

## Визуализация структуры эпителия роговицы методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием на основе Ca/Nd изоморфного замещения в Ca-зависимых молекулярных системах

С.Э. АВETISOV<sup>1,2</sup>, С.В. ТРУФАНОВ<sup>1</sup>, И.А. НОВИКОВ<sup>1</sup>, А.М. СУББОТ<sup>1</sup>, А.А. ФЕДОРОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ глазных болезней», ул. Россолимо, 11, А, Б, Москва, 119021, Российская Федерация; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, Москва, 119991, Российская Федерация

Совокупность признаков, выделяемых биомикроскопически, как правило, позволяет диагностировать рецидивирующую эрозию роговицы и буллезную кератопатию, однако для раскрытия патогенеза заболевания необходима визуализация структуры на субклеточном уровне. В работе предпринимается попытка одновременной визуализации различных структур, отвечающих за организацию эпителиальной ткани, с использованием лантаноидного контрастирования и последующим проведением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). В частности, доказывается применимость Ca/Nd изоморфного замещения Ca<sup>2+</sup>-сайтов в белках клеточной адгезии для визуализации соответствующих им структур. **Цель** — оценка информативности изображений, полученных посредством визуализации структуры эпителия роговицы методом СЭМ с лантаноидным контрастированием на основе Ca/Nd изоморфного замещения в Ca-зависимых молекулярных системах. **Материал и методы.** Соскобы переднего эпителия роговицы, полученные у больных, страдающих рецидивирующей эрозией роговицы или буллезной кератопатией, а также с кадаверных глаз без признаков офтальмологических заболеваний изучали на сканирующем электронном микроскопе (Zeiss EVO LS10, BSE, EP — 70 Па, 20—28 кВ, лантаноидное контрастирование набором реактивов BioREE). **Результаты.** Во всех случаях лантаноидное контрастирование биоптатов позволило получить на сканирующем электронном микроскопе контрастные изображения с хорошо распознаваемой клеточной структурой и элементами ультраструктуры, связанной с Ca<sup>2+</sup>-сайтами белков клеточной адгезии. **Заключение.** Лантаноидное контрастирование биоптатов эпителиального слоя роговицы для проведения СЭМ позволяет визуализировать особенности строения эпителиальной ткани при различных патологических состояниях. Механизм Ca/Nd изоморфизма позволяет оценить структурную позицию большинства белковых молекул, участвующих в Ca-зависимых процессах, формирующих клеточную адгезию. На основании данных о распределении неодима в структуре базальной мембраны описан механизм локального воздействия веществ на плотную пластинку в проекции клеточных границ базального слоя, возникающий при однонаправленной ультрафильтрации. Подтверждены наблюдения о несостоятельности якорного комплекса адгезии при развитии рецидивирующей эрозии роговицы.

**Ключевые слова:** эпителий, роговица, буллезная кератопатия, рецидивирующая эрозия роговицы, сканирующая электронная микроскопия, СЭМ, сканирующий электронный микроскоп, лантаноидное контрастирование, молекулы клеточной адгезии.

## SEM visualization of corneal epithelium through lanthanoid staining based on Ca/Nd isomorphous substitution in Ca-dependent molecular systems

S.E. AVETISOV, S.V. TRUFANOV, I.A. NOVIKOV, A.M. SUBBOT, A.A. FEDOROV

<sup>1</sup>Research Institute of Eye Diseases, 11 A, B Rossolimo St., Moscow, 119021, Russian Federation; <sup>2</sup>The First Sechenov The Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation, 8-2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russian Federation

Cumulative biomicroscopic evidence is usually sufficient for the diagnosis of recurrent corneal erosion or bullous keratopathy, however, exploration of the disease pathogenesis requires subcellular-level visualization of corneal structure. In the current study, lanthanoid staining and scanning electron microscopy were employed to visualize quite a number of structures responsible for epithelium organization. In particular, the study proves possible the use of Ca/Nd isomorphous substitution at Ca<sup>2+</sup> sites of cytoadherence proteins for visualization of corresponding cellular structures. **Aim** — to assess the value of information provided by scanning electron microscopy of corneal epithelium that involves lanthanoid staining based on the Ca/Nd isomorphous substitution in Ca-dependent molecular systems. **Material and methods.** Anterior corneal epithelial scrapes were obtained from patients with recurrent corneal erosion or bullous keratopathy and cadaver eyes with no signs of any ophthalmic disease. Samples were then studied under a scanning electron microscope (Zeiss EVO LS10, BSE, EP — 79 Pa, 20—28 kV, Ln-staining with the BioREE assay kit). **Results.** In all cases, lanthanoid staining of biopsy material provided high-contrast SEM images with well-recognizable structural and ultrastructural elements associated with Ca<sup>2+</sup> sites of cytoadherence proteins. **Conclusion.** Lanthanoid staining of biopsy material and subsequent SEM enabled detailed visualization of structural features of the corneal epithelium in various pathologies. Due to the Ca/Nd isomorphism we were able to evaluate structural position of the majority of protein molecules engaged in Ca-dependant processes and, consequently, in cytoadherence. Basing on the neodymium distribution within the basal membrane, we have described local effects of different substances on the lamina densa in the projection of basal layer cell borders that occur after unidirectional ultrafiltration. The results confirm the failure of the junctional adhesion complex in recurrent corneal erosion.

**Keywords:** epithelium, cornea, bullous keratopathy, recurrent corneal erosion, scanning electron microscopy, SEM, scanning electron microscope, lanthanoid staining, cell adhesion molecules.

Free full text in English: doi: 10.17116/engoftalma 20161326-2

Эпителий глазной поверхности является примером первой линии защиты организма, в частности барьером между структурами глаза и внешней средой. Необходимым условием для обеспечения барьерной функции эпителиальной ткани является ее правильная организация, в значительной степени определяемая межклеточным взаимодействием и взаимодействием клеток с базальной мембраной. В норме клетки эпителия образуют между собой множество адгезивных, плотных и щелевых контактов, создаваемых за счет микрофиламентов, молекул клеточной адгезии, большинство из которых (кадгерины, ламинины, интегрины) являются Са-зависимыми трансмембранными белками.

Разнообразие элементов строения эпителиальной ткани, отвечающих за ее правильную организацию, является одной из причин сложного характера большинства известных заболеваний эпителия роговицы и разнообразия факторов, одновременно включенных в патогенетические цепочки.

В частности, синдром рецидивирующей эрозии роговицы (РЭР) — многофакторное заболевание, обусловленное нестабильностью связи эпителиального слоя клеток с базальной мембраной и характеризующееся повторяющимися эпизодами слущивания значительных по площади участков эпителия роговицы [1, 2].

Современные оптические методы прижизненной визуализации, используемые в офтальмологии (биомикроскопия, конфокальная микроскопия, оптическая когерентная томография), позволили охарактеризовать общую картину повреждений, возникающих в результате развития РЭР. На текущий момент описаны такие морфологические признаки РЭР, как неровность, приподнятость эпителия, эпителиальные микрокристы, буллы, а также изменения в строме (помутнения и клеточные инфильтраты) [3, 4].

Буллезная кератопатия (БК) — заболевание, развивающееся вследствие декомпенсации функции роговицы и характеризующееся ее стойким отеком с образованием булл в эпителиальном слое.

Совокупность признаков, выделяемых биомикроскопически, как правило, позволяет диагностировать РЭР и БК, однако для раскрытия патогенеза заболевания необходима визуализация структуры на более «тонком», субмолекулярном, уровне для оценки состояния и взаимоотношения межклеточных контактов, молекул адгезии и элементов внеклеточного матрикса и протеолитических компонентов, например матриксных металлопротеиназ (ММП).

Наиболее часто привлекаемыми методами в микробиологических исследованиях, способными маркировать процессы на уровне биомолекул, являются высокоспецифичные иммуногистохимические

методики окрашивания. Специфичность является как плюсом, так и минусом такого подхода — исследователь ограничен предполагаемым набором «целевых объектов исследования» и возможностью одновременно детектировать не более трех из них. Однако в сложных патологических процессах, к которым, несомненно, относится и патология эпителия роговицы, объектов, структурно вовлеченных в эти процессы, может быть достаточно много (см. таблицу).

Разнообразие описанных факторов, приводящих к возникновению заболевания и поддерживающих патологический процесс, находится в широком диапазоне — от генетической предрасположенности до дисбаланса ММП и других регулирующих молекул. Следовательно, для реконструкции патогенетических звеньев необходимо одновременно оценить взаимодействие клеток и компонентов внеклеточного матрикса, базальной мембраны — коллагена разных типов, ламинина, фибронектина и других, а также визуализировать микрорельеф базального слоя клеток, их якорные структуры и другие элементы межклеточных контактов — интегрины, кадгерины [12].

Предположительно, для одновременной визуализации объемной структуры образца, расположения компонентов внеклеточного матрикса и локализации ряда Са<sup>2+</sup>- и АТФ-зависимых процессов на молекулярном уровне может быть применим метод лантаноидного контрастирования с последующим проведением СЭМ (рис. 1) [13].

Разнообразие Са-зависимых процессов и локализаций Са в белковых структурах эпителиальной ткани делает обоснованным применение изоморфного замещения Са/Nd для контрастирования структуры роговичного эпителия.

Цель работы — оценка информативности изображений, полученных посредством визуализации структуры эпителия роговицы методом СЭМ с лантаноидным контрастированием на основе Са/Nd изоморфного замещения в Са-зависимых молекулярных системах.

## Материал и методы

С помощью СЭМ исследовали соскобы переднего эпителия роговицы, полученные в условиях операционной у больных, страдающих РЭР (9 образцов мужчин 34—56 лет) или БК (4 образца мужчин 49—61 года), а также с кадаверных глаз без признаков офтальмологических заболеваний (5 образцов мужчин 22—49 лет).

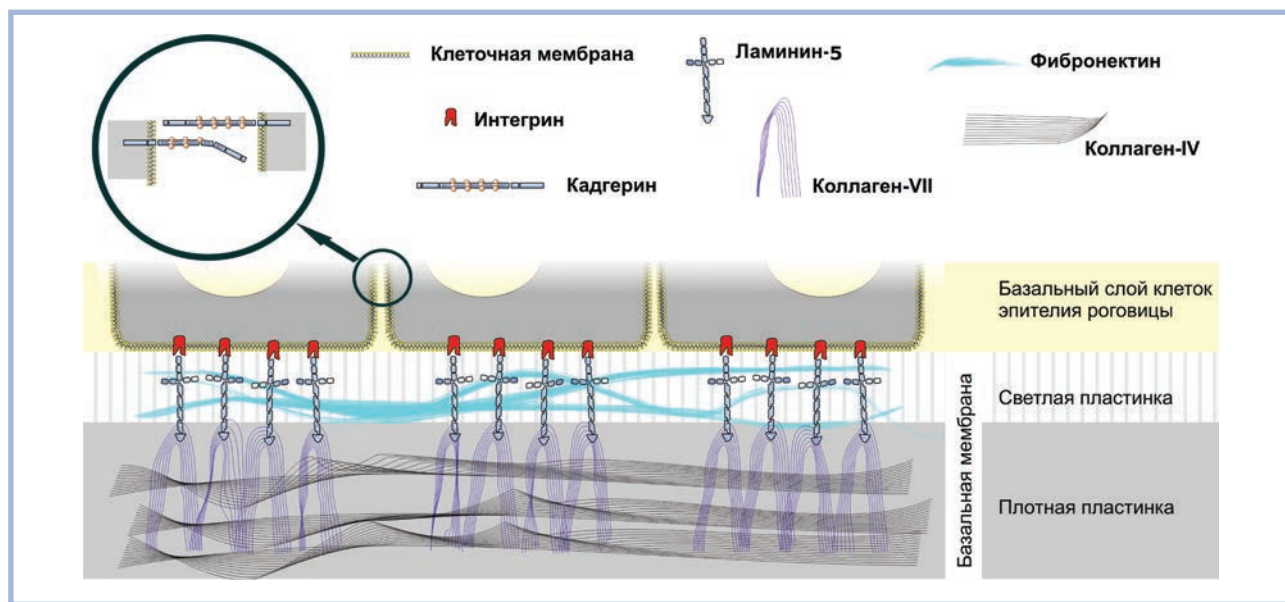
Предварительно пациенты были обследованы стандартными офтальмологическими методами. Кроме того, проводили биомикроскопию и послы-

Для корреспонденции:

Суббот Анастасия Михайловна — ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных исследований в офтальмологии  
e-mail: kletkagb@gmail.com

**Изменчивость основных структурных элементов эпителия роговицы и базальной мембраны при развитии БК и РЭР**

Морфологическая структура	Структурный элемент	Изменения	
		при РЭР	при БК
Десмосома — контакт между соседними клетками	Кадгерин, микрофиламенты	Количество не изменяется [5]	—
Гемидесмосома — контакт базальных клеток с подлежащей мембраной	$\beta 4$ -субъединица интегрина	Разрушается под воздействием ММП-9 [6]	—
	Коллаген XVII	Мутация в кодирующем гене способствует развитию заболевания [7]	—
Светлая пластинка базальной мембраны	Ламинин-5, фибронектин	Разрушается под воздействием ММП-2 вплоть до полного отсутствия [8]	Фрагментирование [9]
Плотная пластинка базальной мембраны	Коллаген IV (основное вещество)	Разрушается под воздействием ММП-2. Мутация в кодирующем гене способствует развитию заболевания [10]	Депозиты в субэпителиальном пространстве [9]
	Коллаген VII (якорные фибриллы)	Разрушается под воздействием ММП-2 вплоть до полного отсутствия [8]	—
Антиадгезивные гликопротеины	Фибриллин-1, тенасцин-С	—	Диффузное накопление [11]



**Рис. 1.** Принципиальная схема взаимоотношений структурных элементов клеток эпителия роговицы и БМ, доступных для визуализации на сканирующем электронном микроскопе с применением лантаноидного контрастирования.

Базальные эпителиоциты фиксированы к коллагенам плотной пластинки через систему якорных белков, пронизывающих светлую пластинку.

ное исследование роговицы глаз (включая донорские) с помощью оптического когерентного томографа HRT II с роговичной насадкой.

В течение первых минут после забора биоптатов, когда клетки сохраняют достаточную метаболическую активность, образцы были контрастированы с использованием набора реактивов BioREE (ООО «Глаукон», Россия) по рекомендованному производителем протоколу:

1) первая промывка для удаления фосфатов с поверхности;

2) экспонирование в растворе хлорида неодима в течение 45 мин для насыщения контрастирующим веществом;

3) вторая промывка для удаления излишков растворов.

В результате контрастирования на СЭМ маркировались зоны, где кальций изоморфно заменяется на неодим, а также участки локализации энергозависимых процессов с высвобождением фосфат-аниона и последующим формированием нерастворимых фосфатов неодима [13, 14].

Подготовленные эпителиальные пласты направляли поверх специализированной адгезивной углеродной ленты для СЭМ. Каждый образец размещали таким образом, чтобы доступными для наблюдения оказались одновременно и передняя поверхность эпителия, и базальный слой (эпителиальный пласт разрезали пополам и размещали различными поверхностями кнаружи или частично подворачивали).

Образцы размещали в камере сканирующего электронного микроскопа (EVO LS10, «Zeiss», Германия). Наблюдения вели в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па) при ускоряющем напряжении 20–28 кВ и токе на образце 360–520 пА. Использовали катод LaB<sub>6</sub>. Изображения захватывали в режиме детекции обратнорассеянных электронов (BSE).

## Результаты и обсуждение

Во всех случаях лантаноидное контрастирование биоптатов позволило получить на СЭМ контрастные изображения с хорошо распознаваемой клеточной структурой.

В медико-биологических исследованиях наиболее распространены электронограммы, получаемые на СЭМ посредством детектора вторичных электронов. Лантаноидное контрастирование предполагает использование другого детектора — обратнорассеянных электронов. При этом получаемые изображения отличаются от привычных, так как детектируется сигнал с большей глубины образца и значительная часть объема тканей остается прозрачной для электронного пучка при высоких ускоряющих напряжениях. Формируемые изображения в некотором смысле оказываются близки к оптическим конфокальным изображениям, и для их интерпретации могут использоваться оптические термины — мутность, яркость и т.п.

Контрастность изображений, получаемых на СЭМ в режиме детекции обратнорассеянных электронов, определяется средним атомным весом каждого лежащего под поверхностью локального объема вещества образца. При этом яркие участки изображения соответствуют насыщенным тяжелыми химическими элементами структурам ткани. Оригинальный метод суправитального лантаноидного контрастирования служит для избирательного насыщения «тяжелыми» лантаноидами отдельных структур и маркирования ими некоторых цепочек клеточного обмена, что делает возможной их последующую визуализацию посредством СЭМ [13, 14].

В рамках настоящего исследования лантаноидное контрастирование биоптатов эпителия роговицы позволило при дальнейшем проведении СЭМ получить для разных состояний эпителиальной ткани (условная норма, БК и РЭР) значительно отличающиеся картины, прямо и косвенно характеризую-

ющие изменения ее ультраструктуры. При этом следует отметить высокую воспроизводимость наблюдаемых изменений. Очевидно, что паттерны на СЭМ-изображениях отражают вовлеченные в однотипные патологические процессы элементы ткани.

Способность лантаноидов включаться в цепочки кальциевого обмена и блокировать их известна [15]. Локализации, связанные с изоморфным замещением Ca/Nd, позволяют визуализировать Ca-зависимые процессы, в том числе клеточной адгезии, и ключевые типы включенных в этот процесс белковых молекул. Сюда входят два типа проявлений гетеровалентного изоморфизма: замена трех ионов кальция на два иона неодима ( $3Ca^{2+} \leftrightarrow 2Nd^{3+}$ ) — ситуация в структуре кадгерина; замена пары ионов кальция на ион неодима и щелочного металла ( $2Ca^{2+} \leftrightarrow (Nd^{3+} + Me^+)$ ) — описано для трансмембранных Ca-насосов. Интегрины и ламинины, являясь Ca-зависимыми белками, также вовлечены в процессы таких замен. При этом наиболее вероятная высокая локальная концентрация лантаноидов в контрастированном препарате будет связана с замещением пяти тройных сайтов  $Ca^{2+}$  в кадгеринах [16], обеспечивая наибольшую яркость клеточных контактов, в том числе десмосом на латеральной поверхности клеток.

Другая группа структурных позиций накопления лантаноидов — это результат их связывания со свободными фосфат-анионами. В этом случае лантаноиды (неодим) маркируют внутриклеточные зоны протекания активных энергозависимых процессов с потреблением АТФ и высвобождением фосфат-аниона (например, треки сборки цитоскелета, работы жгутиков, митохондрий) [17]. Выпадение и накопление взвеси простого фосфата неодима ( $NdPO_4$ ) будет происходить вследствие его низкой растворимости и невозможности быть ремобилизованным системами клеточного обмена. Таким образом, яркость отдельных структур в толще клеток будет связана с активностью протекания в них обменных процессов, существовавшей на момент лантаноидного контрастирования образца [13].

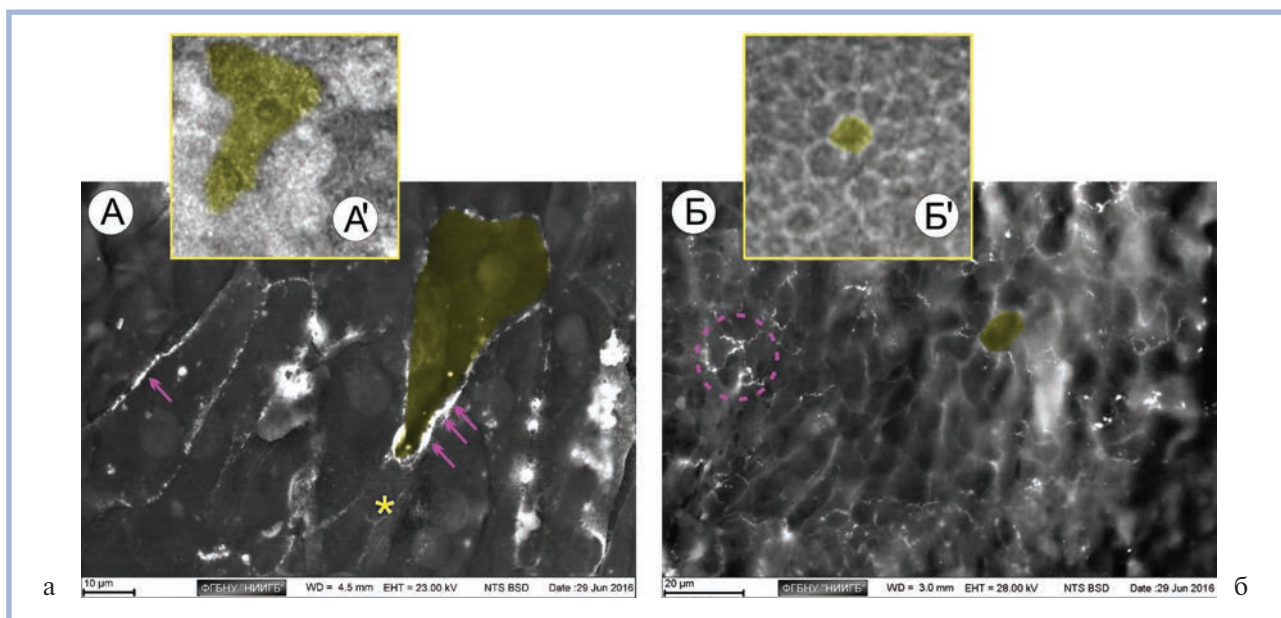
Кроме этого, существует возможность неспецифического связывания лантаноидов со структурными белками внеклеточного матрикса и, соответственно, его «подсвечивания» на СЭМ-изображениях [18].

Исходя из описанных теоретических предпосылок, изображения биоптатов роговичного эпителия, полученные в настоящем исследовании, можно интерпретировать следующим образом.

### *СЭМ «нормального» эпителия роговицы*

На сканограммах передней поверхности «нормального» роговичного эпителия контрастно выделяются границы между клетками, хорошо видна полигональная форма клеток десквамирующегося слоя (рис. 2, а). Весьма яркое свечение отдельных





**Рис. 2.** Изображения биоптата роговичного эпителия, не измененного какими-либо патологическими процессами, полученные на СЭМ (детектор BSE, лантаноидное контрастирование).

а — со стороны передней поверхности; б — со стороны базальной поверхности.

Границы между полигональными клетками контрастны. Отдельные яркие зоны межклеточных границ указывают на участки наибольшей концентрации кадгеринов, маркируя десмосомы, плотные и адгезионные контакты (указаны стрелками). Цитоплазма клеток замутнена, в ней видны ядра клеток, выделяются отдельные древовидные зоны (отмечено звездочкой), связанные с наиболее активно протекающими энергозависимыми процессами (сборка цитоскелета). Со стороны базальной мембраны выделяются локальные участки, в пределах которых границы между клетками заметно контрастней по сравнению с общим паттерном (выделено пунктиром). На соответствующих врезках — послойные оптические сечения, полученные посредством HRT II с роговичным модулем в пределах десквамирующегося (А') и базального (Б') слоев клеток. Для сравнения с СЭМ-изображениями отдельные клетки подсвечены желтым.

зон межклеточных границ показывает участки наибольшей концентрации кадгеринов и, таким образом, маркирует расположение десмосом, плотных и адгезионных контактов (указано стрелкой). Цитоплазма клеток умеренно замутнена, что говорит об активности протекавших в ней энергозависимых процессов с участием фосфат-аниона. Выделяются отдельные древовидные зоны (отмечено звездочкой), вероятно, связанные с преимущественными направлениями сборки цитоскелета. Сквозь замутненную цитоплазму видны ядра клеток. Можно отметить, что при таких условиях съемки обратное рассеяние электронов происходит не только в первом от поверхности слое клеток, но и на большей глубине, что визуально воспринимается как наложение «полупрозрачных» клеток друг на друга.

На базальной поверхности межклеточные контакты, содержащие кадгерин, светятся по всей протяженности границ клеток, что говорит о большей регулярности в их организации по отношению к переднему десквамирующемуся слою эпителия.

Черты строения роговичного эпителия, визуализируемые при применении методики лантаноидного контрастирования и СЭМ, хорошо согласуются с изображениями, получаемыми оптическими методами (выноска к рис. 2).

Базальная поверхность клеточного пласта прикрыта отделившейся вместе с образцом мембраной, которая полупрозрачна для электронов. Однако она

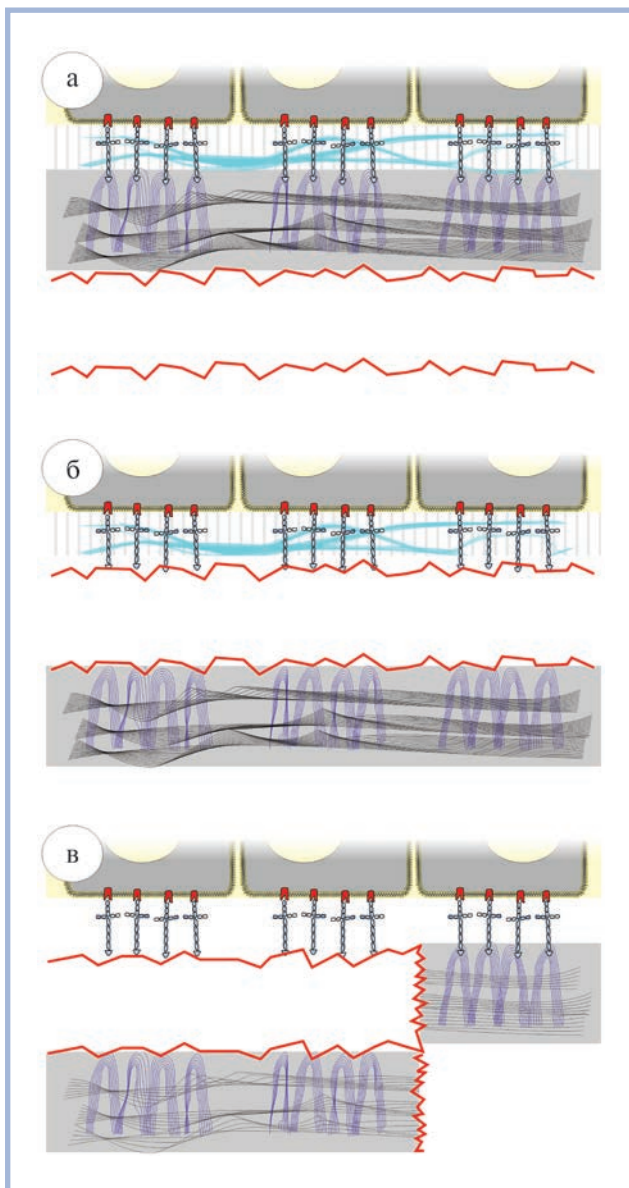
не в состоянии полностью погасить «свечение» межклеточных границ, а всего лишь делает паттерн изображения смазанным. Структуры базальной мембраны (включая плотную пластинку) сохранены на всей наблюдаемой поверхности, что подтверждается повсеместным «облачным» свечением, вероятно, происходящим из-за неспецифического связывания коллагенов с неодимом. Схема такого разделения слоев представлена на рис. 3, а.

Сквозь базальную мембрану (БМ) просвечивают размытые полигональные границы клеток. На отдельных участках границы клеток базального слоя приобретают четкую очерченность и выглядят заметно ярче (см. рис. 2, б). Это наблюдение может иметь два принципиально разных объяснения: либо в пределах этих зон БМ истончена, либо это результат связывания с неодимом «просочившихся» с передней поверхности эпителия молекул. При этом геометрия такой трансмембранной ультрафильтрации повторяет контуры клеточных границ по всей толщине БМ (рис. 4).

Подобное объяснение представляется весьма вероятным, учитывая наличие парацеллюлярного транспорта жидкости в эпителиальной ткани [19].

#### *СЭМ эпителия роговицы при буллезной кератопатии*

При БК СЭМ-изображения эпителиального пласта со стороны передней поверхности демон-

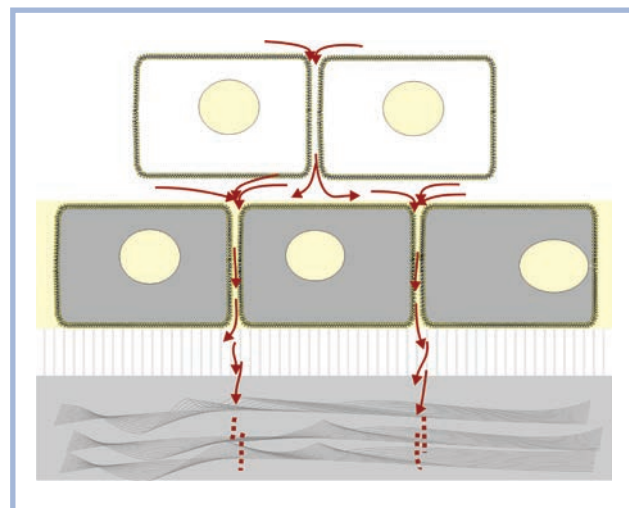


**Рис. 3.** Схема отделения эпителиального пласта при получении биоптата соскабливанием. Три варианта отделения пласта роговичного эпителия от подлежащих структур.

а — отделение вместе со структурами БМ (характерно для неизменной эпителиальной ткани); б — отделение совместно со структурами светлой пластинки и якорными филаментами (характерно для БК); в — отделение совместно с якорными филаментами без прочих структур светлой пластинки и фрагментарная сохранность структур плотной пластинки (характерно для РЭР). Условные обозначения на рис. 1, пояснения в тексте.

стрируют сохранную архитектуру ткани на большей части площади образца. Регулярные клеточные границы на участках поверхности, не затронутых изменениями, несколько менее контрастны по сравнению с контрастностью нормального эпителия, хотя причина этого не ясна.

В предполагаемых зонах расположения булл, в которых повышенное давление привело к избыточному растяжению клеточного пласта, очертания клеток выглядят значительно ярче. Видимые границы клеток на этих участках утолщены, имеются зия-



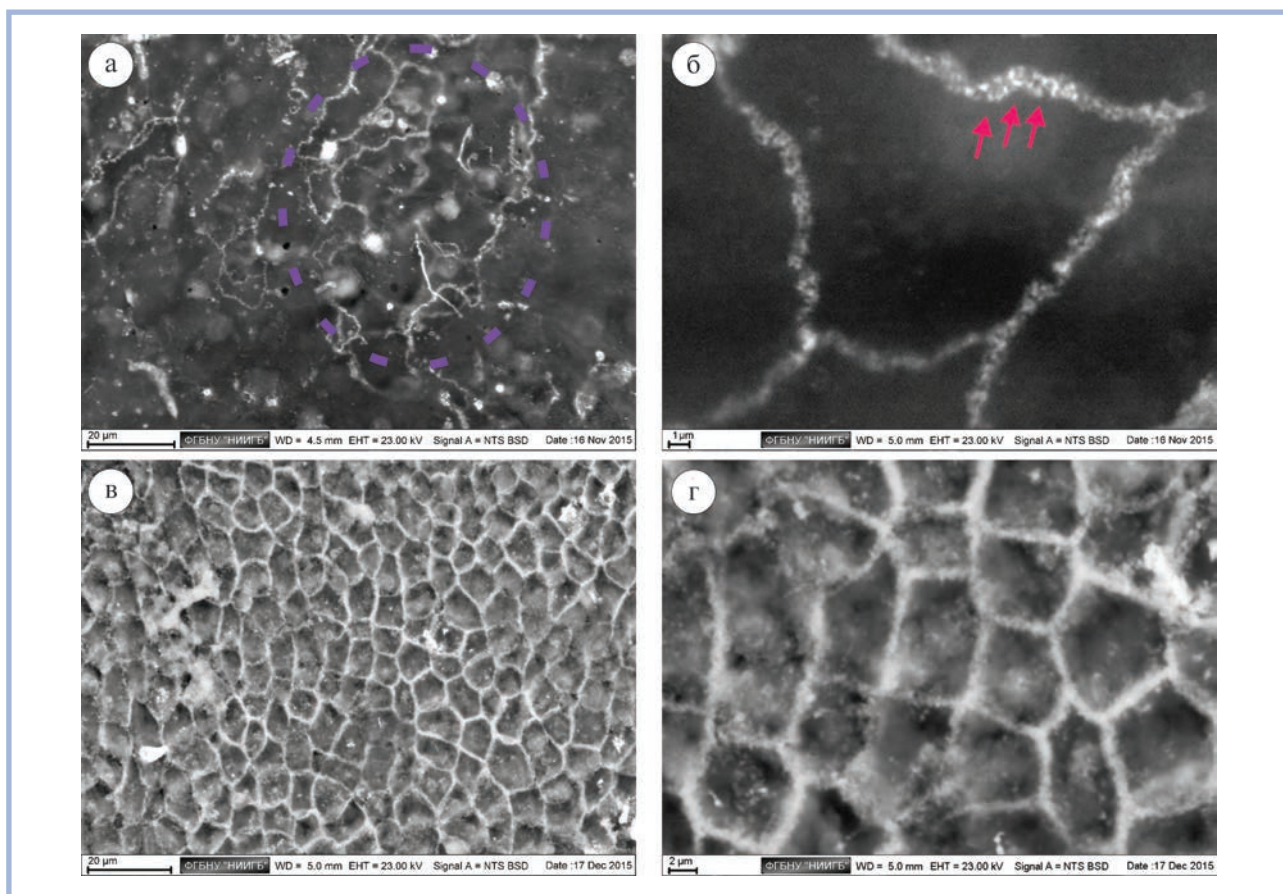
**Рис. 4.** Схема предполагаемого механизма формирования разрывов БМ по контурам базальных эпителиоцитов.

В результате транспорта протеиназ парацеллюлярным образом формируются зоны их повышенной концентрации в БМ, где разрушение коллагенов идет сильнее, что приводит к локальному снижению механической прочности мембраны.

ния межклеточного пространства, зазубренность линий контактов и разобщенность клеток (рис. 5, а). На изображении с большим увеличением отчетливо видно двойственное строение зоны десмосомы с небольшим разобщением ответных частей одного контакта, принадлежащего двум смежным клеткам (см. рис. 5, б).

Базальный слой при БК, как правило, не перекрыт более плотными структурами. Межклеточные границы четкие, яркие (см. рис. 5, в), что косвенно свидетельствует о том, что механическое взаимодействие клеток друг с другом в пределах базального слоя не нарушено. Большие увеличения на СЭМ позволяют выявить «ворсинчатый» характер поверхности клеток базального слоя (рис. 5, г), что вероятно обусловлено наличием молекулярных ансамблей ламинина-5 (якорных филаментов), прикрепленных к клеточной мембране. По отношению к цитоплазме эти молекулярные группы с характерным строением выглядят достаточно яркими, что связано с наличием в их структуре  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов, замещенных неодимом. Видимо, при соскабливании эпителия разделение произошло на границе светлой пластинки, причем с разрывом межмолекулярного контакта ламинин-коллаген-VII/коллаген-IV, так как молекулярные ансамбли ламинина-5 остались спаянными с клеткой. Возможность такого разделения иллюстрирует рис. 3, б. Это предположение согласуется с клиническими и морфологическими данными о формировании булл непосредственно под клеточным слоем, между ним и плотной пластинкой [11]. Представляется логичным, что при соскабливании эпителия при БК он снимается в зонах булл, включающих в себя в том числе и антиадгезивные вещества (тенасцин-С, фибриллин-1).





**Рис. 5.** Изображения биоптата роговичного эпителия при БК, полученные на СЭМ (детектор BSE, лантаноидное контрастирование). а — со стороны передней поверхности (булла показана пунктирной линией); б — со стороны передней поверхности с большим увеличением. Стрелками показан участок, где зона межклеточного контакта испытывает значительные растягивающие напряжения, обнаруживая диссоциацию адгезивных структурных элементов и их симметричное расположение. В этих зонах видны поперечные тяжи кадгеринов; в — вид со стороны БМ. Межклеточные границы четкие, яркие — механическое взаимодействие клеток друг с другом не нарушено; г — со стороны БМ с большим увеличением. «Ворсинчатый» характер поверхности клеток за счет наличия на ней якорных филаментов.

#### *СЭМ эпителия роговицы при рецидивирующей эрозии роговицы*

При РЭР изменения в структуре роговичного эпителия были выявлены по всей поверхности. На изображениях видны характерные ландшафтообразные и фестончатые границы клеток (рис. 6, а, б). Отмечается повсеместная пятнистость передней поверхности, подчеркивающая неравномерность накопления Nd в структуре ткани, что может быть обусловлено тем, что секрет, покрывающий поверхность клеток, разрежен за счет высокой концентрации протеолитических ферментов. Можно наблюдать контрастированные ядра клеток в разреженной цитоплазме. На отдельных участках структура передней поверхности становится рыхлой, межклеточные контакты не визуализируются, а группы клеток образуют десквамирующиеся пласты. При слушивании крупных групп клеток обнаруживаются волокнистые мотивы в структуре основного вещества эпителиальной ткани, не характерные для «нормального» эпителия (см. рис. 6, в). Участки, где под поверхностным слоем обнажается слой, распо-

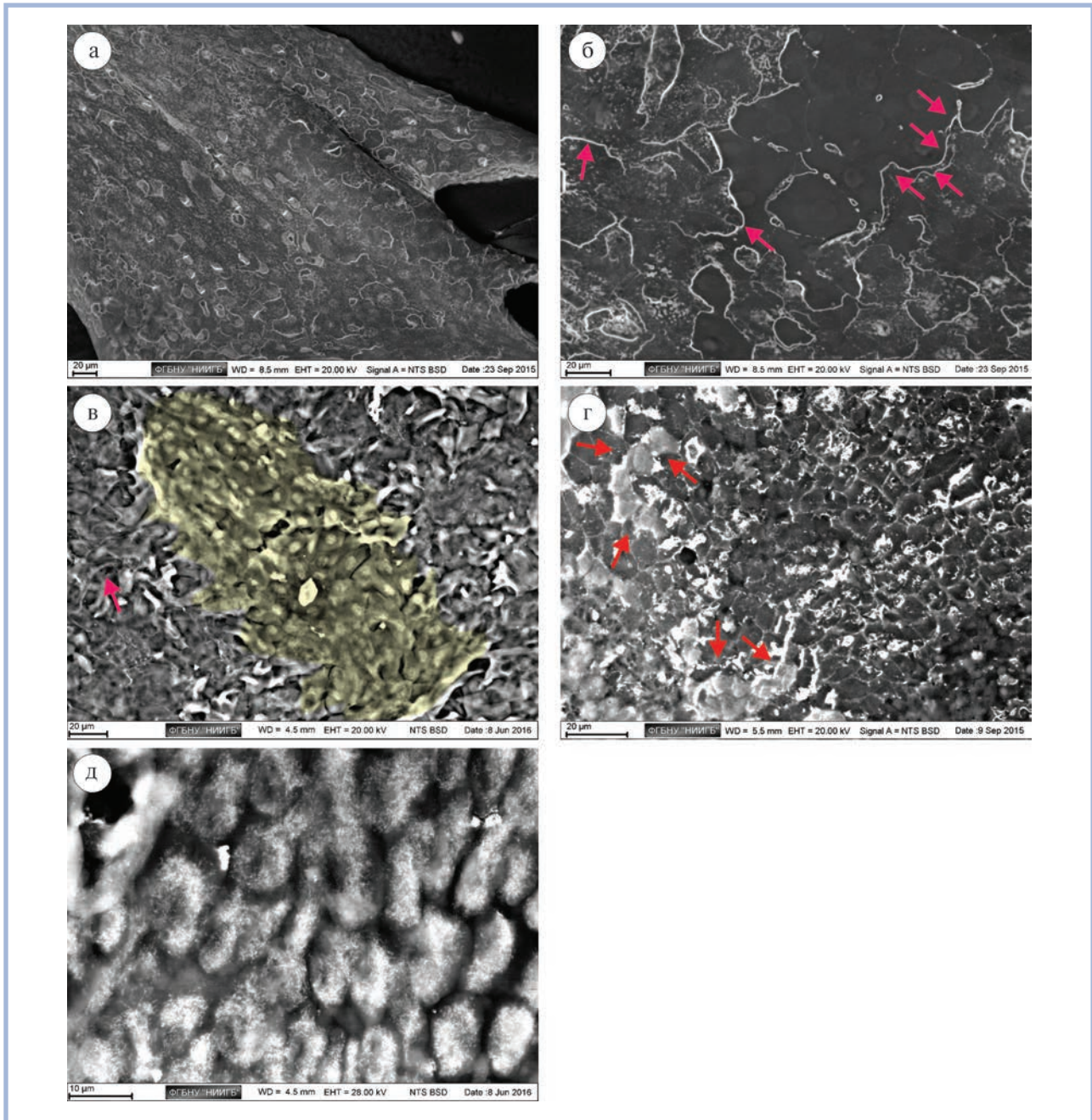
ложенный глубже, демонстрируют, что подобные изменения практически не затрагивают средние слои — взаиморасположение клеток подлежащего слоя близко к нормальному. Видимо, жизнеспособность клеток поверхностного слоя при РЭР снижена настолько значительно, что через поры в мембране внутренняя структура клеток контрастируется пассивно, а в тех случаях, когда целостность мембраны не нарушена, можно наблюдать цитоплазму, практически прозрачную для электронов. Ее темный фототон, без рассеяния электронов на каких-либо объектах внутри клеток, позволяет говорить о низком уровне протекавших энергозависимых процессов. В литературе также встречаются описания многочисленных отклонений в морфологии клеток роговичного эпителия при РЭР (многоядерность, сильная вариабельность размеров, кисты, вакуоли, слушивание) [20].

Со стороны базального слоя отмечаются зоны с отсутствием контрастирования неодимом межклеточных границ. Как видно на изображении (см. рис. 6, г), отделение эпителиального пласта от БМ при соскабливании происходит преимущественно без

плотной ее части, хотя в некоторых случаях клеточный пласт оказался частично прикрыт веществом БМ в пределах своих контуров. На этих участках структура клеток под БМ плохо визуализировалась за счет наложения относительно яркого слоя коллагеновых волокон. Очевидно, в этой зоне отделение эпителиального пласта произошло с захватом плотной пластинки и входящих в ее состав коллагенов.

Известно, что при РЭР наблюдается избыток ММП-2 [8], который приводит к деструкции коллагена IV — основного вещества БМ, что и может приводить к ее «размягчению».

Для того чтобы базальный слой клеток был покрыт отделившимся веществом плотной пластинки только на отдельных участках, при тракции должны были сформироваться поперечные разрывы веще-



**Рис. 6.** Изображение биоптата роговичного эпителия при РЭР, полученное на СЭМ (детектор VSE, лантаноидное контрастирование).

а — со стороны передней поверхности, повсеместная пятнистость передней поверхности; возможно, это обусловлено разреженностью секрета, покрывающего клетки, за счет высокой концентрации протеолитических ферментов; б — участок детализации передней поверхности с ландшафтообразными мотивами в структуре ткани (аномальные фестончатые границы клеток показаны стрелками), контрастированные ядра клеток в разреженной цитоплазме; в — участок детализации передней поверхности с десквамирующимся пластом (подсвечен желтым) и волокнами в структуре основного вещества эпителия (показаны стрелкой); г — со стороны БМ. Относительно равномерно яркими выглядят клетки, прикрытые плотным веществом БМ (показаны стрелкой), другие участки отделились без плотной пластинки; д — участок, снятый со стороны БМ с высоким разрешением. «Ворсинчатый» характер поверхности клеток за счет наличия на ней якорных филаментов.



ства плотной пластинки, позволяющие частично оторгнуть ее, а частично оставить спаянной со структурами эпителия. Наиболее парадоксальное наблюдение связано с тем, что в большинстве случаев такое разделение коллагенового пласта плотной пластинки происходило по границам, согласующимся с границами вышележащих клеток базального слоя эпителия (см. рис. 6, г). Схема процесса показана на рис. 3, в. Механизм этого явления можно связать с просачиванием по межклеточному пространству в эпителии протеолитических ферментов, патологически повышенная концентрация которых описана [8]. В этом случае создается фокус концентрации ММП, что и приводит к ослаблению части БМ непосредственно под клеточными границами базального слоя эпителия. Это хорошо согласуется с предположительной схемой внутритканевого транспорта (см. рис. 4).

В тех местах, где произошло отделение БМ по светлой пластинке (см. рис. 3, в), для наблюдения доступна «ворсинчатая структура» эпителиоцитов (см. рис. 6, д). Яркость фибриллярных белковых структур (предположительно ламинина-5) на изображении определяется не только изоморфным замещением кальция, но и самой нитчатой формой. Исходя из сохранности молекулярных ансамблей якорных белков, можно предположить, что слабое сцепление с плотной пластинкой в этом случае обусловлено несостоятельностью якорных фибрилл коллагена VII [8].

## ЛИТЕРАТУРА

- Mannis MJ, Holland EJ. *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management*. Springer Science & Business Media; 2006:59-62.
- Труфанов С.В., Маложен С.А., Полунина Е.Г., Пивин Е.А., Текеева Л.Ю. Синдром рецидивирующей эрозии роговицы (обзор). *Офтальмология*. 2015;12(2):4-12.
- Heyworth P, Morlet N, Rayner S, Hykin P, Dart J. Natural history of recurrent erosion syndrome — a 4 year review of 117 patients. *Br J Ophthalmol*. 1998;82:26-28.
- Reidy JJ, Paulus MP, Gona S. Recurrent erosions of the cornea: epidemiology and treatment. *Cornea*. 2000;19:767-771. doi:10.1016/S0002-9394(01)00884-4
- Mencucci R, Paladini I, Brahimi B, Menchini U, Dua HS, Romagnoli P. Alcohol delamination in the treatment of recurrent corneal erosion: an electron microscopic study. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(7):933-939. doi:10.1136/bjo.2009.174409
- Pal-Ghosh S, Blanco T, Tadvalkar G, Pajoohesh-Ganji A, Parthasarathy A, Zieske JD et al. MMP9 cleavage of the  $\beta 4$  integrin ectodomain leads to recurrent epithelial erosions in mice. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 15):2666-2675. doi:10.1242/jcs.085480
- Oliver VF, van Bysterveldt KA, Cadzow M, Steger B, Romano V, Markie D et al. A COL17A1 Splice-Altering Mutation Is Prevalent in Inherited Recurrent Corneal Erosions. *Ophthalmology*. 2016;123(4):709-722. doi:10.1016/j.ophtha.2015.12.008
- Garrana RM, Zieske JD, Assouline M, Gipson IK. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(6):1266-1270.
- Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(6):997-1007.
- Savage J, Sheth S, Leys A, Nicholson A, Mack HG, Colville D. Ocular features in Alport syndrome: pathogenesis and clinical significance. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(4):703-799. doi:10.2215/CJN.10581014
- Akhtar S, Bron A, Hawksworth N, Bonshek R, Meek K. Ultrastructural morphology and expression of proteoglycans,  $\beta$ 1-h3, tenascin-C, fibrillin-1, and fibronectin in bullous keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(6):720-731. doi:10.1136/bjo.85.6.720

## Выводы

1. Лантаноидное контрастирование биоптатов эпителиального слоя роговицы для проведения СЭМ позволяет визуализировать особенности строения эпителиальной ткани при различных патологических состояниях.

2. На основе механизма Ca/Nd изоморфизма можно оценить структурную позицию большинства белковых молекул, участвующих в Ca-зависимых процессах, формирующих клеточную адгезию.

3. На основании данных о распределении неодима в структуре базальной мембраны описан механизм локального воздействия веществ на плотную пластинку в проекции клеточных границ базального слоя, возникающий при однонаправленной ультрафильтрации.

4. Полученные результаты подтверждают данные о несостоятельности якорного комплекса адгезии при развитии РЭР.

### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: И.Н., А.С.

Сбор и обработка материала: С.Т., И.Н., А.С.

Статистическая обработка: И.Н.

Написание текста: С.А., И.Н., А.С.

Редактирование: С.А., А.Ф.

### Конфликт интересов отсутствует.

- Toricelli AAM, Singh V, Santhiago MR, Wilson SE. The Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function, and Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(9):6390. doi:10.1167/iovs.13-12547
- Новиков И.А., Суббот А.М., Федоров А.А., Грибоедова И.Г., Антонов Е.Н., Вахрушев И.В. Суправитальное контрастирование лантаноидами для визуализации структуры биологических образцов на сканирующем электронном микроскопе. *Гены и клетки*. 2015;10(2):90-96.
- Novikov IA, Subbot AM, Kiryushchenkova NP, Nesterova TV, Gabashvili AN, Sitnikov AV, и др. Fast and easy method of lanthanoid staining for visualization of cellular ultrastructure and spatial arrangement. В: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing; 2016 с. 20009. <http://scitation.aip.org/content/aip/proceeding/aipcp/10.1063/1.4954343;jsessionid=kbwfkzGp96qMxc-Ro31dkHwy.x-aip-live-02>
- Ferreira-Gomes MS, González-Lebrero RM, de la Fuente MC, Strehler EE, Rossi RC, Rossi JPFC. Calcium occlusion in plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32018-32025. doi:10.1074/jbc.M111.266650
- Cailliez F, Lavery R. Cadherin Mechanics and Complexation: The Importance of Calcium Binding. *Biophys J*. 2005;89(6):3895-3903. doi:10.1529/biophysj.105.067322
- Burton PR, Fernandez HL. Delineation by Lanthanum Staining of Filamentous Elements Associated with the Surfaces of Axonal Microtubules. *Journal of Cell Science*. 1973;12(2):567-583.
- Evans CH. *Biochemistry of the Lanthanides*. Springer Science & Business Media; 2013.
- Rubashkin A, Iserovich P, Hernández JA, Fischbarg J. Epithelial fluid transport: protruding macromolecules and space charges can bring about electro-osmotic coupling at the tight junctions. *J Membr Biol*. 2005;208(3):251-263. doi:10.1007/s00232-005-0831-y
- Aitken DA, Beirouty ZA, Lee WR. Ultrastructural study of the corneal epithelium in the recurrent erosion syndrome. *Br J Ophthalmol*. 1995;79(3):282-289.

Поступила 16.09.2016