

Изучение роли экспрессии рецепторов тиреоидных гормонов в слезной железе при эндокринной офтальмопатии

В. Г. Лихванцева¹Т. Н. Сафонова²О. А. Гонтюрова¹Н. Ю. Свириденко³, К. А. Кузьмин¹, Е. А. Руденко¹¹ Кафедра офтальмологии ФФМ МГУ имени М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия² ФГБУ Институт глазных болезней РАМН, г. Москва, Россия³ ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, г. Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение роли рецепторов к тиреоидным гормонам в развитии аутоиммунного процесса в орбите.**Методы.** Изучали интраоперационные биоптаты слезных желез, полученные при декомпрессии орбит у пациентов с эндокринной офтальмопатией (ЭОП), и сравнивали их с тканью неизмененной аутопсийной слезной железы. Иммуногистохимический анализ проводили с использованием панели первичных антител.**Результаты.** Установлена экспрессия изоформ рецепторов к тиреоидным гормонам в различных клеточных элементах слезной железы в норме, а также изменение места их экспрессии при ЭОП. Этот процесс при ЭОП ассоциируется с изменением структуры слезной железы и инфильтрацией иммунокомпетентными клетками.**Заключение.** Полученные данные подтверждают предположение, что слезная железа может служить органом-мишенью, наряду с ретробульбарной клетчаткой и экстраокулярными мышцами, для аутоиммунной агрессии при ЭОП.**Ключевые слова:** эндокринная офтальмопатия, слезная железа, тиреоидные гормоны

ABSTRACT

V. G. Likhvantseva, O. A. Gontyurova, E. A. Rudenko, T. N. Saphonova, K. A. Kuzmin, N. Y. Sviridenko

Studying the role of thyroid hormone receptor expression in the lacrimal gland in the autoimmune orbitopathy

Purpose: To explore the role of thyroid hormone receptors in the development of the autoimmune process in orbita.**Methods:** The intraoperative biopsy material of the lacrimal gland obtained from orbital decompression in patients with autoimmune orbitopathy (AOP) was studied and compared with biopsy material of normal lacrimal gland.**Results:** The expression of isoforms of thyroid hormone receptors in various cellular elements of the lacrimal gland is improved in normal, as well as change their expression when the AOP. This process is associated with change of structure of the lacrimal gland and organ infiltration cells.**Conclusion:** The findings support the assumption that the lacrimal gland is the target organ, along with orbital and muscles for autoimmune aggression in the AOP.**Key words:** autoimmune orbitopathy, lacrimal gland, thyroid hormones

Офтальмология. — 2013. — Т. 10, № 3. — С. 21–25.

Поступила 08.08.13. Принята к печати 08.09.13

В литературе активно дискутируется вопрос о том, что является основным аутоантигеном, запускающим аутоиммунную реакцию в орбите. Существует гипотеза, согласно которой щитовидная железа и орбитальные ткани имеют одинаковые антигены (АГ), и эндокринная офтальмопатия (ЭОП) развивается вследствие перекрестного реагирования антител к антиге-

нам щитовидной железы с тканями орбиты [1, 2, 5]. Одним из кандидатов на роль антигена-мишени является рецептор к тиреотропному гормону (рТТГ) [4]. Экспрессия рТТГ в структурах орбиты может играть ключевую роль в развитии аутоиммунных реакций [1]. Антитела к рТТГ обнаруживаются практически у 100% пациентов с ЭОП и болезнью Грейвса [2]. Установле-

Таблица 1. Панель использованных антител

Антитела	Клон	Производитель	Разведение
THR $\alpha 1/\alpha 2$ polyclonal	polyclonal	Diagnostic BioSystem	1:50
THR β	polyclonal	Diagnostic BioSystem	1:50
THR α monoclonal	1718	Diagnostic BioSystem	1:50
Anti-CD68	KP1	BioGenex	1:1
Anti-CD4	4B12	BioGenex	1:1
Anti-CD8	1A5	BioGenex	1:1
Anti-CD3 (T-cell)	PS1	BioGenex	1:1
Anti-CD20 (B-cell)	L-26	BioGenex	1:1
IgG	polyclonal	Diagnostic BioSystem	1:8000
Система детекции			
DAB Chromogen		BioGenex	
Super Enhancer		BioGenex	
Polymer-HRP		BioGenex	
Stable DAB Buffer		BioGenex	

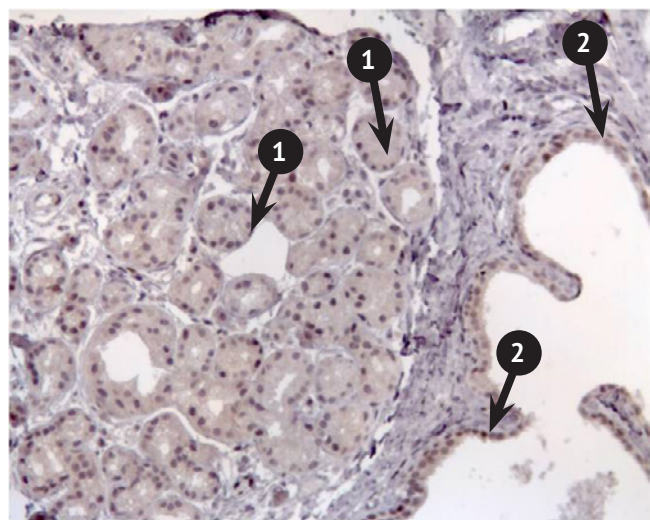


Рисунок 1. Иммуногистохимическая реакция с маркером THR α monoclonal. Видны единичные положительно окрашенные (с интенсивностью ++) ядра эпителии ацинусов (1), а также эпителии протоков слезной железы (2). ув. $\times 400$.

но, что у больных с болезнью Грейвса и ЭОП имеется более высокий уровень антител к рТТГ по сравнению с больными болезнью Грейвса, не сопровождающейся офтальмопатией. В фибробластах орбиты больных с ЭОП обнаружена мРНК, кодирующая внеклеточную часть рТТГ [2, 3]. В связи с этим антитела к рТТГ могут служить фактором, провоцирующим развитие ЭОП и/или прогрессирование уже развившейся ЭОП. В литературе не удалось найти сведений о том, что в тканях орбиты, в частности в слезной железе (СЖ), могут присутствовать и участвовать в аутоиммунном процессе рецепторы к тиреоидным гормонам.

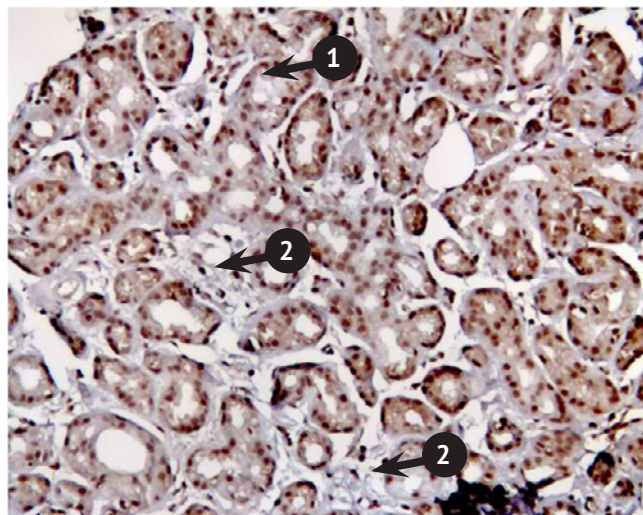


Рисунок 2. ИГХ-реакция с THR α polyclonal в биоптатах неизменной слезной железы. Положительная реакция (+ +, + + +) в 98% ядер эпителиоцитов ацинусов слезной железы (1), эпителии протоков, фибробластов (2). ув. $\times 400$.

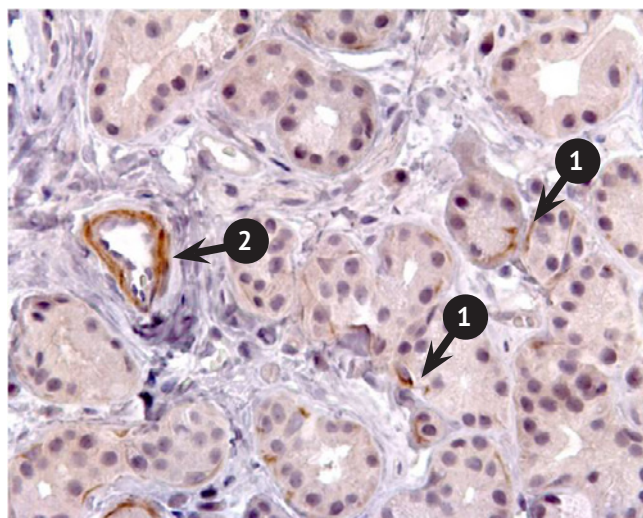


Рисунок 3. ИГХ-реакция с β -рецептором THR. Положительное окрашивание (+ +) в цитоплазме миоэпителиоцитов (1) и цитоплазме гладких мышечных клеток сосудов (2). ув. $\times 400$

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для морфологических исследований служили интраоперационные биоптаты 15 увеличенных в размерах слезных желез, полученных при хирургической декомпрессии орбиты пациентов с ЭОП. В качестве контроля были взяты аутопсийные биоптаты, полученные в первые 6 часов после exitus letalis ($n = 7$).

На первом этапе удаленные ткани подвергли обязательному гистологическому исследованию с целью уточнения характера патоморфологических изменений в СЖ. С этой целью блок иссеченных тканей фиксировали в 10% растворе формалина в течение 30 суток. Осмотр объекта исследования проводили после

Таблица 2. Качественные и количественные показатели лимфоцитарной инфильтрации слезной железы в норме и при эндокринной офтальмопатии

Популяция клеток	Норма	ЭОП
CD3	35±7 клеток в поле зрения	Положительно окрашенные клетки составляют 20% от лимфоидных клеточных элементов; Мср = 200±15 клеток. Вне участков скоплений — отсутствуют.
CD4	46±9 клеток в поле зрения	Положительно окрашенные клетки составляют 15% от лимфоидных очаговых скоплений; 260±24 клеток. Вне скоплений количество положительно окрашенных лимфоцитов составляет в среднем 10±2 клетки в поле зрения
CD8	28±4 клеток в поле зрения	Положительно окрашенные клетки составляют 10% от лимфоидных очаговых скоплений; 100±12 клеток. Вне скоплений количество положительно окрашенных клеток составляет 63±7 клеток в поле зрения.
CD20	нет	Положительно окрашенные клетки составляют 75% лимфоидных очаговых скоплений. Вне скоплений 10±3 клетки в поле зрения.
CD68	5±1 клеток в поле зрения	46±8 клеток в поле зрения

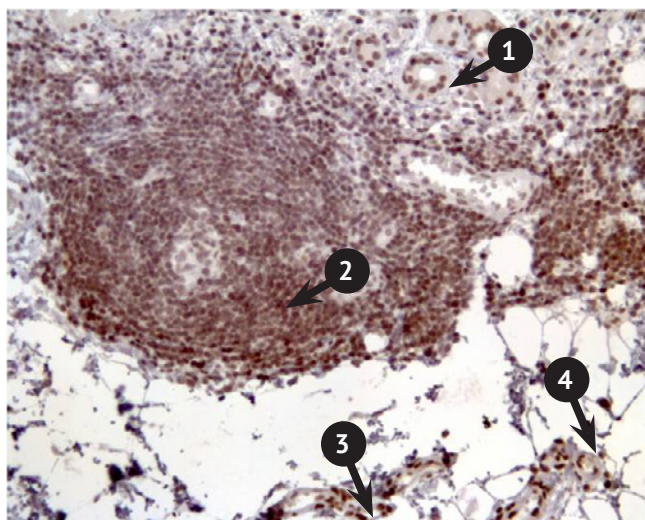


Рисунок 4. ИГХ-реакция с THP α monoclonе: интенсивное (++, +++) окрашивание 95% ядер эпителия ацинусов слезной железы (1), ядер лимфоцитов, составляющих лимфоидный герминативный фолликул (2), ядер (++) эндотелиоцитов (3) и перicyтов (4) мелких кровеносных сосудов.

обезвоживания в спиртах восходящей крепости. Блоки, содержащие ткань собственно СЖ и окружающие ткани, заливали в парафин по традиционной методике. Готовили по 10 срезов, толщиной 4-7 микрон, с каждого блока. Окраску выполняли гематоксилин-эозином. Изучение препаратов и фоторегистрацию осуществляли с помощью микроскопа «Opton» с телевизионной приставкой и увеличением $\times 40$, $\times 125$, $\times 400$.

На *втором этапе* на срезах парафиновых блоков СЖ, предназначенных для стандартного морфологического исследования, проводили иммуногистохимический (ИГХ) анализ. В работе использовали первичные антитела (АТ) и их разведения. Спектр АТ представлен в таблице 1.

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов прогревали срезы на водяной бане в предварительно нагретом до 95-99°C цитратном буфере в течение 45 минут. Затем стекла охлаждали при комнатной температуре в течение 15-20 минут и переносили в фосфатный буфер на 5 минут. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в темноте с 3% раствором перекиси водорода, приготовленным на дистиллированной воде, а затем промывали 5 минут в фосфатном буфере. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 минут с 1% раствором бычьего сыровороточного альбумина. Инкубацию с первичными АТ проводили при 4°C в течение 40 минут. Затем стекла промывали дважды по 5 минут в фосфатном буфере.

Инкубация со вторыми антителами [LSAB + kit, DAKO] проведена при комнатной температуре в течение 20 минут, затем срезы промывали 2 раза по 5 минут. Инкубацию с АТ, мечеными стрептавидином [LSAB + kit, DAKO], выполняли при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего срезы промывали 3 раза по 5 минут. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB + систему [DAKO]. Реакцию осуществляли в темноте в течение 5-10 минут. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

Негативным контролем служила иммуногистохимическая реакция без добавления первичных АТ.

Результаты окрашивания анализировали с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss» ser №984557 axiolab E-re (Германия) при увеличении $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана).

В исследовании применяли следующие критерии оценки ИГХ реакции:

- Отрицательная реакция — отсутствие специфического окрашивания ацинусных клеток слезной железы или наличие до 10% окрашенных клеток от всей площади ее ткани.
- Слабоположительная — окрашивание от 10 до 30% (+) ацинусных клеток.
- Умеренно положительная — окрашивание от 30 до 75% (+ +) клеток.
- Выраженная реакция — окрашивание более 75% клеток (+ + +).

Данные, полученные на биоптатах слезных желез пациентов с ЭОП, были сопоставлены с результатами,

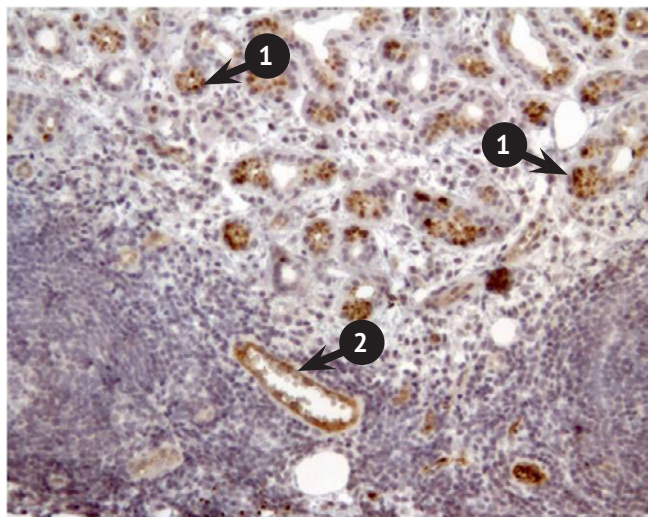


Рисунок 5. ИГХ-реакция с THR α polyclone. В части секреторных клеток ацинусов СЖ отмечается интенсивная окраска гранул апикальной части клеток (1), окрашивание цитоплазмы эндотелия сосудов (2). ув. ×400.

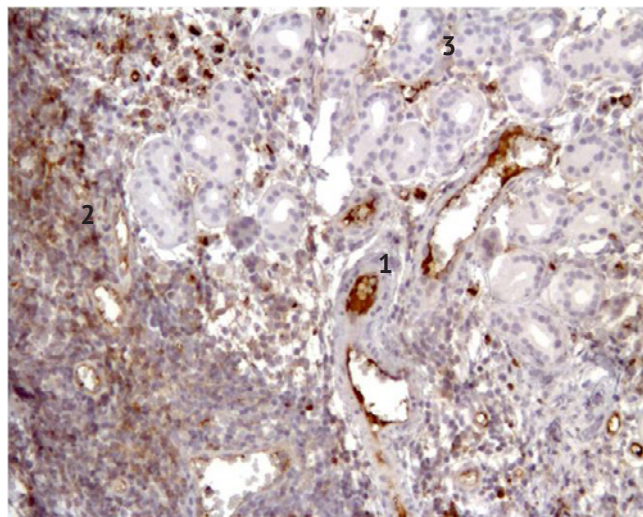


Рисунок 7. ИГХ-реакция на IgG. Выраженная (++) окраска внутренней поверхности кровеносных сосудов (1), цитоплазмы лимфоцитов лимфоидных фолликулов (2), гранулярного вещества межацинарной стромы (3) и цитоплазмы плазматических клеток.

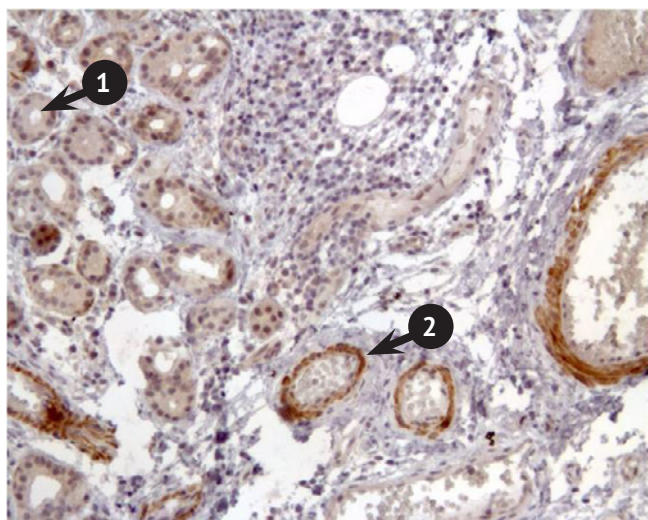


Рисунок 6. ИГХ-реакция с THR β. Положительная реакция (++) в цитоплазме миоэпителиоцитов (1) и цитоплазме гладких мышечных клеток сосудов (2). ув. ×400.

полученными на контрольных аутопсийных биоптатах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что α-рецепторы к тиреоидным гормонам (THR α monoclonal) экспрессируются в единичных клетках ацинусного эпителия и эпителия протоков неизмененных слезных желез. При этом степень выраженности экспрессии расценивали как умеренную (++) (рис. 1).

Наряду с моноклональными рецепторами тиреоидных гормонов THR α monoclonal и THR b, в биоптатах неизмененных контрольных слезных желез выявлены поликлональные рецепторы — THR α polyclone.

Положительная реакция к THR α polyclone (с интенсивностью ++, +++) имела место для 98% ядер эпителиоцитов ацинусов (1), эпителия протоков, фибробластов (2) слезной железы (рис. 2).

Кроме того, в аутопсийных биоптатах визуализировалось иммунное окрашивание с маркером β-рецептора к тиреоидным гормонам — THR β в цитоплазме миоэпителиоцитов и гладкомышечных клетках сосудов (рис. 3).

При эндокринной офтальмопатии в биоптатах увеличенных СЖ отмечена интенсивная (++, +++) положительная ИГХ-реакция с α-рецептором THR monoclonal в 95% ядрах эпителия ацинусов слезной железы (1), во всех ядрах лимфоцитов, составляющих лимфоидный фолликул (2), а также (++) в ядрах эндотелиоцитов (3) и перicyтов (4) мелких кровеносных сосудов.

Среди патоморфологических изменений слезной железы при эндокринной офтальмопатии на иммуногистохимическом уровне отмечали выраженную экспрессию поликлонального α-рецептора тиреоидного гормона — THR α polyclone (рис. 5). Реакция развивалась в апикальной части секреторных клеток ацинусов слезной железы, а также в цитоплазме эндотелия сосудов (2). Выявленная картина резко отличалась от таковой в неизмененной слезной железе, где THRα polyclone экспрессировался исключительно в ядрах секреторных клеток железы.

Как и в норме, β-рецептор к тиреоидным гормонам экспрессировался в цитоплазме миоэпителиоцитов и гладкомышечных клеток сосудов. Однако имело место большее количество сосудов на единицу площади в ткани измененной слезной железы по сравнению с нормальной тканью СЖ, что находит отражение в количественных показателях экспрессии этого маркера (рис. 6).

В увеличенных слезных железах при эндокринной офтальмопатии IgG визуализировался на внутренней поверхности кровеносных сосудов, в цитоплазме 50% лимфоцитов, составляющих лимфоидные фолликулы, в депозитах гранулярного вещества в межацинарной строме, а также в цитоплазме плазматических клеток (рис. 7).

Описанные иммуногистохимические изменения в экспрессии иммуноглобулинов и рецепторов к тиреоидным гормонам сопровождались количественными и качественными изменениями, касающимися инфильтрации иммунокомпетентными клетками.

При детальном сопоставлении морфологической картины слезной железы в норме и при ЭОП выявлен ряд важных отличий. Одним из основных явилось наличие лимфоидных фолликулов и участков очаговых лимфоидных скоплений, а также более выраженная диффузная лимфоидная инфильтрация собственно ткани слезной железы при ЭОП. Наряду с этим, отмечена разница количественного и качественного состава лимфоцитарного инфильтрата (таблица 2).

Было обнаружено при иммунофенотипировании патологически измененных слезных желез при ЭОП, что 75% клеток лимфоидного ряда в упомянутых скоплениях являются В-лимфоцитами (CD20+), около 15% клеток — Т-лимфоцитами (Т-хелперами CD4+) и около 10% клеток — Т-лимфоцитами (Т-киллерами CD8+). Как видно из представленных в табл. 2 данных, подавляющее большинство лимфоидных клеточных элементов в инфильтрате представлены В-лимфоцитами, что является подтверждением аутоиммунного характера воспаления слезной железы.

Описанные иммуногистохимические изменения в экспрессии рецепторов к тиреоидным гормонам и IgG проявлялись выраженными патоморфологическими изменениями. Так, в микропрепаратах слезных желез при ЭОП отмечено значительное утолщение междольковых и внутридольковых соединительнотканых прослоек, преимущественно, за счет накопления грубоволокнистого, плотного коллагена, сдавлива-

ющего и деформирующего ацинусы и протоки слезной железы. Это привело к накоплению секрета в просвете вышеупомянутых структур, который, в свою очередь, сдавливал эпителиальные клетки, приводя к их атрофии, а также к эктазии слезных протоков. В цитоплазме секреторных клеток отмечали образование светлых вакуолей, что явилось проявлением клеточной дистрофии. В отдельных просветах протоков и ацинусов наблюдали скопления слущенного эпителия. Обращали на себя внимание участки пролиферации секреторного эпителия с образованием гнездных скоплений хаотично расположенных клеток и гиперплазией эпителия ацинусов и протоков.

Таким образом, установлено, что в различных клеточных элементах ткани слезной железы в норме и при эндокринной офтальмопатии имеет место экспрессия различных изоформ рецепторов к тиреоидным гормонам. Так, β -рецептор к тиреоидным гормонам экспрессируется в цитоплазме миоэпителиоцитов и гладкомышечных клеток сосудов слезной железы. Экспрессия поликлонального ТНР α в норме осуществляется в апикулярной части секреторных клеток ацинусов слезной железы, а также в цитоплазме эндотелия сосудов, в то время как при ЭОП — исключительно в ядрах секреторных клеток железы. Моноклональный ТНР α экспрессируется в 95% ядрах эпителия ацинусов слезной железы, в ядрах лимфоцитов, эндотелиоцитов и перицитов мелких кровеносных сосудов.

Более выраженная экспрессия перечисленных рецепторов с изменением места их экспрессии ассоциируется с патоморфологическими изменениями в структуре слезной железы и инфильтрацией иммунокомпетентными клетками (CD4, CD8, CD20), что может быть косвенным доказательством аутоиммунной реакции в ткани слезной железы при ЭОП.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что слезная железа может служить органом-мишенью, наряду с ретробульбарной клетчаткой и экстраокулярными мышцами, для проявления аутоиммунной агрессии при эндокринной офтальмопатии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бровкина А. Ф. Эндокринная офтальмопатия// ГЭОТАР-МЕД. — 2008. — 178 стр.
2. Bahn Rebecca S. Pathogenesis of Graves ophthalmopathy: the role of orbital thyroid-stimulating hormone receptor expression Current Opinion in Endocrinology & Diabetes: October 2003 — Volume 10 — Issue 5 — pp 353-356.
3. Conley CA, Fowler VM. Localization of the human 64kD autoantigen D1 to myofibrils in a subset of extraocular muscle fibers. Curr Eye Res. — 1999. — Oct;19 (4):313-22.
4. De Bellis A, Sansone D, Coronella C, Conte M, Iorio S, Perrino S, Serum antibodies to collagen XIII: a further good marker of active Graves' ophthalmopathy.// ClinEndocrinol (Oxf). — 2005 — Jan;62 (1):24-9.
5. Goh S.Y., S.C. Ho, L.L. Seah, K.S. Fong, D.H. C. Khoo Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves' disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. Clinical Endocrinology. — May 2004, — Vol. 60, No. 5: 600-607.