

Министерство здравоохранения Российской Федерации
ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт
глазных болезней им. Гельмгольца»
ГБОУ ВПО «Московский государственный
медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»,
кафедра глазных болезней факультета
последипломного образования

VIII РОССИЙСКИЙ ОБЩЕНАЦИОНАЛЬНЫЙ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ

Сборник научных трудов
научно-практической конференции
с международным участием

Москва, 22-24 сентября 2015 года

Под редакцией В.В. Нероева

Том 2

ИЗДАТЕЛЬСТВО
Апрель

Москва, 2015

Аветисов С.Э., Суббот А.М., Новиков И.А., Сафонова Т.Н., Федоров А.А.

Возможность оценки функционального состояния эпителия глазной поверхности *in vitro* методом СЭМ

ФГБНУ «НИИ глазных болезней», г. Москва

Функциональное значение глазной поверхности в значительной мере определяется структурным состоянием ее эпителиального покрова. Изменение внутриклеточного обмена ведет к потере жизнеспособности отдельных клеток, но снижают прочность межклеточных связей. Это приводит к избыточной десквамации, появлению эрозий и, как следствие, снижению барьерных свойств, ухудшению смачиваемости покровной ткани и нарушению стабильности слезной пленки. Снижение способности удерживать влагу эпителием может быть связано с уменьшением площади контакта со слезной жидкостью – отсутствием правильной организации собственной микроскульптуры поверхности клеток (потеря «ворсинчатости»). Любое из этих нарушений или их совокупность может рассматриваться как патогенетическая основа возникновения синдрома «сухого глаза», различных эпителиальных дистрофий и других офтальмопатологий.

Культуральный метод позволяет нам воспроизвести *in vitro* некоторые свойства изучаемой ткани и в то же время дает возможность неограниченного манипулирования с клетками. Конечно, приближение верно до определенного предела. В случае эпителия глазной поверхности существуют отработанные протоколы получения и работы с такими типами клеток, что привело нас к мысли о возможности использования клеточной культуры как мишени для отработки методики оценки функционального состояния клеток глазной поверхности. Последующие шаги могут быть направлены в сторону диагностических возможностей предлагаемого метода, в первую очередь для исследования проб, полученных методом импрессионной цитологии.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) – идеальный инструмент для изучения ультраструктуры поверхности клетки. Традиционная пробоподготовка зачастую приводит к искажениям и артефактам, и до недавнего момента не существовало метода, позволяющего одновременно визуализировать микроскульптуру поверхности и одновременно оценивать активность биохимических реакций.

Разработанный нами новый метод контрастирования может позволить визуализировать микроструктуру поверхности роговичного эпителия в максимально неизменном виде, а также получить информацию о подповерхностном слое образца (на глубине около 2-3 мкм), что косвенно может свидетельствовать об уровне биохимической активности клетки.

Цель: изучить возможность визуализации и оценки функционального состояния эпителия глазной поверхности с использованием СЭМ.

Материал и методы. В качестве биологических образцов использовались интактные ткани кадаверного глаза – (конъюнктива, роговичный эпителий) и первичные культуры роговичного и конъюнктивального эпителия, полученные методом экспланта.

Образцы контрастировали по разработанной методике хлоридом редкоземельного элемента – неодима.

Исследование проводили на микроскопе EVO LS – 10 («Zeiss»), режим низкого вакуума, ускоряющее напряжение 20 кВ.

Результаты. После контрастирования хлоридом неодима возможно наблюдение на СЭМ как в режиме вторичных электронов, так и в режиме обратно-рассеянных электронов, что позволяет получить изображения с визуализацией микроворсинок, ядер, ядрышек и клеточных мембран.

В пробах интактных тканей эпителиальные клетки были покрыты муциновым слоем, что сглаживало их микрорельеф, однако по мере их высыхания и удаления влаги с поверхности (в том числе активно – под электронным пучком) открывалась характерная структура – ворсинчатость. На клеточной культуре наблюдали появление ворсиноподобных структур в тех частях, где образовывался плотный клеточный пласт. Лидирующий край, активно мигрирующий на поверхность культурального пластика, был лишен таких выростов на своей поверхности. Он демонстрировал более яркое окрашивание лантаноидами, что косвенно свидетельствовало о высоком функциональном напряжении клеток. Переходная зона демонстрировала частичное покрытие поверхности клетки микроворсинками.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки *in vitro* сохраняют способность к организации микрорельефа собственной поверхности, сходной с таковой интактной ткани. Предлагаемый способ визуализации эпителия глазной поверхности с использованием СЭМ может быть применен для изучения различных состояний, связанных с дефицитом слезы.