых клеток, которые в норме, действуя как барьер, предотвращают рост конъюнктивы на роговицу [15, 16].

Концепция лимбальной недостаточности стволовых клеток в патогенезе птеригиума обсуждается офтальмологами на протяжении последних 30 лет. Основным постулатом этой теории является то, что пролиферация измененных лимбальных базальных клеток, имею-

щих миграционный фенотип, обуславливает формирование птеригиума [11].

Исследования Chui J., Soroneo M. et al. (2011) выявили экспрессию белков СК15, СК19 и рб3а, локализованных в головке прогрессирующего птеригиума, активация которых может также являться причиной его инвазии [6]. В настоящее время появились новые представления о птеригиуме как о процессе, характеризующемся патологической пролиферацией, напоминающей aberrantное рубцевание [8].

До конца остается неясным происхождение в птеригиуме осмо-

фильных эластоидных полос, наблюдаемых также при актиническом эластозе кожи. Одной из теорий их возникновения является обнаруженная у пациентов с птеригиумом мутация в гене тропоэластина, вызывающая эластодисплазию [17].

Кроме того, птеригиум обладает опухолеподобными качествами, такими как склонность к росту ткани, высокая частота рецидивирования после его резекции, возможность сосуществования с вторичными предраковыми поражениями – первично приобретенным меланозе, поверхностной плоскоклеточной неоплазией и т.д. [5, 12].

#### Для корреспонденции:

Юрьева Татьяна Николаевна, докт. мед. наук, зам. директора по научной работе;  
Порядин Виктор Рудольфович, офтальмохирург;  
Кузьмин Сергей Владимирович, офтальмохирург  
Иркутский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова»  
Минздрава РФ

Адрес: 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 337  
Тел.: (3952) 564-113. E-mail: if@mntk.irkutsk.ru

Шуко Андрей Геннадьевич, докт. мед. наук, профессор, зав. кафедрой глазных болезней  
Иркутский государственный медицинский университет  
Адрес: 664003, Иркутск, ул. Красного восстания, 1  
Тел.: (3952) 243-825

Батороев Юрий Клементьевич, докт. мед. наук, профессор кафедры онкологии  
ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования Минздрава России»

Адрес: 664079, Иркутск, Юбилейный мкр., 100  
Тел.: (3952) 465-326

Из вышесказанного следует, что, несмотря на успехи в изучении этиологии и морфологии птеригиума, патогенез этого заболевания остается до конца неизученным, среди специалистов имеются приверженцы трех основных теорий: неопластической, дегенеративной и воспалительной [3]. Известно, что птеригиум на начальной фазе своего развития представлен малодифференцированной соединительной тканью [1], характеризуется центростремительно направленным ростом видоизмененных клеток лимбального эпителия, сопровождается деградацией Боуменовой мембраны, активацией фибробластов стромы на фоне хронического воспаления и неоваскуляризации. Ремоделирование ткани обусловлено согласованным действием цитокинов и матричных металлопротеиназ [9, 14].

В последнее время выяснено, что важную роль в регуляции деления играют факторы роста – белки пролиферации. Но в то же время отсутствуют сведения о роли этих факторов в патогенезе прогрессирующего птеригиума, что и послужило основанием для выполнения данной работы.

### ЦЕЛЬ

Определение роли факторов роста – эпидермального и вазопрولی-

феративных белков – в патогенезе прогрессирующего птеригиума на основе данных морфологических и иммуногистохимических исследований тканей.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование включало основную группу пациентов с прогрессирующим птеригиумом III–IV стадии (30 глаз, 28 чел.), средний возраст –  $57 \pm 7$  лет, соотношение мужчин и женщин составило 1:1. Во всех случаях одним хирургом выполнялась операция удаления птеригиума по Чермаку с лечебной целью, иссеченная ткань подвергалась дальнейшему морфологическому и иммуногистохимическому исследованию. Контрольную группу составили пациенты со сходящимся косоглазием без птеригиума, которым произведена биопсия бульбарной конъюнктивы в области лимба (5 глаз, 5 чел.) в ходе хирургического лечения (теносклеропластика внутренней прямой мышцы доступом от лимба). Клиническая оценка послеоперационного состояния проводилась в раннем послеоперационном периоде и через 6 и 12 мес. после операции.

Фиксация первичного материала проводилась нормальным забуференным 10%-ным раствором формалина с последующей заливкой в парафин. Для светооптического (гистологического) ис-

следования удаленный птеригиум с тканями роговицы и конъюнктивы фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. После стандартной гистологической проводкой материал заливали в парафин. Приготовление серийных срезов толщиной 5–6 мкм осуществляли на ротационном микротоме. Депарфинированные срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином с последующим анализом и микрофотографированием при помощи цифровой фоторегистрации. Изображение захватывали при помощи цифровой камеры, и оценивали интенсивность иммуногистохимического окрашивания колориметрическим показателем по четырехбалльной шкале (+, ++, +++, ++++) с помощью программного обеспечения «ДиаМорф Объектив 1.6». Гистологическое исследование проводили при помощи бинокулярного микроскопа при увеличении  $\times 20$  и  $\times 40$ .

Иммуногистохимическое исследование проведено системой визуализации (фирма DAKO, Дания) с использованием моноклональных антител:

1. CD 31 (клон JC70A) является прогностическим маркером ангиогенеза, окрашивает как покоящийся, так и пролиферирующий эндотелий;

2. CD 34 Class II (клон QBEnd 10), мембранный белок, играющий роль на ранних этапах гемопоэза. Максимальная экспрессия данного маркера осуществляется пролиферирующими эндотелиальными клетками.

3. Вазкулярный эндотелиальный ростовой фактор VEGF (клон VG1), один из членов семейства структурно близких между собой белков, которые являются лигандами для семейства рецепторов VEGF. VEGF влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), связываясь и активируя тирозинкиназные рецепторы (рецептор-1 VEGF и рецептор-2 VEGF). Экспрессия VEGF стимулируется множеством проангиогенных факторов, включая эпидермальный ростовой фактор, основной фибробластный ростовой

Таблица

#### Соотношение показателей эпидермального и вазопрولیферативных факторов роста в ткани птеригиума, $M \pm s$

Факторы роста, в баллах (от +1 до +4)	Клиническая группа (n=30)			Контр. группа (n=5)	p, Манна – Уитни
	1 гр. n=30	2 гр. n=26	3 гр. n=4		
CD 31 (клон JC70A)	$3,9 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,0$	$3,25 \pm 0,08$	-	$p \ 2-3 < 0,01$
CD 34 Class II (клон QBEnd 10)	$3,73 \pm 0,04$	$4,0 \pm 0,0$	$2,0 \pm 0,28$	-	$p \ 2-3 < 0,05$
VEGF (клон VG1)	$4,0 \pm 0,0$	$4,0 \pm 0,0$	$4,0 \pm 0,0$	-	-
ЭФР (клон DAK-H1-WT)	$1,9 \pm 0,004$	$2,0 \pm 0,0$	$0,75 \pm 0,10$	-	$p \ 2-3 < 0,001$

фактор, тромбоцитарный ростовой фактор и интерлейкин-1. VEGF участвует в процессе роста опухоли посредством следующих механизмов: стимулирует ангиогенез, необходимый для роста опухоли и метастазирования, препятствует апоптозу незрелых клеток эндотелия, играет роль в образовании новых лимфатических сосудов, которые представляют собой путь для метастазирования опухоли, препятствует нормальному иммунному ответу на опухоль.

4. Эпидермальный фактор роста ЭФР (клон DAK-H1-WT), гиперэкспрессия рецепторов которого тесно связана с процессами клеточной пролиферации и апоптоза, передачей митогенных сигналов в опухолевых клетках. Рецепторы ЭФР рассматривают в последние годы как один из перспективных молекулярно-биологических опухолевых маркеров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологические исследования интраоперационного материала показали, что основную часть птеригиума составляет рыхлая волокнистая соединительная ткань с большим количеством кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (артериолы, вены, капилляры). Эпителий птеригиума пролиферирует с локальной инвазией в эпителий роговицы. На стыке между эпителием роговицы и птеригиумом находятся фидерные сосуды, выявлен фиброз поверхностных слоев корнеальной стромы. При этом были обнаружены выраженные явления мукоидного и фибриноидного набухания межклеточных структур с локальной дезорганизацией волокнистых элементов (рис. 1).

Выявлены изменения коллагеновых и эластических волокон (рис. 2). Последние имели признаки выраженных повреждений, что проявилось в их фрагментации, чередовании участков сильного истончения с локальными утолщениями, между волокнами обнаружены расширения значительных размеров.

Значительное место среди выявленных изменений ткани птеригиума занимает гиперплазия бокаловидных клеток (рис. 3).

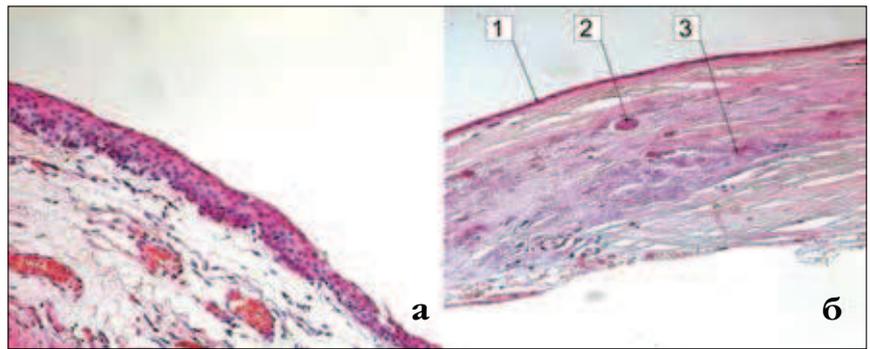


Рис. 1: а) участок нормальной конъюнктивы здорового пациента, окраска гематоксилин-эозином, увеличение X200; б) гистологический срез ткани птеригиума, окраска гематоксилин-эозином, увеличение X200: атрофия эпителия (1), дистрофическое обызвествление (2), эластоз (3)

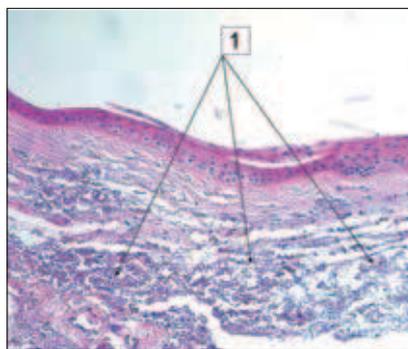


Рис. 2. Гистологический срез ткани птеригиума. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение X200. Эластоз (1)

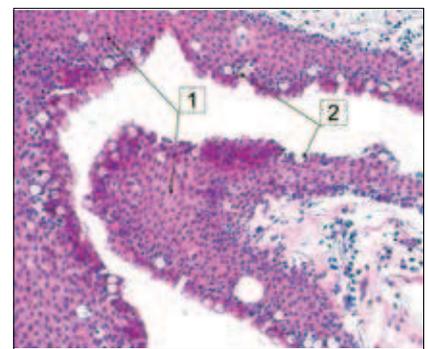


Рис. 3. Гистологический срез ткани птеригиума. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение X400. Гиперплазия эпителия (1) с бокаловидными клетками (2)

В многочисленных расширенных кровеносных сосудах наблюдались признаки расстройств гемоциркуляции. Это проявилось в сладж-явлении (склеивание, слипание эритроцитов), что было выявлено не только в капиллярах, но и в артериолах и венах. Эти расширения были заполнены форменными элементами крови, преимущественно эритроцитами, а также зернистыми преципитатами плазмы. Внутрисосудистая агрегация эритроцитов сопровождалась повышением проницаемости сосудистой стенки, экстравазацией плазмы и диапедезом форменных элементов крови.

Пролиферативные разрастания покровного эпителия, включая формирование погружных тяжей эпителиоцитов, мы наблюдали только в случаях, когда в тех или иных участках птеригиума имелась малодифференцированная соединительная ткань, пронизанная большим количеством капилляров.

Таким образом, птеригиум в структурно-функциональном от-

ношении характеризуется нарушенным гомеостазом тканей конъюнктивы и роговицы, выражающимся в изменении эпителиально-стромальных взаимоотношений, дезорганизации волокнистых структур соединительной ткани, нарушениях в микроциркуляторном русле.

В результате проведенного иммуногистохимического исследования во всех случаях основной группы выявлена экспрессия факторов

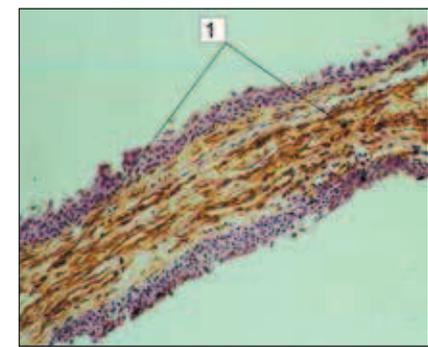


Рис. 4. Гистологический срез ткани птеригиума, экспрессия VEGF (1)

роста. Экспрессия эпидермального фактора выявлена в эпителии птеригиума, преимущественно в его базальном слое, и была диагностирована в 27 объектах с показателем (++) и в 3 объектах с показателем (+), что свидетельствует о наличии в тканях активного пролиферативного процесса.

В стенках сосудов подлежащей ткани птеригиума выявлен высокий уровень экспрессии белка VEGF (рис. 4). В контрольной группе описанные выше изменения выявлены не были, то есть экспрессия эпидермального и сосудистых факторов роста не определялась.

Оценка клинического состояния показала, что у 4 пациентов с минимальной экспрессией генов CD34 наблюдались ареактивный послеоперационный период, ранняя эпителизация роговицы, легкая степень гиперемии конъюнктивы, слабая выраженность роговичного синдрома и в отдаленном послеоперационном периоде наблюдения – отсутствие рецидивов птеригиума.

В 26 случаях, где был выявлен высокий уровень экспрессии белков CD34, CD31 и VEGF с показателем +4 и эпидермального фактора роста с показателем +2, в раннем послеоперационном периоде были отмечены ярко выраженный роговичный синдром, длительная эпителизация роговицы, выраженная гиперемия конъюнктивы, а в позднем послеоперационном периоде в 2 случаях (7,68%) наблюдался рецидив птеригиума.

Соотношение показателей эпидермального и вазопротерогенных факторов роста в ткани птеригиума представлены в табл., где 1 группа представлена всеми 30 исследуемыми пациентами, 2 группу составили 26 чел. с выраженной местной реакцией глаза на операционную травму, в 3 группу вошло 4 чел. с ареактивным ранним послеоперационным периодом и отсутствием рецидивов птеригиума.

Таким образом, высокий уровень содержания факторов роста (эпидермального и вазопротерогенных) можно рассматривать как предиктор прогрессирования и возможных рецидивов птеригиума.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ особенностей роста конъюнктивального эпителия, ангиоархитектоники в тканях птеригиума и подлежащей роговицы позволяет предположить, что ключевым звеном патологического процесса является пролиферация конъюнктивального эпителия с сопровождающим ростом сосудистой сети. Степень выраженности эпидермального и вазопротерогенного факторов роста в птеригиуме может служить прогностическим признаком рецидивирования птеригиума. Ингибирование рецепторов эпидермального фактора роста и VEGF в птеригиуме является перспективным патогенетически обоснованным направлением в лечении прогрессирующего птеригиума и профилактики рецидивов после его хирургического удаления, что требует дальнейшего исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Канюков В.Н., Стадникова А.А., Ломухина Е.А. Особенности микроскопического строения птеригиума // Вестник ОГУ.– 2007.– Т. 78.– С. 119-121.
2. Краснов М.Л. Терапевтическая офтальмология.– М.: Медицина, 1985.– 360 с.
3. Цыганова Т.А., Маланова Н.Л. Современный взгляд на проблему этиологии и патогенеза птеригиума // Нижегородский мед. журнал.– 2005.– № 3.– С. 21-27.
4. Austin P., Jakobiec F.A., Iwamoto T. Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula // Ophthalmology.– 1983.– Vol. 90.– P. 96-109.

5. Basti S., Macsai M.S. Ocular surface squamous neoplasia: a review // Cornea.– 2003.– Vol. 22.– P. 687-704.

6. Chui J., Coronero M., Tat L.T. Ophthalmic pterygium. A stem cell disorder with premalignant features // Am. J. Pathol.– 2011.– Vol. 178.– P. 817-827.

7. Coroneo M.T., Muller-Stolzenburg N.W., Ho A. Peripheral light focusing by the anterior eye and the ophthalmohelioses // Ophthalmic Surg.– 1991.– Vol. 22.– P. 705-711.

8. Di Girolamo N. Signalling pathways activated by ultraviolet radiation: role in ocular and cutaneous health // Curr. Pharm. Des.– 2010.– Vol. 16.– P. 1358-1375.

9. Di Girolamo N., Chui J., Coroneo M.T., Wakefield D. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases // Prog. Retin. Eye Res.– 2004.– Vol. 23.– P. 195-228.

10. Duke-Elder S. Diseases of the Outer Eye. Part 1: System of Ophthalmology.– Kimpton: London, 1965.– 760 p.

11. Figueira E.C., Di Girolamo N., Coroneo M.T., Wakefield D. The phenotype of limbal epithelial stem cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.– 2007.– Vol. 48.– P. 144-156.

12. Hirst L.W., Axelsen R.A., Schwab I. Pterygium and associated ocular surface squamous neoplasia // Arch. Ophthalmol.– 2009.– Vol. 127.– P. 31-32.

13. Kobayashi H., Kobshima S. Unique morphology of the human eye // Nature.– 1997.– Vol. 387.– P. 767-768.

14. Naib-Majani W., Eltobami I., Wernert N. et al. Distribution of extracellular matrix proteins in pterygia: an immunohistochemical study // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.– 2004.– Vol. 242.– P. 332-338.

15. Sborit A.J., Secker G.A., Munro P.M. et al. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells // Stem Cells.– 2007.– Vol. 25.– P. 1402-1409.

16. Taylor H.R., West S.K., Rosenthal F.S. et al. Corneal changes associated with chronic UV irradiation // Arch. Ophthalmol.– 1989.– Vol. 107.– P. 1481-1484.

17. Wang J.J., Hu F.R., Chen P.J., Lin C.T. Mechanism of abnormal elastin gene expression in the pinguecular part of pterygia // Am. J. Pathol.– 2000.– Vol. 157.– P. 1269-1276.

Поступила 10.09.2013