

© Коллектив авторов, 2017
УДК 611.841.2

Н.П.Омельяненко¹, А.В.Ковалев¹, Е.С.Мишина², М.М.Сморчков¹

СТРУКТУРА И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАЗАЛЬНЫХ МЕМБРАН СО СТРОМОЙ РОГОВИЦЫ

¹ Лаборатория соединительной ткани с группой клинической генетики (зав. — проф. Н.П.Омельяненко), ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова» МЗ РФ, Москва;

² кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — проф. А.В.Иванов), ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ

При использовании световой, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии исследованы базальные мембраны (БМ) роговицы глаза человека и их взаимодействие с ее собственным веществом. Подтверждено наличие в роговице глаза человека трех пограничных бесклеточных коллагенсодержащих структур. Под передним эпителием роговицы располагается БМ, с которой с помощью неволокнутого внеклеточного матрикса связана передняя пограничная пластинка (ППП), или боуменова мембрана, — наружная часть собственного вещества роговицы. ППП имеет толщину 7–8 мкм и построена из индивидуальных коллагеновых фибрилл диаметром 20–40 нм, расположенных без преимущественной пространственной ориентации. Коллагеновые фибриллы ППП непосредственно переходят в уплощенные коллагеновые волокна собственного вещества. Задняя пограничная пластинка (ЗПП), или десцеметова мембрана, является по структуре и составу утолщенной БМ (8–10 мкм) заднего эпителия роговицы. Она, как и БМ переднего эпителия, связана с прилежащими к ней коллагеновыми фибриллами собственного вещества посредством неволокнутого внеклеточного матрикса и погружения фибрилл собственного вещества в периферическую часть ЗПП.

Ключевые слова: роговица, собственное вещество роговицы, передняя пограничная пластинка (боуменова мембрана), задняя пограничная пластинка (десцеметова мембрана), базальная мембрана

Роговица является частью внешней (наружной) соединительнотканной оболочки глаза. Она выполняет двойную функцию: биомеханическую, ограничивая и защищая внутреннее содержимое глаза, и оптическую, обеспечивая около двух третей светопреломляющей силы оптической системы глаза. В ее составе выделяют слои: передний эпителий (многослойный плоский неороговевающий), находящуюся под ним и структурно связанную с ним переднюю пограничную пластинку толщиной от 75 до 120 нм, собственное вещество роговицы (плотная оформленная соединительная ткань), наружный слой которого обозначен как передняя пограничная пластинка (боуменов слой — БС толщиной 7–8 мкм), заднюю пограничную пластинку толщиной 8–10 мкм (десцеметову мембрану — ДМ) и задний эпителий роговицы, тесно связанные между собой [4, 5, 9, 13]. В литературе ведется дискуссия о количестве слоев роговицы, обсуждаются новые детали ее строения (например, слой Дуэ) [8], а также разрабатываются новые подходы к созданию ее биоискусственного эквивалента [6, 8]. Особенно важно отметить, что даже в классической учеб-

ной гистологической литературе нет единого мнения о представлениях и определениях структур роговицы.

В одних пособиях указывается на присутствие только передней пограничной пластинки или БС [1, 2, 14], в других — отмечается наличие как базальной мембраны, так и БС [4, 5]. В еще одном варианте базальная мембрана под передним эпителием отождествляется с передней пограничной пластинкой [3].

В связи с указанным выше, целью настоящего исследования явилось микро- и ультраструктурное исследование роговицы глаза человека с акцентом на базальные мембраны и на их структурное взаимодействие с передним и задним эпителием и собственным веществом.

Материал и методы. Исследованы образцы роговицы, полученные от 5 мужчин 35–43 лет, погибших от травм, несовместимых с жизнью, без повреждения глаз, находившихся не более 12 ч в холодильной камере, при температуре +4 °С. При морфологическом исследовании патологических изменений в роговице обнаружено не было. Материал был получен в «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Департамента здравоохранения Москвы на осно-

Сведения об авторах:

Омельяненко Николай Петрович (e-mail: omel156@yandex.ru), Ковалев Алексей Вячеславович, Сморчков Михаил Михайлович, лаборатория соединительной ткани с группой клинической генетики, ФГБУ «ЦИТО им. Н.Н.Приорова», 127299, Москва, ул. Приорова, 10

Мишина Екатерина Сергеевна, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3

вании соглашения с ФГБУ «ЦИТО им. Н.Н.Приорова» Минздрава РФ о научно-исследовательском сотрудничестве. Представленная работа одобрена локальным этическим био-медицинским комитетом ФГБНУ «НИИ глазные болезни» 24 октября 2016 г. № 39/2. Для световой микроскопии (СМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) роговицу фиксировали 10% забуференным нейтральным формалином, обезвоживали в замороженном состоянии в этаноле возрастающей концентрации. Для СМ обезвоженные образцы заливали в парафин. Сделанные срезы окрашивали гематоксилином—эозином. Гистологические препараты изучали под светооптическим микроскопом Eclipse 80i (Nikon, Япония). Для СЭМ после обезвоживания в этаноле использовали метод сушки в критической точке с помощью аппарата Quorum K350 (Quorum gala instrument GmbH, Германия). Подготовленные таким образом образцы монтировали на специальный алюминиевый столик токопроводящим углеродным клеем, напыляли золотом или платино-палладиевым сплавом в напылительной установке Quorum Q150TS (Quorum gala instrument GmbH, Германия) и просматривали в сканирующем электронном микроскопе S3400N (Hitachi, Япония). Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) исследуемые фрагменты измельчали до размеров 1×1 мм, фик-

сировали в 1,5% глутаральдегиде на какодилатном буфере, дополнительно фиксировали тетраоксидом осмия на том же буфере, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в эпоксидную смолу аралдит. После полимеризации смолы изготавливали полутонкие и ультратонкие срезы на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica, Германия). Полутонкие срезы окрашивали азуром II — эозином и выбирали место для ультратонких срезов, которые изучали в просвечивающем электронном микроскопе HT-7700 (Hitachi, Япония).

Результаты исследования. Роговица глаза взрослого человека имеет толщину в наиболее выпуклой части 550–600 мкм, а по периферии — 600–700 мкм. Снаружи волокнистое собственное вещество роговицы покрыто многослойным плоским неороговевающим эпителием (рис. 1, а, б), который отделен от него базальной мембраной (БМ) (толщиной 90–120 нм), утолщающейся к периферии.

Эта мембрана состоит из двух слоев: слабо электронно-плотного (светлого, Lamina lucida)

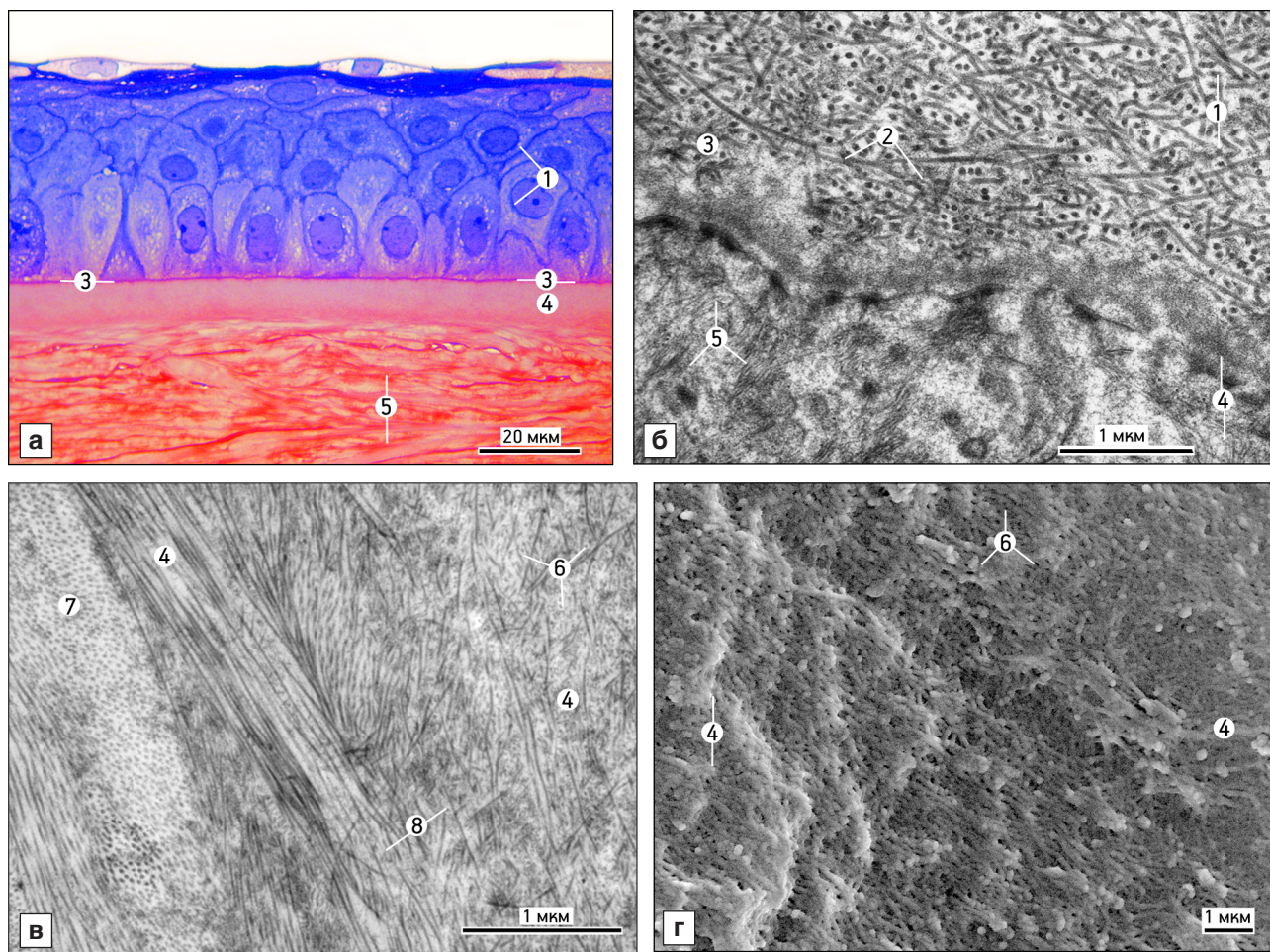


Рис. 1. Наружная часть роговицы глаза человека.

1 — плоский неороговевающий эпителий; 2 — полудесмосомы; 3 — базальная мембрана под передним эпителием; 4 — боуменов слой (БС); 5 — коллагеновые фибриллы БС; 6 — наружный волокнистый слой собственного вещества; 7 — коллагеновые фибриллы в составе плоских коллагеновых волокон собственного вещества роговицы; 8 — зона перехода коллагеновых фибрилл из БС в волокна собственного вещества. а — полутонкий срез, перпендикулярный поверхности роговицы. Окраска азуром II — эозином. б, в — трансмиссионная электронная микроскопия; г — сканирующая электронная микроскопия. Ув.: а — 1000, б–г — 10 000

и электронно-плотного (темного, *Lamina densa*). Первый слой БМ толщиной 20–40 нм прилежит к плазмолемме клеток базального слоя переднего эпителия роговицы. В отдельных местах контакт клеток эпителия и БМ осуществляется с помощью полудесмосом. Электронно-плотная часть БМ представлена мелкогранулярным веществом, которое неравномерно по плотности. В отдельных участках это вещество закрывает светлую часть БМ, примыкая непосредственно к плазмолемме эпителиоцитов. Этот слой более вариабелен по толщине (50–100 нм), чем электронно-светлый, и непосредственно прилежит к передней пограничной пластинке. Характерными особенностями этого слоя является то, что он имеет гомогенное строение при светомикроскопическом исследовании и толщину 8–10 мкм. Под электронным микроскопом видно, что он построен из отдельно расположенных коллагеновых фибрилл, не образующих волокон. Основу фибрилл составляет коллаген I и III типа. Фибриллы расположены без преимущественной ориентации, не упорядоченно, но плотно. Толщина или диаметр фибрилл составляет 20–40 нм с периодичностью продольной структуры 60–70 нм. На срезах, перпендикулярных поверхности роговицы, фибриллы имеют различную форму: круглую (на поперечном срезе), овальную (на тангенциальном срезе), вытянутую (на продольном срезе). Длина фибрилл на таких срезах — от 100 нм и более. Это указывает на волнообразную (вероятно спиральную) форму фибрилл. Отсутствует какая-либо преимущественная ориентация фибрилл. Межфибриллярные расстояния колеблются от 20 до 100 нм. Мелкогранулярное вещество электронно-плотного слоя БМ контактирует с коллагеновыми фибриллами передней пограничной пластинки и частично проникает в ее межфибриллярные промежутки (см. рис. 1, б). Аналогичное вещество имеется и в межфибриллярных промежутках коллагеновых волокон собственного вещества роговицы и неравномерно. Вся информация, полученная о структуре передней пограничной пластинки с помощью ТЭМ, подтверждается данными при его сканирующей электронной микроскопии (см. рис. 1, б, в). Фибриллы передней пограничной пластинки имеют спиральную форму, на что указывает их небольшая длина на продольных срезах (фрагменты 40–200 нм). Иногда встречаются более длинные фибриллы, попадающие в плоскость среза. Они не ветвятся. Имеется два структурных варианта: взаимодействия фибрилл передней пограничной пластинки с коллагеновыми волокнами собственного вещества роговицы. В первом варианте часть фибрилл прилежат

к ориентированным, т. е. упорядоченно расположенным коллагеновым фибриллам собственного вещества роговицы на расстоянии межфибриллярных промежутков в передней пограничной пластинке. В другом варианте часть фибрилл включаются в состав плоских или уплощенных коллагеновых волокон собственного вещества роговицы, сохраняя тот же диаметр, что и в передней пограничной пластинке, но постепенно меняя свою ориентацию на параллельную друг другу, создавая тем самым анизотропность коллагеновых волокон роговицы в этом месте перехода (см. рис. 1, б–г). Эту зону изменений ориентации фибрилл можно рассматривать и в обратном направлении, т. е. от волокон собственного вещества к передней пограничной пластинке.

Со стороны передней камеры глаза собственное вещество роговицы ограничено задней пограничной пластинкой (рис. 2, а).

Толщина последней у взрослых людей составляет 8–12 мкм. Она так же, как передняя пограничная пластинка, гомогенна при исследовании под световым микроскопом. Это объясняется также отсутствием в ее составе структур, превышающих по своим размерам несколько нанометров. Электронно-микроскопически в ее составе можно выделить 3 слоя: наружный слой, прилегающий к собственному веществу роговицы, средний и внутренний слой, контактирующий с эндотелием (задним эпителием). Классические коллагеновые фибриллы отсутствуют в структуре задней пограничной пластинки. Толщина наружного ее слоя (передней трети) вариабельна и составляет 1–4 мкм. Этот слой образован мелкими электронно-плотными гранулами, а также их цепочками или нитями (см. рис. 2, б). Часть промежутков между гранулами остаются свободными, другая — заполнена бесструктурным веществом малой электронной плотности. Отдельные участки этого слоя имеют сетчатый вид. В его периферическую часть погружены коллагеновые фибриллы волокон внутренней четверти роговицы. На поверхности слоя фибриллы располагаются в углублениях задней пограничной пластинки. Глубже фибриллы полностью окружены гранулярным веществом, которое в виде небольших участков располагается и за пределами задней пограничной пластинки, окружая группы расположенных рядом коллагеновых фибрилл собственного вещества роговицы. В средней, или центральной, части (3–4 мкм по ширине) задняя пограничная пластинка построена из такого же гранулярного вещества, из части которого образованы тонкие фибриллярные структуры — нити или цепочки гранул, ориентированные парал-

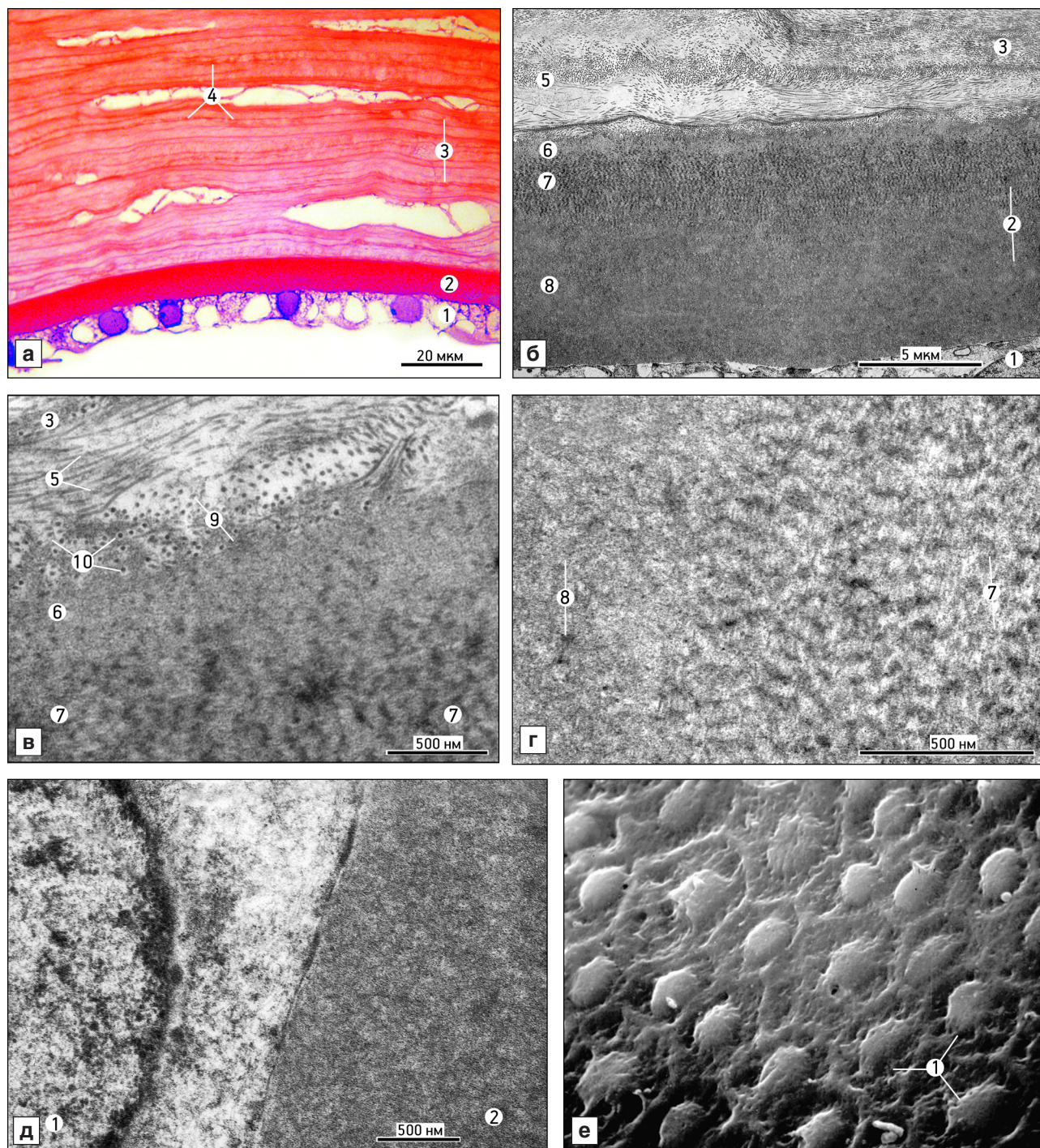


Рис. 2. Внутренняя часть роговицы глаза человека.

1 — эндотелий; 2 — задняя пограничная пластинка; 3 — внутренний волокнистый слой собственного вещества; 4 — плоские коллагеновые волокна собственного вещества; 5 — коллагеновые фибриллы в составе коллагеновых волокон; 6 — наружный слой задней пограничной пластинки; 7 — средний (полосатый) слой; 8 — внутренний периферический слой задней пограничной пластинки; 9 — зона взаимодействия коллагеновых фибрилл волокон собственного вещества с наружным периферическим слоем задней пограничной пластинки; 10 — коллагеновые фибриллы в складках поверхностного рельефа задней пограничной пластинки или полностью погруженные в нее. а — полутонкий срез, перпендикулярный поверхности роговицы. Окраска азуром II — эозином; б-д — трансмиссионная электронная микроскопия; е — сканирующая электронная микроскопия. Ув.: а — 1000; б — 5000; в-д — 10 000; е — 1500

тельно ее поверхности. Нити собраны в пучки, по протяжении которых периодически имеются электронно-плотные скопления гранул, более плотно прилежащих друг к другу и связывающих нити поперечно. Эти скопления имеют размеры от

50 до 60 мкм (см. рис. 2, в, г). Расстояние между ними колеблется от 60 до 70 мкм. Совпадения этих скоплений у соседних пучков в отдельных местах создает вид полосатости задней пограничной пластинки. На обзорных снимках полосы

не имеют регулярного характера. Средний, или «полосатый», слой без четкой границы переходит во внутренний слой, который по своей структуре идентичен наружному слою, только толще последнего (около 4–5 мкм). Электронно-плотные гранулы не структурированы, а распределены относительно равномерно в этой части задней пограничной пластинки (см. рис. 2, г, д). Наблюдается лишь их небольшое разряжение, чередующееся с концентрацией. К периферической части этого слоя прилежит задний эпителий (эндотелий), плазмолеммы клеток которого образуют с задней пограничной пластинкой контакты типа полудесмосом. Эндотелий — монослойный пласт, в котором клетки имеют многоугольную форму, а при контакте между собой образуют десмосомы, запирающие пластинки (см. рис. 2, д, е) и цитоплазматические выросты, вдавливающиеся в тело соседней клетки.

Обсуждение полученных данных. Базальная мембрана отделяет многослойный плоский неороговевающий эпителий роговицы от ее соединительнотканного собственного вещества [12, 15]. Кнаружи от него расположена передняя пограничная пластинка, имеющая отличное от собственного вещества строение. Ее гомогенность, или видимая бесструктурность при светоптическом исследовании определена фибриллярным строением и плотным расположением коллагеновых фибрилл без определенной преобладающей ориентации. Индивидуальные фибриллы имеют диаметр, неразличимый под световым микроскопом. Такая особенность визуализации при световой микроскопии создает впечатление особой структуры, связанной с эпителием, давшее основания многим авторам переднюю пограничную пластинку называть мембраной, подчеркивая ее самостоятельное значение. Однако электронно-микроскопическое исследование передней пограничной пластинки в данной работе, как и у некоторых авторов ранее, подтверждает ее единство со всем остальным собственным веществом роговицы, показывая переход коллагеновых фибрилл передней пограничной пластинки в плоские коллагеновые волокна (стромальные пластины) подлежащего собственного вещества или наоборот [7, 12, 13]. Фибриллярная конструкция передней пограничной пластинки, имеющая неориентированный, изотропный характер, позволяет предположить одинаковые механические свойства в 3D-измерении. У некоторых видов млекопитающих, например, у кроликов, которых часто используют как лабораторных животных для экспериментальных исследований в офтальмологии, передняя пограничная пластин-

ка отсутствует [10]. При лазерной коррекции зрения человека (методика фоторефракционной кератэктомии) считают, что повреждение — удаление передней пограничной пластинки не оказывает существенного отрицательного влияния на состояние роговицы глаза [6, 11]. Авторское название этого слоя менять нецелесообразно, оно давно устоялось, и изменение термина может создать терминологическую путаницу. Этот термин отсутствует в *Terminologia Histologica* (2009), но это не означает невозможность его использования, тем более, что он используется в зарубежной литературе, и это правильно, так как это действительно слой наружной части собственного вещества роговицы, имеющей отличную от остального собственного вещества, волокнистую структуру и являющийся единым целым с ним. С базальной мембраной этот слой связан непосредственным контактом его коллагеновых фибрилл с мелкогранулярным электронно-плотным веществом внутренней темной пластинки базальной мембраны, а также «якорными филаментами» базальной мембраны, образованными коллагеном VII типа [15]. Вероятно, эта часть БМ включает в свой состав протеогликановые комплексы, а гранулы, окрашиваемые солями тяжелых металлов, являются их белковыми составляющими или коллагеновыми белками.

Внутренняя часть собственного вещества прикрепляется к задней пограничной пластинке, которая не входит в состав собственного вещества, но с ней связана за счет своего поверхностного слоя, с которым контактируют и в который погружены коллагеновые фибриллы плоских коллагеновых волокон (пластин) собственного вещества роговицы. Задняя пограничная пластинка в литературе рассматривается как своеобразная базальная мембрана, отделяющая собственное вещество роговицы от эндотелия. Основанием этому служит состав задней пограничной пластинки, включающий сетевые коллагены IV и VIII типов, а также фибронектин, энтактин, ламинин, перлекан [15].

Центральный слой задней пограничной пластинки называют «полосатым», поскольку в его составе обнаруживаются периодически расположенные скопления электронно-плотного гранулярного вещества. По данным литературы, повторяемость или периодичность скоплений темный — светлый участки составляет 110 нм. Этот слой возникает первым в эмбриогенезе. Позже образуются наружный и внутренний слои задней пограничной пластинки [11]. В отличие от передней пограничной пластинки, истончающейся

с возрастом, толщина задней пограничной пластинки с возрастом увеличивается.

Значение этих пограничных структур в роговице пока точно не установлено, в связи с чем последние продолжают исследоваться.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гистология / Под ред. Ю.И.Афанасьева, Н.А.Юриной М.: Медицина, 2012.
2. Данилов Р.К. Гистология. Эмбриология. Цитология: учебник для студентов медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2006.
3. Кузнецов С.Л. Гистология, цитология и эмбриология: учебник для студентов медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2005.
4. Руководство по гистологии / Под ред. Р.К.Данилова, В.Л.Быкова. СПб.: СпецЛит, 2001.
5. Хэм А., Кормак Д. Гистология. М.: Мир, 1983.
6. Boynton G.E., Woodward M.A. Evolving Techniques in Corneal Transplantation // Curr. Surg. Rep. 2015. Vol. 2. P. 2–3.
7. DelMonte D.W., Kim T. Anatomy and physiology of the cornea // J. Cataract. Refract. Surg. 2011. Vol. 3. P. 588–598.
8. Dua H.S., Faraj L.A., Said D.G. Dua's Layer: its discovery, characteristics and applications // J. Emmetropia. 2014. Vol. 5. P. 211–223.
9. Eghrari AO., Riazuddin S.A., Gottsch J.D. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2015. Vol. 4. P. 134–137.
10. Hayashi S., Osawa T., Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians // J. Morphol. 2012. Vol. 3. P. 247–258.
11. Lagali N., Germundsson J., Fagerholm P. The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. Vol. 9. P. 4192–4198.
12. Lewis P.N., White T.L., Young R.D. et al. Three-dimensional arrangement of elastic fibers in the human corneal stroma // Exp. Eye Res. 2016. Vol. 5. P. 143–153.
13. Merindano M.D., Costa J., Canals M. et al. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures // Eur. J. Anat. 2002. Vol. 3. P. 133–139.
14. Ross M.H., Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, 7th Edit. Philadelphia e.a.: Walters Kluwer-Lippincott Williams and Wilknis, 2015.
15. Torricelli A.A., Singh V., Santhiago M.R., Wilson S.E. The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013. Vol. 9. P. 6390–6400.

Поступила в редакцию 14.10.2016

Получена после доработки 29.12.2016

THE STRUCTURE AND THE INTERACTION OF THE BASEMENT MEMBRANES WITH CORNEAL STROMA

N.P.Omelyanenko¹, A.V.Kovalyov¹, Ye.S.Mishina², M.M.Smorchkov¹

Basement membranes (BM) of the cornea of the human eye and their interactions with corneal stroma were studied using light, transmission and scanning electron microscopy. The existence of three acellular collagen-containing structures limiting was confirmed in the cornea of the human eye. BM is located under the anterior corneal epithelium and it is bound via non-fibrous extracellular matrix to the anterior limiting membrane (ALM) or the Bowman's membrane, which is an outer part of the corneal stroma. ALM is 7–8 μm thick, and it is formed by the individual collagen fibrils with diameter of 20–40 nm, located without preferential spatial orientation. ALM collagen fibrils pass directly into flattened collagen fibers of the corneal stroma. The posterior limiting membrane (PLM) or the Descemet's membrane, by its structure and composition, is a thickened BM (8–10 μm) of posterior corneal epithelium. Like the BM of the anterior corneal epithelium, it is associated with the collagen fibrils of the corneal stroma adjacent to it through the non-fibrous extracellular matrix and immersion of the fibrils of the corneal stroma into PLM peripheral part.

Key words: *cornea, corneal stroma, anterior limiting membrane (Bowman's membrane), posterior limiting membrane (Descemet's membrane), basement membrane*

¹ Laboratory of Connective Tissue with the Clinical Genetics Group, N.N.Priorov Central Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow; ² Department of Histology, Embryology and Cytology, Kursk State Medical University