

# Иммунорфологические особенности идиопатической эпиретинальной мембраны, осложненной ламеллярным макулярным разрывом

У.Р. Алтынбаев<sup>1</sup>А.И. Лебедева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Медико-санитарная часть ОАО «Татнефть»

ул. Радищева 67, г. Альметьевск, 423450, Республика Татарстан

<sup>2</sup>ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России

ул. Р.Зорге, 6711, г. Уфа, 450075, Республика Башкортостан

## РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2017;14(3):247–250

**Цель:** Сравнительная морфологическая характеристика и оценка цитокинового профиля идиопатических эпиретинальных мембран (ЭРМ), осложненных ламеллярным макулярным разрывом. **Материалы и методы.** Иммуногистохимическое исследование 15 фрагментов ЭРМ, удаленных во время проведения витрэктомии, включало определение реакции на антигены фибронектина, ламинина, глиального фибриллярного кислого белка. Все образцы мембран были распределены на две группы: I группу составили 8 ЭРМ, которые клинически не сочетались с дефектами на сетчатке, во II группу вошли 7 ЭРМ, осложненных ламеллярным макулярным разрывом. **Результаты.** ЭРМ в I группе представляли собой коллагенсодержащие мембраны толщиной от  $2,1 \pm 0,7$  до  $4,4 \pm 1,4$  мкм, инфильтрированные радиальными глиоцитами, единичными фибробластическими клетками. Для мембран была характерна положительная реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и преимущественно отрицательная реакция (62,7%) на фибронектин, ламинин. ЭРМ во II группе отличались большей толщиной, которая находилась в диапазоне от  $6,03 \pm 1,6$  до  $7,56 \pm 1,02$  мкм, высокой плотностью клеток: радиальных глиоцитов, клеток фибробластического ряда (фибробласты, ламиноциты, миофибробласты) и гиалоцитов. Иммуногистохимически осложненные ЭРМ имели положительное иммунофенотипирование к антигенам против белков адгезии фибронектина, ламинина, GFAP, наряду с выраженной фибробластической и макрофагальной инфильтрацией. **Заключение:** идиопатическая эпиретинальная мембрана, осложненная ламеллярным макулярным разрывом, характеризуется увеличенной толщиной, выраженной инфильтрацией радиальными глиоцитами, клетками фибробластического ряда (фибробласты, ламиноциты, миофибробласты) и гиалоцитами. Сопоставимая положительная реакция данных мембран на фибронектин, ламинин и GFAP может означать участие данных цитокинов в развитии и прогрессировании нейродегенеративного процесса. Накопление коллагеновых волокон и миофибробластов может способствовать усилению контракции и снижению эластических свойств ЭРМ с последующим развитием тангенциальных трещин и разрыва сетчатки.

**Ключевые слова:** идиопатическая эпиретинальная мембрана, ламеллярный макулярный разрыв, фибронектин, ламинин, глиальный фибриллярный кислый белок

**Для цитирования:** Алтынбаев У.Р., Лебедева А.И. Иммунорфологические особенности идиопатической эпиретинальной мембраны, осложненной ламеллярным макулярным разрывом. *Офтальмология*. 2017;14(3):247–250. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-3-247-250

**Прозрачность финансовой деятельности:** Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

**Конфликт интересов отсутствует**

## Immunomorphological Features of Idiopathic Epiretinal Membranes Complicated by Lamellar Macular Hole

U.R. Altynbaev<sup>1</sup>, A.I. Lebedeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Centre “Tatneft”

Radishcheva Str. 67, Almetjevsk, 423450, Republic of Tatarstan

<sup>2</sup>Russian Eye and Plastic Surgery Center

Zorge str., 6711, 450075, Ufa, Republic of Bashkortostan

У.Р. Алтынбаев, А.И. Лебедева

**ABSTRACT****Ophthalmology in Russia. 2017;14(3):247–250**

**Objective:** Comparative morphological characteristic and evaluation of cytokine profile of idiopathic epiretinal membrane (ERM), complicated lamellar macular hole. **Materials and Methods:** Immunohistochemical study of 15 ERM removed during vitrectomy included the definition of responses to antigens fibronectin, laminin, glial fibrillary acidic protein. All membrane samples were divided into two groups: I group consisted of 8 ERM, which wasn't clinically combined with retina defects, the II group included 7 ERM complicated lamellar macular hole. **Results:** ERM in group I were a collagen-membrane with a thickness from  $2,1 \pm 0,7$  to  $4,4 \pm 1,4$   $\mu\text{m}$ , infiltrated radial glial cells, isolated fibroblastic cells. For membranes was characterized by a positive reaction to GFAP and largely negative reaction (62.7%) on fibronectin, laminin. ERM in group II were more thick, which was in the range from  $6,03 \pm 1,6$  to  $7,56 \pm 1,02$   $\mu\text{m}$ , high cell density: radial glial cells, cells of fibroblast series (fibroblasts laminocity, myofibroblasts) and hyalocity. Immunohistochemistry complicated ERM had a positive immunophenotyping antigens against adhesion protein fibronectin, laminin, of GFAP along with a pronounced fibroblastic and macrophage infiltration. **Conclusion:** ERM complicated lamellar macular hole, characterized by an increased thickness, marked infiltration of radial glial cells, cells of fibroblast series (fibroblasts laminocity, myofibroblasts) and hyalocity. The positive response comparable ERM complicated lamellar macular hole on fibronectin, laminin and GFAP could mean cytokines involved into development and progression of neurodegenerative process. The accumulation of collagen fibers and myofibroblasts may help to strengthen the contractions and reduce the elastic properties of ERM, with the subsequent development of the tangential tractions and retinal tear.

**Keywords:** idiopathic epiretinal membrane, lamellar macular hole, fibronectin, laminin, glial fibrillary acidic protein.

**For citation:** Altynbaev U.R., Lebedeva A.I. Immunomorphological Features of Idiopathic Epiretinal Membranes Complicated by Lamellar Macular Hole. *Ophthalmology in Russia*. 2017;14(3):247–250. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-3-247-250

**Financial Disclosure:** No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

**There is no conflict of interests**

**АКТУАЛЬНОСТЬ**

Знания о патогенетических механизмах формирования эпиретинальной мембраны (ЭРМ) до сих пор остаются противоречивыми. Развитие первичной ЭРМ происходит в результате миграции и пролиферации глиальных клеток из дефектов внутренней пограничной мембраны (ВПМ) сетчатки, которые образуются при патологической задней отслойке стекловидного тела (СТ) [1]. В 28.6% случаев отмечается прогрессирующее течение ЭРМ, нередко с формированием ламеллярного разрыва сетчатки. В развитии подобных осложнений не исключается роль гликопротеинов фибронектина и ламинина [2,3,4], которые обеспечивают морфологическую взаимосвязь СТ и сетчатки. Так, в единичных исследованиях указывается на обнаружение фибронектина в эпиретинальных и субретинальных мембранах [5]. Однако имеющиеся сведения не дают полного представления о механизме развития ЭРМ и не раскрывают значимость гликопротеинов стекловидного тела в прогрессировании нейродегенеративного процесса.

Цель: сравнительная клинко-морфологическая характеристика с определением цитокинового профиля идиопатических ЭРМ, осложненных ламеллярным разрывом.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Для проведения исследования было использовано 15 фрагментов ЭРМ, удаленных во время проведения витрэктомии. Все образцы мембран были распределены на две группы: I группу составили 8 ЭРМ, которые клинически не сочетались с дефектами на сетчатке, во II группу вошли 7 ЭРМ, которым клинически сопутствовал ламеллярный разрыв сетчатки.

Фрагменты мембран фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезжировали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в пара-

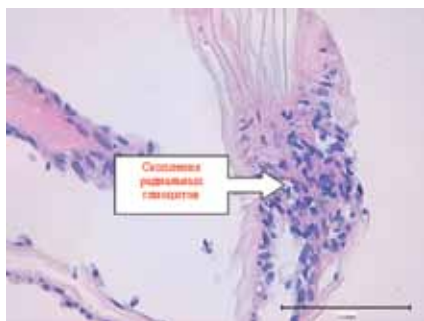
фин по общепринятой методике. Гистологические срезы готовили с использованием микротомы LEICA RM 2145 (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином по Маллори. Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера LeicaMicrosystemsBond™ (Германия). В качестве первых антител применяли: фибронектин в разведении 1:100 (номер по каталогу sc 8422), ламинин в разведении 1:100 (номер по каталогу sc 6018), GFAP в разведении 1:300 (номер по каталогу sc 33673) (SantaCruzBiotechnology, США). Для окрашивания использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции выполняли при окрашивании срезов без первых антител. Исследование и визуализацию препаратов проводили с применением светового микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений Axiovision (Carl Zeiss, Германия). Морфометрию объектов выполняли при увеличении X1000 с иммерсией.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

ЭРМ в I группе (без разрыва сетчатки) представляли собой удлиненную лентообразную волокнистую структуру, которая образовывала многочисленные складки, направленные в сторону витреальной полости. Средняя толщина мембран варьировала от  $2,1 \pm 0,7$  до  $4,4 \pm 1,4$  мкм. Витреальная поверхность мембран выглядела ворсинчатой на всем ее протяжении и не содержала клеток. На витреальной стороне мембраны были расположены клетки радиальной глии сетчатки (Мюллеровы клетки), которые располагались как в виде монослоя, так и образовывали массивные скопления. Промежутков между ними не было. Обращало на себя внимание, что чем массивнее скопления радиальных глиоцитов, тем интенсивнее была складчатость мембраны в этой области. В толще самой

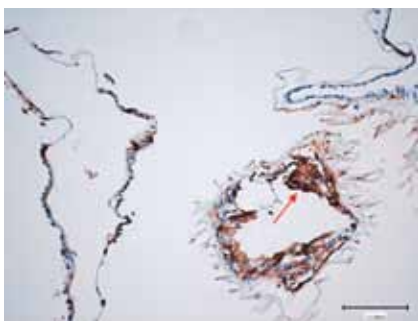
мембраны зафиксированы фибробластические клетки с удлинненным веретеновидным ядром — ламиноциты. Они были плотно припаяны к мембране и встречались в единичном количестве (Рис. 1). Исходя из того, что уровень складчатости ЭРМ прямо коррелирует с количеством радиальных глиоцитов, можно предположить, что клетки нейроглии выступают в роли провоцирующего фактора за счет экспрессии определенного спектра цитокинов. Фибробластические клетки практически отсутствовали или выявлялись в единичном количестве, что ставило под сомнение их индуцирующую активность. ЭРМ интенсивно окрашивалась по Маллори в синий цвет, характерный для волокон коллагена, вероятно, за счет его синтеза ламиноцитами. При окраске по Вейгерту с целью выявления белка эластина реакция во всех случаях была отрицательной. Наличие плотных коллагеновых волокон и отсутствие эластина свидетельствовало о низкой степени растяжимости и тракционных свойствах ЭРМ.

При исследовании GFAP обнаружено, что данный цитокин не определялся в самой мембране и располагался в цитоплазме клеток, расположенных на ее поверхности, а также интенсивно экспрессировался клетками нейроглии — радиальными глиоцитами во всех исследованных образцах (Рис.2). При иммуногистохимическом выявлении фибронектина и ламинина реакция ткани в большинстве случаев (62,5%) была отрицательной.



**Рис. 1.** Структура ЭРМ. Окраска гематоксилином и эозином

**Fig. 1.** Structure of ERM. Coloring by hematoxylin and eosine



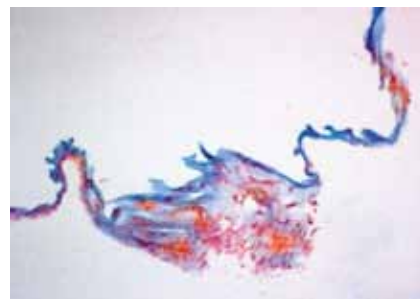
**Рис. 2.** Структура ЭРМ в I группе. Интенсивная реакция на GFAP радиальными глиоцитами сетчатки (коричневый цвет). Непрямой иммунопероксидазный метод выявления GFAP с докраской гематоксилином

**Fig. 2.** Structure of ERM of the I group. The intense reaction to GFAP radial glial cells of the retina (brown color). Indirect immunoperoxidase method for detecting GFAP are stained with hematoxylin

При морфологическом исследовании ЭРМ, осложненных ламеллярным разрывом сетчатки (II группа), оказалось, что они представляют собой также непрерывные фибриллярные мембраны, имеющие волокнистое строение. Средняя толщина мембран была больше, чем в I группе ( $p < 0.05$ ), и находилась в диапазоне от  $6,03 \pm 1,6$  до  $7,56 \pm 1,02$  мкм. ЭРМ были инфильтрированы различными типами клеток: радиальными глиоцитами и фибробластическими клетками. Среди клеток фибробластического ряда наблюдались фибробласты, ламиноциты и миофибробласты.

Кроме того, на поверхности мембраны встречались гиаоциты округлой формы. Клетки воспалительного ряда, такие как лимфоциты, нейтрофилы, лаброциты, а также форменные элементы крови отсутствовали. Относительно клеточных источников известно, что фиброциты и гиаоциты присутствуют в витреальной полости и являются резидентными клетками стекловидного тела. Их особая патогенетическая роль проявляется при развитии патологических состояний стекловидного тела, поскольку они способны к размножению и синтезу межтучного вещества [5]. Миофибробласты располагались пристеночно возле мембраны

и образовывали массивные пролиферирующие инфильтраты, состоящие из нескольких рядов (рис. 3). Линейная ориентация клеток вдоль тяжей пролиферации может играть роль в феномене сокращения мембран. Известно, что миофибробласты являются основным типом клеток в мембранах со значительным тракционным компонентом [6]. По данным Guidry С. при изменении фенотипа нейроглиальных клеток на фибробластический экспрессия GFAP редуцируется, а  $\alpha$ -актин гладкомышечных клеток в цитоплазме накапливается. Следовательно, радиальные глиоциты способны трансформироваться в миофибробласты [7].



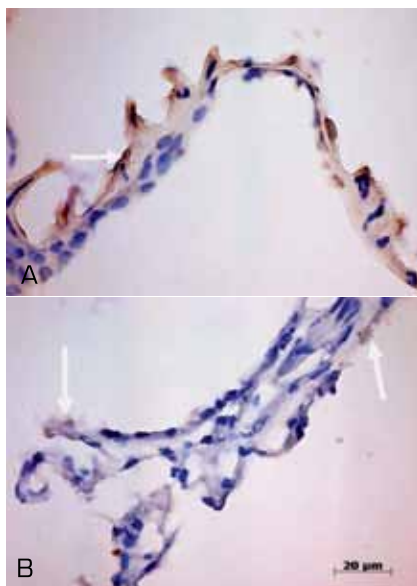
**Рис. 3.** Гистологическая картина ЭРМ пациента с ламеллярным разрывом сетчатки. Коллагеновые волокна (синий цвет) и скопления миофибробластов (красный цвет). Окраска по Маллори

**Fig. 3.** Histology ERM patients with lamellar macular hole. Determined collagen fibers (stained in blue) and the accumulation of myofibroblasts (stained in red). Painting Mallory

При окраске по Маллори ЭРМ окрашивались в интенсивный синий цвет, что являлось свидетельством их коллагеноволоконистой природы. Мембрана имела в основном ламеллярное строение, в некоторых зонах обнаруживалась складчатость. При окраске по Вейгерту с целью выявления белка эластина реакция во всех случаях была отрицательной.

Иммуногистохимически мембраны II группы имели положительное иммунофенотипирование к антигенам против белков адгезии фибронектина, ламинина, а также к GFAP. Фибронектин и ламинин выявлялись со стороны витреаль-

ной полости наряду с выраженной фибробластической и макрофагальной инфильтрацией (Рис.4). Фибронектин является гликопротеином внеклеточного матрикса и может играть роль хемоаттрактанта клеток, образовывать каркас для их миграции, а также он обладает высоким сродством к основным компонентам стекловидного тела, к коллагену II типа и гиалуроновой кислоте. Фибронектин продуцируется в основном фибробластоподобными клетками, а также может экспрессироваться и другими клетками: пигментным эпителием, радиальными глиоцитами, гиалоцитами [8,9]. Ламинин или коллаген IV типа экспрессируется ламиниоцитами, которые были обнаружены в большом количестве в ЭРМ II группы [9]. Все эти морфофункциональные нарушения сопровождались изменениями степени экспрессии в ткани сетчатки GFAP, выполняющей роль маркера глиоза.



**Рис. 4** Положительная реакция ЭРМ на фибронектин (А) и ламинин (Б). Непрямой иммунопероксидазный метод выявления фибронектина и ламинина с докраской гематоксилином

**Fig. 4.** A positive reaction to the ERM fibronectin (A) and laminin (B). Indirect immunoperoxidase method for detecting fibronectin and laminin are stained with hematoxylin

Таким образом, морфологически идиопатическая эпиретинальная

мембрана, осложненная ламеллярным разрывом сетчатки, характеризуется увеличением толщины ЭРМ, высокой плотностью клеток: радиальных глиоцитов, клеток фибробластического ряда (фибробласты, ламинициты, миофибробласты) и гиалоцитов. Сопоставимая положительная реакция данных мембран на фибронектин, ламинин и GFAP может означать участие данных цитокинов в развитии и прогрессировании нейродегенеративного процесса. Цитокины могут способствовать накоплению избыточного коллагена, фиброзированию и утолщению мембраны, что и наблюдается в данном исследовании. Накопление коллагеновых волокон и наличие миофибробластов способствует усилению контракции и снижению эластических свойств ЭРМ с последующим развитием тангенциальных тракций и разрыва сетчатки.

#### УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Алтынбаев У.Р. концепция и дизайн исследования; сбор материала, анализ результатов гистологических исследований, написание текста.  
Лебедева А.И. морфологические исследования материала, статистическая обработка; описание результатов и подготовка иллюстраций.

#### ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

- Hikichi T, Takahashi M. Relationship between premacular cortical vitreous defects and idiopathic premacular fibrosis. *Retina*. 1995;15(5):413-416.
- Foos RY. Vitreoretinal juncture; topographical variations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1972;(11):801.
- Pang C. E., Spaide R. F., Freund K. B. Comparing functional and morphologic characteristics of lamellar macular holes with and without lamellar hole-associated epiretinal proliferation. *Retina*. 2015;35:720-726. doi: 10.1155/2015/450212
- Parolini B., Schumann R. G., Cereda M. G., Haritoglou C. Lamellar macular hole: a clinicopathologic correlation of surgically excised epiretinal membranes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2011;52(12):9074-9083. doi: 10.1167/iov.11-8227.
- Вит В.В. Строение зрительной системы человека. [Vit V.V. The structure of the human visual system. Odessa.-Astroprint. 2010. p.220. (in Russ) ].
- Snead DR, Cullen N. Hyperconvolution of the inner limiting membrane in vitreomaculopathies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004;242(10):853-862.
- Guidry C. Isolation and characterization of porcine Müller cells // Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(5):740-752.
- Weller M., Wiedemann P. The significance of fibronectin in vitreoretinal pathology. A critical evaluation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1988;226 (3):294-298.
- Schumann R. G., Gandorfer A., Ziada J. Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2014;252(12):1887-1894. doi: 10.1007/s00417-014-2841-x.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

МСЧ ОАО «Татнефть»  
Алтынбаев Урал Рифович  
кандидат медицинских наук, врач офтальмологического отделения  
ул. Радищева 67, г. Альметьевск, 423450, Республика Татарстан

ФГУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии  
Лебедева Анна Ивановна  
кандидат биологических наук, заведующая лабораторией гистологии и иммуногистохимии отдела морфологии  
ул. Р.Зорге, 67/1, г. Уфа, 450075, Республика Башкортостан

#### ABOUT THE AUTHORS

Medical Centre of ОАО "Tatneft"  
Altylnbaev Ural R.  
PhD, ophthalmologist  
Radishcheva Str. 67, Almetjevsk, 423450, Republic of Tatarstan

Russian Eye and Plastic Surgery Center  
Lebedeva A.I.  
PhD, Head of Histology and Immunohistochemistry laboratory  
Zorge str., 67/1, 450075, Ufa, Republic of Bashkortostan