

(5)

Patomorfologia błon powstających w przebiegu witreoretinopatii proliferacyjnych

Pathomorphology of membranes appearing in proliferative vitreoretinopathies

Iwona Laudańska-Olszewska¹, Wojciech Omulecki¹, Krzysztof Dzięgielewski¹,
Zbigniew Pikulski¹, Aleksandra Omulecka²

¹ Z Kliniki Chorób Oczu Katedry Chorób Oczu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: dr hab. n. med. Wojciech Omulecki

² Z Zakładu Patomorfologii Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wiesław Papier

Summary: Immunohistochemical techniques were used to investigate the cell content of epiretinal membranes occurring in proliferative vitreoretinopathy (PVR) and proliferative diabetic retinopathy (PDR). Ten epiretinal membranes were obtained during surgery from eyes with PVR and five from eyes with PDR. This material was studied histopathologically and immunohistochemically. Retinal pigment epithelial cells, glial cells, macrophages, T lymphocytes and type IV collagen were identified in these membranes. The findings indicate that the cells mentioned possess a potential role in creating vitreoretinal membranes in PVR and PDR.

Słowa kluczowe: witreoretinopatia proliferacyjna, proliferacyjna retinopatia cukrzycowa, immunohistochemia.

Key words: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, immunohistochemistry.

Witreoretinopatia proliferacyjna (PVR – ang. proliferative vitreoretinopathy) jest definiowana jako rozrost błon na obu powierzchniach odwarstwionej siatkówki oraz na tylnej powierzchni odłączonego ciała szklistego (1). Wśród wielu przyczyn rozwoju błon nasiatkówkowych i podsiatkówkowych, takich jak: zakrzep żyły środkowej siatkówki, starcze zwyrodnienie plamki czy zapalenie wewnątrzgałkowe, witreoretinopatia proliferacyjna, powstająca w przebiegu przedarciowego odwarstwienia siatkówki, a także proliferacyjna retinopatia cukrzycowa (PDR – ang. proliferative diabetic retinopathy), doprowadzająca do odwarstwienia siatkówki w wyniku obkurczania się błon włóknisto-naczyniowych, są, ze względu na częstość występowania i wagę problemu klinicznego, szczególnie istotne (2). Właściwości kurczliwe powstających błon włóknisto-komórkowych i włóknisto-naczyniowych prowadzą do pociągania siatkówki i znacznego spadku ostrości wzroku, stanowiąc ważną i częstą przyczynę niepowodzeń w chirurgii witreoretinalnej (3). Patogeneza błon powstających w przebiegu PVR i PDR nie jest dostatecznie wyjaśniona.

Cel pracy

Celem naszej pracy jest ocena morfologiczna elementów budowy błon w oczach z PVR i PDR.

Materiał i metody

Materiał stanowiło 15 błon proliferacyjnych pobranych od pacjentów podczas witekтомii przez *pars plana*. Dziesięć osób operowanych było z powodu witreoretinopatii proliferacyjnej, wklajającej przedarciowe odwarstwienie siatkówki stopnia C1 lub bardziej zaawansowanego, a 5 osób operowanych było z powodu cukrzycowej retinopatii proliferacyjnej. Żaden z ope-

rowanych pacjentów nie przeżył wcześniej choroby zapalnej operowanego oka. Wszystkie pobrane błony utrwalono w 10% roztworze formaliny, a następnie sporządzono preparaty histopatologiczne ze skrawków parafinowych grubości 6 μ . Były one barwione hematoksyliną i eozyną. Wykonano także odczyn immunohistochemiczne, używając surowic firmy DAKO, zawierających następujące przeciwciała monoklonalne: przeciw cytokeratynom (mouse anti-human cytokeratine clone MNF 116) – marker komórek nabłonka; przeciw kwaśnemu białku włóknienek glejowych (GFAP) – marker astrocytów; CD 3 T Cell – marker limfocytów T; CD 20 cy L 26 – marker limfocytów B; CD 68 Macrophage – marker makrofagów; HMB-45 mouse anti-human melanosome HMB – marker komórek produkujących melaninę; Collagen IV – marker kolagenu IV oraz mouse anti-human von Willebrand Factor (F-VIII) – marker komórek śródbłonka naczyń. Dla wszystkich odczynów wykonano kontrole pozytywne i negatywne.

Wyniki i omówienie

Liczba błon wykazująca immunоекспresję badanych antygenów prezentowana jest w tab. I.

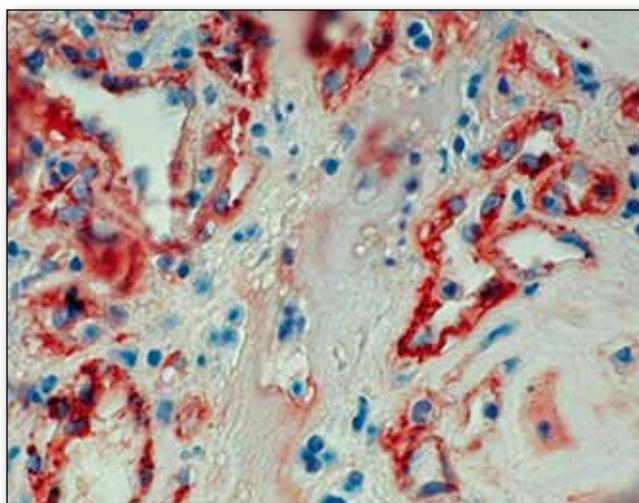
Obraz mikroskopowy błon PDR i PVR nie wykazywał wyraźnych różnic. Łącznotkankowe podścielisko wykazywało słabą ekspresję kolagenu IV. Jego obecność w strukturach błon potwierdzona była także przez innych autorów, m.in. Morino i wsp., którzy wskazują na możliwość produkowania go przez komórki nabłonka barwnikowego (4). Być może kontrola komórek nabłonka barwnikowego i procesu wytwarzania przez nie macierzy pozakomórkowej mogłaby mieć kluczowe znaczenie dla zapobiegania rozwojowi proliferacji witreoretinalnych. W łącznotkankowym podścielisku widoczne były

	Błony PVR (10)	Błony PDR (5)
HMB-45	10	3
MNF-16	10	5
GFAP	10	4
CD3 T Cell	7	3
CD20 cy L26	–	1
CD68 Macrophage	6	3
F VIII	2	4
Collagen IV	2	3

Tab. I. Liczba błon wykazująca immunoekspresję badanych antygenów.

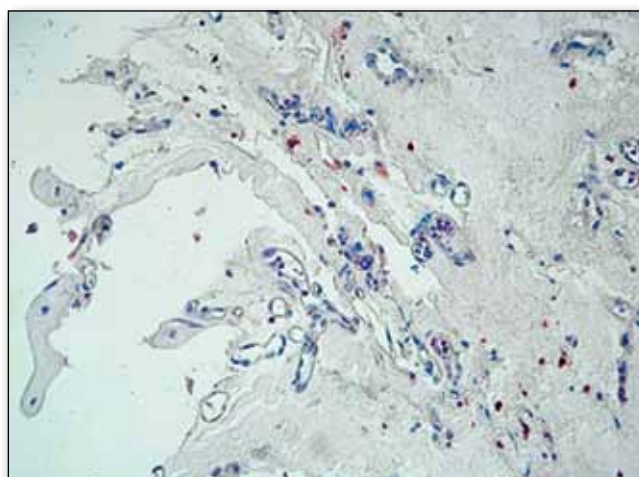
Tab. I. Number of membranes showing antigen expression.

liczne, szczególnie w PDR (w 4 na 5 przypadków), proliferujące naczynia krwionośne różnego kalibru – od naczyń włosowatych do małych tętniczek (niektóre z nich wykazywały pogrubienie ścian). W PVR naczynia uwidoczniły się tylko w 2 z 10 przypadków (ryc. 1). Wyniki te potwierdzają obserwacje innych autorów wskazujących na włóknisto-naczyniowy charakter błon PDR i nieliczne naczynia występujące w błonach PVR, które charakteryzują się przewagą komórkowego (2). W otoczeniu naczyń, a także poza nimi stwierdzono obecność limfocytów T (w 3 z 5 badanych PDR i w 7 z 10 PVR) (ryc. 2). Limfocyty B, wykazujące immunoekspresję CD 20, stwierdzono tylko w jednej błonie PDR. Obecność limfocytów T w większości badanych błon wskazuje, że mogą one odgrywać istotną rolę w patofizjologii błon powstających zarówno w przebiegu witreoretinopatii proliferacyjnej, jak i proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. Jak wynika z dostępnego piśmiennictwa, cytokiny wydzielane przez limfocyty T stanowią jeden z czynników zapoczątkowujących proces proliferacji i obkurczania błon. Brak limfocytów B w przebadanym przez nas materiale wydaje się przemawiać za opinią o niezaangażowaniu odpowiedzi humoralnej w patofizjologię błon proliferacyjnych. W opinii tej jesteśmy zgodni z innymi autorami (5,6). Jednak nie wszystkie wyniki podawane w piśmiennictwie potwierdzają tę opinię. Baudoin i wsp., a także Tang i wsp. w swoich pracach potwierdzili obecność limfocytów B, jak również immunoglobulin klasy IgG, IgA oraz IgE w strukturach badanych błon (7,8). Jak sugerują Chartis i wsp. (6), przyczyną tej rozbieżności może być odmienna metodyka przeprowadzonych badań. W większości przypadków z obu badanych grup w podścielisku błon widoczne były komórki zawierające ziarnistości ciemnobrązowego barwnika, w przeważającej liczbie mające morfologiczne cechy makrofagów i wykazujące immunoekspresję CD 68 (ryc. 3,4). Obecność makrofagów w proliferujących błonach potwierdzają także prace innych autorów. Martin i wsp. (9,10) zwracają uwagę na znamienne większą liczebność makrofagów w szkliskach pacjentów operowanych z powodu odwarstwienia siatkówki powikłanego witreoretinopatią proliferacyjną i pacjentów operowanych z powodu przedar-



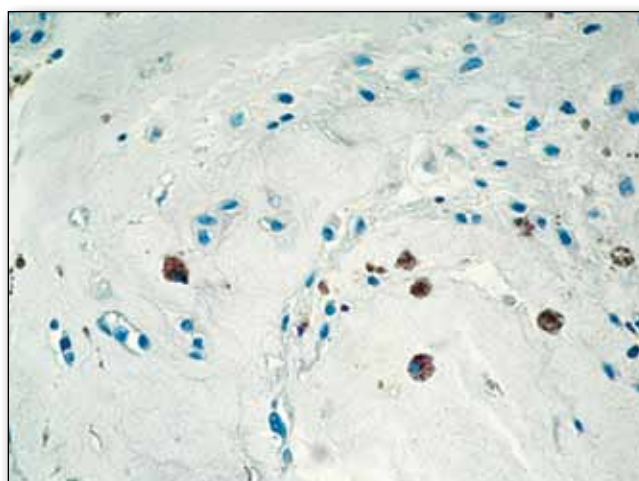
Ryc. 1. Immunoekspresja F-VIII w komórkach śródbłonna proliferujących naczyń krwionośnych.

Fig. 1. F-VIII positive endothelial cells in proliferating vessels.



Ryc. 2. Immunoekspresja CD3 w limfocytach T.

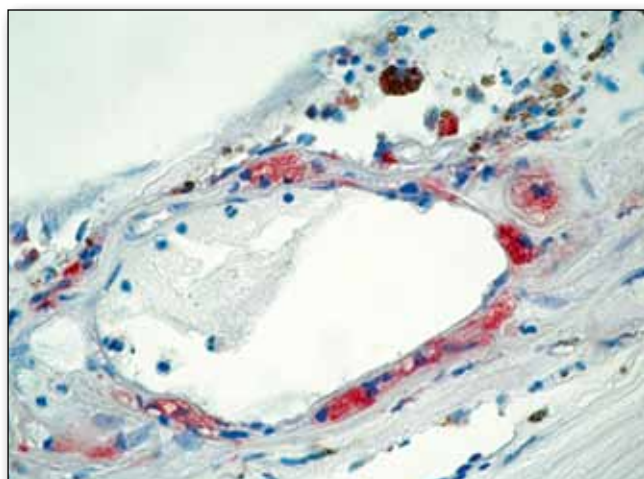
Fig. 2. CD3 positive lymphocytes T.



Ryc. 3. H + E: komórki podścieliska błon zawierające ciemnobrązowe ziarnistości.

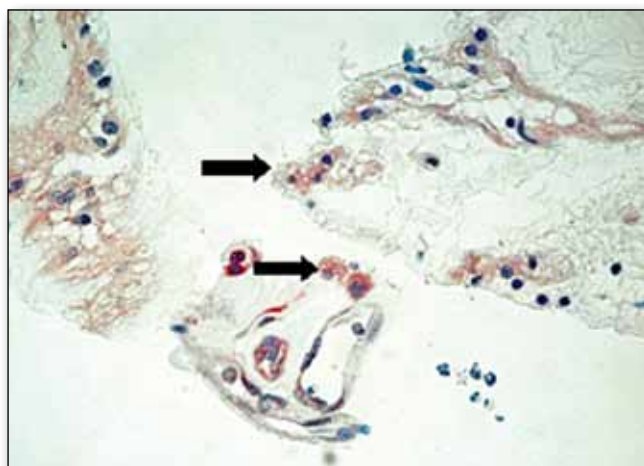
Fig. 3. H + E: membrane stromal cells containing dark-brown granules.

ciowego odwarstwienia siatkówki bez towarzyszącej PVR. Wyniki te stanowią jeszcze jeden argument przemawiający za



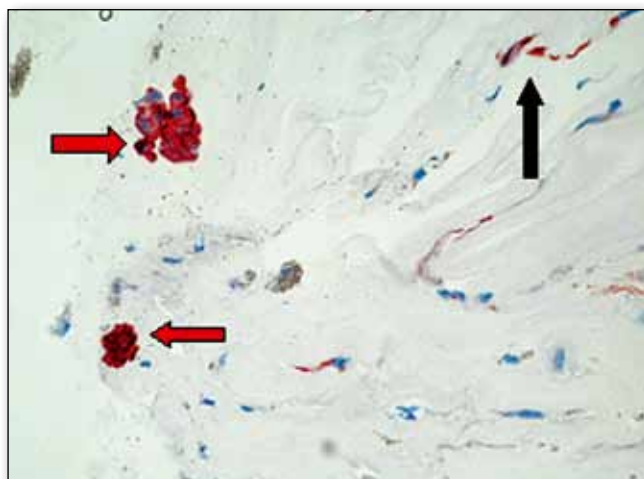
Ryc. 4. Immunoekspresja CD68 w makrofagach zawierających ciemnobrązowy barwnik oraz komórki z barwnikiem niewykazujące ekspresji CD68 (strzałka).

Fig. 4. CD68 positive macrophages containing dark-brown pigment and CD68 negative cells containing pigment (arrow).



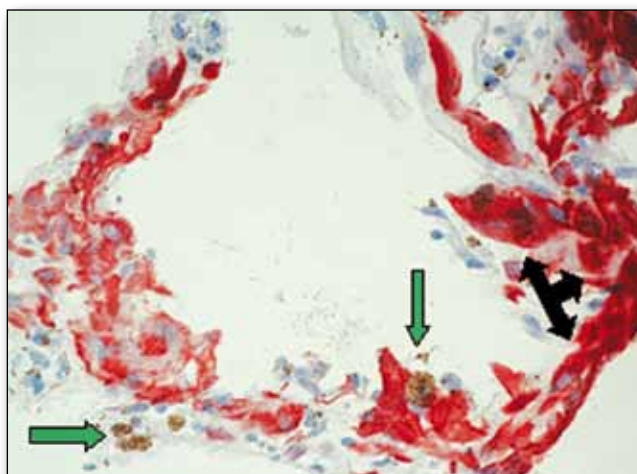
Ryc. 5. Komórki z ziarnistościami barwnika wykazujące immunoekspresję HMB-45 (strzałki).

Fig. 5. HMB-45 positive cells containing pigment granules (arrows).



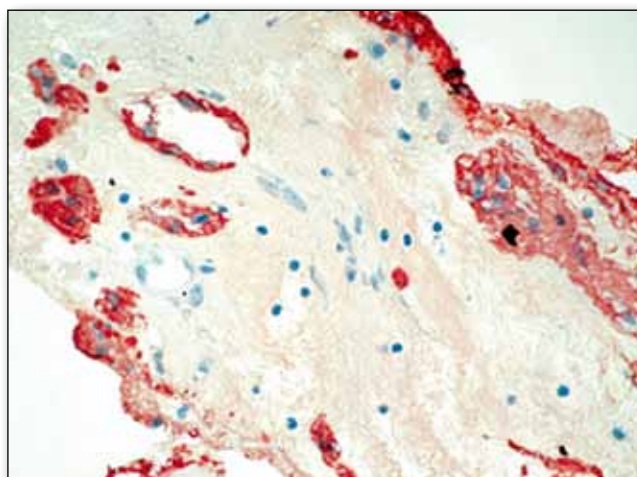
Ryc. 6. Immunoekspresja cytokeratyn – wieloboczne komórki układające się w grupy (czerwona strzałka) oraz komórki kształtu wrzecionowatego przypominające fibroblasty (czarna strzałka).

Fig. 6. Immunoreactive for cytokeratines polyhedral cells forming groups (red arrow) and like fibroblast fusiform cells (black arrow).



Ryc. 7. Immunoekspresja cytokeratyn w komórkach pokrywających powierzchnię błon (czarna strzałka) oraz komórki cytokeratyno-ujemne zawierające ziarnistości barwnika w cytoplazmie (zielona strzałka).

Fig. 7. Immunoreactive for cytokeratines cells covering surfaces of membranes (black arrow), and cytokeratine-negative cells containing granulations of pigment in cytoplasm.



Ryc. 8. Immunoekspresja GFAP w komórkach pokrywających powierzchnię błon oraz w komórkach podścieliska.

Fig. 8. GFAP positive cells covering surfaces of membranes and GFAP positive stromal cells.

udziałem procesów zapalnych w patofizjologii powstających błon. Część z komórek wykazujących immunoekspresję antygeny CD68 była immunopoztywna na antygen HMB-45 (ryc. 5). Poza tym błony zawierały komórki kształtu wrzecionowatego, podobne do fibroblastów. Wyniki te wskazywać mogą na opisywaną już w latach siedemdziesiątych możliwość transformacji komórek nabłonka barwnikowego w komórki makrofagopodobne, a także w komórki o fenotypie komórek fibroblastycznych (11,12,13). Błony zawierały również komórki wieloboczne, układające się w grupy przypominające nabłonek, niekiedy pokrywające jedno- lub wielowarstwowo powierzchnię błon. Większość z nich miała dodatnią immunoekspresję cytokeratyn, ale jednocześnie część z nich wykazywała koekspresję na obecność GFAP. Poza tym w podścielisku występowały komórki cytokeratyno-dodatnie i jednocześnie GFAP-ujemne. Komórki wykazujące immunoekspresję cytokeratyn nie wykazywały ziarnistości bar-

wnika w cytoplazmie (ryc. 6,7,8). Zarówno komórki nabłonka barwnikowego, jak i komórki glejowe obecne są w nieuszkodzonej siatkówce. Obecność komórek nabłonka barwnikowego zarówno w witreoretinopatii proliferacyjnej, jak i proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej potwierdzona była w pracach wielu autorów (14,15). Jednakże droga, którą pojawiają się w błonach PDR, jest wciąż dyskutowana. Niektórzy autorzy są zdania, że komórki nabłonka barwnikowego w błonach PDR są obecne jedynie w tych przypadkach, w których doszło do powstania przedarcia (14). W naszej pracy komórki wykazujące immunoksyntezę cytokeratyn obecne były we wszystkich błonach pobranych od pacjentów operowanych z powodu proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. Być może pierwotnie włóknisto-naczyniowe błony PDR w wyniku obkurczania się doprowadzają do powstania przedarcia siatkówki, umożliwiając komórkom nabłonka barwnikowego migrację. Nie zawsze otwór niewielkich rozmiarów udaje się zobrazować w badaniu klinicznym. Rola obecnych w błonach PVR i PDR komórek glejowych w procesie obkurczania się błon nie została do końca wyjaśniona. Wydaje się jednak, że stanowią one raczej szkielet dla innych, migrujących i proliferujących komórek, nie biorą natomiast udziału w procesie obkurczania błon (16).

Wnioski

1. Wyniki naszych badań potwierdzają udział komórek nabłonka barwnikowego i komórek glejowych siatkówki w tworzeniu się błon proliferacyjnych.
3. Obecność limfocytów T wskazuje na udział procesów zapalnych w rozwoju błon nasiatkówkowych.
4. Brak limfocytów B wskazuje, że odpowiedź humoralna nie odgrywa roli w proliferacjach witreoretinalnych.
7. Obecność makrofagów o nietypowej morfologii, zawierających barwnik, a także komórek wykazujących koekspresję cytokeratyn i GFAP potwierdza możliwość transformacji komórek nabłonka barwnikowego w komórki o morfologii makrofagów i komórek glejowych.

PIŚMIENNICTWO:

1. The Retina Society Terminology Committee: *The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy*. *Ophthalmology*, 1983, 90, 121-125.
2. Hiscott P., Hagan S., Heathcote L., Sheridan C.M., Groenewald C.P., Grierson I., Wong D., Paraoan L.: *Pathobiology of epiretinal and subretinal membranes: possible roles for the matricellular proteins thrombospondin 1 and osteonectin (SPARC)*. *Eye*, 2002, 16, 393-403.
3. Jerdan J.A., Pepose J.S., Michels r.G., Hayashi H., De Bustros S., Sebag M., Glaser B.M.: *Proliferative Vitreoretinopathy membranes*. *Ophthalmology*, 1989, 96, 801-810.
4. Morino I., Hiscott P., McKechnie N., Grierson I.: *Variation in epiretinal membrane components with clinical duration of proliferative tissue*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1990, 74, 393-399.
5. Charteris D.G., Hiscott P., Robey H.L., Gregor Z.J., Lightman S.L., Grierson I.: *Inflammatory cells in proliferative vitreoretinopathy subretinal membranes*. *Ophthalmology*, 1993, 100, 43-46.
6. Charteris D.G., Hiscott P., Grierson I., Lightman S.L.: *Proliferative vitreoretinopathy lymphocytes in epiretinal membranes*. *Ophthalmology*, 1992, 99, 1364-1367.
7. Baudouin C., Fredj-Reygrobelle D., Gordon W., Baudouin F., Peyman G., Lapalus P., Gastaud P., Bazan N.G.: *Immunohistological study of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy*. *Am. J. Ophthalmol.*, 1990, 110, 593-598.
8. Tang S., Scheiffarth O.F., Wildner G., Thruau S.R., Lund O.E.: *Lymphocytes, macrophages and HLA-DR expression in vitreal and epiretinal membranes of proliferative vitreoretinopathy. An immunohistochemical study*. *Ger. J. Ophthalmol.*, 1992, 1(3-4), 176-179.
9. Esser P., Heimann K., Wiedemann P.: *Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy: differentiation of subpopulations*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1993, 77, 731-733.
10. Martin F., Pastor J.C., De La Rúa E.R., Mayo-Isacar A., Garcia-Arumi J., Martinez V., Fernandez N., Saornil M.A.: *Proliferative vitreoretinopathy: cytologic findings in vitreous samples*. *Ophthalmic. Res.*, 2003, 35, 232-238.
11. Ando A., Ueda M., Uyama M., Masu Y., Ito S.: *Enhancement of dedifferentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor*. *Br. J. Ophthalmol.*, 2000, 84, 1306-1311.
12. Hiscott P., Sheridan C., Magee r.M., Grierson I.: *Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease*. *Prog. Ret. Eye Res.*, 1999, 18, 167-190.
13. Machemer r.: *Pathogenesis and classification of massive periretinal proliferation*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1978, 62, 737-747.
14. Hiscott P., Gray r., Grierson I., Gregor Z.: *Cytokeratin – containing cells in proliferative diabetic retinopathy membranes*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1994, 78, 219-222.
15. Hiscott P., Grierson I., McLeod D.: *Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1984, 68, 708-715.
16. Hiscott P., Grierson I., Trombetta C.J., Rahi A.H.S., Marshall J., McLeod D.: *Retinal and epiretinal glia – an immunohistochemical study*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1984, 68, 698-707.

X Jubileuszowe Sympozjum Sekcji Zapobiegania Ślepotcie i Rehabilitacji Słabowidzących, PTO, Warszawa, 5-6 listopada 2004 r.

Praca wpłynęła do Redakcji 14.10.2005 r. (797).
Zakwalifikowano do druku 18.01.2006 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
lek. med. Iwona Laukańska-Olszewska
ul. Syrenki 19 m. 27
91-496 Łódź