

<https://doi.org/10.17116/patol20198102124>

Состояние слизистой оболочки полости носа и результаты дакриоцисториностомии

Е.Л. АТЬКОВА¹, А.Ф. АСТРАХАНЦЕВ², А.А. ФЕДОРОВ¹, Д.А. РЕЙН¹, Н.Н. КРАХОВЕЦКИЙ¹, В.Д. ЯРЦЕВ¹¹ФГБНУ «НИИ глазных болезней», Москва, Россия;²Центральная клиническая больница №2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД», Москва, Россия

Цель исследования — изучить влияние состояния слизистой оболочки полости носа на результаты дакриоцисториностомии на основании данных морфологического исследования. **Материал и методы.** В исследование вошли 73 пациента, которым проводили эндоназальную эндоскопическую дакриоцисториностомию. Всем пациентам выполняли интраоперационную биопсию слизистой оболочки полости носа. Полученные образцы подвергали стандартному гистологическому исследованию, а также иммуногистохимическому исследованию с антителом к гладкомышечному актину α . Для определения интенсивности воспаления в образце ткани вычисляли коэффициент хронического воспаления. Подсчет клеточных элементов, положительно окрашенных по гладкомышечному актину α , осуществляли в полуавтоматическом режиме. В соответствии с исходом хирургического лечения по истечении 6 мес пациентов разделяли на группы. **Результаты.** Неблагоприятный исход оперативного вмешательства наблюдали у 10 (13,7%) пациентов. В образцах, полученных у пациентов данной группы, выявили более высокий коэффициент хронического воспаления (8,33) и большее количество клеточных элементов, положительно окрашенных по гладкомышечному актину α (6026,38±1944,29). Корреляционная зависимость между исходом хирургического вмешательства и количественной характеристикой миофибробластов была статистически достоверна ($p < 0,05$). **Заключение.** Данные исследования свидетельствуют о прямой корреляционной зависимости эффективности эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии от наличия и степени исходного хронического воспаления в слизистой оболочке полости носа.

Ключевые слова: дакриоцисториностомия, слизистая оболочка полости носа, дакриоцистит, фиброз, иммуногистохимическое исследование, миофибробласты.

The nasal mucosa and outcomes of dacryocystorhinostomy

E.L. ATKOVA¹, A.F. ASTRAKHANTSEV², A.A. FEDOROV¹, D.A. REIN¹, N.N. KRAKHOVETSKY¹, V.D. YARTSEV¹¹Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia;²N.A. Semashko Central Clinical Hospital Two, ОАО «RZhD», Moscow, Russia

Objective — to investigate the impact of the nasal mucosa on the outcomes of dacryocystorhinostomy on the basis of morphologic findings. **Material and methods.** The investigation enrolled 73 patients who had undergone endonasal endoscopic dacryocystorhinostomy. Nasal mucosal biopsies were intraoperatively taken from all the patients. The obtained samples were subjected to standard histological examination, as well as to immunohistochemical study using an anti- α -smooth muscle actin antibody. To determine the intensity of inflammation in the tissue sample, a chronic inflammation score was calculated. The cell elements positively stained with α -smooth muscle actin were estimated using a semi-automatic method. The patients were divided into groups in accordance with the outcome of surgical treatment after 6 months. **Results.** An unfavorable outcome of dacryocystorhinostomy was observed in 10 (13.7%) patients. The samples obtained from the patients showed a higher chronic inflammation score (8.33%) and a larger number of the cell elements positively stained with α -smooth muscle actin (6026.38±1944.29). The correlation between the outcome of surgical intervention and the quantitative characteristics of myofibroblasts was statistically significant ($p < 0.05$). **Conclusion.** These studies suggest that there is a direct correlation of the efficiency of endonasal endoscopic dacryocystorhinostomy with the presence and degree of chronic nasal mucosal inflammation at baseline.

Keywords: dacryocystorhinostomy, nasal mucosa, dacryocystitis, fibrosis, immunohistochemical study, myofibroblasts.

Одним из основных элементов процесса заживления ран после хирургических вмешательств является рубцевание, или фиброз. Начинающаяся приблизительно на 15-й день после ранения фаза ремоделирования может продолжаться до 6 мес и закончиться формированием более плотной рубцовой ткани [1]. Миофибробласты, напоминающие одновременно и фибробласты и гладкие миоциты, обычно появляются в ране, способствуя стягиванию ее краев [2].

Впервые миофибробласты описаны в 1971 г. G. Gabiani и соавт. [3] в гистологических образцах кожных ран.

Миофибробласты — особые клетки, сочетающие сократительную способность гладкомышечных клеток и секреторную активность фибробластов. Первое обеспечивается наличием пучков микроволокон гладкомышечного актина (α smooth muscle actin, α -SMA) в цитоплазме клетки, второе — выраженным эндоплазматическим ретикулулом. Основываясь на этой характеристике, ряд исследователей

Атькова Евгения Львовна — канд. мед. наук, зав. отд.-нием патологии слезного аппарата; <http://orcid.org/0000-0001-9875-6217>

Рейн Д.А. e-mail: illefarn@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0868-3876>

Краховецкий Н.Н., <http://orcid.org/0000-0002-3247-8418>

Ярцев В.Д., <http://orcid.org/0000-0003-2990-8111>

© Коллектив авторов, 2019

обнаружили миофибробласты в гистологических образцах ран других органов и тканей [4, 5]. Выявлено, что миофибробласты отсутствуют в неповрежденных тканях и появляются в ране, «активируясь» из ряда других типов клеток, прежде всего фибробластов. Трансформация клеток-предшественников в миофибробласты происходит в ответ на воздействие ряда медиаторов фиброза, таких как трансформирующий фактор роста β и фактор роста соединительной ткани [6, 7]. После заживления ран миофибробласты подвергаются апоптозу или деактивируются [8].

Фиброз является также одним из наиболее важных элементов заживления ран при дакриоцисториностомии (ДЦР). Данная операция, применяемая при нарушении слезоотведения, предполагает создание соустья (дакриостомы) между полостью слезного мешка и полостью носа. Фиброз искусственного соустья может привести к его облитерации рубцовой тканью и, как следствие, регрессу эффекта операции [9]. Причиной этого, по-видимому, является продолжающаяся после окончания процесса заживления активность миофибробластов, которая поддерживается упомянутыми выше медиаторами [2].

Попытки выявления факторов, предрасполагающих к избыточному рубцеванию, предпринимались рядом авторов. Так, L. Heindl и соавт. [10] определили, что субэпителиальный фиброз в слизистой оболочке полости носа, являющийся результатом хронического воспаления, сопутствует неблагоприятному исходу ДЦР. Данные результаты подтверждают и исследования других авторов [11, 12], указывающих на связь явлений хронического воспаления слизистой оболочки полости носа с неблагоприятным исходом ДЦР.

Z. Koturović и соавт. [13] отметили, что наиболее частой находкой при гистологическом исследовании получаемых при ДЦР образцов является негранулематозное хроническое воспаление с явлениями фиброза.

O. Ozer и соавт. [14] предложили использовать коэффициент хронического воспаления (КХВ) при оценке гистологических образцов, основанный на определении интенсивности воспалительной инфильтрации, интенсивности фиброза и пролиферации капилляров. Авторы обнаружили связь между величиной данного коэффициента и частотой возникновения рецидива при ДЦР.

Исследований корреляции между количественной характеристикой миофибробластной инфильтрации слизистой оболочки полости носа и исходом ДЦР проведено не было.

Цель исследования — изучить влияние состояния слизистой оболочки полости носа на результаты дакриоцисториностомии на основании данных морфологического исследования.

Материал и методы

В исследование вошли 73 пациента (19 мужчин и 54 женщины), которым была проведена эндоназальная эндоскопическая ДЦР (ЭЭДЦР) по поводу дакриоцистита. Все операции выполнял один хирург. Критериями исключения из исследования являлись заболевания полости носа и околоносовых пазух, требующие лечения, новообразования слезоотводящих путей, вторичные дакриоциститы. В исследование не вошли пациенты, которым на завершающем этапе операции была выполнена интубация дакриостомы лакримальным имплантатом. Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Разрешение на исследование получено от локального этического комитета ФГБНУ НИИ глазных болезней.

До оперативного вмешательства всем пациентам проведены стандартное офтальмологическое обследование, а также «цветные» канальцевая и носовая пробы, промывание слезоотводящих путей, мультиспиральная компьютерная томография слезоотводящих путей с их контрастированием, эндоскопическое обследование полости носа. Критерием неудачного исхода оперативного вмешательства считали повторное возникновение слезотечения на фоне непреходимости слезоотводящих путей при промывании и визуализирующих методах исследования. Срок послеоперационного наблюдения составил 6 мес. Контрольные осмотры осуществляли через 7, 14, 28 дней, 3 и 6 мес после оперативного вмешательства.

В соответствии с исходом оперативного вмешательства пациентов разделили на две группы: 1-я — пациенты с неблагоприятным исходом оперативного вмешательства, 2-я — с благоприятным исходом.

Полнослойные тканевые биоптаты слизистой оболочки полости носа у всех пациентов получены из предполагаемой области дакриостомы в среднем носовом ходе. Забор материала осуществляли до начала оперативного вмешательства после проведения местной анестезии. Оперативное вмешательство выполняли по методике P. Wormald [15].

После получения материал фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе нейтрального формалина (рН 7,0±0,2). Фрагменты ткани после обезвоживания в гистопроцессоре карусельного типа STP120 («Thermo Fisher Scientific», ФРГ) заливали в парафин в модульной системе заливки TES-99 («Meditate», ФРГ). Гистологические срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме HM340E («Mingrom GmbH», ФРГ), окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для окрашивания срезов HMS 70 («Thermo Fisher Scientific», ФРГ).

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовали коммерческое моноклональное антитело Actin, Smooth Muscle (клон 1A4) фирмы «Cell Marque» (США) в разведении 1:400. Срезы для ИГХ-исследования толщиной 4 мкм наносили на высокоадгезивные стекла, высушивали в течение 2 ч при температуре 58 °С, затем 18 ч при температуре 37 °С. Восстановление антигенной активности проводили на водяной бане WB-4MS («BioSan», Латвия) в Target Retrieval Solution рН 6,0 («Dako Denmark A/S», Дания). Дальнейшие операции с препаратами выполняли во влажной камере Slide Master («Bio-Optica Milano SpA», Италия). Инактивацию эндогенной пероксидазной активности осуществляли посредством инкубирования с блокирующим раствором («Dako Denmark A/S», Дания) в течение 15 мин. Инкубацию с первичными антителами проводили при температуре 4—8 °С в течение 18 ч. Далее следовала инкубация со вторичными антителами системы детекции REAL En Vision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse («Dako Denmark A/S», Дания) в течение 30 мин при комнатной температуре с последующей двукратной инкубацией с диаминобензидином в хромогенном растворе в течение 3 мин при комнатной температуре. После каждого этапа обработки антителами срезы промывали в фосфатном солевом буфере («Cell Marque», США). На последнем этапе препараты докрашивали гематоксилином Майера («Dako Denmark A/S», Дания) и заключали в синтетическую смолу Shandon-Mount («Thermo Fisher Scientific», ФРГ). Также были проведены реакции с положительным и отрицательным контролем.

Гистологические и ИГХ-срезы анализировали на микроскопе AxioImager Z1 («Carl Zeiss AG», ФРГ). Фотосъемку осуществляли при помощи камеры AxioCam («Carl Zeiss AG», ФРГ) с последующей обработкой изображений в программе AxoVision, version 4.7 («Carl Zeiss AG», ФРГ).

При морфологическом анализе оценивали состояние поверхностного эпителия слизистой оболочки полости носа, наличие, характер и состав инфильтратов собственной пластинки слизистой оболочки, наличие и степень выраженности субэпителиального фиброза, наличие и выраженность плоскоклеточной (сквамозной) метаплазии поверхностного эпителия. Среднее количество α -SMA-позитивных клеточных элементов на 1 мм^2 вычисляли на основании подсчета в нескольких полях зрения для каждого образца.

Выраженность гистопатологических явлений, ассоциированных с хроническим воспалением, определяли при помощи КХВ, предложенного О. Озер и соавт. [14]. Для этого при 400-кратном увеличении оценивали в поле зрения выраженность следующих явлений:

- 1) воспалительной инфильтрации (количество лимфоцитов, гистиоцитов и плазматических клеток в поле зрения): слабая (менее 50 клеток), умеренная (50—200 клеток), выраженная (более 200 клеток);
- 2) фибротических изменений (содержание фиброзной ткани в поле зрения): слабые (менее 25%), умеренные (25—50%), выраженные (более 50%);
- 3) капиллярной пролиферации (количество капилляров в поле зрения): слабая (менее 5), умеренная (5—10), выраженная (более 10).

В соответствии с интенсивностью каждого из этих элементов ему присваивали коэффициент от 1 до 3. Таким образом, КХВ каждого образца составлял от 3 до 9 в зависимости от выраженности каждого из перечисленных явлений.

Учитывая тот факт, что позитивное окрашивание по α -SMA характерно не только для миофибробластов, но и для других клеток, в частности для гладких миоцитов, являющихся частью сосудистой стенки, для исключения влияния гладких миоцитов на итоговые показатели α -SMA-позитивных элементов подсчет проводили в отдалении от крупных сосудов, а также использовали усредненные показатели нескольких полей зрения.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе IBMSPSS Statistics v23 («IBM Corporation», США). Корреляционные зависимости признавали статистически достоверными при $p < 0,05$. Все количественные данные представлены в виде средних значений ($M \pm SD$).

Результаты и обсуждение

По результатам послеоперационного наблюдения в 1-ю группу вошли 10 (13,7%) пациентов после ЭЭДЦР с неблагоприятным исходом операции, обусловленным рубцовым зарастанием дакриостомы (рис. 1). Сохранение проходимости дакриостомы (по данным эндоскопического исследования полости носа и промывных вод слезных путей) было характерно для всех (63) пациентов 2-й группы по истечении 6 мес послеоперационного наблюдения (рис. 2). Эффективность ЭЭДЦР в настоящем исследовании составила 86,3%, что соответствует данным литературы [16].

Во всех образцах обнаружены воспалительная инфильтрация, субэпителиальный фиброз, сквамозная (плоскоклеточная) метаплазия поверхностного эпителия слизистой оболочки. Перечисленные находки свидетельствуют о длительно протекающем воспалении в данной ткани, которое может являться причиной возникновения дакриоцистита. Полученные данные поддерживают мнение ряда исследователей [17—19] о «восходящей» природе патогенеза дакриоцистита: воспалительные явления из полости носа распространяются на вертикальный отдел слезоотводящих путей, приводя к облитерации их просвета рубцовой тканью.

Клеточные элементы, имеющие позитивное окрашивание по α -SMA, выявлены во всех образцах. Среднее количество α -SMA-позитивных клеточных элементов во всех образцах составило 4447 ± 1481 . Средний КХВ составил 6,17.

Для образцов тканей, полученных у пациентов 1-й группы, характерен более высокий КХВ 8,33. Диапазон значений КХВ в данной группе составил от 7 до 9. Выраженный фиброз наблюдали во всех образцах. Этому сопутствовала выраженная инфильтрация клеточными элементами, имеющими положительное окрашивание по α -SMA собственной пластинки (рис. 3). Для образцов слизистой обо-



Рис. 1. Рубцовое зарастание дакриостомы (эндоскопия полости носа).



Рис. 2. Анатомически проходимая дакриостома (эндоскопия полости носа).

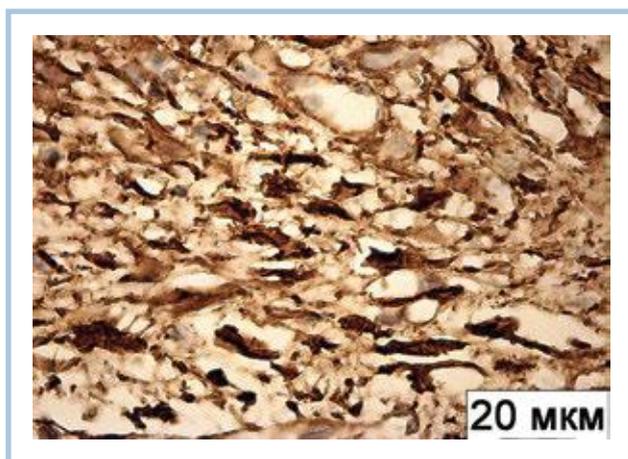


Рис. 3. Выраженная миофибробластная инфильтрация в слизистой оболочке полости носа.

Докрашивание гематоксилином Майера, $\times 250$.

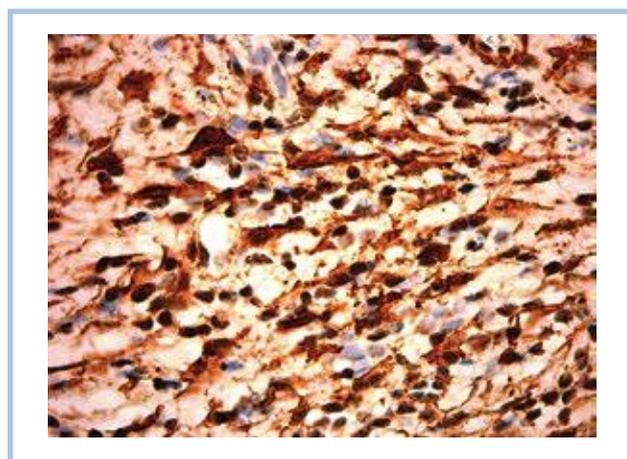


Рис. 4. Умеренная миофибробластная инфильтрация в слизистой оболочке полости носа.

Докрашивание гематоксилином Майера, $\times 250$.

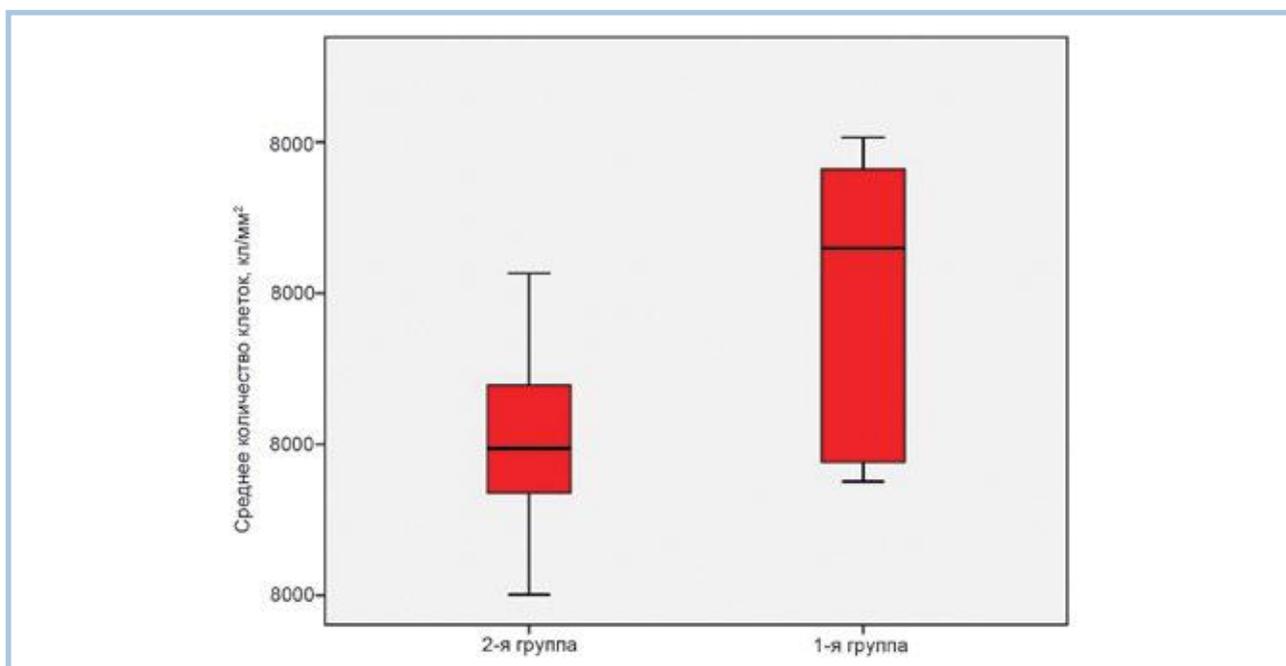


Рис. 5. Количество α -SMA-положительных клеточных элементов в образцах слизистой оболочки полости носа.

лочки полости носа, полученных у пациентов 2-й группы, характерна меньшая, чем у 1-й группы, выраженность воспалительной инфильтрации и сквамозной метаплазии поверхностного эпителия, а также меньшая инфильтрация α -SMA-положительными клеточными элементами (рис. 4). Средний КХВ для данной группы составил 5,72, диапазон значений КХВ — от 4 до 8.

Данные о связи выраженности явлений хронического воспаления, в частности сквамозной метаплазии, с неблагоприятным исходом ДЦР согласуются с наблюдениями G. Smirnov и соавт. [11]. Более выраженное образование грануляционной и рубцовой ткани в послеоперационном периоде в 1-й группе свидетельствует о связи данного явления с процессом рубцевания.

Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации представлена в таблице и на рис. 5. Корре-

ляционная зависимость умеренной силы (0,392) между количеством α -SMA-положительных клеточных элементов и возникновением рецидива дакриоцистита была статистически достоверна ($p < 0,05$).

Таким образом, о влиянии хронического воспаления на исход ДЦР также свидетельствует и выраженность миофибробластной инфильтрации в образцах слизистой оболочки полости носа. Учитывая, что миофибробласты считаются основным клеточным элементом, обеспечивающим процесс фиброза, количественная характеристика их инфильтрации может расцениваться как прогностический фактор интенсивности фиброза в ткани. В настоящем исследовании получена статистически достоверная корреляция между α -SMA-положительными элементами и зарастанием дакриостомы после ДЦР, что может свидетельствовать о влиянии интенсивности фиброза в ткани слизистой оболочки поло-

Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации в образцах слизистой оболочки полости носа

Группа	Число больных	Количество α -SMA-позитивных клеток	Стандартное отклонение	p^*
1-я	10	6026,38	1944,29	0,02
2-я	63	4120,39	1160,08	

Примечание. * — согласно коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

сти носа на процесс заживления в области дакриостомы. По всей видимости, течение фазы ремоделирования раны, обеспечиваемое миофибробластами, нарушается в результате «перенасыщения» ткани данными клетками в сторону избыточного рубцевания и тормозит тем самым наступление следующей стадии (разрешения), характеризующейся апоптозом миофибробластов и окончательной реорганизацией экстрацеллюлярного матрикса в ране.

Заключение

В настоящем исследовании установлена корреляция между выраженностью фиброза в субэпителиальном слое носа и плотностью миофибробластов и клиническим эффектом дакриоцисториностомии. Таким образом, патоло-

гические изменения слизистой оболочки полости носа в виде хронического воспаления с выраженной активностью пролиферирующих миофибробластов могут являться не только причиной развития дакриоцистита, но и фактором риска неблагоприятного исхода хирургического лечения.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Е.Л.А., А.Ф.А.
Сбор и обработка материала — Н.Н.К., А.Ф.А., А.А.Ф.
Статистическая обработка — Д.А.Р., В.Д.Я.
Написание текста — Д.А.Р., В.Д.Я.
Редактирование — Е.Л.А., А.А.Ф., Н.Н.К.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Beule A. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2010;9:Doc07. <https://doi.org/10.3205/cto000071>
- Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2016;142:56-70. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.07.009>
- Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971;27(5):549-550.
- Cleary PE, Ryan SJ. Mechanisms in traction retinal detachment. *Dev Ophthalmol.* 1981;2:328-333.
- Schmitt-Graff A, Pau H, Spahr R, Piper HM, Skalli O, Gabbiani G. Appearance of alpha-smooth muscle actin in human eye lens cells of anterior capsular cataract and in cultured bovine lens-forming cells. *Differentiation.* 1990;43(2):115-122.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-111.
- Jun JI, Lau LF. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(12):945-963. <https://doi.org/10.1038/nrd3599>
- Wilson SE, Chaurasia SS, Medeiros FW. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. *Exp Eye Res.* 2007;85(3):305-311. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.06.009>
- Ali MJ, Mishra DK, Baig F, Naik MN. Histopathology, immunohistochemistry, and electron microscopic features of a dacryocystorhinostomy ostium cicatrix. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* 2016;32(5):333-336. <https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000000530>
- Heindl LM, Junemann A, Holbach LM. A clinicopathologic study of nasal mucosa in 350 patients with external dacryocystorhinostomy. *Orbit.* 2009;28(1):7-11. <https://doi.org/10.1080/01676830802414806>
- Smirnov G, Pirinen R, Tuomilehto H, Seppä J, Terasvirta M, Uusitalo H. et al. Strong expression of HSP47 in metaplastic nasal mucosa may predict a poor outcome after primary endoscopic dacryocystorhinostomy: a prospective study. *Acta Ophthalmol.* 2011;89(2):e132-e136. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01654.x>
- Penttilä E, Hyttinen J, Hytti M, Kauppinen A, Smirnov G, Tuomilehto H. et al. Upregulation of inflammatory genes in the nasal mucosa of patients undergoing endonasal dacryocystorhinostomy. *Clin Ophthalmol.* 2014;8:799-805. <https://doi.org/10.2147/oph.s50195>
- Koturović Z, Knežević M, Rašić DM. Clinical significance of routine lacrimal sac biopsy during dacryocystorhinostomy: a comprehensive review of literature. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017;17(1):1-8. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2016.1424>
- Ozer O, Eskiizmir G, Unlü H, İşisaiğ A, Aslan A. Chronic inflammation: a poor prognostic factor for endoscopic dacryocystorhinostomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012;269(3):839-845. <https://doi.org/10.1007/s00405-011-1728-2>
- Tsirbas A, Wormald PJ. Endonasal dacryocystorhinostomy with mucosal flaps. *Am J Ophthalmol.* 2003;135(1):76-83.
- Marcet MM, Kuk AK, Phelps PO. Evidence-based review of surgical practices in endoscopic endonasal dacryocystorhinostomy for primary acquired nasolacrimal duct obstruction and other new indications. *Curr Opin Ophthalmol.* 2014;25(5):443-448. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000084>
- Busse H, Muller KM. Development of idiopathic dacryostenosis; clinical and pathological findings. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1977;170:627-632.
- Paulsen FP, Thale AB, Maune S, Tillmann BN. New insights into the pathophysiology of primary acquired dacryostenosis. *Ophthalmology.* 2001;108(12):2329-2336.
- Singh S, Alam MS, Ali MJ, Naik MN. Endoscopic intranasal findings in unilateral primary acquired nasolacrimal duct obstruction. *Saudi J Ophthalmol.* 2017;31(3):128-130. <https://doi.org/10.1016/j.sjopt.2017.05.013>

Поступила 20.09.18