

Диагностический потенциал электронно-микроскопического анализа слезной жидкости человека

А.Е. Григорьева¹, А.В. Еремина², И.Б. Дружинин², Д.В. Черных², Е.В. Варваринский²,
Е.И. Рябчикова¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

² Новосибирский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

РЕФЕРАТ

Цель. Оценить возможность применения электронно-микроскопического анализа слезной жидкости (СЖ) человека при разработке методов ранней диагностики и прогноза офтальмологических заболеваний.

Материал и методы. Образцы рефлекторной СЖ, собранные из нижнего конъюнктивального свода глаза в пробирку у 20 пациентов с диагнозом диабетическая ретинопатия, гиперметропия, глаукома, катаракта и макулодистрофия, осаждали центрифугированием. Жидкую часть СЖ исследовали методом негативного контрастирования, осадки – методом ультратонких срезов в электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония).

Результаты. Жидкая часть СЖ содержит макромолекулярные агрегаты, микрочастицы и экзосомы, количество и морфо-

логия которых различаются в зависимости от заболевания. В осадках СЖ выявляются волокнистый матрикс, эпителиоциты, полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты, клеточный детрит, а также небольшие округлые везикулы (150-300 нм), несущие на поверхности белковые «нити», проникающие внутрь. Клеточный состав осадков СЖ варьирует в зависимости от заболевания органа зрения.

Заключение. Выявление очевидных различий в содержании и морфологии структурных компонентов СЖ свидетельствует о высоком диагностическом потенциале СЖ и перспективности поиска ультраструктурных диагностических и прогностических маркеров офтальмологических заболеваний.

Ключевые слова: слезная жидкость, электронная микроскопия, микрочастицы, экзосомы, офтальмологические заболевания. ■

Офтальмохирургия.– 2013.– № 4.– С. 104-107.

ABSTRACT

Diagnostic potential of the electron microscopic analysis of human lacrimal fluid

A.E. Grigoryeva¹, A.V. Eremina², I.B. Druzhinin², D.V. Chernykh², E.V. Varvarinsky², E.I. Ryabchikova¹

¹ The Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;

² The Novosibirsk Branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk

Purpose. To evaluate the possibility of application of electron microscopic analysis of human lacrimal fluid (LF) in the development of methods for early diagnosis and prognosis of ophthalmic diseases.

Material and methods. Specimens of the reflex LF were collected from the lower conjunctival arch of eyes in 20 patients with a diagnosis of diabetic retinopathy, hyperopia, glaucoma, cataract and macular degeneration, and pelleted by centrifugation. The liquid portion of LF was examined by the negative staining method, and the pellets were processed by the ultrathin sectioning method, and the sections were studied in the electron microscope JEM-1400 (JEOL, Japan).

Results. The liquid portion of LF contained macromolecular aggregates, microparticles and exosomes, the number and

morphology of which varied depending on the eye disease. Ultrathin sections of the LF pellets showed fibrous matrix, epithelial cells, lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes, cell debris, and small roundish vesicles (150-300 nm) on the surface bearing the protein «filaments» penetrating inside. The cellular composition of LF pellets varied depending on the disease of eye.

Conclusions. Identification of the obvious differences in the content and morphology of the structural components of the LF indicates a high diagnostic potential of the LF. Electron microscopy of LF looks promising for a search of ultrastructural diagnostic and prognostic markers of ophthalmic diseases.

Key words: lacrimal fluid, electron microscopy, microparticles, exosomes, ophthalmologic diseases. ■

Ophthalmosurgery.– 2013.– No. 4.– P. 104-107.

Современная цивилизация становится все более компьютеризированной, что неизбежно ведёт к возрастанию нагрузок на орган зрения человека и, соответственно, к увеличе-

нию частоты офтальмологических заболеваний, приводящих к потере трудоспособности и снижению качества жизни. Значительно уменьшить риск потери зрения позволяет ранняя ди-

агностика офтальмологических заболеваний, разработка методов которой является крайне актуальной задачей [9, 14, 23]. Важнейшим элементом эффективных диагностических методов

является доступный для анализа субстрат, адекватно отражающий состояние исследуемой системы. При офтальмологических заболеваниях таким субстратом может быть слезная жидкость (СЖ) – постоянная микросреда переднего отдела глаза, участвующая в метаболических процессах глазного яблока и орбиты. 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 [5, 12, 15, 23].

Состав СЖ изменяется при офтальмологических и ряде системных заболеваний [20, 21, 23], изменения слезной пленки связывают с сухостью глаз, – распространенным нарушением зрения [8, 10, 12].

Анализ научной литературы показал высокую информативность исследований физико-химических, биохимических, иммунологических параметров СЖ для понимания патогенеза многих офтальмологических заболеваний. Первые работы по изучению иммунобиохимических показателей в СЖ начали проводиться в конце 90-х гг. прошлого столетия и успешно развиваются в настоящее время. Авторами научных публикаций установлены активность процессов перекисного окисления липидов, дисбаланс содержания цитокинов, факторов роста, активация синтеза специфических антител, появление биохимических маркеров воспа-

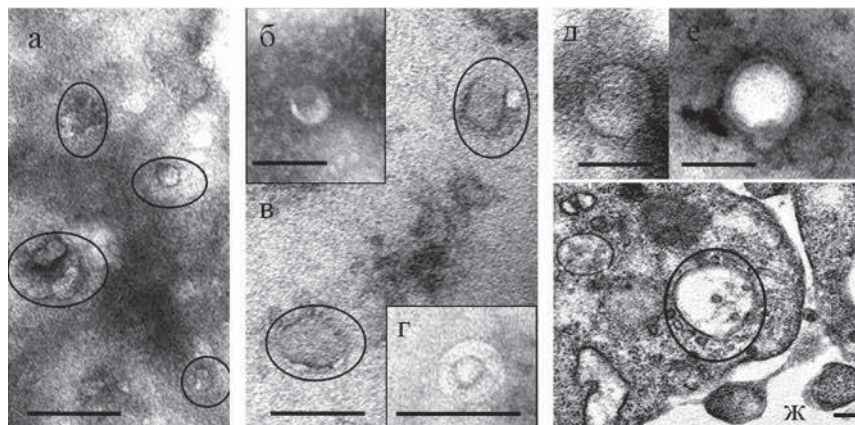


Рис. 1. Микрочастицы (МЧ) в слезной жидкости (СЖ) человека, выявление методом негативного контрастирования: а) общий вид препарата (овалом выделены МЧ); б-е) экзосомоподобные частицы; г) МЧ с «капсулой»; ж) участок клетки (ультратонкий срез), овалом выделено мультивезикулярное тельце, содержащее экзосомы.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

ления и деструкции в слезной жидкости при многих офтальмологических заболеваниях, таких как глаукома, диабетическая ретинопатия, увеиты и др. [1-5, 17, 18]. Таким образом, СЖ предстает в качестве универсального индикатора нарушения обменных процессов при патологических состояниях органа зрения [20].

Однако публикации, посвященные изучению СЖ, отражают результаты иммунологических и биохимических исследований, морфологическое изучение слезной жидкости не проводилось.

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 являет-

ся анализ в биологических жидкостях микрочастиц, передающих сигналы от клетки к клетке, в том числе экзосом. Микрочастицы и экзосомы формируются всеми клетками организма и несут многочисленные маркеры, в том числе маркеры многих заболеваний [13, 16, 22]. Следует подчеркнуть, что экзосомы и микрочастицы СЖ не исследованы, до сих пор не опубликовано прямых доказательств их присутствия в СЖ.

ЦЕЛЬ

Мы провели электронно-микроскопическое изучение СЖ с целью выявления и характеристики её структурных компонентов, включая микрочастицы и экзосомы, и оценки пригодности СЖ для диагностики офтальмологических заболеваний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы слезной жидкости

Пробы рефлекторной СЖ были собраны у пациентов с диагнозом диабетической ретинопатии (8 случаев), у пациентов с гиперметропией (2 случая), у пациентов с глаукомой (5 случаев), у пациентов с катарактой (4 случая) и у пациента с макулодистрофией (1 случай).

Забор слезы проводили из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку в количестве 0,3-0,4 мл, как было описано ранее [5, 6]. Было получено информ-

Для корреспонденции:

Григорьева Алина Евгеньевна, аспирант;

Рябчикова Елена Ивановна, докт. биол. наук, профессор, руководитель группы микроскопических исследований

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Адрес: 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8

Тел.: (383) 363-5163, факс: (383) 363-5153

E-mail: feabelit@mail.ru

Еремينا Алена Викторовна, врач-офтальмолог;

Дружинин Игорь Борисович, канд. мед. наук, врач-офтальмолог;

Черных Дмитрий Валерьевич, врач-офтальмолог;

Варваринский Егор Викторович, врач-офтальмолог

Новосибирский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Адрес: 630096, Новосибирск, ул. Колхидская, 10

Тел.: (383) 341-5540. E-mail: sci@mntk.nsk.ru

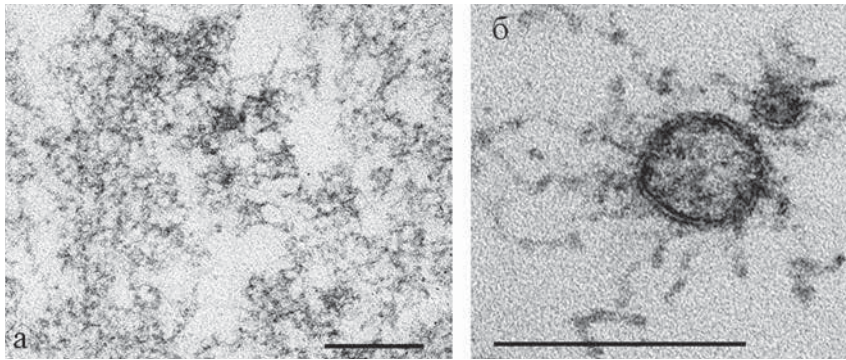


Рис. 2. Ультратонкие срезы осадка слезной жидкости: а) волокнистый матрикс; б) везикула, несущая на поверхности нити белок. Длина масштабной линии соответствует 200 нм. Электронная микроскопия

рованное согласие всех пациентов на использование данных обследования в научных целях, и согласие комитета по биомедицинской этике Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» (г. Новосибирск) на проведение исследования.

Электронная микроскопия

Пробы СЖ центрифугировали 15 мин при 14 000 об/мин, супернатант исследовали методом негативного контрастирования (НК) [7], а осадки фиксировали 4%-ным параформальдегидом, обрабатывали стандартным методом [11] и получали ультратонкие срезы на ультратоме Ultracut-6 (Reichert-Young, Австрия). Образцы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) с цифровой фотокамерой Veleta (SIS, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурные компоненты супернатанта СЖ человека

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. 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. Во всех образцах присутствовали округлые мембранные везикулы размером 40-100 нм, часто – чашеобразной формы (рис. 1б-в, д-ж). Структура этих везикул соответствует экзосомам, описанным в различных биологических жидкостях людей [19]. Другим распространенным вариантом мембранных микрочастиц СЖ являются микрочастицы, окруженные «капсулой», имеющие гладкую поверхность и форму, близкую к округлой (рис. 1г). Большинство микрочастиц, связанных с ММА, не имеют мембраны, их форма часто неправильная (рис. 1а). Соотношение мембранных и немембранных частиц, а также их морфологический профиль могут варьировать в зависимости от офтальмологической патологии. Так, было выявлено, что в образцах людей, больных диабетической ретинопатией, существенно выше содержание мембранных частиц, чем в других исследованных образцах.

Ультраструктурная характеристика осадков СЖ человека

Электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов осадков, полученных при центрифугировании СЖ, выявило во всех образцах большое количество внеклеточного матрикса – разнообразных волокон, которые образуют сплошную сеть на срезах (рис. 2а). Морфология и количество волокнистого матрикса варьируют в зависимости от заболевания пациента. Так, в осадках СЖ больных макулодистрофией содержание матрикса крайне низкое.

Во всех исследованных осадках СЖ были обнаружены мембранные пузырьки различного разме-

ра, среди которых выделяются небольшие округлые везикулы размером от 150 до 300 нм, несущие на поверхности белковые «нити», проникающие внутрь (рис. 2б). 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». Такие «мохнатые» везикулы встречались во всех образцах, кроме образцов людей с гиперметропией.

Осадки СЖ содержат также фрагменты разрушенных клеток и клеточный детрит в виде скоплений пузырьков, часто встречаются эпителиальные клетки, морфология которых различается (рис. 3б). По-видимому, это – клетки эпителия роговицы, которые смываются и попадают в СЖ. Все эпителиальные клетки несут микроворсинки на поверхности, электронно-прозрачная цитоплазма заполнена тонкими волоконцами, 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 человека с глаукомой. Кроме эпителиальных клеток на срезах отмечаются макрофаги, лимфоциты (рис. 3а) и полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) (рис. 3в). Лейкоциты обнаруживаются преимущественно в образцах пациентов с диабетической ретинопатией, при других заболеваниях эти клетки крайне редки. В отдельных осадках СЖ были обнаружены бактериальные клетки (рис. 3г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование СЖ человека методом электронной микроскопии позволило визуализировать и идентифицировать её структурные компоненты. Жидкая фракция СЖ содержит микрочастицы, включая экзосомы, макромо-

лекулярные агрегаты и волокна. В осадках СЖ обнаружены различные типы клеток и пузырьков, а также волокнистый матрикс. 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. Абсаликова Д.К., Мальханов В.Б., Шевчук Н.Е. Исследование уровня простагландина Е2 в сыворотке крови и слезной жидкости у больных увеитом при системных ревматических заболеваниях // Репракативная хирургия и офтальмология. – 2009. – Т. 9, № 4. – С. 42-44.

2. Жабоедов Г.Д., Курилина Е.И., Петренко О.В. Исследования уровня оксида азота в слезе, водянистой влаге и плазме крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой // Современные технологии лечения глаукомы: Сб. науч. статей. – М., 2003. – С. 58-64.

3. Макашова Н.В., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Антиоксидантная активность слезной жидкости у больных первичной глаукомой // Вестн. офтальмологии. – 1999. – № 5. – С. 3-4.

4. Федоров С.Н., Метавев С.А. Содержание цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 в локальном и системном иммунитете у пациентов с различной стадией пролиферативной диабетической ретинопатии // Офтальмохирургия. – 2000. – № 2. – С. 54-58.

5. Черных В.В., Шваюк А.П., Горбенко О.М. и др. Особенности патогенеза начальной и развитой стадии первичной открытоугольной глаукомы // Аллергология и иммунология. – 2006. – № 1. – С. 28-31.

6. Черных В.В., Братко В.И., Лыиков А.Г., Трунов А.Н. Влияние эфферентных и лимфотропных технологий на течение патологического процесса при диабетической ретинопатии // Офтальмохирургия. – 2008. – № 3. – С. 4-7.

7. Bello V., Mattei G., Mazzoldi P. et al. Transmission electron microscopy of lipid vesicles for drug delivery: comparison between positive and negative staining // Microsc Microanal. – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 456-461.

8. Danjo Y., Watanabe H., Tisdale A.S. et al. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1998. – Vol. 39, № 13. – P. 2602-2609.

9. Echouffo-Tcheugui J.B., Ali M.K., Roglic G. et al. Screening intervals for diabetic retinopathy and incidence of visual loss: a systematic review // Diabet Med. – 2013. – Vol. 30, № 11. – P. 1272-1292.

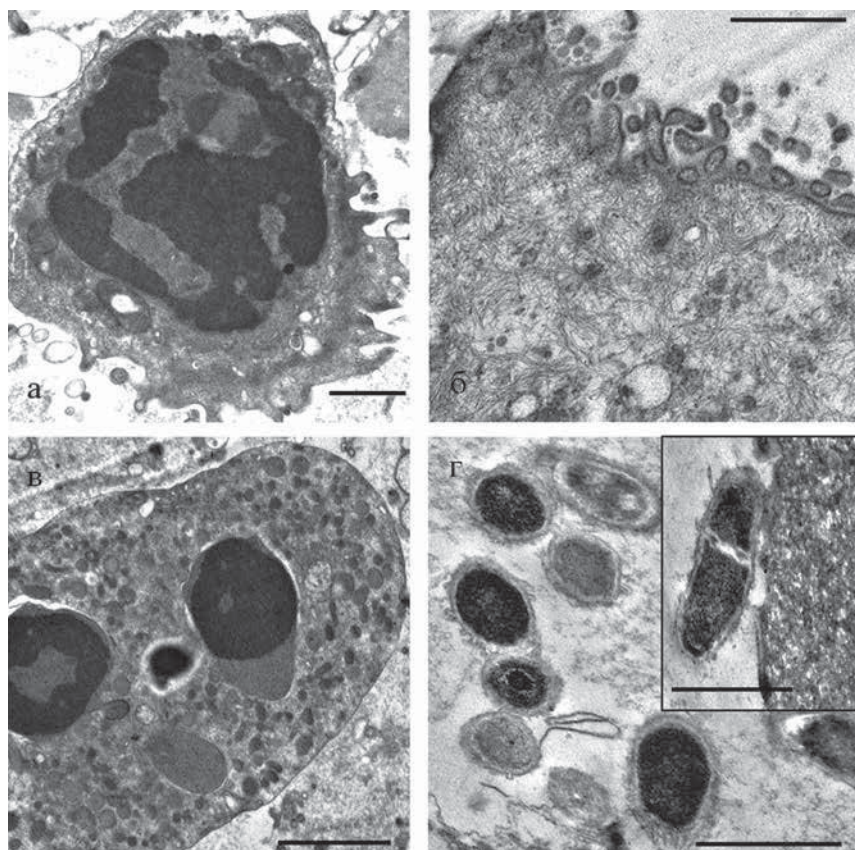


Рис. 3. Клетки осадков СЖ: а) лимфоцит; б) эпителиоцит; в) нейтрофил; г) бактериальные клетки, на врезке бактерия, взаимодействующая с эпителиоцитом. Длина масштабной линии соответствует 1 мкм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы

10. Enriquez-de-Salamanca A., Castellanos E., Stern M.E. et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease // Mol. Vis. – 2010. – Vol. 16. – P. 862-873.

11. Grigor'eva A., Saranina I., Tikunova N. et al. Fine mechanisms of the interaction of silver nanoparticles with the cells of Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus // Biometals. – 2013. – Vol. 26, № 2.

12. Holly F.J., Lemp M.A. Tear physiology and dry eyes // Surv. Ophthalmol. – 1977. – Vol. 22, № 2. – P. 69-87.

13. Li J., Sherman-Baust C.A., Tsai-Turton M. et al. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // BMC Cancer. – 2009. – Vol. 9. – P. 244.

14. Li X., Wang Z. Prevalence and incidence of retinopathy in elderly diabetic patients receiving early diagnosis and treatment // Exp. Ther. Med. – 2013. – Vol. 5, № 5. – P. 1393-1396.

15. Nichols B.A., Chiappino M.L., Dawson C.R. Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1985. – Vol. 26, № 4. – P. 464-473.

16. Obsbima K., Inoue K., Fujiwara A. 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. – Vol. 5, № 10. – P. e13247.

17. Park K.S., Kim S.S., Kim J.C. et al. Serum and tear levels of nerve growth factor in diabetic retinopathy patients // Am. J. Ophthalmol. – 2008. – Vol. 145, № 3. – P. 432-437.

18. Stolwijk T.R., Kuizenga A., van Haeringen N.J. et al. Analysis of tear fluid proteins in insulin-dependent diabetes mellitus // Acta Ophthalmol. – 1994. – Vol. 72, № 3. – P. 357-362.

19. Van der Pol E., Hoekstra A.G., Sturk A. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes // J. Thromb. Haemost. – 2010. – Vol. 8, № 12. – P. 2596-2607.

20. Van Haeringen N.J., van Agtmaal E.J. Fibrinolytic activity in human tears // Exp. Eye Res. – 1989. – Vol. 48, № 3. – P. 461-464.

21. Wong T.T., Zhou L., Li J. et al. Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52, № 10. – P. 7385-7391.

22. Yang C., Robbins P.D. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis // Clin. Dev. Immunol. – 2011. – Vol. 2011. – P. 842-849.

23. Zhou L., Beuerman R.W. Tear analysis in ocular surface diseases // Prog. Retin. Eye Res. – 2012. – Vol. 31, № 6. – P. 527-550.

Поступила 09.09.2013