

Роль тромбоцитарного фактора роста в патобиологии эпиретинальных мембран при пролиферативной витреоретинопатии (экспериментально-морфологическое исследование)

И.П. Хорошилова-Маслова, Н.Л. Лепарская

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России

*Пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) представляет собой патологический процесс, в основе которого лежит пролиферация клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и глии на внутренней поверхности сетчатки с формированием эпиретинальных мембран. Патогенез заболевания остается недостаточно выясненным. Наиболее обоснованной является гипотеза об участии в патогенезе ПВР факторов роста / цитокинов, где тромбоцитарному фактору роста (PDGF) принадлежит ключевая роль. Целью работы является экспериментально-морфологическое изучение изменений тканей глаза после воздействия рекомбинантного PDGF при его интравитреальном введении. **Материал и методы.** PDGF вводили 6 кроликам (12 глаз) породы Шиншилла интравитреально через плоскую часть цилиарного тела по 0,1 мл в концентрации 2000 (4 глаза), 5000 (4 глаза) и 20 000 мг/мл (4 глаза). Микроскопическое исследование энуклеированных через месяц глаз проводили с помощью микроскопической системы Leica с встроенной цифровой камерой при увеличении $\times 200$ – 600 . **Результаты.** Установлено, что РПЭ является основной мишенью воздействия PDGF. Выявлен дозозависимый характер воздействия. При дозах в 2000 и 5000 мг/мл происходит диссоциация ретинальных эпителиальных клеток, их округление с формированием отростков, выход из пласта и миграция в окружающее пространство. При больших дозах (20 000 мг/мл), наряду с обширной миграцией клеток и облысением мембраны Бруха, происходит гибель фоторецепторных клеток сетчатки. Обсуждается механизм процессов миграции, связанный с воздействием PDGF на систему контрадгезивных протеинов РПЭ. **Заключение.** Обоснована роль процессов миграции клеток РПЭ, индуцированных PDGF, в формировании начальной стадии ПВР.*

Ключевые слова: пролиферативная витреоретинопатия, ретинальный пигментный эпителий, факторы роста, цитокины, тромбоцитарный фактор роста.

Российский офтальмологический журнал, 2016; 4: 59-63

Пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) представляет собой процесс, характеризующийся пролиферацией клеток на внутренней поверхности сетчатки с формированием эпиретинальных мембран. Наиболее часто этот процесс проявляется как осложнение при регматогенной отслойке сетчатки (5–10 %) и при травматической отслойке сетчатки (45–60 %) [1, 2–4].

Особенностью новообразованных мембран является наличие у них контрактильных свойств, что приводит к тракционной отслойке сетчатки, хирургическое лечение которой связано с серьезными осложнениями и снижением зрения. Патогенез ПВР остается недостаточно выясненным, что тормозит создание обоснованной стратегии лечения этого заболевания [1, 4].

За последние десятилетия, благодаря многочисленным фундаментальным исследованиям в области биохимии и молекулярной биологии, появились новые данные о патогенезе ПВР, где большая роль в механизме этого патологического процесса отводится факторам роста и цитокинам [5]. Эти исследования позволили обосновать гипотезу, где в основе развития ПВР лежит избыточное накопление в тканях глаза факторов роста / цитокинов, провоцирующих клеточную реакцию с формированием эпиретинальных мембран, характерных для ПВР.

Одним из первых условий развития ПВР является появление разрывов сетчатки, через которые иммунокомпетентные клетки проникают в полость стекловидного тела, где эти клетки активно экспрессируют факторы роста и цитокины. Накопление этих факторов в полости стекловидного тела является вторым условием развития ПВР. Воздействие факторов роста на клетки сетчатки — РПЭ и глиальные клетки вызывает специфический клеточный ответ, свойственный пролиферативным процессам: от трансдифференцировки, миграции и пролиферации до секреции экстраклеточного матрикса с формированием мембран, обладающих контрактивными свойствами, что и характеризует развитие ПВР. Молекулярно-биологический анализ показал, что в патологический процесс вовлекается множество факторов роста, таких как тромбоцитарный фактор роста (PDGF), гепатоцитарный фактор роста (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF) и др. [5, 6]. Однако ключевая роль в патогенезе ПВР принадлежит тромбоцитарному фактору роста с рецептором PDGFR α , который экспрессируется клетками РПЭ и глии и является главным метаболитом в межклеточных взаимодействиях. Другие факторы роста / цитокины, накапливающиеся в стекловидном теле, направлены на стимуляцию экспрессии и активацию PDGFR α , локализующихся на поверхности РПЭ и глиальных клеток сетчатки. Полученные данные послужили основанием для более глубокого изучения PDGF и привели к лучшему пониманию участия этого фактора роста в процессе развития ПВР.

В семействе PDGF выявлено 4 изоформы (A, B, C, D), из которых наиболее активными являются изоформы C и D. PDGF имеет две субъединицы: a и b, из которых PDGFR α является более эффективным для индукции экспериментальной ПВР [6–8]. Показано влияние PDGF на синтез ДНК клеток РПЭ [7], это объясняет его активное участие в регуляции процессов миграции и пролиферации.

Активное участие PDGF в развитии ПВР подтвердилось клиническими исследованиями. Иммуногистохимический анализ эпиретинальных мембран, удаленных у пациентов с отслойкой сетчатки, показал активную экспрессию PDGF и PDGFR РПЭ и глиальными клетками. Высокий уровень PDGF в

стекловидном теле определялся чаще (8/9) у пациентов с ПВР, чем у пациентов, страдающих другой ретинальной патологией (1/16) [5].

Участие PDGF/PDGFR в патогенезе ПВР подтверждено также на экспериментальных моделях животных. Определено значительное накопление PDGF в стекловидном теле у экспериментальных животных с ПВР по сравнению с контрольными.

Важным открытием является выявление активации PDGFR с помощью других факторов роста, так называемая непрямая активация. Даже небольшое содержание PDGF при активации других факторов может привести к развитию ПВР.

Определение ведущей роли факторов роста / цитокинов в патогенезе ПВР дало возможность создать новую стратегию фармакологической терапии ПВР, основанную на блокировании патологических агентов в стекловидном теле, что нашло подтверждение в экспериментальных моделях [4, 9].

Как показал анализ биохимических и иммунобиологических исследований, основное внимание в патогенезе ПВР уделяется роли факторов роста / цитокинов. В то же время морфологические исследования влияния PDGF на ткани глаза с определением возможности их участия в патоморфогенезе ПВР не нашли широкого освещения.

ЦЕЛЮ данной работы явилось экспериментально-морфологическое изучение изменений тканей глаза после воздействия рекомбинантного PDGF при его интравитреальном введении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 12 глаз 6 кроликов породы Шиншилла весом 2,5–3 кг, содержащихся в стандартных условиях вивария согласно Международной конвенции о защите прав домашних животных 1987 года. Проведено 3 серии экспериментов: PDGF вводили интравитреально через плоскую часть цилиарного тела по 0,1 мл в концентрации 2000, 5000 и 20 000 мг/мл — по 4 глаза в каждой серии. Животных обследовали в течение месяца с использованием биомикроскопии и офтальмоскопии. После выведения животных из эксперимента глаза энуклеировали, фиксировали в 10 % буферированном формалине и подвергали стандартной гистологической обработке. Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопической системы Leica с встроенной цифровой камерой при увеличении $\times 200$ –600.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При морфологическом исследовании во всех сериях экспериментов отмечено поражение РПЭ. При дозе 2000–5000 мг/мл поражение отмечалось преимущественно в периферических и экваториальных отделах сетчатки, при 20 000 мг/мл поражение распространялось и на задний отрезок глаза.

Основные изменения наблюдались в области РПЭ при введении доз 2000–5000 мг/мл. Измене-

ния характеризовались диссоциацией клеток РПЭ. Клетки округлялись, отслаивались друг от друга и от подлежащей мембраны Бруха, что сопровождалось выходом клеток РПЭ из пласта. Вышедшие из эпителиального пласта клетки приобретали способность к подвижности благодаря появлению многочисленных отростков на поверхности. Возникал феномен миграции клеток РПЭ (рис. 1—3).

В результате миграционных процессов формировались очаги оголения РПЭ, размеры которых значительно увеличивались в 3-й серии эксперимента при использовании дозы 20 000 мг/мл (рис. 4, 5). Мигрирующие клетки изменяли свою форму, теряли пигмент, приближались по форме к фибробластоподобным. Появлялись новые функции: способность к пролиферации и секреции экстраклеточного матрикса. При больших дозах отмечались более обширные изменения в структурах глаза, которые локализовались преимущественно в фоторецепторном слое сетчатки, что, видимо, связано со значительным разрушением РПЭ и резким расстройством метаболизма наружных слоев сетчатки. Выявлялась деструкция наружных и внутренних сегментов палочек и колбочек фоторецепторов

сетчатки. Наблюдалась гибель ядер фоторецепторных клеток с истончением и редукцией наружного ядерного слоя, т. е. полная атрофия фоторецепторного слоя сетчатки (рис. 6). Таким образом, основной мишенью воздействия PDGF при его интравитреальном введении был РПЭ сетчатки. В основе его воздействия при малых дозах было нарушение адгезии между клетками и выход из пласта в окружающее пространство с формированием зон оголения мембраны Бруха. При больших дозах отмечалось развитие более обширных участков оголенной мембраны Бруха, возникали изменения в питании сетчатки, связанные с нарушением функции РПЭ, полностью редуцировалась структура наружных слоев сетчатки с замещением глиальной тканью.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя механизм патологических изменений РПЭ при воздействии PDGF, следует отметить особенности нормальной биологии клеток РПЭ (рис. 7). РПЭ представляет собой монослой клеток, в котором клетки соединяются друг с другом благодаря наличию не только межклеточных контактов, но и

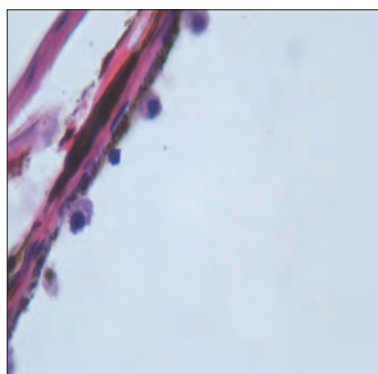


Рис. 1. Интравитреальное введение PDGF в дозе 2000 мг/мл. Процесс диссоциации клеток ретинального пигментного эпителия. Окраска — гематоксилин-эозин. × 400.

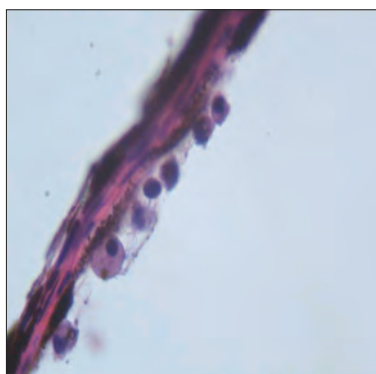


Рис. 2. Интравитреальное введение PDGF в дозе 2000 мг/мл. Выход клеток РПЭ из пласта. Округление формы и потеря пигмента диссоциированных эпителиальных клеток. Окраска — гематоксилин-эозин. × 400.

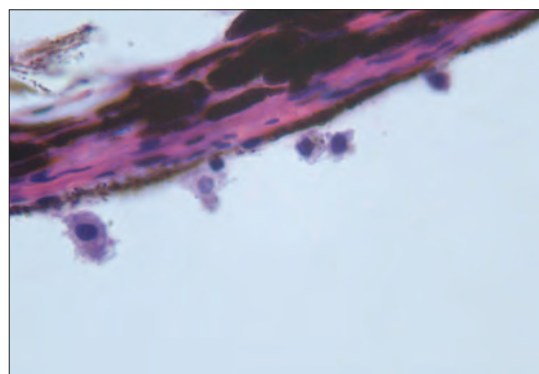


Рис. 3. Интравитреальное введение PDGF в дозе 2000 мг/мл. Скопление клеток РПЭ, вышедших из пласта. Миграция клеток РПЭ. Формирование отростков цитоплазматической мембраны РПЭ-клеток. Окраска — гематоксилин-эозин. × 400.

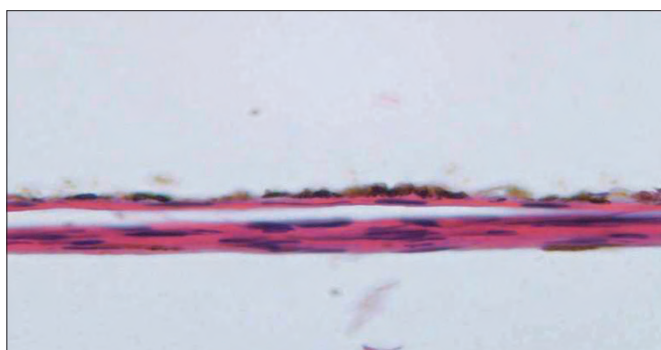


Рис. 4. РПЭ-норма, в виде ровного пласта на внутренней поверхности хориоидеи. Окраска — гематоксилин-эозин. × 200.

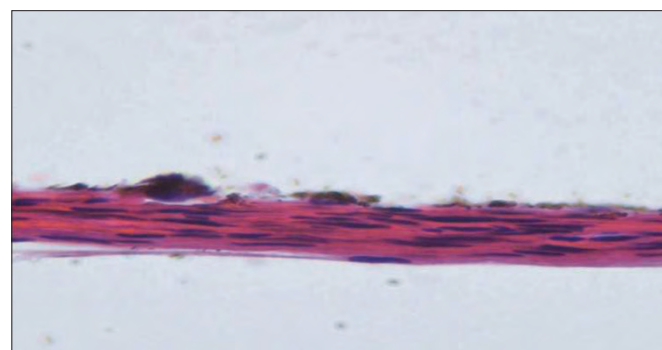


Рис. 5. Интравитреальное введение PDGF в дозе 20 000 мг/мл. Участок оголения мембраны Бруха вследствие активной десквамации РПЭ-клеток. Окраска — гематоксилин-эозин. × 400.

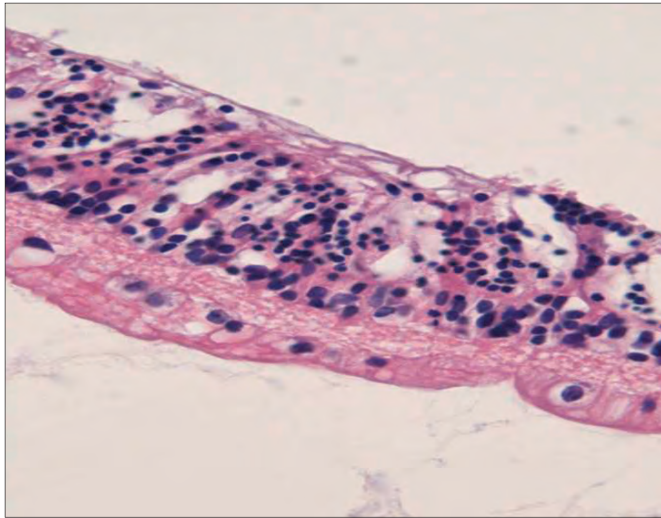


Рис. 6. PDGF в дозе 5000 мг/мл. Атрофия сетчатки. Исчезновение фоторецепторного слоя, замещение его глиальной тканью. Окраска — гематоксилин-эозин. × 400.

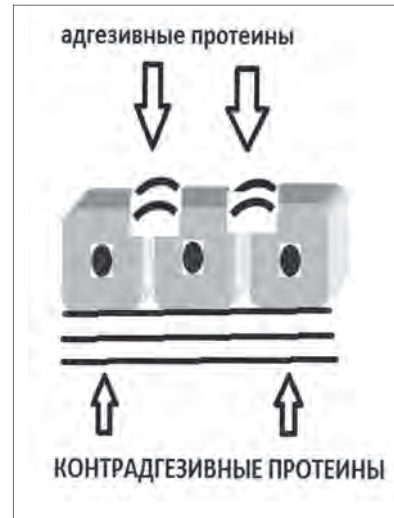


Рис. 7. Схематичное изображение монослоя клеток РПЭ и систем адгезивных и контрадгезивных протеинов.

присутствию экстрацеллюлярных протеинов. Среди экстраклеточных протеинов различают две системы: адгезивные и контрадгезивные протеины [10]. Адгезивные протеины, способствующие адгезии клеток, и контрадгезивные (матрицеллюлярные) протеины, способствующие клеточной диссоциации. В норме эти системы сбалансированы и находятся в инертном состоянии.

PDGF является тропным к контрадгезивным протеинам РПЭ. В результате воздействия PDGF на РПЭ активизируется вся система контрадгезивных белков и нарушается баланс, приводящий к освобождению клеток эпителия из пласта и их миграции в окружающее пространство (рис. 8).

Таким образом, феномен миграции клеток РПЭ является ключевым фактором воздействия PDGF, который индуцирует комплекс сложных биохимических реакций, приводящих к диссоциации клеток. Мигрирующие клетки РПЭ, способные к пролиферации, являются тем биологическим потенциалом, который определяет формирование очагов клеточных пролифератов на внутренней поверхности сетчатки в виде эпиретинальных мембран.

Можно полагать, что PDGF, вызывая сложную трансдифференцировку РПЭ, приводящую к его активной миграции, может индуцировать развитие начальной стадии ПВР. Поэтому разработка препаратов, блокирующих действие PDGF, является перспективным исследованием, направленным на профилактику ПВР.

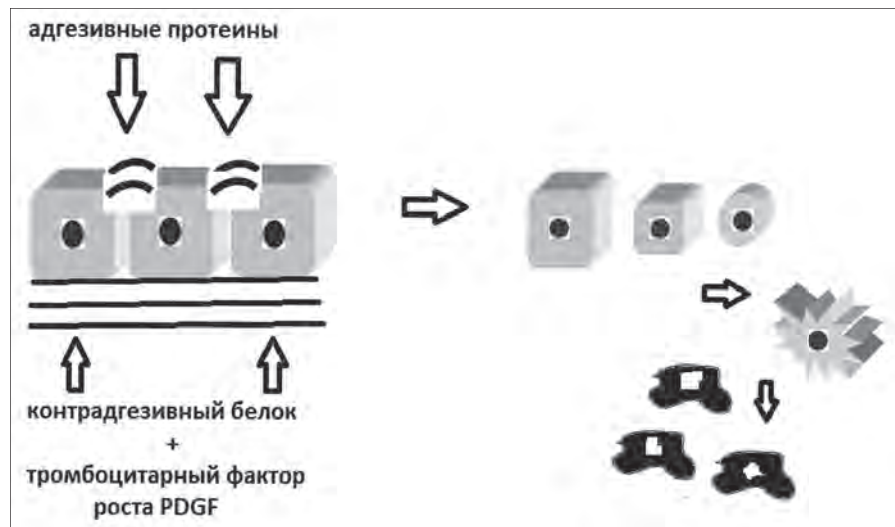


Рис. 8. Схематичное изображение активации контрадгезивных протеинов при воздействии PDGF с последующей миграцией клеток РПЭ и их пролиферацией.

Литература/References

1. Charteris D.G., Sertini C.S., Levis G.P., Fisher S.K. Proliferative vitreoretinopathy — developments in adjunctive treatment and retinal pathology. *Eye*. 2002; 16: 369–74.
2. Moysidis S., Thanos A., Vavvas D. Mechanisms of inflammation in proliferative vitreoretinopathy: from bench to bedside. Hindawy Publishing Corporation. *Mediators of inflammation*. 2012; Article ID 815937: 11.
3. Morescalchi F., Duse S., Gambicorti E., et al. Proliferative vitreoretinopathy after eye injuries: an over expression of growth factors and cytokines leading to a retinal keloid. Hindawy Publishing Corporation. *Mediators of inflammation*. 2013. Article JD 269787: 12.
4. Sadaka A., Giuliary G. Proliferative vitreoretinopathy current and emerging treatments. *Clinical Ophthalmology*. 2012; 6: 1325–33.
5. Lei H., Rheaume M., Kaziauskas A. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Research*. 2010; 90(3): 376–81.
6. Li R., Maiminishkis A., Wang F., Miller Sh. PDGF-C and PDGF-D induced proliferation/migration of human RPE is abolished by

- inflammatory cytokines. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48(12): 5722–32.
7. Leschey K.H., Hines J., Singer J., Hockett S., Compochiaro P. Inhibition of Growth Factor effects in retinal pigment epithelial cells. Investigative Ophthalmology. 1991; 32(6): 1770–8.
 8. Leschey K.H., Hockett S., Singer J., Compochiaro P. Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990; 31(5): 839–46.
 9. Pennock S., Rheaume M., Mukai Sh., Kaziauskas A. A novel strategy to develop therapeutic approaching to prevent proliferative vitreoretinopathy. American Journal of Pathology. 2011; 179(6): 2931–40.
 10. Hiscott P., Hogan S., Heathcote L., et al. Pathobiology of epiretinal and subretinal membranes: possible roles for the matricellular proteins thrombospondin and osteonectin (SPAKC). Eye. 2002; 16: 393–403.

The role of platelet-derived growth factor in pathobiology of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy (an experimental morphological study)

I.P. Khoroshilova-Maslova, N.L. Leparskaya

Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia
nll19@mail.ru

*Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is a pathological process based on proliferation of retinal pigment epithelium (RPE) cells and glia on the interior surface of the retina accompanied by epiretinal membrane formation. The condition's pathogenesis remains unclear. The best-founded hypothesis is that PVR pathogenesis involves growth factors and cytokines with the key role of platelet-derived growth factor (PDGF). The purpose of this work is an experimental morphologic study of changes in eye tissues after they were treated by recombinant PDGF administered intravitreally. **Material and methods.** 6 Chinchilla rabbits (12 eyes) were given intravitreal injections of 0.1 ml of PDGF through the flat part of the ciliary body. The concentrations were 2000 mg/ml (4 eyes), 5000 mg/ml (4 eyes), and 20000 mg/ml (4 eyes). Microscopic observation of the eyes, enucleated one month after the procedure was performed with a Leica microscopic system supplied with a digital camera with a x200-x600 magnification. **Results.** RPE was found to be the main target of PDGF. The impact was revealed to be dose-related. With doses of 2000 mg/ml and 5000 mg/ml retinal epithelial cells are dissociated, rounded, they form processes, fall out of the sheet and migrate to the surrounding area. With big doses (20000 mg/ml), death of photoreceptor cells in the retina occurs along with extensive migration of cells and Bruch's membrane denudement. The mechanism underlying migration processes, associated with the influence of PDGF on the system of counter-adhesive proteins is discussed. **Conclusion.** The role of migration of RPE cells induced by PDGF in the formation of the early stage of PVR was demonstrated.*

Keywords: proliferative vitreoretinopathy, retinal pigment epithelium, growth factors, cytokines, platelet-derived growth factor.

doi: 10.21516/2072-0076-2016-9-4-59-63

Russian Ophthalmological Journal, 2016; 4: 59–63

Адрес для корреспонденции: 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19; ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России
nll19@mail.ru