

УДК 617.764-07

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ И СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА ЛЮДЕЙ

© А.В. Еремина, А.Е. Григорьева, И.Б. Дружинин, Д.В. Черных,
Е.В. Варваринский, Е.И. Рябчикова

Ключевые слова: слезная жидкость; стекловидное тело; электронная микроскопия; микрочастицы; офтальмологические заболевания.

Состав и структура компонентов слезной жидкости (СЖ) и стекловидного тела (СТ) меняются при офтальмологических заболеваниях (ОЗ), однако их морфология не изучена.

Цель – оценить возможность применения электронной микроскопии СЖ и СТ человека при разработке методов диагностики ОЗ.

СЖ содержит белки, микрочастицы, волокнистый матрикс, клетки и детрит, их количество и морфология зависят от ОЗ. СТ содержит коллаген, гиалоциты, микрочастицы и волокна. Выявление очевидных различий в содержании и морфологии структурных компонентов СЖ говорит о ее высоком диагностическом потенциале.

Возрастающая нагрузка на орган зрения – характерная черта современной цивилизации, из-за чего различные офтальмологические заболевания все чаще приводят к слепоте. Ранняя диагностика заболеваний позволяет уменьшить риск потери зрения, поэтому разработка новых неинвазивных методов диагностики крайне актуальна [1]. Важнейшим элементом эффективных диагностических методов является доступный для анализа субстрат, адекватно отражающий состояние исследуемой системы. Таким субстратом служит слезная жидкость (СЖ) – постоянная микросреда переднего отдела глаза, участвующая в метаболических процессах глазного яблока и орбиты. Известно, что состав СЖ изменяется при офтальмологических и ряде системных заболеваний [2–3]. СЖ легко получить, а процесс сбора безопасен для органа зрения [4–5]. СЖ прозрачная или слегка опалесцирующая, имеет слабощелочную реакцию и плотность около 1,008, содержит 97,8 % воды, электролиты, низкомолекулярные метаболиты, клеточный детрит, слизь и многочисленные белки, основную долю которых составляют лизоцим, лактоферрин и липокалин [2; 6].

Анализ научной литературы показал высокую информативность исследований параметров СЖ с помощью физико-химических, биохимических, иммунологических методов для понимания патогенеза многих офтальмологических заболеваний. Авторами научных публикаций установлена активность процессов перекисного окисления липидов, дисбаланс содержания цитокинов, факторов роста, активация синтеза специфических антител, появление биохимических маркеров воспаления и деструкции в слезной жидкости при многих офтальмологических заболеваниях, включая глаукому, диабетическую ретинопатию, увеиты и др. [1–5; 7–8]. Однако публикации, посвященные изучению СЖ, отражают результаты иммунологических и биохимических исследований, морфологическое изучение слезной жидкости не проводилось.

Другим диагностическим субстратом может быть стекловидное тело (СТ), которое представляет собой сеть коллагеновых волокон, окруженных разветвленными молекулами гиалуроновой кислоты [9]. СТ также в небольшом количестве содержит клетки – гиалоциты и фибробласты. Показано, что офтальмологические заболевания приводят к изменению структуры СТ [10]. Основной проблемой изучения СТ с помощью электронной микроскопии является искажение первоначальной структуры под действием быстрой дегидратации в спиртах. Использование медленной (несколько месяцев) дегидратации позволяет этого избежать [11].

Однако и СЖ, и СТ прозрачны, что затрудняет их исследование после отбора образцов из глаза. Для визуализации СТ *in vivo* применяются различные виды офтальмоскопии, темнопольная микроскопия с щелевой лампой и др. [12–13]. Тем не менее, относительно простой способ изучения тонкой структуры извлеченного из глаза стекловидного тела человека при офтальмологических заболеваниях еще не найден.

Между тем возможности современных микроскопических методов позволяют исследовать в биологических жидкостях не только клетки, но и субклеточные структуры. Активно развивающимся направлением диагностических исследований с использованием электронной микроскопии является анализ в биологических жидкостях микрочастиц, передающих сигналы от клетки к клетке, в т. ч. экзосом (рис. 1ж). Микрочастицы и экзосомы формируются всеми клетками организма и несут многочисленные маркеры, в т. ч. и маркеры многих заболеваний [14–16].

Следует подчеркнуть, что экзосомы и микрочастицы СЖ и СТ не исследованы, до сих пор не опубликовано прямых доказательств их присутствия в слезной жидкости и стекловидном теле. В связи с этим мы провели электронно-микроскопическое изучение СЖ и СТ с целью выявления и характеристики структурных

компонентов, включая микрочастицы и экзосомы, и оценки пригодности их использования для диагностики офтальмологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы слезной жидкости. Пробы рефлексорной СЖ были собраны у пациентов с диагнозом диабетическая ретинопатия (10 случаев), с гиперметропией (2 случая), с глаукомой (12 случаев), с катарактой (4 случая) и с макулодистрофией (9 случаев). Забор слезы проводили из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку в количестве 0,3–0,4 мл, как было описано ранее [17–18].

Образцы стекловидного тела. Пробы стекловидного тела были получены от больных макулодистрофией (7 случаев) и больных диабетической ретинопатией (3 случая).

Забор стекловидного тела проводился на начальных этапах витрэктомии. Для исключения попадания бессолевого раствора (BSS) забор материала осуществлялся на фоне воздушной тампонады. Стекловидное тело (1–1,5 мл) собирали в стерильные пен. флаконы.

Было получено информированное согласие всех пациентов на использование данных обследования в научных целях и согласие комитета по биомедицинской этике Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» на проведение исследования.

Электронная микроскопия. Пробы СЖ и СТ центрифугировали 15 мин. при 14 000 об./мин., супернатант исследовали методом негативного контрастирования (НК) [7], а осадки фиксировали 4 % параформальдегидом, обрабатывали стандартным методом [8] и получали ультратонкие срезы на ультратоме Ultracut-6 (Reichert-Young, Austria). Образцы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Japan) с цифровой фотокамерой Veleta (SIS, Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурные компоненты супернатанта СЖ людей. Все исследованные образцы супернатанта СЖ содержали два основных компонента: микрочастицы и белковые макромолекулярные агрегаты (ММА). Микрочастицы размером до 250 нм имели преимущественно округлую и неправильную форму, среди них выявлялись мембранные и немембранные, с гладкой или неровной поверхностью, с дополнительной «капсулой» из вещества низкой молекулярной плотности (рис. 1). Несмотря на разнообразие морфологических признаков, выделялись некоторые закономерности в структуре и количестве микрочастиц. Так, мембранные частицы обычно имели правильную округлую или чашеобразную форму, гладкую поверхность и не были связаны с ММА (рис. 1б–1е). Во всех образцах присутствовали округлые мембранные везикулы размером 40–100 нм, часто – чашеобразной формы. Структура этих везикул соответствует экзосомам, описанным в различных биологических жидкостях людей [19]. Другим распространенным вариантом мембранных микрочастиц СЖ являются микрочастицы, окруженные «капсулой» (рис. 1г), имеющие гладкую поверхность и форму, близкую к округлой. Большинство микрочастиц, связанных с ММА, не имеют мембраны, их форма часто неправильная. Соотношение мембранных и немембранных частиц, а также их морфологический профиль может варьировать в зависимости от офтальмологической патологии. Было выявлено, что в образцах больных диабетической ретинопатией существенно выше содержание мембранных частиц, чем в других исследованных образцах.

В образцах СЖ обнаружены макромолекулярные агрегаты (ММА) трех типов (рис. 2). ММА-1: разветвленные цепочки округлых частиц размером около 10 нм с четкими границами, «прокрашиваются» контрастирующей

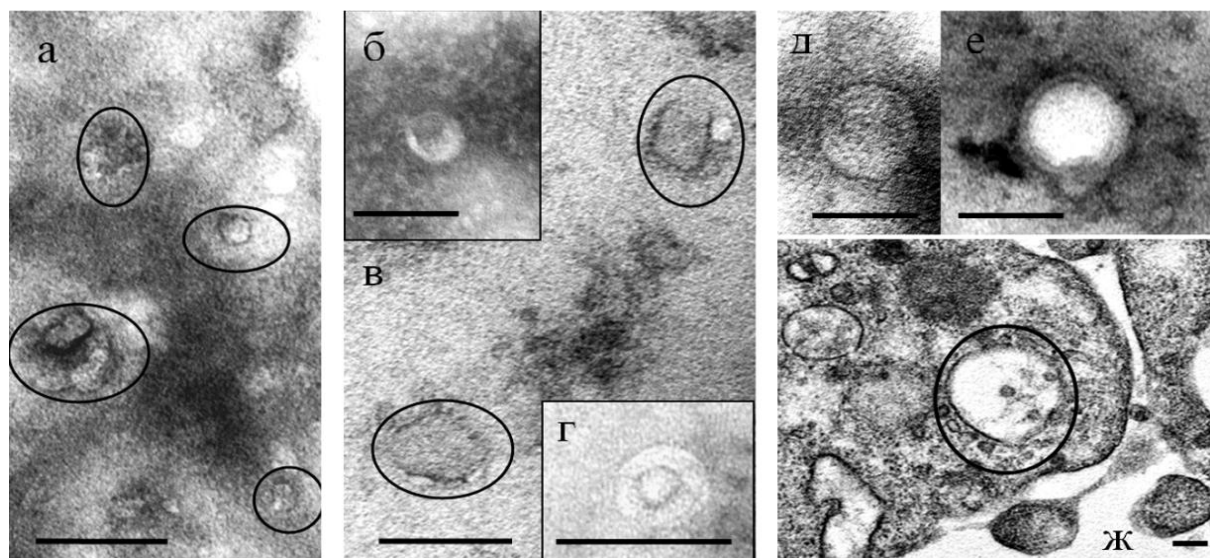


Рис. 1. Микрочастицы (МЧ) в слезной жидкости (СЖ) человека, выявленные методом негативного контрастирования: а – общий вид препарата (овалом выделены МЧ); б, в, г, д, е – экзосомоподобные частицы; г – МЧ с «капсулой»; ж – участок клетки (ультратонкий срез), овалом выделено мультивезикулярное тельце, содержащее экзосомы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия

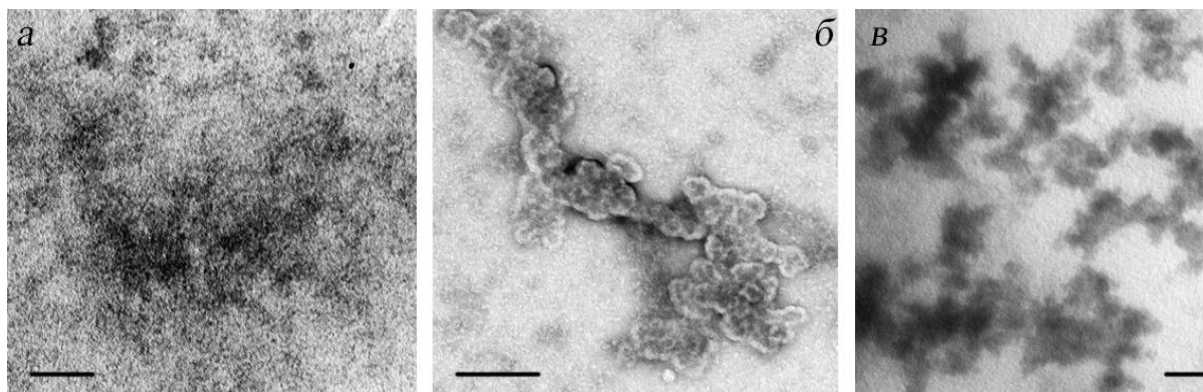


Рис. 2. Макромолекулярные агрегаты (MMA): а) MMA-1; б) MMA-2; в) MMA-3. Электронная микроскопия

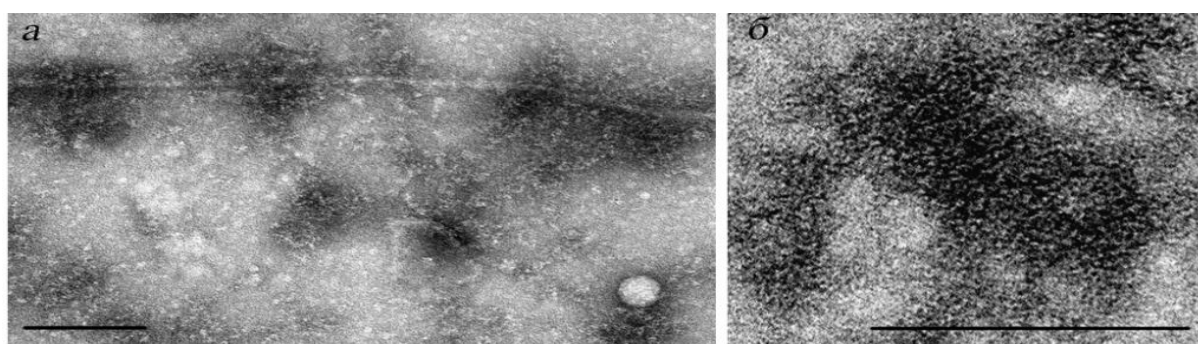


Рис. 3. Супернатанты стекловидного тела с микрочастицами MMA: а) коллаген при негативном контрастировании; б) скопление очень мелких субъединиц-колечек. Электронная микроскопия

щим веществом (рис. 2а). MMA-2: агрегаты, напоминающие «кружево» из округлых чашеобразных частиц, частично сливающихся друг с другом (размеры частиц 15 и 50 нм), не «прокрашиваются» (рис. 2б). MMA-3: рыхлые агрегаты из «звеньев» с нечеткой границей, размер частиц около 20 нм, «прокрашиваются» (рис. 2в).

Содержание разных типов MMA в образцах варьировало. Например, в образцах людей, больных гиперметропией, содержалось только небольшое количество MMA-1, тогда как в образцах СЖ больных макулодистрофией присутствовало большое количество MMA-3, образцы больных диабетической ретинопатией отличались наличием как MMA-1, так и MMA-3, но их соотношение могло значительно варьировать. Таким образом, морфологический профиль MMA образцов СЖ может стать важным диагностическим признаком.

Структурные компоненты супернатантов СТ людей. Супернатанты стекловидного тела содержат микрочастицы MMA особого типа и волокна коллагена (рис. 3). Содержание всех трех компонентов варьирует. При негативном контрастировании коллаген выглядит как длинное волокно диаметром около 18 нм, иногда проявляется исчерченность (рис. 3а). Образцы СТ содержат значительное количество MMA, которые выглядят как бесформенное скопление очень мелких субъединиц-колечек (диаметр примерно 15 нм) (рис. 3б). MMA такого типа в образцах СЖ не обнаружены.

В образцах СТ содержится большое количество микрочастиц, чаще преобладают немембранные частицы правильной округлой формы, размер которых в

среднем составляет 60 нм, иногда частицы располагаются группами или частично «срастаются» друг с другом. Размер частиц редко превышает 100 нм, редко встречаются крупные частицы около 250 нм.

Мембранные частицы встречаются в образцах стекловидного тела реже, чем в образцах слезы, возможно, из-за небольшого количества клеток, присутствующих в СТ и способных продуцировать мембранные частицы. Тем не менее, практически во всех образцах обнаружены хотя бы единичные мембранные частицы размером 40–150 нм, преимущественно чашеобразной формы, часть из которых по морфологии можно отнести к экзосомам.

При сравнении образцов СТ больных макулодистрофией и диабетической ретинопатией существенных отличий выявлено не было, что может говорить о схожем влиянии этих заболеваний на компоненты СТ.

Использование метода негативного контрастирования позволило визуализировать компоненты СТ не прибегая к дегидратации. Полученные данные говорят о перспективности использования метода негативного контрастирования в исследовании СТ людей, т. к. позволяет увидеть изменение состава и морфологии его основных структурных компонентов.

Ультраструктурная характеристика осадков СЖ людей. Электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов осадков, полученных при центрифугировании СЖ, выявило во всех образцах большое количество внеклеточного матрикса – разнообразных волокон (рис. 4а), которые образуют сплошную сеть на срезах. Морфология и количество волокон

нистого матрикса варьируют в зависимости от заболевания пациента. Наименьшее количество внеклеточного матрикса обнаружено в образцах больных макулодистрофией, наибольшее в образцах больных псевдоэкссфолиативным синдромом и в образцах больных глаукомой 3 стадии.

Во всех исследованных осадках СЖ, кроме образцов людей с гиперметропией, были обнаружены мембранные пузырьки различного размера, среди которых выделяются небольшие округлые везикулы размером от 150 до 300 нм, несущие на поверхности белковые «нити», проникающие внутрь (рис. 4б). Наружная часть «нитей» может достигать в длину до 100 нм. Интересно, что данные «нити» различаются: одни – тонкие длинные извитые (70–100 нм), другие короткие и толстые с небольшими шариками на концах (30–40 нм). Одна и та же везикула может нести на своей поверхности оба типа «нитей».

Осадки СЖ содержат также фрагменты разрушенных клеток и клеточный детрит в виде скоплений пузырьков, часто встречаются эпителиальные клетки (рис. 5б), морфология которых различается. По-видимому, это – клетки эпителия роговицы, которые слущиваются и попадают в СЖ. Все эпителиальные клетки несут микроворсинки на поверхности, электронно-прозрачная цитоплазма заполнена тонкими волоконцами, наблюдаются редкие митохондрии, всегда присутствуют элементы эндосомально-лизосомального аппарата. На срезах клеток эпителия выявляются мультивезикулярные тельца, что говорит о том, что обнаруженные в СЖ методом негативного контрастирования экзосомы могут выделяться клетками роговицы. Эпителиальные клетки встречаются во всех образцах, однако максимальное их количество обнаружено в образцах от людей, больных катарактой, а минимальное – в осадках СЖ людей с глаукомой.

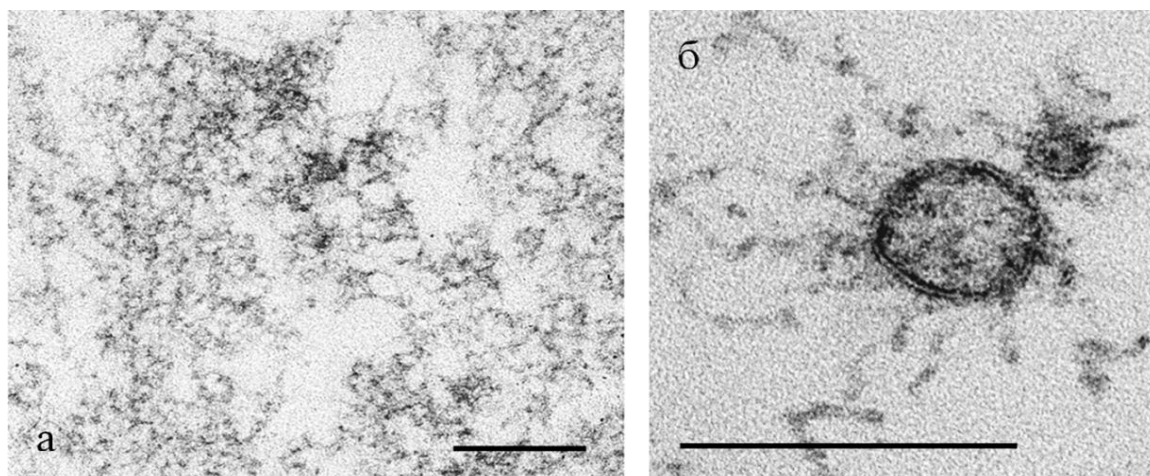


Рис. 4. Ультратонкие срезы осадка слезной жидкости: а) волокнистый матрикс; б) везикула, несущая на поверхности нити белка. Длина масштабной линии соответствует 200 нм. Электронная микроскопия

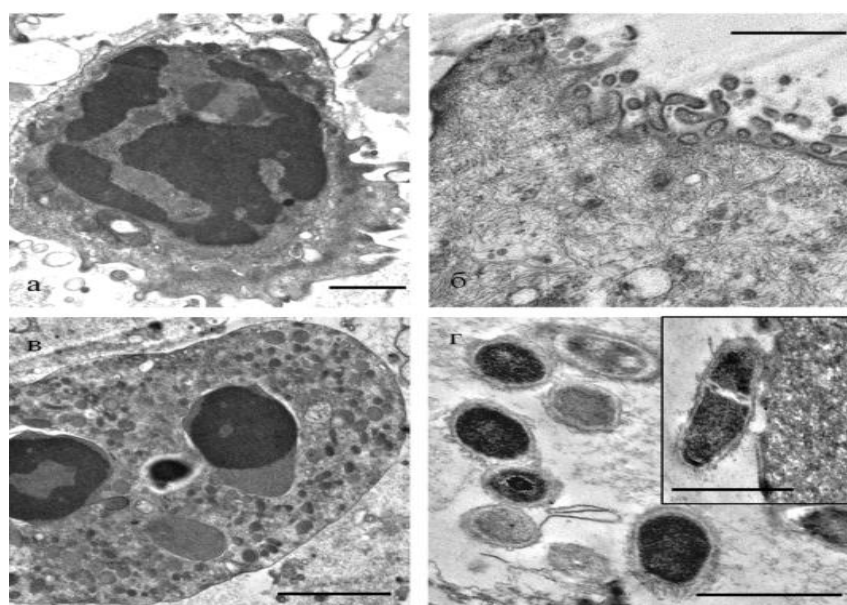


Рис. 5. Клетки осадков СЖ: а) макрофаги; б) эпителиальные клетки; в) нейтрофил; г) бактериальные клетки. Длина масштабной линии соответствует 1 мкм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы

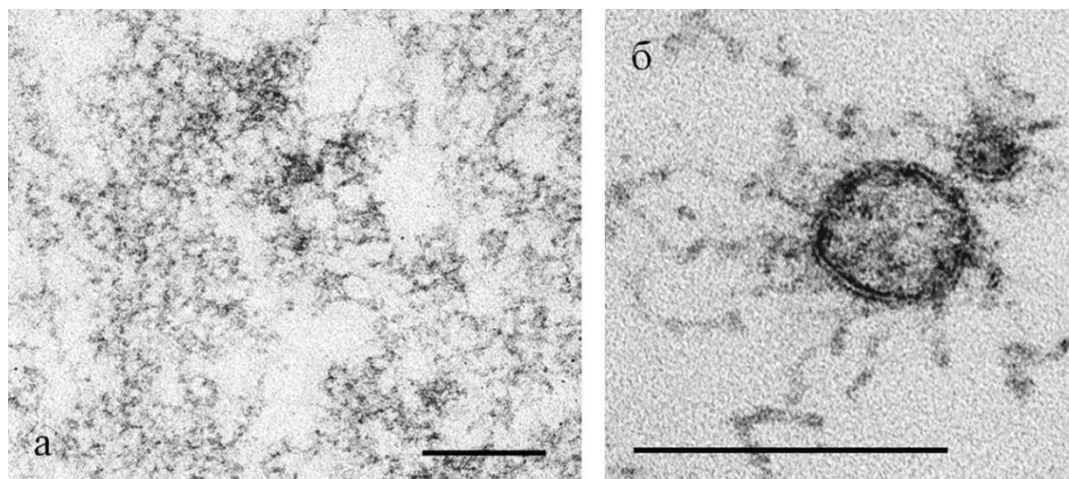


Рис. 6. Осадки СТ с коллагеновыми волокнами (а), осадки СТ организованные в пучки, и редкие гиалоциты (б). Электронная микроскопия

Кроме эпителиальных клеток на срезах отмечаются макрофаги (рис. 5а), лимфоциты и полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) (рис. 5в). Лейкоциты обнаруживаются преимущественно в образцах пациентов с диабетической ретинопатией, при других заболеваниях эти клетки в СЖ крайне редки. В отдельных осадках СЖ были обнаружены бактериальные клетки (рис. 5г).

Ультраструктурная характеристика осадков СТ людей. Осадки СТ содержат большое количество коллагеновых волокон (рис. 6а), которые часто организованы в пучки и редкие гиалоциты (рис. 6б), выполняющие функции фибробластов и макрофагов. Поверхность этих клеток покрыта многочисленными отростками, ядро обычно светлое с небольшим количеством гетерохроматина, цитоплазма средней электронной плотности содержит множество органелл. Обычно большое количество митохондрий, всегда присутствуют элементы эндосомально-лизосомального аппарата и мультивезикулярных телец объясняет присутствие редких экзосом в супернатантах СТ.

При сравнении образцов осадков СТ больных макулодистрофией и диабетической ретинопатией существенных различий не выявлено. Следует отметить, что осадки при центрифугировании СТ получаются не всегда, а только когда СТ при заборе имеет желтоватый или красноватый оттенок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование СЖ и СТ людей методом электронной микроскопии позволило визуализировать и идентифицировать их структурные компоненты. Жидкая фракция СЖ содержит микрочастицы, включая экзосомы, макромолекулярные агрегаты и волокна. В осадках СЖ обнаружены различные типы клеток и пузырьков, а также волокнистый матрикс. Жидкая фракция СТ содержит коллаген, макромолекулярные агрегаты и преимущественно немембранные микрочастицы. В осадках СТ обнаружены разнообразные пучки коллагена и многочисленные гиалоциты. В данной работе компоненты СТ были визуализированы методом, который не влияет на первоначальную структуру, что важно для дальнейшего изучения влияния патологических

процессов в органе зрения на состояние СТ. Выявление различий в содержании и морфологии структурных компонентов СЖ при различных офтальмологических заболеваниях свидетельствует о высоком диагностическом потенциале СЖ и перспективности поиска диагностических и прогностических маркеров заболеваний на доклиническом этапе развития патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Echouffo-Tcheugui J.B. et al. Screening intervals for diabetic retinopathy and incidence of visual loss: a systematic review // *Diabet Med.* 2013. V. 1. P. 248-251.
2. Zhou L. et al. Tear analysis in ocular surface diseases // *Prog Retin Eye Res.* 2012. V. 31. № 6. P. 527-550.
3. Wong T.T. et al. Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011. V. 52. № 10. P. 7385-7391.
4. Якушев Д.Ю., Бойко Э.В., Позняк А.Л., Сидорчук С.Н., Хлопунова О.В., Нуралова И.В., Мальцев Д.С. Содержание провоспалительных цитокинов в слезной жидкости и сыворотке крови пациентов с глаукомой и катарактой // *Актуальные проблемы офтальмологии: 6 Всерос. науч. конф. молодых ученых: сб. науч. работ.* М., 2011. С. 283-285.
5. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // *Цитокины и воспаление.* 2002. Т. 1. Вып. 3. С. 9-14.
6. Nichols B.A. et al. Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1985. V. 26. № 4. P. 464-473.
7. Bello V. et al. Transmission electron microscopy of lipid vesicles for drug delivery: comparison between positive and negative staining // *Microsc. Microanal.* 2010. V. 16. № 4. P. 456-461.
8. Grigor'eva A. et al. Fine mechanisms of the interaction of silver nanoparticles with the cells of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* // *Biometals.* 2013. V. 1. P. 18-23.
9. Sebag J. et al. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1989. V. 30. № 8. P. 1867-1871.
10. Sebag J. et al. Abnormalities of human vitreous structure in diabetes // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1993. V. 231. № 5. P. 257-260.
11. Dunker S. et al. Morphologic studies of the peripheral vitreoretinal interface in humans reveal structures implicated in the pathogenesis of retinal tears // *Retina.* 1997. V. 17. № 2. P. 124-130.
12. Sebag J. To see the invisible: the quest of imaging vitreous // *Dev. Ophthalmol.* 2008. V. 42. № 5. P. 28.
13. Sebag J. Seeing the invisible: the challenge of imaging vitreous // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. № 1. P. 38-46.
14. Oshima K. et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 10. P. 132-147.
15. Li J. et al. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // *BMC Cancer.* 2009. V. 9. P. 244.

16. Yang C. et al. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis // Clin Dev Immunol. 2011. V. 1. P. 842-849.
17. Григорьева А.Е., Еремина А.В., Дружинин И.Б., Черных Д.В., Варваринский Е.В., Рябчикова Е.И. Влияние эфферентных и лимфотропных технологий на течение патологического процесса при диабетической ретинопатии // Офтальмохирургия. 2008. № 3. С. 4-7.
18. Черных В.В. Особенности патогенеза начальной и развитой стадии первичной открытоугольной глаукомы // Аллергология и иммунология. 2006. № 1. С. 28-31.
19. Van Der Pol E. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes // J. Thromb. Haemost. 2010. V. 8. № 12. P. 2596-2607.

БЛАГОДАРНОСТИ: Программа фундаментальных исследований Президиума РАН № 5 «Фундаментальные науки – медицине»; № 35 «Поиск диагностических и прогностических маркеров первичной открытоугольной глаукомы в слезной жидкости».

Поступила в редакцию 6 мая 2014 г.

Еремина Алена Викторовна Новосибирский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Новосибирск, Российская Федерация, врач-офтальмолог, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Eremina Alyona Viktorovna, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC "Eye Microsurgery", Novosibirsk branch, Novosibirsk, Russian Federation, Ophthalmologist, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Григорьева Алина Евгеньевна, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация, аспирант, e-mail: feabelit@mail.ru

Grigoryeva Alina Evgenyevna, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation, Post-graduate Student, e-mail: feabelit@mail.ru

Дружинин Игорь Борисович, Новосибирский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Новосибирск, Российская Федерация, кандидат медицинских наук, врач-офтальмолог, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Druzhinin Igor Borisovich, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC "Eye Microsurgery", Novosibirsk branch, Novosibirsk, Russian Federation, Candidate of Medicine, Ophthalmologist, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Черных Дмитрий Валерьевич, Новосибирский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Новосибирск, Российская Федерация, врач-офтальмолог, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Chernykh Dmitriy Valeryevich, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC "Eye Microsurgery", Novosibirsk branch, Novosibirsk, Russian Federation, Ophthalmologist, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Варваринский Егор Викторович, Новосибирский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Новосибирск, Российская Федерация, врач-офтальмолог, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Varvarinskiy Egor Viktorovich, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC "Eye Microsurgery", Novosibirsk branch, Novosibirsk, Russian Federation, Ophthalmologist, e-mail: sci@mntk.nsk.ru

Рябчикова Елена Ивановна, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация, доктор биологических наук, профессор, руководитель группы микроскопических исследований, e-mail: lenryab@yandex.ru

Ryabchikova Elena Ivanovna, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation, Doctor of Biology, Professor, Head of Microscopy Research Group, e-mail: lenryab@yandex.ru

Eremina A.V., Grigoryeva A.E., Druzhinin I.B., Chernykh D.V., Varvarinskiy E.V., Ryabchikova E.I. POSSIBILITY OF USING OF ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSIS OF HUMAN LACRIMAL FLUID AND VITREOUS BODY

Tear's and vitreous body's structure change in view of ophthalmologic diseases, however, their morphology is not clearly identified. The aim is to estimate possible application of electron microscopy of tears and vitreous in ophthalmologic diagnostics.

Tears contain proteins, microparticles, fibrous matrix, cells and debris, their morphology depends on ophthalmologic disease. Vitreous contain collagen, microparticles, vitreous cells and fibers. Demonstration of differences in tear's components morphology shows high diagnostic potential.

Key words: tears; vitreous; electron microscopy; microparticles; ophthalmologic disease.