

Возможность использования слезной жидкости для электронно-микроскопической диагностики офтальмологических заболеваний

А.Е. Григорьева¹, А.В. Еремина², А.В. Тупицына¹, О.М. Станишевская², В.В. Черных², В.В. Власов¹, Е.И. Рябчикова¹

¹ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, Новосибирск

² ФГАУ «Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Новосибирский филиал

Цель работы — провести сравнительное исследование клеточных и субклеточных компонентов слезной жидкости (СЖ) здоровых людей, больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) (три стадии) и диабетической ретинопатией (ДР) (пролиферативной и непролиферативной). **Материал и методы.** Методом электронной микроскопии ультратонких срезов изучены образцы СЖ 16 пациентов с начальной, 9 — с развитой и 6 — с далеко зашедшей стадией ПОУГ, а также 12 пациентов с пролиферативной (ПДР) и 6 пациентов с непролиферативной (НПДР) ДР. Контролем служили образцы СЖ 29 лиц без офтальмопатологии. **Результаты.** Все образцы СЖ содержали клетки и фрагменты клеток, клеточный детрит, мукоидные гранулы и липидные структуры; выявлены изменения встречаемости этих структур при ПОУГ и ДР по сравнению с контролем. Содержание эпителиальных клеток в СЖ возрастает в 2 раза по сравнению с контролем на начальной стадии ПОУГ, затем снижается, на далеко зашедшей стадии ПОУГ клетки не обнаруживаются. В СЖ больных НПДР возрастает содержание муцина и липидов, на стадии ПДР оно снижается по сравнению с контролем. Лейкоциты в СЖ отмечаются у четверти здоровых людей, значительное увеличение их количества в СЖ больных ДР отражает рост проницаемости кровеносных сосудов в динамике заболевания. В образцах СЖ всех больных ПОУГ лейкоциты не выявлены, что может быть связано с нарушением функций стенки кровеносных сосудов. В СЖ присутствуют «мохнатые» везикулы, не описанные ранее, количество которых нарастает на ранних стадиях ДР и ПОУГ. **Заключение.** Электронно-микроскопическое исследование осадков СЖ позволяет оценивать состояние роговицы и конъюнктивы, бокаловидных клеток и мейбомиевых желез, а также выявлять признаки изменений проницаемости сосудов тканей, прилежащих к переднему отделу глаза. Впервые установлены изменения компонентов СЖ при ДР и ПОУГ, которые могут быть в дальнейшем использованы для ранней диагностики этих заболеваний.

Ключевые слова: слезная жидкость, электронная микроскопия, глаукома, диабетическая ретинопатия.

Российский офтальмологический журнал, 2017; 1: 56-62

Офтальмологические заболевания, в частности глаукома и диабетическая ретинопатия (ДР), неизбежно приводят к потере остроты зрения. Выявление ранних стадий этих заболеваний повышает вероятность замедления их развития, что делает актуальным поиск способов ранней диагностики. Для создания эффективных диагностических систем необходим доступный для анализа субстрат, отражающий состояние исследуемой системы. В офтальмологии

проведение диагностических процедур осложняется строением органа зрения. Единственным легко- и атравматично доступным для анализа субстратом является слезная жидкость (СЖ), представляющая собой многокомпонентный секрет, который формирует постоянную микросреду переднего отдела глаза, смачивая, питая и защищая его. СЖ активно участвует в метаболизме прилежащих тканей и содержит продукты их жизнедеятельности, что делает

ее универсальным индикатором патологических процессов, протекающих в органе зрения [1–3].

Диагностический потенциал СЖ, показанный при синдроме сухого глаза [4], послужил стимулом для исследований белкового [5–7] и липидного [8, 9] состава СЖ с целью расширить область использования СЖ в диагностике [10–12]. Многочисленные работы установили возможность применения кристаллографического исследования СЖ для диагностики катаракты, болезней слезоотводящих путей и других заболеваний органа зрения [13, 14]. Таким образом, СЖ выступает в качестве уникального объекта исследований, содержащего молекулярные и структурные маркеры офтальмологических заболеваний. Вместе с тем в научной литературе отсутствуют данные о клеточных и субклеточных структурах, которые могут присутствовать в СЖ, и доступны для исследования на ультратонких срезах в просвечивающем электронном микроскопе. Данный метод позволяет также установить присутствие вирусов и бактерий в СЖ, а также сформировать ультраструктурный эквивалент патологических состояний.

ЦЕЛЬ работы — провести сравнительное исследование клеточных и субклеточных компонентов СЖ здоровых людей, больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) (три стадии) и ДР (пролиферативной, ПДР и непролиферативной, НПДР) методом электронной микроскопии ультратонких срезов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы СЖ. Образцы СЖ взяты у 16 пациентов с начальной стадией ПОУГ (ПОУГ I), у 9 — с развитой (ПОУГ II) и у 6 — с далеко зашедшей (ПОУГ III), а также у 12 пациентов с ПДР и у 6 пациентов с НПДР. В качестве контроля использовали образцы СЖ 29 лиц без офтальмопатологии. Слезоотделение стимулировали порошком альбуцида, СЖ собирали стерильным хирургическим капилляром из нижнего конъюнктивального свода глаза в стерильную пробирку. Визуальный осмотр полученных образцов показал, что СЖ может быть прозрачной или мутной с гелеобразными полупрозрачными включениями.

Биоэтика. На исследование было получено информированное согласие всех пациентов и разрешение комитета по биомедицинской этике Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза». Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с основами законодательства РФ об охране здоровья граждан.

Электронная микроскопия. Индивидуальные образцы СЖ центрифугировали (20000 g, 15 мин, 4 °C); полученные супернатанты были прозрачные, без включений, осадки — обычно белого цвета, могли состоять из гелеобразного вещества или иметь творожистую структуру. Осадки фиксировали 4 %

раствором параформальдегида, дофиксировали в 1 % растворе четырехоксида осмия, обезжизняли в растворах этилового спирта и ацетоне, заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Германия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца. Подготовленные срезы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Veleta (Olympus Corporation, Япония). Размеры структур измеряли на экране монитора с помощью программы iTEM (Olympus Corporation, Япония).

Закономерности изменений структуры компонентов СЖ при офтальмологических заболеваниях ранее описаны не были, поэтому мы не могли воспользоваться уже предложенной системой параметров. Для оценки структурного состава образцов СЖ мы использовали такой параметр, как доля образцов СЖ (%), которая определялась как количество образцов, на ультратонких срезах которых обнаружены исследуемые структуры, разделенное на общее количество образцов в группе. Все данные представлены в таблице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на доступность СЖ, ее исследования проводятся реже, чем других биологических жидкостей. Возможно, это связано с трудностями, с которыми сталкиваются исследователи: СЖ прозрачна, она на 90 % состоит из воды и содержит множество частиц, размер которых обычно не превышает 1 мкм, поэтому для визуализации ее компонентов требуется применение электронной микроскопии. Получение образцов СЖ для анализа является отдельной проблемой: собирать СЖ можно, лишь стимулировав слезоотделение. В литературе описан метод стимуляции выделения СЖ с помощью вдыхания паров аммиака [15]. В нашей работе для стимуляции выделения СЖ использован порошок альбуцида, внесение которого вызывает кратковременное слезоотделение в объеме 200–300 мкл, достаточном для проведения исследований.

Электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов выявило в осадках СЖ клетки, фрагменты разрушенных клеток и клеточный детрит в виде скоплений пузырьков — именно эти компоненты составляют основную часть осадков СЖ. Кроме того, в СЖ встречаются пылинки и другие частицы из внешней среды, клетки макрофагального ряда и лейкоциты, а также их гранулы.

Клетки эпителия роговицы и конъюнктивы постоянно обновляются и, слущиваясь с их поверхности, попадают в СЖ. На ультратонких срезах обнаружены клетки ромбовидной формы с множеством выростов, закреплявших клетки в толще эпителиального пласта (рис. 1, А). На поверхности

выростов наблюдаются тонкие волокна (рис. 1, Б), которые являются частью гликокаликса клеток и служат для закоривания муцинов путем взаимодействия трансмембранного домена с клеточным актином [16]. Цитоплазма клеток — электронно-прозрачная, заполнена тонкими волокнами, редкие органоиды представлены митохондриями, элементами эндосомальной системы и пузырьками, отмечаются единичные мультивезикулярные тельца. Эпителиальные клетки СЖ не имеют характерных для эпителиального пласта плотных контактов, что указывает на их попадание в СЖ в ходе естественного слущивания. Анализ доли образцов СЖ, содержащих эпителиальные клетки, выявил различия между здоровыми и больными людьми (табл.). Так, развитие ДР не влияет на процессы слущивания эпителиальных клеток, частота их обнаружения в образцах СЖ такая же, как в группе здоровых людей. Существенный рост доли образцов СЖ, содержащих эпителиальные клетки, характерен для ранней стадии развития ПОУГ, на последующих стадиях развития заболевания этот показатель снижается. Повреждение эпителиальных клеток роговицы при развитии ПОУГ показано во многих исследованиях, однако не установлено, связан ли этот эффект с развитием ПОУГ или с длительными инстилляциями противооперационных препаратов [17, 18].

В осадках СЖ встречаются лейкоциты, представленные лимфоцитами (рис. 1, В) и нейтрофилами (рис. 1, Г). Нейтрофилы имеют округлую форму, цитоплазма средней электронной

плотности заполнена электронно-плотными гранулами, на срезах часто встречаются скопления гранул. Лимфоциты имеют округлую форму, основную часть клетки занимает ядро, в котором преобладает гетерохроматин, в цитоплазме средней электронной плотности расположены редкие органеллы. В образцах СЖ здоровых людей лейкоциты встречаются редко и представлены в основном нейтрофилами;

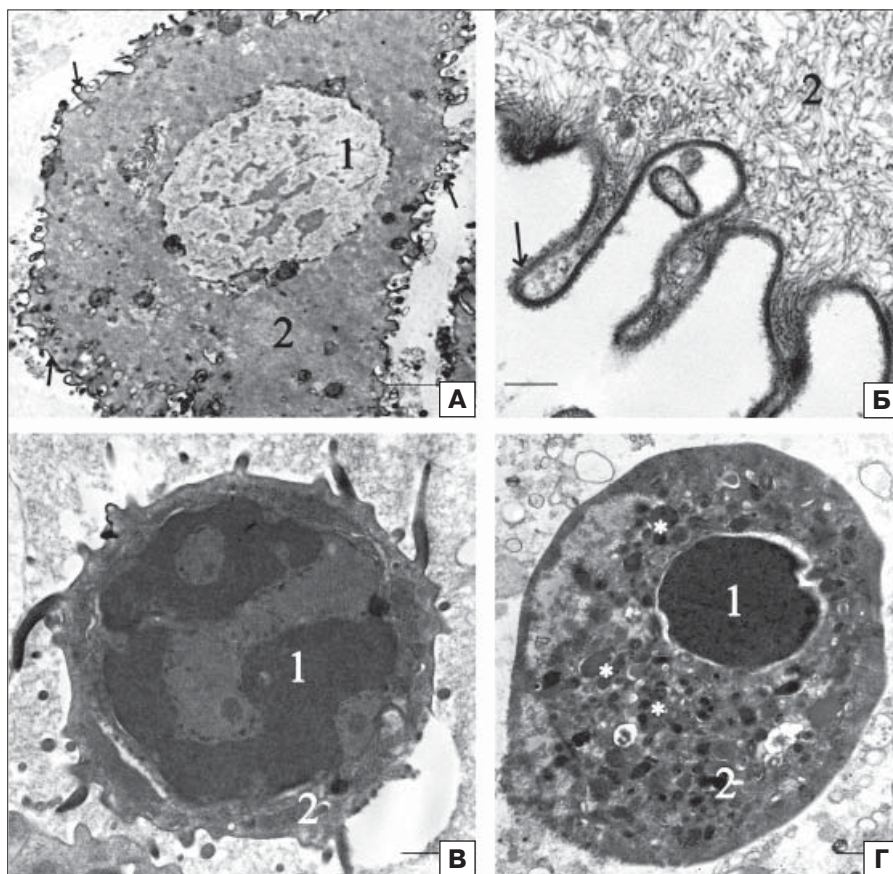


Рис. 1. Клеточные структуры СЖ. А — эпителиальная клетка, стрелками показана плазмалемма, образующая выросты, длина масштабной линии соответствует 2 мкм; Б — участок эпителиальной клетки, цитоплазма заполнена промежуточными филаментами, стрелкой показан гликокаликс, длина масштабной линии соответствует 200 нм; В — лимфоцит; Г — нейтрофил, звездочками обозначены полиморфные гранулы; В, Г — длина масштабной линии соответствует 1 мкм; 1 — ядро, 2 — цитоплазма. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.

Таблица. Морфологические характеристики осадков СЖ (приведена доля образцов (%), содержащих определенные структурные компоненты СЖ)

Заболевание	Количество образцов	Эпителиальные клетки, %	Лейкоциты, %	Гранулы бокаловидных клеток, %	Липиды слезной пленки, %	«Мохнатые» везикулы, %
Группа контроля	29	31	24	72	72	20
НПДР	6	33	33	83	83	66
ПДР	12	41	66	41	58	41
ПОУГ, I	16	62	0	62	81	62
ПОУГ, I	9	44	0	66	66	33
ПОУГ, I	7	0	0	83	66	33
ПОУГ, все стадии	33	45	0	67	74	55

в образцах СЖ больных ДР лейкоцитов существенно больше (см. табл.), отмечаются как нейтрофилы, так и лимфоциты. Известно, что развитие диабета ведет к изменению проницаемости кровеносных сосудов, в том числе сосудов конъюнктивы [19]. Повышенная проницаемость новообразованных сосудов в динамике заболевания, очевидно, сопровождается усилением миграции лейкоцитов из их просвета в эпителий конъюнктивы, которая омывается СЖ, соответственно, большее количество лейкоцитов попадает в СЖ. Пристального внимания заслуживает факт отсутствия лейкоцитов в образцах СЖ больных ПОУГ на всех стадиях: ни у одного из 33 больных на срезах осадков СЖ не найдено ни одного лейкоцита или их фрагментов (см. табл.), в отличие от образцов здоровых людей и больных ДР. Можно предположить, что течение ПОУГ сопровождается нарушением функций стенки терминальных венул, в том числе миграции лейкоцитов, что находит отражение в их отсутствии в СЖ. Известно, что нарушение микроциркуляции и в том числе транспорта нутриентов из крови в ткани органа зрения является одним из патогенетических механизмов ПОУГ [18]. Мы полагаем, что в этот механизм вовлечен и диапедез лейкоцитарных клеток. Обнаруженный нами факт отсутствия лейкоцитов в СЖ больных ПОУГ, несомненно, требует дальнейшего изучения.

Осадки СЖ, помимо клеточных элементов, содержат субклеточные структуры, среди которых — компоненты слезной пленки, попадающие в СЖ при стимуляции ее выделения. Поверхность глаза в «спокойном» состоянии покрыта слезной пленкой, которая постоянно обновляется при моргании и представляет собой трехслойную структуру. Слой слезной пленки, непосредственно взаимодействующий с роговицей, образован муцинами, которые формируют трехмерную сеть, препятствующую контакту инородных тел с роговицей. Средний слой пленки состоит из водного раствора белков и солей и служит для увлажнения роговицы. Внешний слой слезной пленки представлен липидами, которые предохраняют нижележащие слои от высыхания [20, 21]. В последние годы введено понятие «зрительная поверхность», которое включает в себя роговицу, конъюнктиву, слезные железы и связанные с ними отделы век, действующие как единая система, обеспечивающая нормальное функционирование органа зрения [22]. В данной концепции слезная пленка рассматривается как совокупность липидной пленки, водно-муцинового слоя и аппарата его прикрепления к клеткам эпителия, включающего гликокаликс эпителиальных клеток, их выросты и микроворсинки, а также белки, обеспечивающие закоривание муцинов на поверхности эпителия [22].

На ультратонких срезах образцов СЖ наблюдаются скопления гранул размером 0,5–1,5 мкм (рис. 2, А), по морфологическим признакам соответствующих гранулам муцина бокаловидных клеток. Ма-

териал гранул после выделения из клеток набухает, плотно упакованные волокна муцинов распределяются по поверхности роговицы, образуя трехмерную сеть [22]. Содержимое гранул представляет собой плотно упакованный волокнистый материал, на срезах выглядящий зернистым, окружающая мембрана, как правило, частично или полностью разрушена, высвобождаемое содержимое образует сеть волокон (рис. 2, А). Проведенная нами на срезах СЖ визуальная оценка площади сети волокон — муцинов показала, что наибольшее их количество наблюдается в образцах больных ПОУГ на всех стадиях заболевания. Увеличение количества муцинов в СЖ при развитии ПОУГ, обнаруженное при помощи электронной микроскопии, требует дальнейшего изучения с помощью биохимических методов, поскольку состояние бокаловидных клеток и продукция муцина являются важными показателями, например, при оценке новых противоглаукомных препаратов [23, 24]. Количество волокнистого материала в образцах СЖ больных ДР и здоровых людей не различается и заметно меньше, чем в образцах больных ПОУГ. Анализ ультратонких срезов осадков СЖ позволяет заключить, что развитие ДР не влияет на состояние бокаловидных клеток, а развитие ПОУГ сопровождается их гиперсекрецией.

Электронно-микроскопическое исследование выявило в осадках СЖ липидные структуры в виде полиморфных образований, состоящих из гомогенного вещества, в котором перемежаются участки средней и низкой электронной плотности (рис. 2, Б). Часто в липидных структурах присутствуют мелкие электронно-плотные включения, возможно, частицы пыли, попавшие из внешней среды. Липидные структуры в составе СЖ, очевидно, представляют собой липиды слезной пленки, которые продуцируются мейбомиевыми железами [25], и липиды, выделившиеся при разрушении клеток, которым соответствуют структуры, связанные с различным материалом, например частицами средней электронной плотности, не имеющими мембраны (рис. 2, В), количество вторых существенно меньше. Анализ ультратонких срезов показывает, что содержание липидов в образцах СЖ больных ДР и ПОУГ несколько меняется по сравнению со здоровыми людьми (см. табл.), по-видимому, отражая целостность липидного слоя слезной пленки. В литературе не удалось обнаружить каких-либо сведений об изменении уровня липидов в СЖ при ДР и ПОУГ.

Белковый компонент СЖ после центрифугирования находится в супернатанте во взвешенном состоянии и не может быть изучен на ультратонких срезах осадков СЖ. Мы исследовали супернатанты СЖ здоровых людей, в которых были обнаружены внеклеточные везикулы, включая экзосомы, и охарактеризовали их с помощью комплекса электронно-микроскопических и молекулярно-биологических методов [26].

На ультратонких срезах осадков СЖ наблюдаются разнообразные везикулы, которые можно отнести к клеточному детриту и группе внеклеточных везикул. Среди них отчетливо выделяются округлые везикулы размером 150–300 нм, на поверхности которых локализуются длинные волокна, пронзающие мембрану насквозь, что говорит о наличии белкового трансмембранного домена (рис. 2, Г). Наружные части волокон могут достигать в длину 150 нм, внутренние части взаимодействуют друг с другом и образуют внутри везикулы сеть. Морфология «мохнатых» везикул позволяет предположить, что они представляют собой отшнуровавшиеся участки цитоплазматических выростов и/или микроворсинок эпителиальных клеток. В работе В. Nichols и соавт. [21] сходные структуры описаны как поперечные срезы микроворсинок клеток эпителия конъюнктивы, в этой же работе отмечено, что внешняя поверхность клеток конъюнктивы несет микроворсинки, тогда как эпителиальные клетки роговицы покрыты выростами.

Проведенный нами анализ серийных ультратонких срезов показал, что «мохнатые» везикулы не связаны с клетками, и это позволяет говорить о том, что они отшнуровываются с поверхности эпителиальных клеток конъюнктивы и роговицы и попадают в СЖ независимо от слущивания эпителиальных клеток и, в соответствии с существующими представлениями, могут быть отнесены к внеклеточным везикулам [27]. В мембране «мохнатых» везикул, очевидно, заякорены муцины, связанные с трансмембранными белками [16, 21, 22], морфология нитей на поверхности «мохнатых» везикул соответствует структуре волокон муцина, описанной в литературе [4, 16, 20] и наблюдаемой нами на ультратонких срезах СЖ (см. рис. 1). Встречаемость «мохнатых» везикул в осадках СЖ варьирует: на ранних стадиях ПОУГ и при ДР доля образцов, содержащих «мохнатые» везикулы, намного превышает таковую у здоровых людей (см. табл.). Причины, по которым эпителиальные клетки формируют данные везикулы, остаются неясными, однако изменение их количества при патологических состояниях указывает на то, что они отражают какие-то деструктивные изменения эпителиальных клеток органа зрения.

Проведенное нами исследование осадков (твердой части) СЖ показало присутствие в них всех

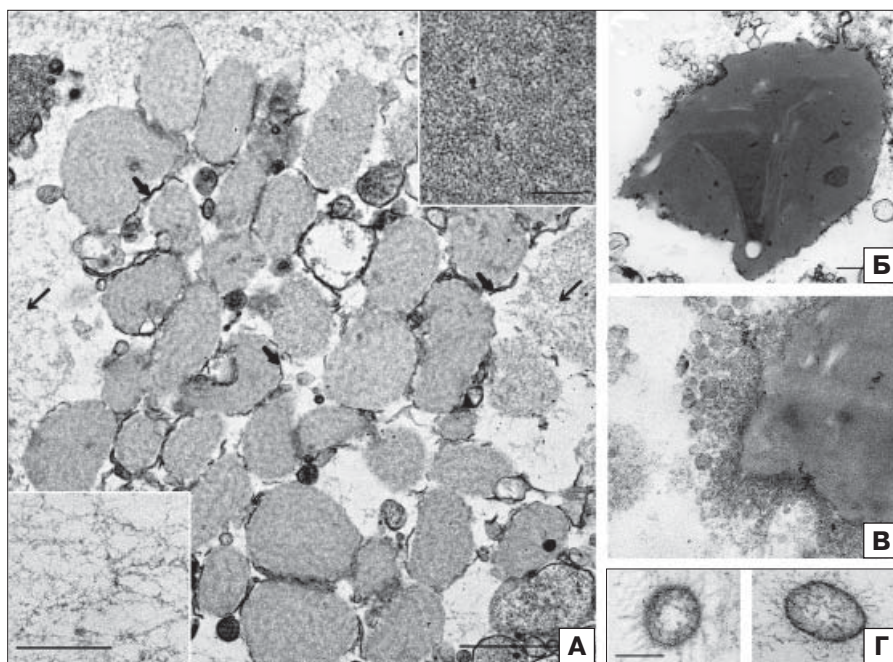


Рис. 2. Субклеточные структуры СЖ. А — скопление гранул бокаловидных клеток, тонкими стрелками показана сеть волокон, толстыми — мембрана гранул, на верхней врезке содержимое гранулы — волокнистый материал, на нижней врезке — сеть волокон; Б — полиморфное липидное образование; В — участок полиморфного липидного образования; Г — «мохнатые» везикулы, слева — из образца СЖ больного ПОУГ, справа — из образца СЖ здорового человека. Длина масштабной линии соответствует: А — 1 мкм, Б–Г — 100 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.

компонентов слезной пленки, что свидетельствует об адекватности состава получаемых образцов естественным структурам глаза и, соответственно, о возможности использования полученных описанным способом образцов СЖ для оценки состояния переднего отдела глаза. Выявленные отличия состава осадков СЖ здоровых и больных ДР и ПОУГ говорят о том, что эти заболевания влияют на продукцию компонентов СЖ, состав которой, таким образом, отражает состояние и глубоких структур глаза. Совокупность полученных данных позволяет полагать, что исследование СЖ различными методами может служить основой для разработки диагностических подходов к распознаванию офтальмологических заболеваний на доклинической стадии.

ВЫВОДЫ

Состав СЖ здоровых людей отличается от состава СЖ больных ДР и ПОУГ.

Отличия состава СЖ у больных на ранней (непролиферативной) и поздней (пролиферативной) стадии ДР отражают изменения синтетической активности бокаловидных клеток и мейбомиевых желез, а также нарушения проницаемости кровеносных сосудов.

Изменения ультраструктуры компонентов СЖ на разных стадиях ПОУГ отражают нарастающие нарушения всех изученных параметров по сравнению со здоровыми людьми, а такие параметры, как присутствие в СЖ лейкоцитов, эпителиальных клеток и

«мохнатых» везикул, существенно изменяются уже на I стадии ПОУГ.

Электронно-микроскопическое исследование осадков СЖ позволяет без нарушения целостности органа зрения оценивать состояние таких структур, как роговица и конъюнктив, бокаловидные клетки и мейбомиевы железы, а также выявлять признаки изменений проницаемости сосудов тканей, прилежащих к переднему отделу глаза.

Проведенное исследование впервые визуализировало основные компоненты СЖ и установило их изменения при ДР и ПОУГ, что доказывает ценность СЖ как диагностического субстрата и обосновывает необходимость дальнейших исследований с целью определения четких критериев диагностики этих заболеваний на ранних стадиях.

Литература/References

1. Гусейнов Е.С., Касимов Э.М., Меджидова С.Р. Сравнительное исследование IgE в слезной жидкости у пациентов с набухающей и стационарной травматической катарактой. Российский офтальмологический журнал. 2014; 7 (1): 14–8.
Guseynov E.S., Kasimov E.M., Medzhidova S.R. A comparative study of the total IgE level in the lacrimal fluid of patients with swelling and stationary traumatic cataract. Russian Ophthalmological Journal. 2014; 7 (1): 14–8 (in Russian).
2. Черных В.В., Егорова Е.В., Ермакова О.В. и др. О возможной роли иммунных нарушений в патогенезе псевдоэкзофалиативного синдрома. Бюллетень СО РАМН. 2009; 4(138): 131–5.
Chernikh V.V., Egorova E.V., Ermakova O.V., et al. About a possible role of immune disorders in pathogenesis of the pseudoexfoliative syndrome. B'ulleten' SO RAMN. 2009; 4 (138): 131–5 (in Russian).
3. Черных В.В., Шваюк А.П., Горбенко О.М. и др. Особенности патогенеза начальной и развитой стадии первичной открытоугольной глаукомы. Аллергология и иммунология. 2006; 7 (1): 28–31.
Chernikh V.V., Shvajuk A.P., Gorbenko O.M., et al. Characteristics of pathogenesis of the initial and advanced open-angle glaucoma. Allergologija i imunologija. 2006; 7 (1): 28–31 (in Russian).
4. Danjo Y., Watanabe H., Tisdale A.S., et al. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39 (13): 2602–9.
5. Li B., Sheng M., Xie L., et al. Tear proteomic analysis of patients with type 2 diabetes and dry eye syndrome by two-dimensional nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2014; 55 (1): 177–86.
6. Perumal N., Funke S., Wolters D., et al. Characterization of human reflex tear proteome reveals high expression of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR4). Proteomics. 2015; 15 (19): 3370–81.
7. Pieragostino D., D'alessandro M., Di Ioia M., et al. Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: beyond ocular diseases. Proteomics Clin Appl. 2015; 9 (1-2): 169–86.
8. Ivanova S., Tonchev V., Yokoi N., et al. Surface Properties of Squalene/Meibum Films and NMR Confirmation of Squalene in Tears. Int J Mol Sci. 2015; 16 (9): 21813–31.
9. Fenner B.J., Tong L. More to stable tears than thickness of the tear film lipid layer. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015; 56 (3): 1601.
10. Herber S., Grus F.H., Sabuncuo P., Augustin A.J. Two-dimensional analysis of tear protein patterns of diabetic patients. Electrophoresis. 2001; 22 (9): 1838–44.
11. Stolwijk T.R., Kuizenga A., Van Haeringen N.J., et al. Analysis of tear fluid proteins in insulin-dependent diabetes mellitus. Acta Ophthalmol. (Copenh). 1994; 72 (3): 357–62.
12. 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; 145 (3): 432–7.
13. Белоглазов В.Г., Атькова Е.Л., Федоров А.А. и др. Возможности применения метода кристаллографии слезы при патологии слезоотводящей системы. Вестник офтальмологии. 2003; 119 (4): 49–52.
Beloglazov V.G., At'kova E.L., Fedorov A.A., et al. Possibilities of using tears crystallography in pathologies of the lacrimal apparatus. Vestnik Oftal'mologii. 2003; 119 (4): 49–52 (in Russian).
14. Курешева Н.И., Колединцев М.Н., Шилкин Г.А. и др. Кристаллография слезной жидкости как метод прогнозирования риска развития катаракты у больных первичной глаукомой. Вестник офтальмологии. 1999; 115 (5): 5–6.
Kuryшева N.I., Koledintsev M.N., Shilkin G.A., et al. Crystallography of the lacrimal fluid as a method for predicting the risk of developing cataract in patients with primary glaucoma; Vestnik Oftal'mologii. 1999; 115 (5): 5–6 (in Russian).
15. Stuchell R.N., Feldman J.J., Farris R.L., Mandel I.D. The effect of collection technique on tear composition. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1984; 25 (3): 374–7.
16. Gipson I.K. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007; 48 (10): 4390–8.
17. Pozarowska D., Pozarowski P., Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of cytostatic and cytotoxic effects of topical glaucoma medications on human epithelial corneal line cells. Cytometry B Clin. Cytom. 2010; 78 (2): 130–7.
18. Noecker R.J., Herrygers L.A., Anwaruddin R. Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. Cornea. 2004; 23 (5): 490–6.
19. Gerber A.L., Harris A., Siesky B., et al. Vascular Dysfunction in diabetes and glaucoma: a complex relationship reviewed. J. Glaucoma. 2015; 24 (6): 474–9.
20. 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; 26 (4): 464–73.
21. Nichols B., Dawson C.R., Togni B. Surface features of the conjunctiva and cornea. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1983; 24 (5): 570–6.
22. Cher I. Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics. Clin Experiment Ophthalmol. 2012; 40 (6): 634–43.
23. Liu W., Li H., Lu D., et al. The tear fluid mucin 5AC change of primary angle-closure glaucoma patients after short-term medications and phacotrabeculectomy. Mol. Vis. 2010; 16: 2342–6.
24. Soucier M., Buron N., Lafontaine P.O., et al. Trefoil factor family 1, MUC5AC and human leucocyte antigen-DR expression by conjunctival cells in patients with glaucoma treated with chronic drugs: could these markers predict the success of glaucoma surgery? Br. J. Ophthalmol. 2006; 90 (11): 1366–9.
25. King-Smith P.E., Nichols J.J., Braun R.J., Nichols K.K. High resolution microscopy of the lipid layer of the tear film. Ocul. Surf. 2011; 9 (4): 197–211.
26. Григорьева А.Е., Еремина А.В., Тамкович С.Н. и др. Ультразвуковой анализ слезной жидкости у пациентов с диабетической ретинопатией. Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук. 2014; 34 (3): 31–6.
Grigor'eva A.E., Eremina A.V., Tamkovich S.N., et al. Ultrastructure analysis of tears in patients with diabetic retinopathy. B'ulleten' sibirskogo otdelenija rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 2014; 34 (3): 31–6 (in Russian).
27. Yanetz-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles. 2015; 4: 27066.

Possibilities of using tear fluid for electron microscopic diagnostics of eye diseases

A.E. Grigor'eva¹, A.V. Eremina², A.V. Tupitsyna¹, O.M. Stanishevskaya², V.V. Chernykh²,
V.V. Vlasov¹, E.I. Ryabchikova¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk Branch of Acad. S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Russian Ministry of Health, Novosibirsk, Russia

lenryab@yandex.ru

Purpose. To conduct a comparative study of cellular and subcellular components of tear fluid of healthy persons (HP), those suffering from primary open-angle glaucoma (POAG), and patients with diabetic retinopathy (DR). **Material and methods.** Electron microscopy of ultrathin sections was used to test tear samples of 16 patients with initial POAG, 9 patients with developed POAG, and 6 with an advanced stage of POAG. Besides, 12 patients with proliferative DR (PD) and 6 patients with nonproliferative DR (NPD) were tested. Tear samples of 29 subjects with no ophthalmic pathology served as control. **Results.** All the examined samples contained cells, cellular fragments and debris, mucous granules and lipid structures. The occurrence of all these structures was found to be different in the tears of diabetic and glaucomatous patients as compared to that of HP. The share of epithelial cells in the tear of patients with the initial stage of POAG was twice as high as in the control group; then it drops gradually so that in the advanced stage, epithelial cells are not detected. The tear of NPD patients shows an increase of the content of mucin and lipids against the control, while in PD it is lower than in HP. Leukocytes were observed in the tear of a quarter of HP, while in diabetic patients leukocytes show a significant increase, which reflect a higher permeability of blood vessels as the disease develops. There were no leukocytes in tear samples of all patients with POAG, which may be associated with damaged functions of the blood vessel wall. We found "hairy" vesicles in the tear which had not been noted previously; the amount of these vesicles was growing at early stages of POAG and DR. **Conclusion.** Electron microscopy of tear deposits evaluates the state of the cornea and the conjunctiva, as well as goblet cells and the meibomian glands. It reveals signs of permeability change in tissue vessels adjacent to the anterior area of the eye. For the first time changes in tear components in glaucomatous and diabetic patients, were found: these changes may in future be used to achieve early diagnosis of these diseases.

Keywords: tear fluid, electron microscopy, glaucoma, diabetic retinopathy.

doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-1-56-62

Russian Ophthalmological Journal, 2017; 1: 56–62

Адрес для корреспонденции: 630090 Новосибирск, ул. Лаврентьева, д. 8, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
lenryab@yandex.ru