

На правах рукописи

Патеюк Людмила Сергеевна

**МИНЕРАЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РОГОВИЦЫ
И НЕОРГАНИЧЕСКИЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СЛЕЗЫ
ПРИ КЕРАТОКОНУСЕ**

14.01.07 – глазные болезни

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2015

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

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Аветисов Сергей Эдуардович

Официальные оппоненты:

Майчук Дмитрий Юрьевич, доктор медицинских наук, ФГБУ «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, заведующий отделом терапевтической офтальмологии

Слонимский Юрий Борисович, доктор медицинских наук, доцент, ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится «30» ноября 2015 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11, корпус А, корпус 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 « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Иванов М.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Кератоконус (КК) – невоспалительное эктатическое заболевание роговицы, проявляющееся деструктивными изменениями, прогрессирующим истончением и выпячиванием ее центральной части с соответствующим изменением формы до конусовидной. Вопрос о происхождении КК по-прежнему остается открытым: достоверно неизвестны ни его этиология, ни патогенез. Не установлены ультраструктурные механизмы и нарушения, лежащие в основе развития этого вида протрузии, несмотря на огромное число исследований, теорий и гипотез о природе КК.

Согласно немногочисленным эпидемиологическим данным заболеваемость КК широко варьирует (0,0003–2,3%) в зависимости от региона наблюдения (Горскова Е.Н., Севостьянов Е.Н., 1998; Jonas J.V. et al., 2009; Millodot M. et al., 2011). Высока социальная значимость этого заболевания в связи с возможностью возникновения у пациентов с КК инвалидности по зрению или профессиональной нетрудоспособности. Ранняя диагностика КК возможна только при наличии современной высокотехнологичной и дорогостоящей лечебно-диагностической базы. Лечебные мероприятия, выполняемые с целью стабилизации или оптической коррекции этого вида кератэктазии, также требуют высоких финансово-экономических затрат и высокого профессионализма врачебного персонала. Отдельного рассмотрения заслуживает эффективность проводимой при КК терапии, сопряженной с рисками повторных хирургических вмешательств в результате недостижения желаемых результатов или развития рецидивов (Barbara A., Rabinowitz Y.S., 2011; Sinjab M.M., 2011; Wang M., Swartz T.S., 2010). Большое количество опубликованных за последние годы научных работ, посвященных КК, говорит об актуальности данной проблемы (Абугова Т.Д., 2011; Лобанова О.С, Слонимский Ю.Б., 2012; Нероев В.В. и соавт., 2012; Пенкина А.В. и соавт., 2012; Слонимский Ю.Б. и соавт., 2014).

Вопросы этиологии и патогенеза КК в системе современных медицинских знаний широко освещены на междисциплинарном уровне (офтальмология, генетика, гистология, цитология, биохимия, иммунология, аллергология, эндокринология и др.). Несмотря на многочисленные сообщения в специальной литературе об исследованиях, свидетельствующих в пользу той или иной теории возникновения КК и данных об его ассоциации с другими заболеваниями, вопрос о причинах и механизмах его развития остается открытым (Каспарова Е.А., 2002; Пучковская Н.А., Титаренко З.Д., 1990; Barbara A., Rabinowitz Y.S., 2011; Kenney C.M, Brown D.J., 2003; Sinjab M.M., 2011; Wang M., Swartz T.S., 2010).

Химический состав слезной жидкости при заболеваниях глаз может претерпевать существенные изменения (Бржеский В.В., 1990; Куренков В.В, и соавт., 2000; Майчук Д.Ю., 2005; Мошетьова Л.К., Волков О.А., 2004). В ряде современных исследований отмечена связь КК с аномальным составом слезы (Горскова Е.Н. и соавт., 1998; Горскова Е.Н. и соавт., 2001; Горскова Е.Н. и соавт., 2002; Севостьянов Е.Н. и соавт., 2005; Семенова А.Л. и соавт., 2008; Kahan I.L. et al., 1990; Lema I., Duran J.A., 2005; Lema I. et al., 2008; Lema I. et al., 2009). Имеются сообщения о минеральном дисбалансе (железо и цинк) в роговице при КК (Севостьянов Е.Н. и соавт., 2005). Получены предварительные данные об уменьшении кислотности слезы и аномальном распределении меди в роговице при развитии КК. В 2011г. С.Э. Аветисов и соавт. предложили гипотезу о принципиально новом патогенетическом механизме развития КК, связанном с недостаточностью медь-зависимого фермента лизилоксидазы (Аветисов С.Э. и соавт., 2011).

В связи с вышеизложенным можно сделать вывод о необходимости детального изучения минерального метаболизма в тканях роговицы и в слезной жидкости в патогенезе КК – уточнить характер и роль нарушений обмена минералов в роговице, изучить минеральные компоненты слезы и провести анализ ее кислотности и осмолярности.

Цель: изучение распределения минеральных элементов в тканях роговицы и неорганических биохимических параметров слезы (минеральный состав, кислотность и осмолярность) в норме и при кератоконусе.

Задачи:

1. Изучить минеральный состав роговичных дисков без признаков патологических изменений и роговичных дисков, удаленных при сквозной кератопластике (СКП) по поводу КК III ст. с помощью методов рентгенофлуоресцентного анализа (XRF) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии на базе сканирующего электронного микроскопа (SEM-EDS).

2. Адаптировать методы XRF и SEM-EDS для изучения биологических объектов; разработать методики элементного анализа тканей роговицы в соответствии с ее зонами и слоями.

3. Определить минеральные компоненты, входящие в состав слезы в норме и при КК, методом электронно-зондового рентгеноспектрального анализа (РСМА).

4. Разработать методику рН-метрии, позволяющую с высокой точностью оценивать кислотность содержимого конъюнктивальной полости; разработать программное обеспечение для компьютерного колориметрического анализа лакмусовых проб слезы.

5. Изучить статистическое распределение кислотности слезы в норме (среди здоровых лиц, не страдающих заболеваниями глаз, и пациентов с миопическим астигматизмом) в зависимости от рефракции, возраста, половой принадлежности, аллергологического анамнеза и привычки к табакокурению.

6. Выявить статистические особенности распределения кислотности слезы в норме (среди здоровых лиц, не страдающих заболеваниями глаз, и пациентов с миопическим астигматизмом) и при КК.

7. Изучить статистическое распределение осмолярности слезы при КК.

Научная новизна

1. Впервые на репрезентативном материале изучен минеральный состав роговицы в норме и при КК. При КК выявлено аномальное перераспределение минеральных элементов в тканях роговицы.

2. Разработаны методики проведения XRF и SEM-EDS для оценки состояния роговицы.

3. Впервые в репрезентативном материале проведено исследование минерального состава слезной жидкости в норме и при КК.

4. Впервые обнаружены значимые концентрации бора в слезе в норме и при КК. Предложена гипотеза боратной буферной системы в качестве наиболее надежной составляющей механизма, поддерживающего стабильность нормального кислотно-основного состояния слезы.

5. Впервые на репрезентативном материале проведено изучение кислотности слезы в норме (у здоровых лиц и пациентов с миопическим астигматизмом) и при КК.

6. Разработана оригинальная методика прецизионной рН-метрии, позволяющая оценивать кислотность сред конъюнктивальной полости при помощи лакмусовых тест-полосок высокой чувствительности. Разработано оригинальное программное обеспечение для проведения компьютерного колориметрического анализа лакмусовых тест-полосок с пробами слезы.

7. Выявлена гетерогенность уровня рН содержимого конъюнктивальной полости.

8. Установлено естественное возрастное изменение кислотности слезы: уменьшение рН ее вязкого компонента.

9. Впервые выявлено достоверное отличие кислотности содержимого конъюнктивальной полости у пациентов с КК от аналогичного показателя в норме.

10. Впервые на репрезентативном материале изучена осмолярность слезы у пациентов с КК.

11. Предложена новая теория патогенеза КК, основанная на принципе «порочного круга».

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанные методики XRF и SEM-EDS для изучения тканей роговицы могут быть адаптированы для изучения других биологических объектов. Выявленные нарушения минерального метаболизма в роговице и сдвиг pH вязкого компонента слезы в щелочную сторону при КК, а также новая теория патогенеза КК по принципу «порочного круга» в дальнейшем предполагают разработку патогенетических методов терапии, диагностики и профилактики этого заболевания. Предложенная гипотеза боратной буферной системы слезы может быть рассмотрена в контексте создания местно действующих фармакологических препаратов. Разработанную методику pH-метрии содержимого конъюнктивальной полости применяют в научно-исследовательской работе ФГБНУ «НИИГБ». Выявленная гетерогенность кислотности содержимого конъюнктивальной полости в норме и при КК является предметом будущих научно-исследовательских работ.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов и основных принципов научного исследования, соблюдены схема и этапы последнего. Сочетание качественных и количественных методик исследования позволили предложить гипотезу о возможных причинно-следственных связях в этиопатогенезе КК. Работа выполнена в дизайне одномоментного кросс-секционного исследования с использованием клинических, инструментальных, аналитических, лабораторных и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. При КК III ст. нарушен минеральный обмен в роговице. Аномальное распределение минеральных элементов в роговице характеризует преимущественное накопление железа, меди и цинка в зоне пигментного

кольца Флейшера (Fleischer B.) в поверхностных слоях стромы, в области боуеновой мембраны и в эпителии роговицы; центральная зона роговицы тотально обеднена всеми тремя элементами.

2. Методы рентгенофлуоресцентного анализа (XRF) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии на базе сканирующего электронного микроскопа (SEM-EDS) могут быть использованы для изучения роговицы.

3. Минеральный компонент слезной жидкости в норме и при КК представлен преимущественно растворимыми соединениями хлора, натрия, калия и бора. Боратная буферная система может выступать в качестве вероятной составляющей механизма, поддерживающего нормальное кислотно-основное состояние слезы. Минеральный состав слезы при КК аналогичен таковому у здоровых лиц.

4. Оригинальная методика рН-метрии с проведением компьютерного колориметрического анализа лакмусовых проб может быть использована для измерения кислотности биологических сред, в т.ч. для измерения кислотности содержимого конъюнктивальной полости. Содержимое конъюнктивальной полости гетерогенно; кислотность свободной слезной жидкости достоверно выше ее вязкого компонента, имеющего более щелочной характер.

5. Естественную возрастную изменчивость кислотности слезы характеризует физиологическое уменьшение рН (закисление) ее вязкого компонента. Кислотность свободной слезной жидкости не зависит от возраста, половой принадлежности, аллергологического анамнеза, привычки к табакокурению и рефракции. Статистическое распределение рН свободной слезной жидкости и вязкого компонента слезы пациентов с миопическим астигматизмом не отличается от аналогичного показателя здоровых лиц.

6. У здоровых лиц и у пациентов с миопическим астигматизмом распределение рН свободной слезной жидкости является нормальным, а при КК имеет признаки полимодальности. Кислотность вязкого компонента слезы пациентов с КК в более молодом возрасте превышает норму.

7. Связь кислотности слезы с патогенезом КК возможна согласно предложенной теории патогенеза КК по принципу «порочного круга».

8. Статистическое распределение осмолярности слезы при КК не имеет отличительных особенностей от нормы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяет репрезентативный объем материала с использованием современных методов исследований и объективных методов обработки данных. В работе использовано современное сертифицированное офтальмологическое, аналитическое и лабораторное оборудование, условия исследования стандартизированы для выполнения поставленных задач. Анализ материала и статистическая обработка полученных данных выполнены с применением современных методов и в соответствии с современными стандартами сбора и обработки научных данных.

Основные положения и материалы диссертации доложены на:

1. Научно-практической конференции с международным участием «VI Российский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, 2013) – «Изменение химического состава роговицы при кератоконусе (предварительное сообщение)»;

2. XII Международной научно-практической конференции «Федоровские чтения – 2014. Современные технологии лечения патологии роговицы»: «Современные технологии лечения патологии роговицы» (Москва, 2014) – «Новые данные о происхождении кольца Флейшера при кератоконусе»;

3. V Международном симпозиуме «Осенние рефракционные чтения»: «Индукцированные аметропии» (Москва, 2014) – «Новая концепция патогенеза кератоконуса»;

4. «XIV Всероссийской школе офтальмолога» (ВШО – 2015) (Московская обл., 2015) – «Биохимические неорганические параметры слезы при кератоконусе»;

5. X Съезде офтальмологов России (Москва, 2015) – «Физико-химический барьер в роговице – основа новой концепции патогенеза кератоконуса»;

6. Заседании проблемной комиссии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней» (ФГБНУ «НИИГБ») – 08.06.2015 г.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в подготовке и проведении всех экспериментальных и клинических исследований, обработке и интерпретации полученных данных, анализе результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертации.

Внедрение результатов работы

Разработанные в ходе настоящей работы методики и полученные результаты исследований реализованы и применяются в научно-исследовательской работе ФГБНУ «НИИГБ».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 – в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами и 30 рисунками. Работа состоит из введения, главы обзора литературы, главы о материале и методах настоящих исследований, главы о результатах собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 251 источник, из них 66 – русскоязычных и 185 – иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Общая характеристика материала, а также специальные офтальмологические и неофтальмологические методы исследования, использованные в настоящей работе, представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Материал и методы специальных исследований

Методы исследования	Характеристики материала исследования		
	Материал	Группы	
		Контрольная (норма)	Исследуемая (кератоконус)
Рентгенофлуоресцентный анализ (XRF)	Роговичные диски (шт.)	7	5
	Возраст доноров и пациентов (лет)	25–35	27–31
	Муж.	7	3
	Жен.	0	2
Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия со сканирующей электронной микроскопией (SEM-EDS)	Роговичные диски (шт.)	6	5
	Возраст доноров и пациентов (лет)	25–35	28–34
	Муж.	6	4
	Жен.	0	1
Электронно-зондовый рентгеноспектральный анализ (РСМА)	Пробы слезы (шт.)	12	22
	Возраст пациентов (лет)	21–28	20–32
	Муж.	7	14
	Жен.	5	8
рН-метрия	Пробы слезы (шт.)	200 *	60
	Возраст пациентов (лет)	18–47	20–43
	$\mu \pm \sigma$	26,50 ± 6,80	30,83 ± 5,76
	Mo	21	28
	Муж.	88	48
	Жен.	112	12
Осмометрия	Пробы слезы (шт.)	— **	40
	Возраст пациентов (лет)		20–52
	$\mu \pm \sigma$		33,90 ± 8,42
	Mo		32
	Муж.		32
	Жен.		8

* Контрольная группа (норма) включала две подгруппы: А – здоровые лица и Б – пациенты с миопическим астигматизмом (см. табл. 2).

** В качестве контроля использовали доступные в литературе данные, полученные по результатам ранее проведенных исследований.

Таблица 2. Характеристика материала для рН-метрии слезы в контрольной группе

Характеристики	Подгруппы контрольной группы	
	А	Б
Пробы слезы (шт.)	100	100
Возраст пациентов (лет)	20–47	18–42
$\mu \pm \sigma$	$27,7 \pm 7,59$	$25,31 \pm 5,69$
<i>Mo</i>	20	21
Муж.	48	40
Жен.	52	60

В качестве исследуемого материала использовали кадаверные роговичные диски без признаков патологических изменений, и роговичные диски, удаленные при сквозной кератопластике по поводу КК III ст. согласно классификации, предложенной М. Амслером, а также пробы слезы базальной секреции в норме и при КК I–III ст. (Amsler M., 1951; Абугова Т.Д., 2010).

Кадаверные глаза, энуклеированные не позже чем через 12 ч. после смерти донора, консервировали в специальной среде для хранения роговиц (среда Борзенка С.А. – Мороз З.И.) во влажной камере при температуре от +4 до +6°C не более 3 сут. (Борзенок С.А., 2008).

Пациенты, кроме опроса, специальных офтальмологических и неофтальмологических методов исследований, проходили стандартное для КК офтальмологическое обследование, включая визометрию, периметрию, авторефрактокератометрию, пневмотонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, эхобиометрию и исследование роговицы при помощи оптического анализатора переднего отрезка глаза «Galilei G4» (Ziemer Ophthalmic Systems AG, Швейцария).

Критерии включения пациентов в исследуемые группы: прогрессирующий КК I–III ст. обоих глаз.

Критерии включения пациентов в контрольные группы нормы: отсутствие диагноза и/или подозрения на КК.

Критерии исключения пациентов из исследования: хирургические вмешательства по поводу КК, использование жестких и/или мягких контактных линз, инстилляций офтальмологических препаратов, синдром

сухого глаза и другие заболевания глазной поверхности и/или переднего отрезка глазного яблока, хирургические вмешательства на переднем отрезке глазного яблока и/или структурах придаточного аппарата глаза, тяжелые заболевания глаз в настоящее время или в анамнезе и/или сопутствующие общесоматические заболевания.

Химический состав роговичных дисков определяли методом XRF при помощи энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного спектрометра «РеСПЕКТ» (Предприятие «ТОЛОКОННИКОВ», Россия) и методом SEM-EDS при помощи сканирующего электронного микроскопа EVO LS 10 (Carl Zeiss Group, Германия), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским спектрометром (кремний-дрейфовым детектором рентгеновского излучения) X-Max 50 (Oxford Instruments, Соединенное Королевство).

Минеральный состав слезы определяли методом электронно-зондового рентгеноспектрального анализа (РСМА) при помощи комбинированного электронно-зондового микроанализатора Superprobe JXA-8200 (JEOL Ltd., Япония), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским спектрометром.

Кислотность слезы определяли методом рН-метрии по оригинальной методике с применением компьютерного колориметрического анализа.

Осмолярность слезы измеряли по стандартной методике при помощи осмометра TearLab Osmolarity System (TearLab Corp., США).

При наличии показаний пациентам проводили дополнительные уточняющие методы исследования.

Результаты собственных исследований

Для рентгенофлуоресцентного анализа (XRF) роговичные диски выкраивали при помощи корнеальных трепанов диаметром 7–8 мм. Затем при помощи трепана диаметром 2 мм выкраивали два сегмента (условно центральный и периферический в нижнем отделе роговицы) (рис. 1). Образцы подвергали эвапорации в беспылевой камере: температура – +20°C, относительная влажность – 65% и атмосферное давление – 1 атм. В качестве источника излучения использовали рентгеновскую медную трубку: ускоряющее напряжение на трубке – 30 кВ, экспозиция – 300 с.

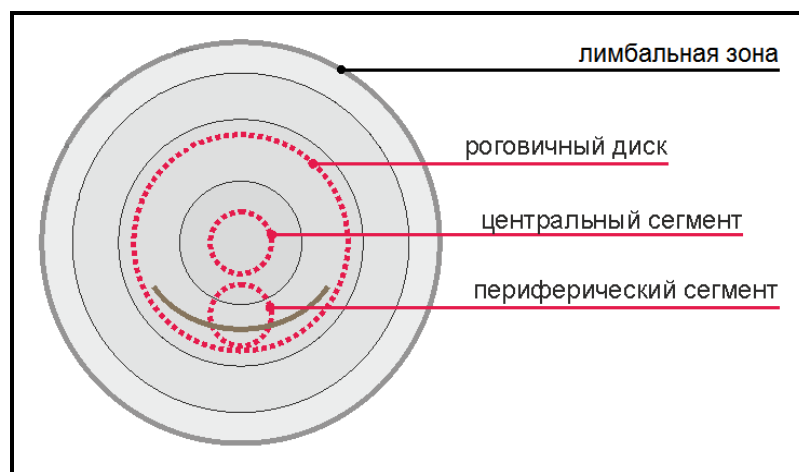


Рисунок 1. Препарирование роговицы для проведения XRF

В центральной и периферической зоне роговичных дисков в норме выявлено наличие меди, цинка и железа. При КК в периферической зоне выявлено накопление меди, цинка, железа; в центральной зоне эти элементы отсутствовали. Содержание меди в периферической зоне при КК превышает норму в среднем в 20,6 раза, цинка – в 7,8 раза, железа – в 3,7 раза.

Для энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии со сканирующей электронной микроскопией (SEM-EDS) роговичные диски выкраивали при помощи корнеальных трепанов диаметром 7–8 мм и подвергали быстрому замораживанию в жидком азоте при температуре –195,75°C с последующей лиофилизацией при температуре –5°C и давлении в 50–60 Па. Через центральную зону роговичного диска был произведен

косо-сагиттальный срез (рис. 2). На гистологическом срезе выделяли 5 субпараллельных профилей длиной 850 точек. На поверхности роговицы выделяли профиль, параллельный краю среза, длиной 1000 точек. Необходимый регистрируемый диапазон энергий рентгеновского спектра составлял 4,445–9,982 кэВ. В каждой точке получали спектр при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе на образце 520 пА, в расширенном режиме давления ЕР и в режиме низкого вакуума, время экспозиции – 18 сек.

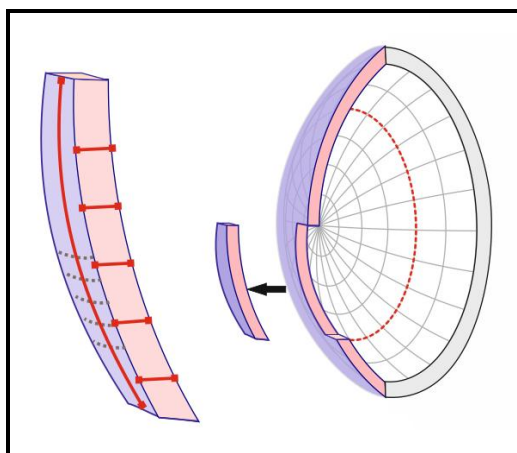


Рисунок 2. Препарирование роговицы для проведения SEM-EDS

Карты распределения, построенные по результатам интерполяции данных, показали, что в норме железо (рис. 3 А), медь и цинк распределены относительно равномерно в толще роговицы. При КК выявлено аномальное избыточное накопление железа, меди и цинка в передних слоях периферической зоны роговичного диска (рис. 3 Б, В и Г).

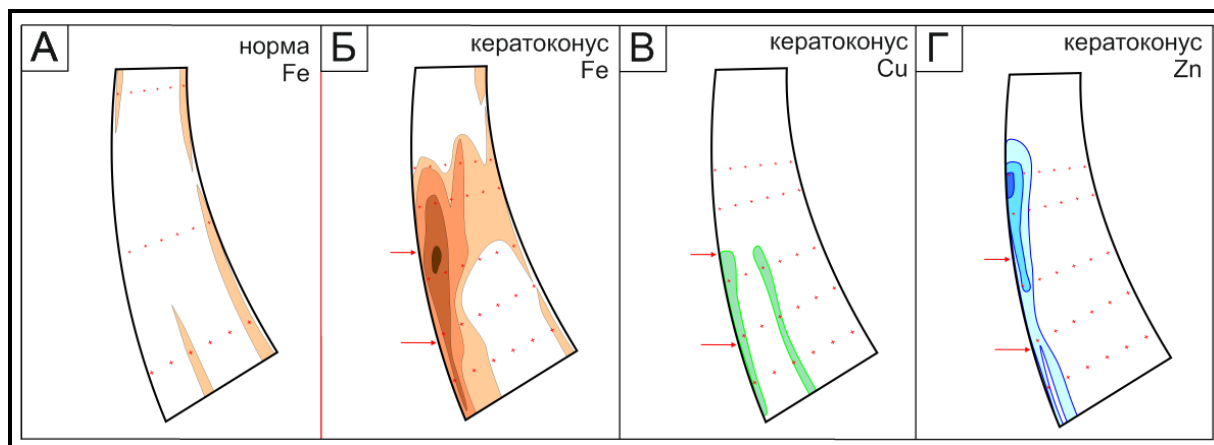


Рисунок 3. Карты распределения металлов в роговице в норме и при КК по данным SEM-EDS

Полученные результаты свидетельствует в пользу того, что кольцо Флейшера формируется в результате осаждения минеральных элементов на физико-химическом барьере (увеличение рН или Eh) в тканях роговицы. Недостаточность металлов и нарушение активности металлозависимых ферментов в центральной зоне роговицы ведут к эктазии из-за деструктивных процессов, сопровождающихся алкализацией среды и развитием оксидативного стресса (увеличение рН и Eh). В пределах предложенной схемы просматривается возможный «порочный круг» (рис. 4).

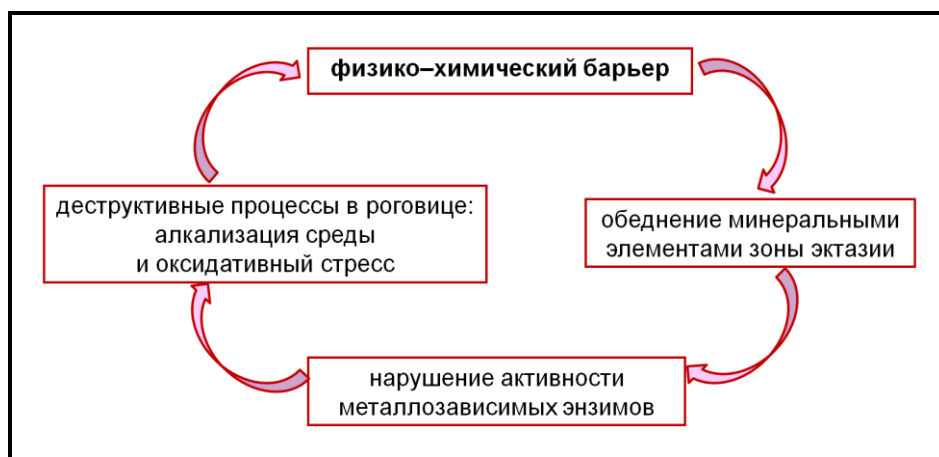


Рисунок 4. Патогенез кератоконуса, развивающийся по принципу «порочного круга»

Для электронно-зондового рентгеноспектрального анализа РСМА производили забор слезы при помощи микропипетки из зоны слезного ручья «в одно касание». Пробы высушивали в контейнере на токопроводящей углеродной пленке в беспылевых условиях при относительной влажности 85% и температуре +18°C до получения лиофилизата («кристаллограмма»). Далее пробы вакуумировали с целью их эвапорации. Изображения получали в отраженных электронах BSE, вторичных электронах SE и в режиме построения микротопограмм поверхности ТОРО с последующим спектральным анализом и локальным элементным микрокартированием.

Основными минеральными составляющими слезной жидкости являются хлор, натрий, калий и бор. Минеральные продукты представлены двумя твердыми фазами: с преимущественным содержанием хлорида калия и хлорида натрия (рис. 5). Логарифмическое весовое соотношение NaCl/KCl в

норме и при КК составляет в среднем 5,6 и 5,3, с диапазоном 4,0–6,9 и 3,6–7,7, соответственно. В норме в составе кристаллов хлорида калия концентрация бора варьировала 7,89–26,50 ат.%, в составе хлорида натрия 0,00–18,02 ат.%; при КК – 0,00–32,95 ат.% и 0,00–32,42 ат.%, соответственно.

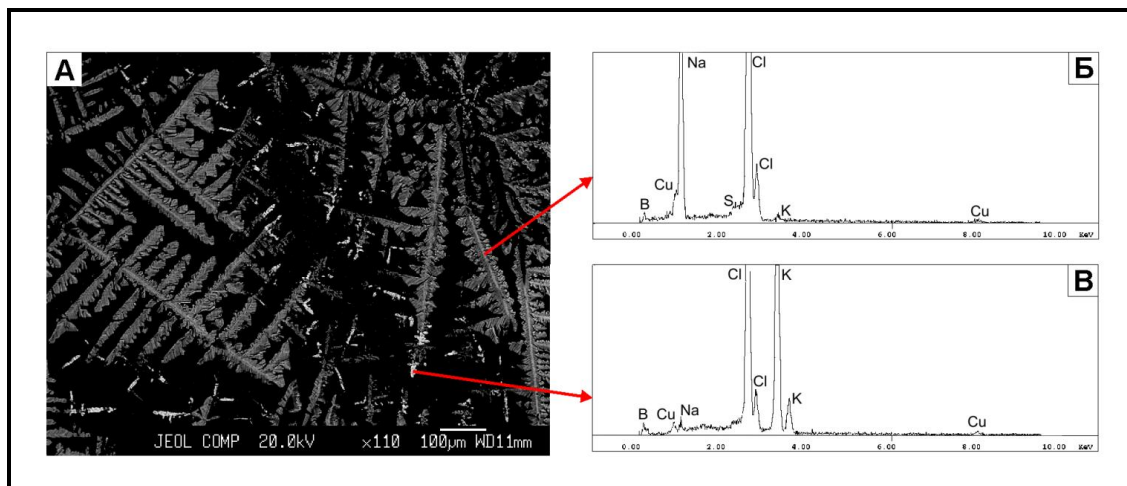


Рисунок 5. Элементный анализ слезы методом РСМА: серые кристаллы хлорида натрия и белые кристаллы хлорида калия (электронное изображение) (А), энергодисперсионный спектр твердой фазы с преимущественным содержанием хлорида натрия (Б) и хлорида калия (В).

Наличие бора в слезе свидетельствует о том, что боратная буферная система на основе гидратированного тетраборат-аниона: $8 \text{H}_3\text{BO}_3 \leftrightarrow 10 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}_2\text{B}_4\text{O}_7$ – может выступать в качестве составляющей механизма, поддерживающего нормальное кислотно-основное состояние слезы.

Для изучения кислотности слезы в норме и при КК была разработана оригинальная методика pH-метрии. Забор слезной жидкости проводили лакмусовой тест-полоской (Сомов Е.Е., 1995; Connor A.J., Severn P., 2009; Stevens S., 2005) путем однократного касания конъюнктивы в средней трети нижнего свода. Использовали специальные индикаторные бумаги высокой чувствительности с возможным диапазоном измерений от 6,4 до 8,0 и интервалом 0,2 ед. pH (Macherey-Nagel, Германия). Разработанная оригинальная компьютерная программа «РНА» позволяет проводить колориметрическую оценку pH с точностью до 0,01 ед. pH (рис. 6). Оценку результатов осуществляли через 1–4 мин. после забора слезы.

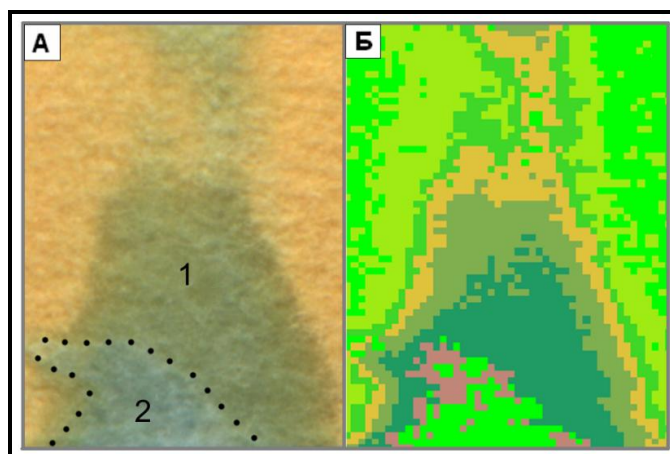


Рисунок 6. Лакмусовая тест-полоска (А) с образцом свободной слезной жидкости (1) и вязкого компонента слезы (2) и результат цифрового измерения ее рН с помощью программы «РНА» (Б)

Слеза имеет выраженный гетерогенный характер и содержит в своем составе, как свободную слезную жидкость, так и более вязкий (слизистый) компонент. При этом рН вязкого компонента существенно выше по сравнению с этим параметром свободной слезной жидкости. При анализе проб здоровых пациентов в подгруппе А и пациентов с миопическим астигматизмом в подгруппе Б контрольной группы было выявлено наличие вязкого компонента слезы в 34 и 21 случае, соответственно.

Сравнительный анализ показал, что кислотность свободной слезной жидкости у здоровых лиц не зависит от возраста ($p > 0,05$), тогда как кислотность вязкого компонента снижается с возрастом ($r = -0,616$, $p < 0,05$) (рис. 7). Кислотность свободной слезной жидкости у здоровых лиц имеет нормальное распределение Гаусса.

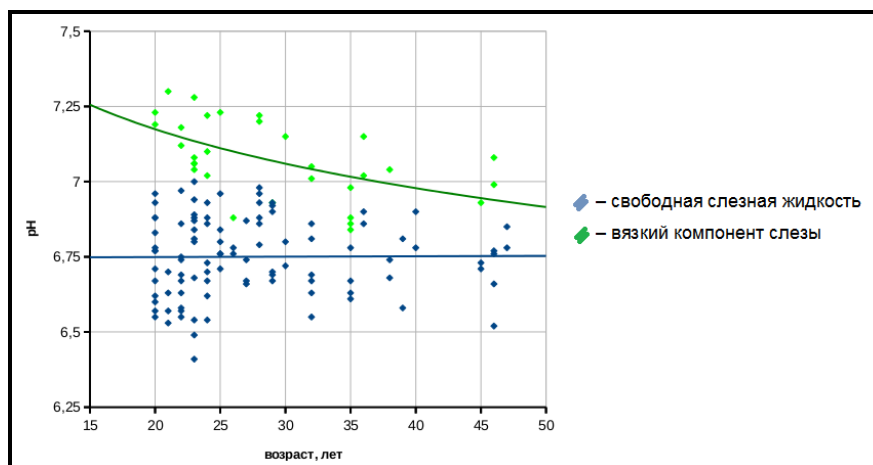


Рисунок 7. Кислотность слезы у здоровых лиц в зависимости от возраста

Отсутствие отличий в распределении кислотности слезы между здоровыми добровольцами и пациентами с миопическим астигматизмом ($p > 0,05$) позволило объединить две субвыборки в одну единую контрольную группу (норма). В норме отсутствует связь кислотности слезы с латерализацией глаз, наличием вязкого компонента в пробах, половой принадлежностью, табакокурением и аллергоанамнезом ($p > 0,05$).

При КК вязкий компонент слезы был обнаружен в 15 образцах. Кислотность вязкого компонента при КК в относительно молодом возрасте существенно ниже нормы и приближается к физиологической норме только с возрастом ($r = -0,573$, $p < 0,05$) (рис. 8). Распределение кислотности свободной слезной жидкости при КК носит полимодальный характер (рис. 9).

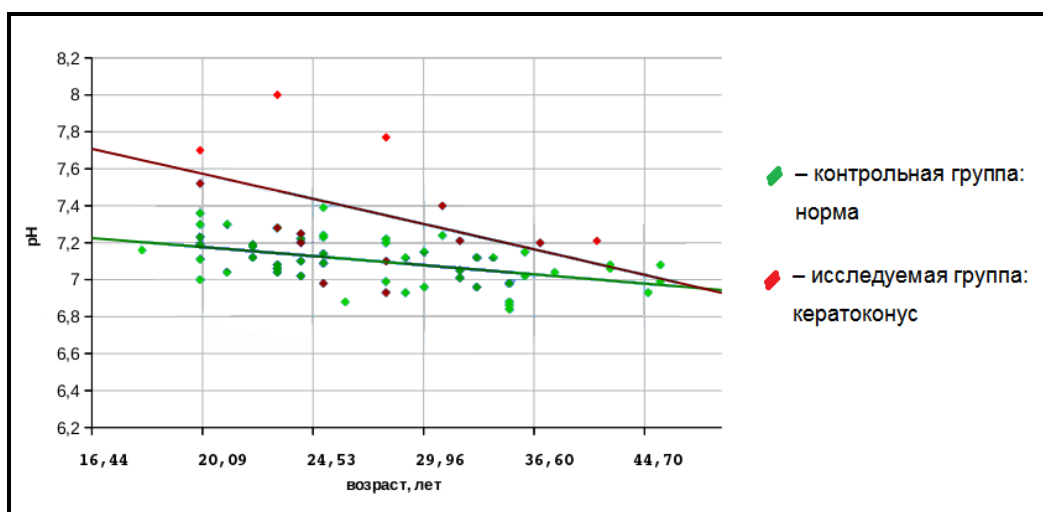


Рисунок 8. Кислотность вязкого компонента в норме и при КК в зависимости от возраста (логарифмическая шкала по возрасту)

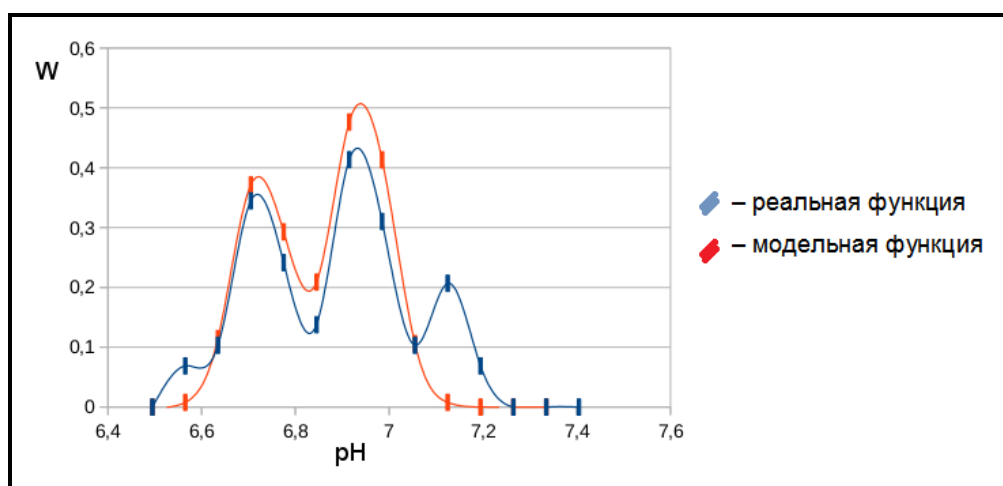


Рисунок 9. Реальная и модельная бимодальные функции распределения pH свободной слезной жидкости при кератоконусе

При КК связь кислотности свободной слезной жидкости с результатами кератометрии, индексами иррегулярности роговицы и наличием кольца Флейшера отсутствует ($p > 0,05$). При КК была выявлена слабая положительная корреляционная связь между результатами кератопахиметрии и кислотностью свободной слезной жидкости ($r = 0,263, p < 0,05$).

В табл. 3 представлены результаты pH-метрии слезы в норме и при КК.

Таблица 3. Кислотность свободной слезной жидкости и вязкого компонента слезы в норме и при кератоконусе

Компоненты слезы	Группы	
	Контрольная: норма	Исследуемая: кератоконус
Свободная слезная жидкость, ед. pH	6,41–7,00	6,53–7,18
$\mu \pm \sigma$	$6,76 \pm 0,13$	$6,85 \pm 0,16$
Mo	6,76	6,76 и 6,98
Вязкий компонент слезы, ед. pH	6,84–7,30	6,81–8,00 и более
$\mu \pm \sigma$	$7,12 \pm 0,17 *$	$7,31 \pm 0,36 *$
Mo	7,12 *	7,21 *

* Анализ кислотности вязкого компонента слезы следует осуществлять с учетом возраста.

Осмометрия слезы пациентов с КК показала, что параметры осмолярности слезы остаются в пределах нормы. Результаты статистической обработки полученных данных свидетельствуют о возрастной изменчивости данного параметра ($r = 0,526, p < 0,05$) (рис. 10).

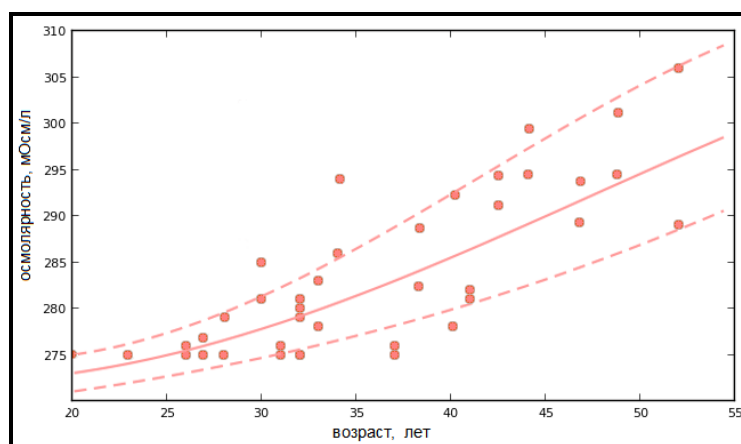


Рисунок 10. Осмолярность слезы при кератоконусе в зависимости от возраста

Полученные данные согласуются с результатами, ранее проведенных исследований в отношении возрастной динамики осмолярности слезы: в норме происходит ее физиологическое повышение с возрастом (Craig J.P., Tomlinson A., 1998; Mathers W.D. et al., 1996).

ВЫВОДЫ

1. Впервые на репрезентативном материале (23 роговицы, включая кадаверный и операционный материал; 334 пробы слезы здоровых добровольцев, пациентов с миопическим астигматизмом и пациентов с кератоконусом) были изучены распределение минеральных элементов в роговице и неорганические биохимические параметры слезы – минеральный состав, кислотность и осмолярность.

2. Разработаны методики элементного анализа тканей роговицы в соответствии с ее зонами и слоями на основе рентгенофлуоресцентного анализа (XRF) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии на базе сканирующего электронного микроскопа (SEM-EDS).

3. В норме в тканях роговицы отмечается относительно равномерное распределение железа, меди и цинка. При кератоконусе III ст. имеет место аномальное распределение минеральных элементов, которое характеризует преимущественное накопление железа, меди и цинка в зоне пигментного кольца Флейшера (парацентральная часть роговицы) в поверхностных слоях стромы, в области боуеновой мембраны и в эпителии роговицы; при этом центральная зона роговицы тотально обеднена железом, медью и цинком.

4. Минеральный компонент слезной жидкости в норме и у пациентов с кератоконусом представлен преимущественно растворимыми соединениями хлора, натрия, калия и бора. Минеральный состав слезной жидкости при кератоконусе и в норме не различаются.

5. Разработана и апробирована оригинальная методика прецизионной рН-метрии слезы, позволяющая оценивать кислотность содержимого конъюнктивальной полости при помощи лакмусовых тест-полосок высокой чувствительности. Содержимое конъюнктивальной полости гетерогенно в отношении рН и варьирует в соответствии с компонентами слезы. Кислотность свободной слезной жидкости в норме достоверно выше

кислотности вязкого компонента слезы (вязкий компонент имеет более щелочной характер).

6. Впервые установлена естественная возрастная изменчивость кислотности слезы: с возрастом происходит физиологическое уменьшение рН (закисление) вязкого компонента слезы, при этом кислотность свободной слезной жидкости не зависит от возраста. Рефракция, половая принадлежность, аллергологический анамнез и табакокурение не оказывают влияние на рН слезы.

7. Статистическое распределение кислотности свободной слезной жидкости при кератоконусе достоверно отличается от аналогичного показателя в норме: распределение рН при кератоконусе имеет признаки полимодальности. Кислотность вязкого компонента слезы пациентов с кератоконусом достоверно превышает показатели в норме.

8. Статистическое распределение осмолярности слезы при кератоконусе не имеет отличительных особенностей от нормы. Соответственно, при кератоконусе осмолярность не является причиной отклонения рН от нормы.

9. Полученные данные о нарушении минерального метаболизма в роговице и повышении рН вязкого компонента слезы при кератоконусе могут быть учтены при разработке патогенетических методов терапии, диагностики и профилактики кератоконуса.

Практические рекомендации

1. Изучение элементного состава тканей глазного яблока в дальнейшем возможно на основании новых методик XRF и SEM-EDS для изучения биологических объектов.

2. При дальнейшем изучении этиологии и патогенеза КК и возможной разработке патогенетических методов лечения необходимо принимать во внимание нарушение минерального метаболизма в роговице и сдвиг рН вязкого компонента слезы в щелочную сторону при КК.

3. Новые данные о минеральном составе слезы могут быть учтены при дальнейшем изучении механизмов, поддерживающих кислотно-щелочной баланс глазной поверхности и при разработке фармакологических препаратов.

4. Новая методика рН-метрии содержимого конъюнктивальной полости может быть в дальнейшем использована в научно-практических целях.

5. Гетерогенность кислотности сред конъюнктивальной полости является важной анатомо-физиологической особенностью глазной поверхности, и может иметь значение в патогенезе, диагностике и лечении ряда ее заболеваний.

6. Возрастная изменчивость кислотности содержимого конъюнктивальной полости, так же, как и осмолярности, должна быть учтена при диагностике и лечении при заболеваниях глазной поверхности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Патеюк Л.С. К вопросу о рН-метрии слезы. ВШО, 12-я: Сб. науч. тр. – М.: 2013. – С. 383–386.
2. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Патеюк Л.С. Изменение химического состава роговицы при кератоконусе (предварительное сообщение). РООФ, 6-й: Сб. науч. тр. науч.-пр. конф. с междунар. уч-ем. – М.: 2013. – С. 187–190.
3. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Патеюк Л.С. К вопросу о применении понятия «геохимические барьеры» в фундаментальной медицине. Хим. наука: современные достижения и ист. перспектива: Мат. 2-й ежегод. Всерос. науч. интернет-конф. с междунар. уч-ем. – Казань: 2014. – С. 5–7.
4. Новиков И.А., Федоров А.А., Грибоедова И.Г., Махотин С.С., Патеюк Л.С., Кирющенкова Н.П. Уточнение базовой кривой энергодисперсионного спектра для качественной оценки распределения микроэлементов в тканях глаза с использованием сканирующего электронного микроскопа (SEM-EDS). РООФ, 7-й: Сб. науч. тр. науч.-пр. конф. с междунар. уч-ем. – М.: 2014. – С. 444–447.
5. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Патеюк Л.С. Кератоконус: этиологические факторы и сопутствующие проявления // **Вестник офтальмологии.** – 2014. – № 4. – С. 110–116.
6. Аветисов С.Э., Сафонова Т.Н., Новиков И.А., Патеюк Л.С., Грибоедова И.Г. Кислотность и буферная система глазной поверхности (по данным исследования конъюнктивальной полости) // **Вестник офтальмологии.** – 2014. – № 5. – С. 5–10.
7. Сафонова Т.Н., Патеюк Л.С. Система глазной поверхности // **Вестник офтальмологии.** – 2015. – № 1. – С. 96–102.
8. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Сафонова Т.Н., Патеюк Л.С., Гладкова О.В. Естественная возрастная изменчивость кислотности слезы. ВШО, 14-я: Сб. науч. тр. – М.: 2015. – С. 204–207.
9. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Патеюк Л.С. Биохимические неорганические параметры слезы при кератоконусе. ВШО, 14-я: Сб. науч. тр. – М.: 2015. – С. 197–203.

Список сокращений

КК – кератоконус

РСМА – (рентгеноспектральный микроанализ) электронно-зондовый рентгеноспектральный анализ

SEM-EDS – (англ. scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy) энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия в сочетании со сканирующей электронной микроскопией

XRF – (англ. X-ray fluorescence) рентгенофлуоресцентный анализ