

УДК 57.085.2

БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЯ ТРАБЕКУЛЯРНОЙ ТКАНИ ПРИ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ

© 2020 г. М. В. Кравчик^{1,*}, А. М. Суббот¹, И. А. Новиков¹,
А. А. Антонов¹, С. Ю. Петров¹, академик РАН С. Э. Аветисов¹

Поступило 17.08.2020 г.
После доработки 25.08.2020 г.
Принято к публикации 26.08.2020 г.

Выделен тип открытоугольной глаукомы, при котором кальциевая и кремниевая облитерация является потенциально значимым компонентом ретенции на уровне трабекулярной ткани. Отмечено, что минеральной облитерации данной области способствуют различные нарушения кислотно-основного баланса ткани. Рассмотрена роль меланосомальных ферментов в инициации образования минерального фосфата кальция при открытоугольной глаукоме.

Ключевые слова: открытоугольная глаукома, биоминерализация, энергодисперсионная спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S2686738920060128

ВВЕДЕНИЕ

Изменения, происходящие при глаукоме, приводят к необратимой слепоте, а само заболевание занимает одно из первых мест среди всех причин снижений зрения человека. В нашем исследовании изучена происходящая при глаукоме эктопическая минерализация дренажной зоны, которая до текущего момента прямыми методами не обнаруживалась. Идентификация минерального вещества проводилась при изучении тканей в максимально нативном состоянии, что исключило грубое изменение химического состава на этапе пробоподготовки образца к анализу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В клиническую группу вошли: 29 пациентов (30 глаз), медиана по возрасту составила 73 года (Q25 = 58; Q75 = 78), из них: первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) II стадия – 8 пациентов (8 глаз); ПОУГ III стадия – 20 пациентов (21 глаз), сочетанная врожденная глаукома на фоне аниридии, III стадия – 1 пациент (1 глаз). От пациентов было получено информированное согласие на проведение исследований. Пациентам проводили стандартное офтальмологическое обследование. Стадию глаукомы оценивали по классификации А.П. Нестерова. Образцы наружной части трабекулы получали в ходе антиглау-

комной операции (непроникающей глубокой склерэктомии). Пробоподготовку к анализу в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) проводили с использованием щадящей по отношению к минеральному веществу методике, исключающей экспозицию в растворах глутарового альдегида и этанола. Образцы клинического материала размещали на поверхности химически чистой углеродной ленты и помещали в камеру СЭМ для визуального и химического анализа в режиме низкого вакуума (ЕР, 70 Па).

В рамках экспериментального этапа изучали химический состав пигмента радужки 5 кадаверных глаз. В стерильных условиях бокса Ламинар-С, NEOTERIC (ламинарные системы, РФ) вырезали диск радужки, промывали в PBS (рН 7.4) с добавлением антибиотика-антимикотика и помещали в пробирку с 8 мл сбалансированного р-ра Хэнкса (HBSS) без двухвалентных ионов. Дезагрегировали образец встряхиванием на вортекс-миксере (10 мин), затем пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм (“СПЛ ЛайфСайенс Ко., ЛтД”, Корея) для удаления клеточных элементов и больших агрегатов. Очищенную суспензию меланосомальных гранул разделяли на 2 части (опыт и контроль) и центрифугировали на скорости 2000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Elmi; ELMILtd., Латвия), супернатант удаляли. Контрольные образцы ресуспендировали в D-MEM, опытные – в D-MEM с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone), затем рассеивали в культуральные чашки Петри диаметром 35 мм и инкубировали во влажной ат-

¹ ФГБНУ “НИИ глазных болезней”, Москва, Россия
*e-mail: kravchik.mv@gmail.com

мосфере при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. Далее чашки промывали дистиллированной водой, на дне при этом визуальнo отмечали наличие окрашенного осадка. После сушки на воздухе в течение 1 ч дно чашки помещали в камеру СЭМ для визуального и химического анализа.

Ткань трабекулы и пигмент были исследованы на СЭМ EVO LS 10 (Zeiss, Германия), снабженным энергодисперсионным спектрометром (ЭДС) Oxford X-Max-50 (Oxford, Великобритания). Поверхность образцов визуализирована с помощью детектора обратно-рассеянных электронов (BSE) при ускоряющем напряжении 21.5 кВ и токе на образце 420 пА. Химическое микрокартирование проведено при помощи ЭДС с использованием силы тока на образце 490–520 пА для выборочных химических элементов: С, N, O, Ca, Cl, Na, P, Si, S.

Учитывая специфику ЭДС-анализа нативных биологических объектов на электронном микроскопе, который сопровождается утратой летучих компонентов, дегидратацией и разрушением структуры в процессе анализа, этот метод нельзя считать неразрушающим. По этой причине измерения проводились единожды для предварительно выбранного оптимального участка каждого образца.

Неоднородная поверхность анализируемых фрагментов, а также невозможность создания эталонов для биологической матрицы, позволяют характеризовать метрологический класс анализа как “качественный”, вследствие чего реальная погрешность анализа заведомо выше аппаратной погрешности прибора, вычисляемой в процессе измерений для каждого из анализируемых элементов. Таким образом, приводить аппаратную погрешность не представляется целесообразным.

Принимая во внимание близость регистрируемых значений к пределу обнаружения детектором и качественный метрологический класс анализа, распределение каждого оцениваемого параметра по умолчанию не относили к нормальному закону. Исходя из этого, для оценки групп использовали следующие величины описательной статистики: средние данные приводили в виде медианы (Me), дополняя ее в некоторых случаях интерквартильным размахом (Q25; Q75).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На СЭМ в 22 образцах трабекулы из 30 единственным детектируемым патологическим материалом оказывались серосодержащие агрегаты пигментных гранул, занимающие значимую площадь. В 1 образце с отсутствием пигментных гранул (врожденная глаукома, сочетанная с аниридией) скоплений серосодержащих веществ не наблюдалось, что дополнительно указывает на

связь S с выщелачиваемым из ткани радужки пигментом.

При подготовке к визуализации 7 образцов из 30 была выявлена облитерация ткани трабекулы минеральным веществом, при извлечении представляющим собой микроскопические блоки однородной рассыпчатой массы бежевого цвета.

В 3 образцах с выраженной минерализацией на ЭДС обнаружено увеличение доли Si. По данным валового химического анализа, на поверхности образцов медиана C(Si) = 0.06 вес. % с максимумом C(Si) = 0.1 вес. %. При этом в остальных 27 образцах изучаемой группы концентрация Si была ниже порога обнаружения. Микрокартирование поверхности трабекулярной ткани выявило очаги совместной импрегнации трабекулярных пластин гранулами пигмента и аморфным кремнеземом, а также пространственную связь между участками с повышенным содержанием Si и областями, через которые в норме осуществляется фильтрация внутриглазной жидкости.

В 4 образцах с выраженной минерализацией обнаружено аномально высокое содержание P и Ca. На поверхности таких образцов медиана C(P) = 0.46 вес. %, медиана C(Ca) = 0.1 вес. %. При этом в неминерализованных образцах медиана C(P) = 0.11 вес. %, а концентрация Ca была ниже порога обнаружения. Отчетливой пространственной связи между распределением фосфата кальция и фильтрующими областями установлено не было.

На основании потенциальной возможности патологических минеральных и органических сернистых веществ физической вызвать ретенцию, обусловленную занимаемой ими площадью, все анализируемые случаи были разделены на группы, соответствующие типу идентифицированного вещества:

- 1) глаукома с накоплением серосодержащих веществ (рис. 1а);
- 2) минеральная глаукома с силитизацией трабекулы (рис. 1б);
- 3) минеральная глаукома с кальцификацией трабекулы (рис. 1в).

В эксперименте отмечено, что в опытных образцах, подвергшихся экспозиции FBS, пигментные гранулы окружены фосфатно-кальциевой оболочкой. C(Ca) на анализируемой площади распределялась в диапазоне 0.01 вес. %–0.06 вес. % при медиане C(Ca) = 0.04 вес. %. В контрольных образцах, C(Ca) на анализируемой площади оказывалась ниже типичного предела обнаружения в ЭДС-детекторе (0.01 вес. %).

В результате анализа локальных атомных замеров с опытных образцов (рис. 1г) обнаружено, что P/Ca ≈ 0.96, чему соответствуют две формы фосфата: CaHPO₄ · 2H₂O – дикальциевый фосфат ди-

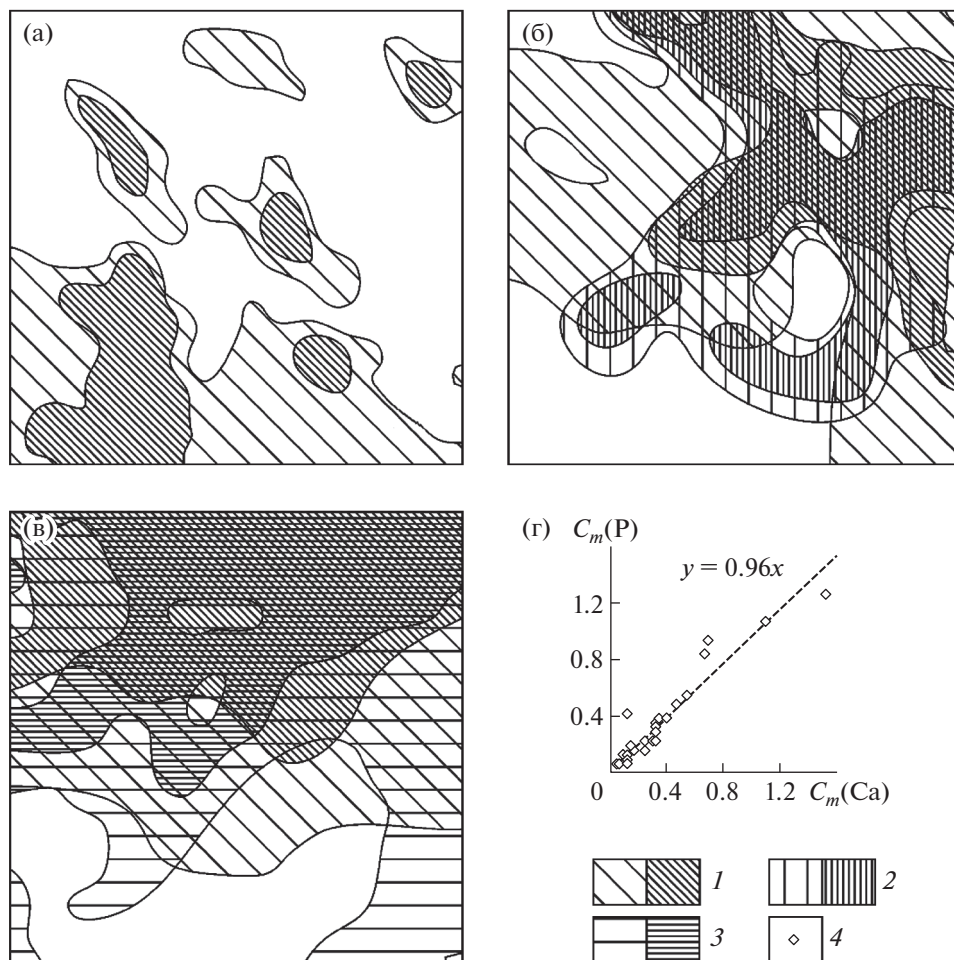


Рис. 1. Схема минерализации образцов тканей наружной части трабекулы пациентов с открытоугольной глаукомой по данным ЭДС. а–в: карта распределения химических веществ на наружной части трабекулы для: а – образцов с накоплением серосодержащих веществ; б – силицизованных образцов; в – кальцифицированных образцов (1 – сигнал S; 2 – сигнал Si; 3 – сигнал Ca; плотность штриховки соотносится с интенсивностью сигнала; г – отношение P к Ca на поверхности гранул пигмента (4 – количество вещества S и P для одиночного спектра поверхности гранул пигмента).

гидрат (ДКФД) и $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot z\text{H}_2\text{O}$ – аморфный фосфат кальция (АФК).

ОБСУЖДЕНИЕ

Существуют единичные данные об идентификации Si в ткани человека [1], что связано с химической инертностью и низкой растворимостью в воде, вследствие чего элемент непригоден к широкому использованию в биологических системах. Аккумуляция Si потенциально может происходить на мембране в зоне постоянного и длительно существующего градиента pH. Таким образом, накопление Si свидетельствует о продолжительном локальном дисбалансе pH ткани биологической системы.

ДКФД часто обнаруживают при патологической кальцификации [2]. При физиологическом pH ДКФД является метастабильной фазой по от-

ношению к октакальцию фосфату (ОКФ). Однако отмечается, что переход ДКФД в ОКФ в растворе D-МЕМ происходит только по прошествии суток [3]. Стехиометрия АФК во многом зависит от условий осаждения, и при pH 6.6 соотношение Ca/P = 1.18 [4]. В целом, АФК также является метастабильной фазой, но в условиях *in vivo* может существовать в течение значительного времени [5].

Таким образом, в биологических системах возможно образование идентифицируемых в нашем исследовании веществ, что подтверждается литературными данными.

Кальцинация пигментных гранул может свидетельствовать о длительном изменении pH на их поверхности. Допустимо предположить, что способностью поддерживать определенное значение pH может обладать только функционирующая органелла, при создании определенных виталь-

ных условий – в нашем случае это достигалось при добавлении FBS. На мембране, выделенной из клетки меланосомы, длительное время идет энергетический процесс расщепления аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) до аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и неорганического фосфора (Pi). Данный процесс обеспечивается деятельностью фермента V-типе H + ATPase [6], при работе которого протоны попадают внутрь меланосомы. При этом на ее наружной поверхности достигается относительно щелочная среда. Таким образом, на поверхности меланосомы может происходить как накопление Pi, так и образование относительно щелочной реакции, что в совокупности способствует осаждению фосфата кальция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологические изменения в ткани дренажной зоны глаза, происходящие при ПОУГ, в определенных случаях проявляются выраженной минерализацией (кальцификацией и силицизацией) наружной части трабекулы. Минерализацию может провоцировать локальный дисбаланс кислотно-основной реакции среды в передней камере. Для силицизации для этого требуется создание зоны постоянного и длительно существующего

градиента pH. Субтотальную кальцификацию, в свою очередь, могут инициировать фермент-зависимые процессы, происходящие на поверхности гранул пигмента, что продемонстрировано в эксперименте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Figueroa M.P., Lihón J.S.* Autofluorescent chalcedony in human brains from elderly patients. *Biotechnic & Histochemistry*. 2010; 85 (3): 171–176.
2. *LeGeros R.* Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. *Zeitschrift für Kardiologie*. 2001; 90 (3): 116–124.
3. *Mandel S., Tas A.C.* Brushite (CaHPO₄·2H₂O) to octacalcium phosphate (Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄·5H₂O) transformation in DMEM solutions at 36.5 C. *Materials Science and Engineering: C*. 2010; 30 (2): 245–254.
4. *Dorozhkin S.V., Eppe M.* Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*. 2002; 41 (17): 3130–3146.
5. *Wang L., Nancollas G.H.* Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical reviews*. 2008; 108 (11): 4628–4669.
6. *Pelkonen L., Reinisalo M., Morin-Picardat E., et al.* Isolation of intact and functional melanosomes from the retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0160352.

BIOMINERALIZATION OF TRABECULAR MESHWORK IN OPEN-ANGLE GLAUCOMA

M. V. Kravchik^{a,#}, A. M. Subbot^a, I. A. Novikov^a, A. A. Antonov^a,
S. Yu. Petrov^a, and Academician of the RAS S. E. Avetisov^a

^a *Scientific Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: kravchik.mv@gmail.com*

A new form of open-angle glaucoma has been identified, in which calcification and silicification of trabecular meshwork is a potentially significant component of outflow obstruction. It is noted that the mineralization of this area occurs due to violations of the acid-base balance of the tissue. The role of melanosomal enzymes in the initiation of the formation of mineral calcium phosphate in trabecular tissue in open-angle glaucoma is considered.

Keywords: open-angle glaucoma, biomineralization, energy-dispersive X-ray spectroscopy, scanning electron microscopy