

Мирошник Наталья Викторовна

**ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА ПРИ
АСТЕРОИДНОМ ГИАЛОЗЕ**

3.1.5. — Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Харлап Сергей Иванович

Официальные оппоненты:

Страхов Владимир Витальевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, заведующий кафедрой офтальмологии

Шишкин Михаил Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры глазных болезней.

Ведущая организация: ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ.

Защита состоится 18 апреля 2022 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.174.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д.11, корп. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Автореферат диссертации разослан « _____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Иванов М.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Астероидный гиалоз (АГ) — особая форма дегенеративных изменений стекловидного тела (СТ) неизвестной этиологии. Морфологические изменения проявляются развитием специфических деформаций СТ, связанных с появлением в его коллагеновом каркасе минеральных отложений — астероидных телец (АТ) [Kador P.F., 2008; Winkler J., 2001].

Для более точной оценки структуры СТ и понимания процессов, приведших к возникновению такого состояния как АГ, и возможно, играющих роль в формировании других патологических изменений СТ необходимо дальнейшее изучение структуры гиалоидных элементов с применением новых способов и методов исследования.

В настоящее время нет альтернативного УЗ анализу способа прижизненно проанализировать пространственные изменения в стекловидной камере. Использование цифрового УЗ сканирования позволяет осуществить цифровую пространственную реконструкцию глаза и стекловидного тела, а также провести их одновременный или последовательный мультипланарный анализ [Аветисов С.Э., 2008; Насникова И.Ю., 2003; Нероев В.В., 2019]. При этом АТ можно рассматривать как маркеры сложно визуализируемых структур СТ.

На сегодняшний день накоплен определенный опыт осуществления морфологических исследований структуры СТ. Как правило, он основан на изучении биопсийного или аутопсированного материала с использованием импрегнационных методик, контрастирования рентгеноконтрастными веществами [Кислицина Н.М., 2010].

Однако использование стандартных методов подготовки и структурного анализа высокогидратированных объектов, к которым относится и СТ, может сопровождаться возникновением значительных деформационных артефактов, затрудняющих полноценную расшифровку их строения.

Оптимальным методом изучения СТ, позволяющим сочетать топографические наблюдения с минимальными искажениями структуры гиалоидных компонентов, является сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) в режиме низкого вакуума. Апробированный в данном исследовании оригинальный способ пробоподготовки образцов СТ ограничивает искажения на уровне его тонкой структуры и обеспечивает возможность оценки морфологических изменений гиалоидных структурных элементов СТ.

При помощи современных методов клинического анализа весьма затруднительно адекватно оценить морфологическое состояние СТ. По этой причине создание диагностического способа, способного прижизненно отобразить пространственную структуру СТ, представляется своевременным и необходимым.

Цель: оценка структуры стекловидного тела при астероидном гиалозе при помощи цифрового акустического исследования и сканирующей электронной микроскопии в режиме низкого вакуума.

Задачи работы

1. Разработать алгоритм пространственного УЗ исследования стекловидного тела и создать акустическое изображение её цифровой пространственной 3D модели с последующим мультипланарным пространственным анализом;

2. По результатам анализа диагностической пространственной 3D УЗ модели стекловидного тела рассмотреть возможные варианты изображения пространственных изменений его структуры при астероидном гиалозе, а также изучить особенности «проявляемости» диагностического рисунка гиалоидных элементов;

3. Разработать способ пробоподготовки образцов стекловидного тела для проведения его ультраструктурного анализа с помощью сканирующей электронной микроскопии в режиме низкого вакуума;

4. Проанализировать строение вещества стекловидного тела при астероидном гиалозе и его элементный состав.

Научная новизна работы

1. Впервые проведена пространственная оценка стекловидного тела при астероидном гиалозе на достаточном клиническом материале с помощью цифрового УЗ сканирования.

2. Разработан алгоритм создания пространственной 3D модели глаза. Полученные варианты изображения могут быть представлены в виде объемной виртуальной модели стекловидной камеры глаза.

3. На основании алгоритма создания пространственной 3D модели описаны часто встречающиеся признаки деструкции гиалоидных трактов при астероидном гиалозе.

4. Разработан способ максимально щадящей подготовки образцов стекловидного тела для исследования методом СЭМ в низком вакууме.

5. Впервые предложено ранжирование различных структур стекловидного тела, доступных для наблюдения после подготовки образцов методом СЭМ.

6. Получены данные о составе и структуре астероидных телец, основой которых является радиально-лучистый агрегат игольчатых кристаллов фосфата кальция и заполняющий интерстиции матрикс из органических соединений.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Разработана и клинически апробирована методика УЗ акустического анализа состояния стекловидного тела при АГ, позволяющая прижизненно анализировать пространственные изменения в стекловидной камере.

2. На основании разработанного алгоритма цифрового диагностического УЗ исследования глаза определены часто встречающиеся признаки деструкции гиалоидных трактов при астероидном гиалозе, которые могут найти применение в офтальмологической практике.

3. Разработан и апробирован оригинальный алгоритм пробоподготовки образцов стекловидного тела, обеспечивающий сохранение его нативной структуры, что позволяет без искажений анализировать состав и строение

астероидных телец.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертационной работы послужил комплекс методов научного познания. Диссертация выполнена в соответствии с принципами научных исследований, в дизайне ретроспективного, проспективного и одномоментного открытого сравнительного исследования с использованием инструментальных, клинических, аналитических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Цифровое пространственное 3D УЗ исследование может стать «методом выбора» для анализа структурных изменений стекловидного тела и пространственных деформаций внутренних элементов глаза, связанных с различными патологическими состояниями.

2. Последовательный анализ морфологических и топографических параметров объемного изображения глаза и стекловидной камеры необходим для определения вида и степени выраженности патологических изменений гиалоидных трактов при астероидном гиалозе.

3. СЭМ в режиме низкого вакуума вместе с оригинальным способом пробоподготовки подходит для изучения строения и состава стекловидного тела при астероидном гиалозе.

4. Структурообразующей единицей АТ является радиально-лучистый агрегат игольчатых кристаллов фосфата кальция и заполняющий интерстиции матрикс из органических соединений.

5. Сформированные АТ обнаружены не во всем объеме стекловидного тела, а лишь в зонах с обособленными биохимическими условиями — внутри белковых каналов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность проведенных исследований и их результатов

определяется достаточным и репрезентативным объемом материала. В работе использованы современные методы исследования, выполняемые в стандартизированных условиях. Анализ результатов исследования и обработка данных проведены с применением современных методов сбора и обработки научных данных.

Основные положения диссертации были озвучены на научно-практической конференции с международным участием «Сканирующая электронная микроскопия в медицине, биологии и микробиологии» (г. Москва, 5 апреля 2018 г.).

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в подготовке, планировании и проведении УЗ исследований, апробации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы. Обработка и интерпретация полученных результатов выполнена лично автором.

Внедрение результатов работы

Результаты работы внедрены в практику ФГБНУ НИИГБ и включены в учебные программы преподавания на кафедре глазных болезней ПМГМУ им. И.М. Сеченова.

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 6 печатных работ в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов, глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 66 отечественных и 81 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 35 рисунками и 3 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ультразвуковые методы

В исследование включены результаты УЗ обследования глаз 68 пациентов (136 глаз) с астероидным гиалозом в возрасте от 62 до 73 лет (средний возраст — 68,2 года). Пациенты исследуемой группы находились на обследовании и лечении в ФГБНУ «НИИГБ».

Акустическое пространственное исследование проводилось на УЗ цифровой диагностической системе VOLUSON-730 Pro (Kretz) и УЗ цифровой системе VOLUSON E8 после информированного согласия, с учетом необходимых требований безопасности. Для проведения исследования были использованы линейный датчик SP 10–16 МГц (рис. 6) и объемный датчик RSP 5–12 МГц.

Алгоритм 3D ультразвукового обследования складывался из выполнения следующих этапов:

1 этап – заключался в проведении самого исследования и продолжался в пределах 60 – 80 сек сканирования одного глаза. Для анализа структуры СТ при помощи цифрового УЗ исследования, в качестве предварительного этапа использовался способ его визуальной оценки при помощи динамической пробы. Во время движения глаз в режиме реального времени проводился осмотр тех или иных изменений и осуществлялась их фиксация посредством записи «кинопетли». Далее проводилось стандартное УЗ сканирование глазного яблока в В-режиме серой шкалы и 3D сканирование.

2 этап не подразумевал контакт с пациентом и заключался в виртуальной графической обработке полученного во время сканирования цифрового материала. Данный материал использовался для расшифровки «акустической» структуры биологического объекта, визуального воссоздания и топографического анализа изучаемого объема ткани. Конечным результатом

исследования было создание объемной модели глаза, а также, при необходимости, выделение отдельных его частей.

В каждом конкретном случае, проводилось первичное сопоставление пространственных и УЗ характеристик различных морфологических элементов. Оно базировалось на результатах их изучения с обеих сторон, оценки степени возможной пространственной деформации и так называемой «акустической прозрачности».

Детали мультипланарного пространственного анализа 3D изображения внутренней структуры глаза были установлены посредством оценки как всего объемного изображения глаза, так и отдельно стекловидного тела в трех проекциях: горизонтальной, вертикальной и фронтальной.

Сканирующая электронная микроскопия

Материалом данного исследования явились образцы СТ, полученные в результате витрэктомии из центрального отдела стекловидного тела у 7-и пациентов в возрасте от 62 до 73 лет (средний возраст — 67,4 года) с витреомакулярным тракционным синдромом и пролиферативной диабетической ретинопатией.

СЭМ образцов СТ проводили на электронном микроскопе Zeiss EVO LS 10 (Цейсс, Германия). Исследование осуществляли в режиме низкого вакуума ($E_p = 70$ Па) при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе на образце 14–110 пА. Для оценки морфологии образца использовали два детектора вторичных и обратно-рассеянных электронов (VPSE и BSD, соответственно). Рабочее разрешение микроскопа находилось в диапазоне от 4,25 до 0,06 мкм/точка. Дополнительно был оценен химический состав поверхности образца посредством энергодисперсионного спектрометра (ЭДС-детектор Oxford X-Max 50, Великобритания), установленного на микроскоп.

Условия пробоподготовки образцов стекловидного тела к СЭМ

После забора образцы СТ объемом 0,6–0,9 мл помещали в стерильный шприц и сохраняли в условиях гипотермии (+4 °С) не более 24–48 часов.

Был использован оригинальный алгоритм размещения образца на предметном стекле, который заключался в так называемом «вытягивании», то есть в частичном разделении спавшихся фракций гелеобразной ткани с помощью струи 0,9М раствора NaCl. На следующем этапе из капли СТ механически вытягивали структуры, которые в нормальном состоянии связаны с другими белковыми образованиями и не доступны для самостоятельного изучения. Вытягивание проводили иглой с визуальным контролем под стереомикроскопом.

Выделенные из общей массы СТ отдельные форменные элементы длиной от 1 до 9 мм, были уложены рядом с каплей на поверхность углеродной ленты для дальнейшего изучения на СЭМ. При подготовке к СЭМ стекловидное тело не подвергалось каким-либо другим воздействиям, связанным с его фиксацией, окрашиванием или центрифугированием.

Критериями пригодности выведенных из капли СТ структур для дальнейшего изучения служили воспроизводимость макроморфологии и механическая устойчивость при вытягивании. Описанным методом для дальнейших исследований удалось подготовить образцы СТ в пяти случаях из семи.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты УЗ цифрового акустического исследования

Все полученные эхограммы были систематизированы в соответствии с той или иной преобладающей формой морфологических изменений СТ.

При анализе топографии распределения астероидных включений в проекции УЗ среза СТ были использованы плоскостные и объемные изображения без выраженных признаков изменения макроструктуры СТ.

Основную группу составили изображения глаз с АГ, которые демонстрировали наличие множества гиперэхогенных включений в проекции стекловидного тела.

Эхограммы были подразделены на те, в которых целостность СТ была условно сохранена и те, в которых имелись выраженные проявления

структурной деформации гиалоидных трактов и коллапса СТ. Также были выделены случаи с наличием единичных астероидных включений.

Варианты распределения астероидных включений при отсутствии коллапса стекловидного тела

Разница между УЗ изображениями исследуемых проекций стекловидного тела заключалась в степени проявления признаков деструкции гиалоидных трактов. Это осуществлялось посредством выделения зон внутренней деструкции СТ и определения признаков скопления точечных гиперэхогенных включений (непосредственно астероидных включений). Такой методический подход позволил подразделить подобные случаи на *три вида*.

Первый вид изменений структуры СТ при АГ

К данной группе были отнесены 11 пациентов (12 глаз). В этих случаях на УЗ изображениях практически по всей площади акустического среза стекловидной камеры было отмечено множество равномерно расположенных точечных гиперэхогенных включений, исключая область проекции преретинального гиалоидного тракта. Т.е. отмечалось полное заполнение УЗ среза стекловидного тела астероидными включениями.

Результаты цифрового сканирования позволили охарактеризовать не только структуру СТ, но и общее соотношение различных изменений внутри глаза.

При сравнительном исследовании в режиме серой шкалы было установлено, что в области передних отделов СТ (непосредственно за хрусталиком), видны границы неких структур, выделяющихся на фоне множественных точечных гиперэхогенных включений. Эти элементы хорошо различимы в проекции УЗ среза ПГМ в виде неравномерного щелевидного контура. Данное пространство может быть обозначено как пространство Бергера (Berger's space; *spatium Berger*). С обеих его сторон видны участки так называемой связки Вигера (Wieger's ligament; *lig. hyaloideocapsulare*). Подобные объекты нераспознаваемы в условно здоровых глазах.

Второй вид изменений структуры СТ при АГ

К данной группе были отнесены 26 пациентов (31 глаз).

В передних отделах стекловидного тела, непосредственно за хрусталиком не было сгруппированных астероидных включений, а практически по всей циркулярной проекции внутренней поверхности плоской части цилиарного тела прослеживались неравномерные по площади и протяженности эхонегативные пространства с точечными астероидными включениями. Причем наблюдаемые пространства соответствовали области передних центральных и периферических отделов СТ.

Такой вариант распределения астероидных включений — как во всем стекловидном теле, так и в проекции отдельных гиалоидных элементов — характерен для условно нормального морфологического строения СТ. При этом наблюдается различная плотность отложения астероидных включений в передних, средних и задних пространственных областях СТ, причем в средних и задних областях таких скоплений больше.

Третий вид изменений структуры СТ при АГ

К этой группе изменений были отнесены случаи деструкции областей СТ в проекции передних и средних его внутренних отделов. Они были выявлены у 8 пациентов (10 глаз).

На плоскостном продольном УЗ изображении четко проявляются контуры проекции отдельных гиалоидных трактов. В данном варианте изменений СТ хорошо прослеживаются места пограничного соприкосновения продольно расположенных анэхогенных областей, которые воспроизводятся как тонкие, несколько извитые гиперэхогенные «нити», переплетающиеся в виде сети. Предположительно, эти структуры соответствуют границам между гиалоидными трактами.

Отмечается, что при данном варианте изменений в нижнем отделе СТ находится значительно больше гиперэхогенных точечных включений, чем в передних и средних областях.

Распределение астероидных включений при коллапсе стекловидного тела

К данной группе отнесены 22 пациента (24 глаза) с астероидным гиалозом. На эхограммах такие изменения воспроизводились в виде коллапса корпуса СТ, а также признаков отслойки ЗГМ.

Выраженность этих нарушений у пациентов с коллапсом СТ была различной и оценивалась посредством изучения измененного акустического изображения СТ. При помощи акустической пространственной оценки данной области стекловидного тела по результатам УЗ цифрового сканирования получилось не только оценить изменения в виде коллапса СТ, но и охарактеризовать структурное состояние отслоенного, расположенного на периферии, заднего гиалоидного тракта и состояние гиалоидной мембраны.

Варианты распределения единичных астероидных включений

К данной группе клинических наблюдений, характеризующихся частичной деструкцией СТ, были отнесены результаты УЗ сканирования глаз пациентов, имевших структурные изменения его внутренней проекции. На плоскостных диагностических УЗ изображениях 6 глаз (6 пациентов), астероидные включения были сосредоточены в проекции преретинального гиалоидного тракта. Во всех случаях, на эхограммах было отмечено наличие единичных точечных гиперэхогенных включений разного размера в пределах границ заднего контура УЗ среза проекции стекловидного тела.

Виды акустического пространственного анализа стекловидного тела при астероидном гиалозе

Все представленные выше формы пространственного анализа структуры СТ, полученные на основании результатов цифрового акустического анализа, могут быть воспроизведены в виде объемных виртуальных моделей участков астероидных отложений. Эти модели могут быть проанализированы посредством использования мультипланарного пространственного анализа их

структуры. Такой анализ может быть осуществлен для 7-ми пространственных срезов.

Данный подход позволяет определять положение того или иного внутриглазного структурного элемента или определенного внутриглазного пространства, которое отграничено отложением астероидных включений. Такие диагностические акустические методики позволяют контролировать положение того или иного внутреннего пространственного объекта в различных сечениях и «фиксировать» его в пределах того или иного объемного изображения. Оно может быть воспроизведено в виде гиперэхогенных контуров или плоскостных структурных элементов, а также в виде их отдельных трехмерных цифровых акустических моделей.

Некоторые макроморфологические структурные элементы в процессе осуществления УЗ исследования могут быть выделены и определены как подвижные, и зафиксированы в промежуточном пространственном положении. Они могут быть прослежены и зафиксированы относительно того или иного временного отрезка. В каждом из таких пространственных вариантов может быть проведено 3D сканирование и осуществлено изучение пространственного взаимоотношения отдельных морфологических элементов.

Полости, воспроизводимые на комбинированном УЗ изображении СТ как округлые анэхогенные структуры различной формы, могут быть оценены количественно. Их параметры можно охарактеризовать как с топографических, так и с анатомо-морфологических позиций. Объемные характеристики отдельной полости в проекции СТ можно пространственно проанализировать в различных проекциях.

Другим вариантом акустического анализа СТ у пациентов с АГ может являться способ изучения акустической плотности астероидных включений.

Результаты СЭМ образцов стекловидного тела

При визуализации методом СЭМ в режиме низкого вакуума было обнаружено, что удлиненные элементы, выделенные из образцов СТ, обладали

сходной структурной организацией, в которой условно можно выделить четыре порядка (рис.1).

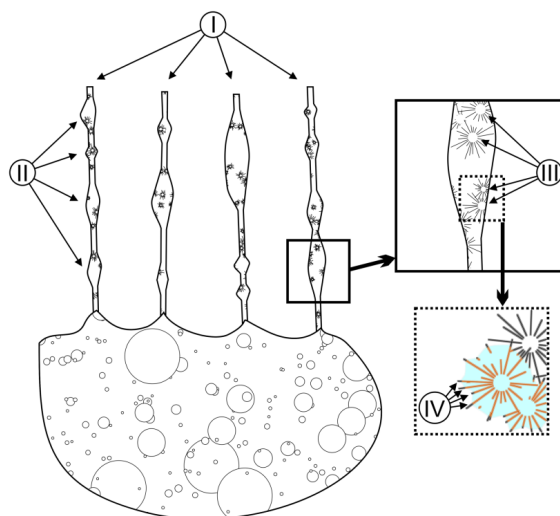


Рис. 1. Схема взаимоотношений доступных для визуализации структурных элементов СТ различных порядков (I–IV, объяснения в тексте).

Первый порядок — удлиненные структуры, или гиалоидные тяжи, характерной особенностью которых является трубчатое строение. Можно утверждать, что исходный внутренний диаметр этих удлиненных полых структур СТ в некоторых случаях достигал 0,2–0,3 мм, а исходная форма в позиции *in situ* наиболее вероятно была схожа с резко удлиненными карманами, а не с трубками.

Второй порядок — веретенообразные «полости» в продольной структуре тяжей. Это зоны остаточного просвета полого гиалоидного тяжа, сохранившегося в процессе пробоподготовки. Возникшие полости можно условно разделить на два подтипа. Один — связан с тем, что спадающая при вытягивании структура была поддержана изнутри каркасом из твердых форменных элементов, преимущественно АТ, а второй — сформировался за счет гидростатической поддержки внутреннего просвета каплей электролита, который сконцентрировался в момент высыхания образца.

Третий порядок — непосредственно сами твердые форменные элементы внутри полых тяжей. Наиболее важным наблюдением является то, что во всех проанализированных образцах различные формы фосфата кальция

обнаруживаются **только внутри веретенообразных полостей** гиалодных тяжей.

Взаимное пространственное расположение твердых форменных элементов внутри гиалоидного тяжа весьма нерегулярно. Для АТ характерно как одиночное нахождение, так и формирование сгруппированных разномерных агрегатов. Размеры индивидуальных АТ и их связь с расстоянием до центра ближайшей более крупной частицы показаны на рис. 2. Было определено, что чем мельче АТ, тем ближе оно располагается к более крупному индивиду. Это скорее всего говорит о многократном зарождении этих объектов в благоприятных локальных условиях.

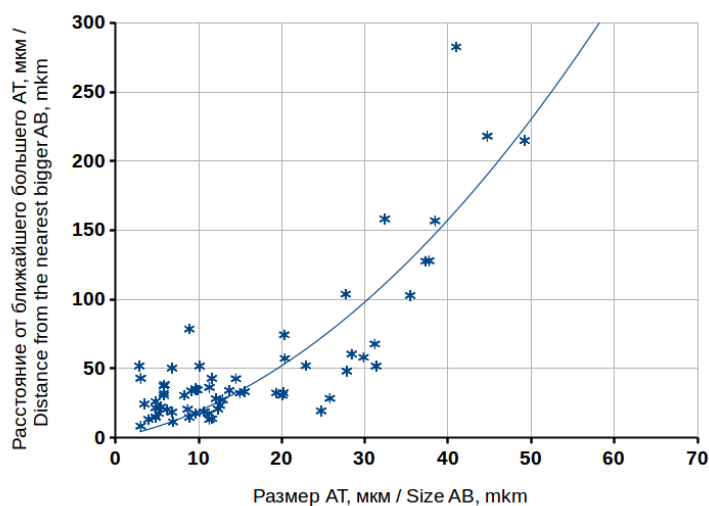


Рис. 2. Размеры индивидуальных АТ и связь диаметра индивидуальной частицы с расстоянием до центра ближайшей более крупной частицы.

Четвертый порядок — элементы внутреннего строения АТ. Следует отметить, что все обнаруженные АТ имели сходное строение, независимо от размера и взаимного положения.

Исследование на низких ускоряющих напряжениях позволяет детально раскрыть микротопографию облегающей АТ мембраны — внешней оболочки гиалоидного тяжа. Мембрана вне АТ имеет ровную поверхность, но при плотном контакте с АТ отображает её микроскульптуру и подчеркивает выступающие из сферических тел пластинчатые кристаллы. Это наблюдение позволяет косвенно говорить о радиально-лучистом строении кристаллического агрегата, являющегося основой АТ.

Следует отметить, что помимо описанных форменных элементов с помощью СЭМ и химического микроанализа во всех образцах во внутреннем наполнении веретенообразных структур также были обнаружены петрифицированные эритроциты.

Минеральный состав стекловидного тела

В образцах СТ методом химического микроанализа были идентифицированы различные формы фосфатов кальция.

Фосфат кальция для сферолитов

Таблица 1. Элементный состав АТ

Название спектра	Элементный состав (at%)										Сумма	Са/Р
	С	N	O	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca		
Сферолит 1 (спектр 4)	24,77	4,74	43,48	2,35	0,07	2,25	0,05	1,29	0,1	2,07	81,17	0,92
Сферолит 1 (спектр 5)	2,39	0,79	7,54	32,16	0,01	0,48	0,03	31,21	0,33	0,44	75,38	0,92
Сферолит 2	13,47	1,95	48,23	2,67	0,06	3,52	0,03	2,17	0,12	3,36	75,58	0,95
Сферолит 3	12,62	10,84	21,84	12,38	0,1	9,87	0,44	2,84	0,05	9,97	80,95	1,01
Сферолит 4	8,58	5,08	15,44	27,09	0,03	4,47	0,15	8,45	0,07	4,12	73,48	0,92

Полуколичественный химический микроанализ обнаженных участков островершинных кристаллов, выступающих из сферолита, выявил, что минеральное вещество имеет соотношение Са:Р близкое к 1:1 (таблица 1). Учитывая такое соотношение, слагающий АТ фосфат кальция можно определить, как дикальциевый фосфат дигидрат (ДКФД, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Необходимо указать на то, что все изученные сферолиты, полученные из 5 образцов, имели аналогичный минеральный состав. Очевидно, что радиально-лучистый агрегат игольчатых кристаллов ДКФД имеет структурообразующую функцию при формировании АТ, являясь по существу их «скелетом».

Состав кристаллов, формирующих основу АТ, достаточно выдержан, в то время как прочие фосфорсодержащие форменные элементы, отмечаемые в препарате СТ, имеют переменный состав (таблица 2).

Таблица 2. Элементный состав форменных минеральных элементов СТ после
высыхания

Название спектра	Элементный состав (at%)										Сумма	Ca/P
	C	N	O	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca		
Минеральный Детрит	10,4	2,74	31,96	12,42	0,3	3,55	0,32	12,87	0,45	4,85	79,86	1,37
Эритроцит 1	9,49	6,76	29,73	18,44	0,27	3,24	0,29	7,47	0,41	4,42	80,52	1,37
Эритроцит 2	8,11	5,1	28,98	24,03	0,39	3,56	0,21	7,2	0,36	3,62	81,56	1,02

Фосфатный минеральный детрит

Близкой к незрелому гидроксилapatиту является минеральная фаза, слагающая минеральный детрит, регулярно обнаруживаемый внутри веретенообразных полостей. Это обломки сплошной минеральной массы, исходную морфологию, позицию и объем которой описать не представляется возможным. Обломочная, иногда оскольчатая, форма частиц фосфатного минерального детрита говорит о его значительном перемещении вдоль полостей от исходной позиции, в которой была сформирована сплошная масса минерала.

Измененные эритроциты

Замещенные фосфатом кальция (петрифицированные, фосфатизированные, кальцинированные) эритроциты обладают соотношением Ca:P, колеблющемся в диапазоне 1:1–1:1,4. Это позволяет сделать вывод о возможной направленности процесса химического изменения, начинающегося с замещения органического вещества эритроцитов ДКФД, произошедшего в условиях локального закисления, с последующим преобразованием в незрелый гидроксилapatит при восстановлении нормального pH СТ.

Гипотетическая модель взаимоотношений различных форм фосфатов кальция при АГ

Бикарбонатный и фосфатный буферы играют основную роль в поддержании стабильности pH. Бикарбонатный буфер ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{CO}_3$),

является типичным для всех глазных жидкостей. Ему принадлежит основная роль в поддержании постоянного уровня pH СТ [Völcker H. E., 1980]. Согласно исследованиям Mieno H. и др., pH СТ у группы пациентов без сахарного диабета находится в диапазоне 7,24–7,26 ($7,25 \pm 0,02$) [Mieno H., 2018]. Сдвиги pH за указанные границы приводят к существенным сдвигам окислительно-восстановительных процессов, проницаемости биологических мембран. Учитывая, что интервал стабильности pH ДКФД находится в интервале от 2 до 6, а значение pH СТ в норме 7,24–7,26, можно предположить, что сопутствующим фактором при возникновении и дальнейшем росте АТ является сдвиг pH в сторону ацидоза. Помимо кислотности, необходимым условием для выпадения минеральных форм фосфатов кальция является достижение насыщения по кальцию и фосфору, предполагающее транспортировку к точке зарождения АТ и создание избытка этих элементов. Для реконструкции патогенетической цепочки, приводящей к формированию АТ, важно отметить, что их возникновение происходит не по всему объему СТ.

Представленные в настоящей работе наблюдения показывают, что АТ расположены только внутри полых структур, где наряду с прочими формами нахождения фосфатов они образуют патогенетический комплекс. Таким образом можно говорить о том, что все три фактора: избыточная концентрация подвижного кальция (Ca^{2+}), избыточная концентрация фосфат-аниона (Pi) и локальный ацидоз возникали внутри некоторых белковых каналов в объеме СТ. Наличие фосфатизированных эритроцитов позволяет сделать предположение о достаточно приближенном положении дистальной части этих структур к прилежащим к СТ кровенасыщенным структурам глаза. В противном случае невозможно объяснить попадание эритроцитов в эти «полости» до момента их кальцинации/фосфатизации.

В настоящей работе не рассматривался патогенез возникновения АТ, который до сих пор остается предметом дискуссий. Однако, выявленный факт регулярного присутствия петрифицированных эритроцитов среди прочих форменных элементов позволяет предположить наличие связи между

образованием АТ и регионарными сосудистыми нарушениями, когда система капилляров, кровоснабжающих структуры заднего полюса глаза временно теряет устойчивость. Часть эритроцитов, не подвергшаяся фагоцитозу (по причине отсутствия в СТ фагоцитирующих клеток), осталась в СТ и могла адсорбировать на своей поверхности ионы Са и фосфат-ионы на фоне протекающего АГ. При этом, процесс вне зависимости от его характера ограничивается внутренним просветом гиалоидных тяжей.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на основе комбинированного ультразвукового исследования исследования глаза и сканирующей электронной микроскопии проанализировано структурно-морфологическое состояние стекловидного тела при астероидном гиалозе (68 пациентов (136 глаз) и 7 образцов стекловидного тела).

2. По результатам УЗ исследования разработан алгоритм, заключающийся в последовательном изучении и сравнении локализации астероидных включений в плоскостном и объемном срезах.

3. Применение этого алгоритма позволило составить схему часто встречающихся признаков деструкции гиалоидных трактов.

4. Впервые разработан и апробирован оригинальный способ пробоподготовки образцов стекловидного тела, обеспечивающий максимальное сохранение нативной структуры стекловидного тела.

5. По результатам сканирующей электронной микроскопии образцов, полученных в результате витрэктомии, выявлена повторяющаяся структура, высшим порядком которой можно считать гиалоидные тяжи, вторым порядком — веретенообразные «полости» в продольной структуре тяжей, третьим порядком — непосредственно сами твердые форменные элементы внутри полых тяжей, четвертым порядком — элементы внутреннего строения астероидных телец.

6. Сравнительный анализ результатов цифрового УЗ исследования структуры стекловидного тела у пациентов с астероидным гиалозом и результаты сканирующей электронной микроскопии показывают, что все

новообразованные форменные элементы, включая астероидные тельца, расположены только внутри веретенообразных полостей гиалоидных тяжей и не выявляются в объеме неизмененных участков стекловидного тела.

7. Подтвержден минеральный состав форменных элементов, который варьирует от фосфата кальция до хлоридов калия и натрия, а также расшифрована структура астероидных телец, основой которых является радиально-лучистый агрегат игольчатых кристаллов фосфата кальция с матриксом из органических соединений.

8. По морфометрическим данным установлена многократность процесса зарождения и роста астероидных телец, что указывает на повторяющуюся патогенетическую ситуацию в основе их формирования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенный метод и алгоритм УЗ исследования стекловидного тела позволяют определить формы морфологических изменений и оценить акустическую структуру стекловидного тела при астероидном гиалозе. Отмеченные в работе признаки деструкции гиалоидных трактов могут быть использованы в практической деятельности для оценки степени изменений стекловидного тела.

2. Разработанный метод пробоподготовки образцов стекловидного тела для исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии в режиме низкого вакуума может быть использован для дальнейших исследований морфологической структуры и элементного состава стекловидного тела с минимальными искажениями.

3. Предложенное ранжирование структурных элементов стекловидного тела при астероидном гиалозе может быть применимо для интерпретации особенностей метаболических процессов в стекловидном теле и направлений физической миграции веществ в его объеме при развитии астероидного гиалоза и в норме.

Список публикаций по теме диссертации:

1. Насникова И.Ю., Харлап С.И., Салихова А.Р., Круглова Е.В., Эксаренко О.В., Мирошник Н.В. Трехмерный анализ анатомо-топографической структуры глаза при врожденной патологии // **Кремлевская Медицина**. Клинический вестник. – 2018, № 3. – С.150–159.
2. Салихова А.Р., Харлап С.И., Мирошник Н.В., Эксаренко О.В., Шерстнева Л.В. Мультипланарный акустический анализ в диагностике структурно-морфологических изменений глаза при некоторых видах врожденной патологии // **Вестник офтальмологии**. – 2018. – Т.134, № 6. – С.10–14.
3. Харлап С.И., Харлап М.С., Салихова А.Р., Митичкина Т.С., Сурнина З.В., Мирошник Н.В., Авитосов С.Э. Клинико-морфологические аспекты при болезни Фабри (клинический случай) // **Вестник офтальмологии**. – 2019. – Т. 135, № 3. – С.78–89.
4. Харлап С.И., Салихова А.Р., Мирошник Н.В., Шерстнева Л.В. Астероидный гиалоз // **Вестник офтальмологии**. – 2019. – Т. 135, № 5-2. – С.286–289.
5. Харлап С.И., Салихова А.Р., Мирошник Н.В., Новиков И.А., Аветисов С.Э. Особенности структуры стекловидного тела при астероидном гиалозе // **Вестник офтальмологии**. – 2020. – Т.136, № 4. – С.20–26.
6. Харлап С.И., Новиков И.А., Аветисов С.Э., Мирошник Н.В., Сургуч В.К., Федоров А.А., Чижонкова Е.А. Результаты сканирующей электронной микроскопии стекловидного тела при астероидном гиалозе // **Вестник офтальмологии**. – 2021– Т. 137, № 5-2. – С.181–187.

Список специальных сокращений, обозначений и терминов:

- УЗ** — ультразвук, ультразвуковой
СТ — стекловидное тело
АТ — астероидные тельца
3D — трехмерный режим
ПГМ — передняя гиалоидная мембрана
ЗГМ — задняя гиалоидная мембрана
ВПМ — внутренняя пограничная мембрана
СЭМ — сканирующая электронная микроскопия
ДКФД — дикальциевый фосфат дигидрат