

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375316>

Сравнительный анализ структуры эндотелия* и десцеметовой мембраны роговицы, уровня TGF- β 1 во внутриглазной жидкости при эндотелиальной дистрофии Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатии

Ю.Н. Юсеф^{1,2}, А.М. Суббот¹, Н.В. Фисенко¹, Г.А. Осипян¹, Т.А. Демур²¹ Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова, Москва, Российская Федерация;² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Хронический отёк роговицы часто обусловлен ускоренной гибелью эндотелия при эндотелиальной дистрофии Фукса или псевдофакичной буллезной кератопатии.

Цель исследования — сравнение морфологических изменений эндотелия и десцеметовой мембраны роговицы, а также уровня TGF- β 1 во внутриглазной жидкости при эндотелиальной дистрофии Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатии.

Материалы и методы. В исследование включены 35 пациентов (36 глаз) с хроническим отеком роговицы, обусловленным необратимым нарушением функций эндотелиальных клеток: группа 1а — 12 пациентов (12 глаз) с эндотелиальной дистрофией Фукса; группа 1б — 10 больных (10 глаз) с псевдофакичной буллезной кератопатией; группа 2а — 8 пациентов (9 глаз) с эндотелиальной дистрофией Фукса; группа 2б — 5 больных (5 глаз) с псевдофакичной буллезной кератопатией. Контрольные группы — 5 (для групп 1а, 1б) и 7 (для групп 2а, 2б) донорских корнеосклеральных дисков.

Уровень TGF- β 1 у пациентов групп 1а, 1б определяли иммуноферментным анализом внутриглазной жидкости. Проводили гистологическое исследование десцеметовых мембран и эндотелия пациентов групп 1а, 1б и 5 донорских корнеосклеральных дисков контрольной группы (окрашивание гематоксилином и эозином). Выполняли окрашивание десцеметовых мембран и эндотелия на белки ZO-1 и α -SMA и контрастирование ядер (Hoechst 33342) у пациентов групп 2а и 2б и 7 донорских корнеосклеральных дисков контрольной группы.

Результаты. Отмечено повышение уровня TGF- β 1 у пациентов группы 1а по сравнению с пациентами группы 1б ($p < 0,05$). Выявлено утолщение десцеметовой мембраны (гутты) при эндотелиальной дистрофии Фукса. По сравнению с контролем в образцах пациентов групп 2а и 2б показано увеличение площади эндотелиальных клеток, снижение уровня синтеза белка ZO-1, изменение параметров ядер (увеличение площади и уменьшение соотношения сторон), $p < 0,05$. Отмечен высокий уровень продукции белка α -SMA эндотелием в образцах пациентов группы 2а.

Заключение. Эндотелиальная дистрофия Фукса и псевдофакичная буллезная кератопатия характеризуются различными изменениями десцеметовой мембраны и эндотелия. TGF- β 1 играет ключевую роль в образовании гутт при эндотелиальной дистрофии Фукса.

Ключевые слова: эндотелий роговицы; десцеметова мембрана; эндотелиальная дистрофия Фукса; буллезная кератопатия; TGF- β 1; ZO-1.

Для цитирования:

Юсеф Ю.Н., Суббот А.М., Фисенко Н.В., Осипян Г.А., Демур Т.А. Сравнительный анализ структуры эндотелия и десцеметовой мембраны роговицы, уровня TGF- β 1 во внутриглазной жидкости при эндотелиальной дистрофии Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатии // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 143–152. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375316>

Рукопись получена: 05.09.2022

Рукопись одобрена: 11.12.2022

Опубликована: 20.05.2023

* Под термином «эндотелий» здесь и далее подразумевается задний эпителий роговицы — однослойный плоский эпителий нейроглиального типа.

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375316>

A comparative study on morphology of corneal endothelium* and Descemet membrane, TGF- β 1 aqueous humor level in Fuchs endothelial corneal dystrophy and pseudophakic bullous keratopathy

Yusef N. Yusef^{1,2}, Anastasia M. Subbot¹, Natalia V. Fisenko¹, Grigory A. Osipyan¹, Tatiana A. Demura²

¹ M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Chronic corneal edema is often associated with endothelial cell loss due to Fuchs endothelial dystrophy and pseudophakic bullous keratopathy.

AIM: to compare the changes of Descemet membrane/endothelium complexes and aqueous humor TGF- β 1 level in Fuchs endothelial dystrophy and pseudophakic bullous keratopathy.

MATERIALS AND METHODS: The study included 35 patients (36 eyes) with chronic corneal edema caused by irreversible dysfunction of endothelial cells: 1a group — 12 patients (12 eyes) with Fuchs endothelial dystrophy, 1b group — 10 patients (10 eyes) with pseudophakic bullous keratopathy; 2a group — 8 patients (9 eyes) with Fuchs endothelial dystrophy, 2b group — 5 patients (5 eyes) with pseudophakic bullous keratopathy. Control groups — 5 (for groups 1a, 1b) and 7 (for groups 2a, 2b) donor corneoscleral discs.

TGF- β 1 level in patients of groups 1a, 1b was determined by enzyme immunoassay of intraocular fluid. Descemet membrane/endothelium complexes (1a, 1b groups and control group (5 of 12 preserved human corneas) were stained with hematoxylin/eosin. Descemet membrane/endothelium complexes (2a, 2b groups and control group (7 of 12 preserved human corneas) were stained with ZO-1, α -SMA antibodies, nuclei were counterstained (Hoechst 33342).

RESULTS: TGF- β 1 level was elevated in 1a group ($p < 0.05$). In 1a group Descemet membrane was thickened by guttae. Descemet membrane/endothelium complexes of 2a, 2b groups presented enlarged endothelial cells with lower levels of ZO-1 expression. There was an increase in nuclear areas in 2a, 2b groups compared to controls ($p < 0.05$). Nuclear aspect ratio was lower in 2a, 2b groups compared to the controls ($p < 0.05$). In 2a group endothelial cells showed high level of α -SMA expression.

CONCLUSION: Fuchs endothelial dystrophy and pseudophakic bullous keratopathy are conditions of different structural changes in Descemet membrane/endothelium complexes. TGF- β 1 may play a pivotal role in guttae formation in Fuchs endothelial dystrophy.

Keywords: corneal endothelium; Descemet membrane; Fuchs endothelial dystrophy; bullous keratopathy; TGF- β 1; ZO-1.

To cite this article:

Yusef YuN, Subbot AM, Fisenko NV, Osipyan GA, Demura TA. A comparative study on morphology of corneal endothelium and Descemet membrane, TGF- β 1 aqueous humor level in Fuchs endothelial corneal dystrophy and pseudophakic bullous keratopathy. *Genes & cells*. 2022;17(4):143–152. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375316>

Received: 05.09.2022

Accepted: 11.12.2022

Published: 20.05.2023

* The term "endothelium" hereafter refers to the posterior corneal epithelium - a single-layer flat epithelium of the neuroglial type.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что эндотелий (в некоторых публикациях используют термин «задний эпителий») роговицы — это монослой высокодифференцированных клеток преимущественно гексагональной формы, плотно прилежащих друг к другу и расположенных на десцеметовой мембране (ДМ) [1]. Клеточный цикл эндотелиоцитов *in vivo* остановлен в G1-фазе, что обусловлено механизмом контактного торможения и ингибирующим действием биологически активных веществ внутриглазной жидкости (ВГЖ) [2]. Эндотелиальные клетки (ЭК) характеризуются выраженной метаболической активностью и высокой плотностью ионных каналов. Так, трансмембранный перенос веществ формирует осмотическое давление, обеспечивающее поддержание динамического равновесия между притоком ВГЖ в строму и её оттоком в переднюю камеру. Различные типы межклеточных соединений эндотелиального слоя формируют эффективный барьер между экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) стромы и влагой передней камеры. Снижение плотности ЭК приводит к накоплению ВГЖ в строме, разрушению базальной мембраны и появлению микроист эпителия, то есть к развитию буллезной кератопатии (БК) [3].

Буллезная кератопатия может быть обусловлена ускоренной гибелью ЭК из-за их повреждения при различных интраокулярных хирургических вмешательствах, например экстракции катаракты (псевдофакичная БК), на фоне локального воспалительного процесса или может быть признаком несостоятельности кератотрансплантата [4, 5].

Среди причин снижения плотности ЭК также выделяют генетически детерминированные патологические изменения эндотелия и ДМ. К ним относится эндотелиальная дистрофия Фукса (ЭД Фукса), для которой характерна клиническая картина *cornea guttata*: при биомикроскопии переднего отрезка глаза на задней поверхности роговицы, между ЭК, визуализируются каплевидные образования различного размера — гутты. Увеличение числа гутт приводит к гибели ЭК и как следствие — к хроническому отёку роговицы [6]. В экспериментально-клинических исследованиях показано, что гутты представляют собой зоны накопления ЭЦМ, а их появление связано со сдвигом морфологического типа и функционального статуса ЭК в фибробластоподобную сторону — эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ). При этом ЭК под влиянием различных факторов (в том числе трансформирующего фактора роста $\beta 1$, transforming growth factor $\beta 1$ — TGF- $\beta 1$) синтезируют избыточное количество компонентов ЭЦМ — фибронектина, коллагена I и III типов и др. [7–9].

Таким образом, с учётом представленных особенностей патогенеза ЭД Фукса и псевдофакичной БК актуальны детальное изучение структурных изменений эндотелия и ДМ роговицы, а также оценка уровня

TGF- $\beta 1$ во ВГЖ передней камеры глаза при этих заболеваниях.

Цель исследования — сравнение морфологических изменений эндотелия и десцеметовой мембраны роговицы, а также уровня TGF- $\beta 1$ во внутриглазной жидкости при эндотелиальной дистрофии Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 35 пациентов (36 глаз) с хроническим отёком роговицы, обусловленным необратимым нарушением функций ЭК. Всем больным проведена селективная кератопластика (трансплантация донорской ДМ и эндотелия (ДМ-Э) роговицы) в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова». Все пациенты перед началом исследования подписывали информированное согласие.

Сформированы 4 группы исследования: 1а, 1б, 2а, 2б — и 2 контрольные группы. Группу 1а составили 12 пациентов (12 глаз) с диагнозом ЭД Фукса, группу 1б — 10 больных (10 глаз) с псевдофакичной БК. У пациентов этих групп во время операции через парацентез роговицы были получены образцы ВГЖ (100–150 мкл), которые затем хранили при температуре -80 °С. Концентрацию TGF- $\beta 1$ в этих образцах определяли методом твёрдофазного иммуоферментного анализа (табл. 1), используя реагенты тест-системы Mini Samples ELISA Kit for TGF- $\beta 1$ (Cloud-Clone Corp., США). Детекцию сигнала выполняли на фотометре Muliscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм. Проведено гистологическое исследование образцов ДМ-Э, удалённых при кератопластике у пациентов групп 1а и 1б.

В качестве контроля использовали 5 образцов ДМ-Э, выделенных из донорских корнеосклеральных дисков (срок хранения в консервационной среде Борзенка-Мороз — 2 ± 1 сут, глазной тканевой банк ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»). Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, заливали в парафин и готовили серийные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином (см. табл. 1). Срезы визуализировали на световом микроскопе Leica DM-2500 (Leica Microsystems, Швейцария) с фотокамерой Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Швейцария). Морфометрический анализ структуры ДМ проводили в программе Leica Application Suite V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария). Дифференциацию переднего «полосатого» и заднего «неполосатого» слоёв выполняли на основании особенностей окрашивания гематоксилином и эозином [10]. Полученные результаты толщины каждого из слоёв представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни, SPSS Statistics 26.0).

Таблица 1. Общая характеристика материала и методов исследования

Характеристики	ЭД Фукса 1а группа	ПБК 16 группа	Контроль	ЭД Фукса 2а группа	ПБК 26 группа	Контроль
Количество пациентов/доноров	12	10	5	8	5	7
Количество глаз	12	10	5	9	5	7
Пол, м/ж	3/9	5/5	2/3	3/5	4/1	5/2
Возраст, лет, М±m	76,0±7,9	68,1±12,6	69,2±11,7	68,6±12,6	72,4±11,4	71,3±8,4
Толщина роговицы в центральной зоне до операции, мкм, М±m	757,9±98,7	774,6±57,0	—	701,4±46,9	748,6±59,8	—
Материал и методы исследования	Твёрдофазный иммуноферментный анализ образцов внутриглазной жидкости (концентрация TGF-β1)		—	Имунофлуоресцентный анализ десцеметовых мембран с задним эпителием (окрашивание на ZO-1, α-SMA, контрастирование ядер клеток Hoechst 33342)		
	Гистологическое исследование парафиновых срезов десцеметовых мембран с задним эпителием (окрашивание гематоксилином и эозином)					

Примечание: ЭД Фукса — эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса; ПБК — псевдофакичная буллёзная кератопатия; TGF-β1 — transforming growth factor β1; ZO-1 — zonula occludens-1; α-SMA — α-smooth muscle actin.

Группу 2а составили 8 пациентов (9 глаз) с диагнозом ЭД Фукса, группу 26 — 5 больных (5 глаз) с псевдофакичной БК. У всех пациентов при кератопластике были получены комплексы ДМ-Э. В качестве контроля использовали 7 образцов ДМ-Э, выделенных из донорских корнеосклеральных дисков (срок хранения в консервационной среде Борзенка-Мороз — 2±1 сут, глазной тканевой банк ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова») (см. табл. 1). Для иммунофлуоресцентного исследования плоскостных препаратов ДМ-Э все образцы фиксировали 10% нейтральным раствором формалина сразу после получения. После пермеабиллизации и блокировки неспецифического связывания проводили двухступенчатое окрашивание. Первичные антитела к белку плотных межклеточных контактов zonula occludens-1 — ZO-1 (Thermo Fisher Scientific, США) — и к α-гладкомышечному актину (α-smooth muscle actin) — α-SMA (Thermo Fisher Scientific, США) — использовали в разведении 1:100, инкубировали в течение 8 ч при температуре 4 °С. В качестве флуоресцентной метки применяли вторичные антимышечные антитела Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:750. Контрастирование ядер ЭК осуществляли красителем Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл (см. табл. 1). Визуализацию выполняли на инвертированном микроскопе Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) в режиме детекции флуоресценции и фазового контраста. Обработку изображений, полученных при фотофиксации (фотоаппарат Canon EOS 700D, Япония), осуществляли с помощью программного пакета CorelDraw и ImageJ. Полученные данные представлены

в виде медианы и квартилей (Me [Q1; Q3]). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни, GraphPad Prism).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ содержания TGF-β1 в ВГЖ свидетельствует о его статистически значимом повышении у пациентов группы 1а (ЭД Фукса) по сравнению с пациентами группы 1б (псевдофакичная БК) (рис. 1).

Световая микроскопия парафиновых срезов ДМ-Э пациентов контрольной группы показала, что ДМ состоит из заднего «неполосатого» слоя (толщина — 9,40±2,53 мкм) и переднего «полосатого» слоя (толщина — 2,61±0,64 мкм). Стромальная поверхность ДМ представлена зоной плотного ЭЦМ (рис. 2, а).

При гистологическом исследовании образцов ДМ-Э пациентов группы 1а (ЭД Фукса) во всех случаях выявлены единичные ЭК, прилежащие к ДМ. Последняя представлена синтезированными в постнатальном периоде задним «неполосатым» слоем, коллагеновой зоной и гуттами (капельвидными разрастаниями ЭЦМ), суммарная толщина всех слоёв составила 16,56±2,25 мкм. Ближе к стромальной поверхности ДМ определяются менее интенсивно окрашенные гематоксилином и эозином её передний «полосатый» слой толщиной 3,06±0,17 мкм и зона плотного ЭЦМ (рис. 2, б).

В образцах пациентов группы 1б (псевдофакичная БК) световая микроскопия образцов ДМ-Э не выявила наличия ЭК, что, вероятно, связано с их более слабой адгезией к ДМ и потерей на этапе получения срезов.

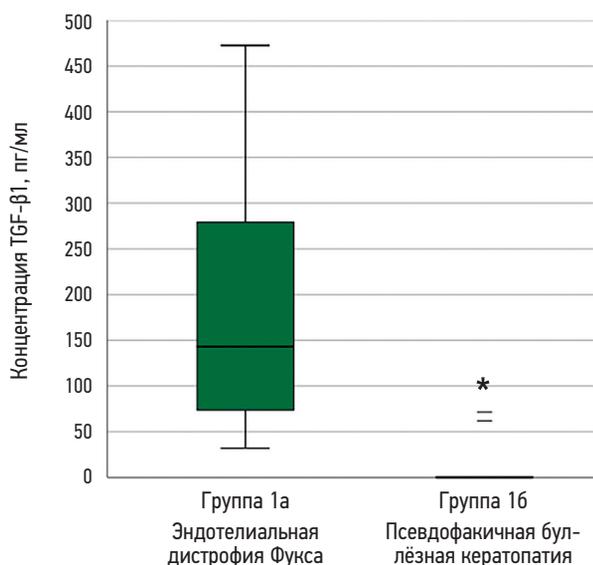


Рис. 1. Концентрация TGF-β1 (пг/мл) во внутриглазной жидкости при эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатии.

ДМ в этой группе состоит из заднего «неполосатого» слоя ($7,86 \pm 0,88$ мкм) и переднего «полосатого» слоя ($3,0 \pm 0,32$ мкм). Стромальная поверхность ДМ представлена плотным ЭЦМ (рис. 2, в).

Результаты проведённого гистологического исследования подтверждают, что при ЭД Фукса патологический процесс затрагивает ДМ, приводя к её морфологическим изменениям, а именно к увеличению толщины зоны, синтезированной в постнатальном периоде (состоящей из заднего «неполосатого» и коллагенового слоёв, а также гутт). В то же время при анализе образцов ДМ с псевдофакичной БК нет значимых различий в её структуре по сравнению с контролем.

Анализ состояния эндотелия в образцах ДМ-Э пациентов групп 2а и 2б, а также контроля проведён иммунофлуоресцентным методом (световой микроскопией в режиме детекции флуоресценции и фазового контраста).

Так, в плоскостных препаратах ДМ-Э, относящихся к контрольной группе, определяется монослой полигональных ЭК. Межклеточные контакты сохранены,

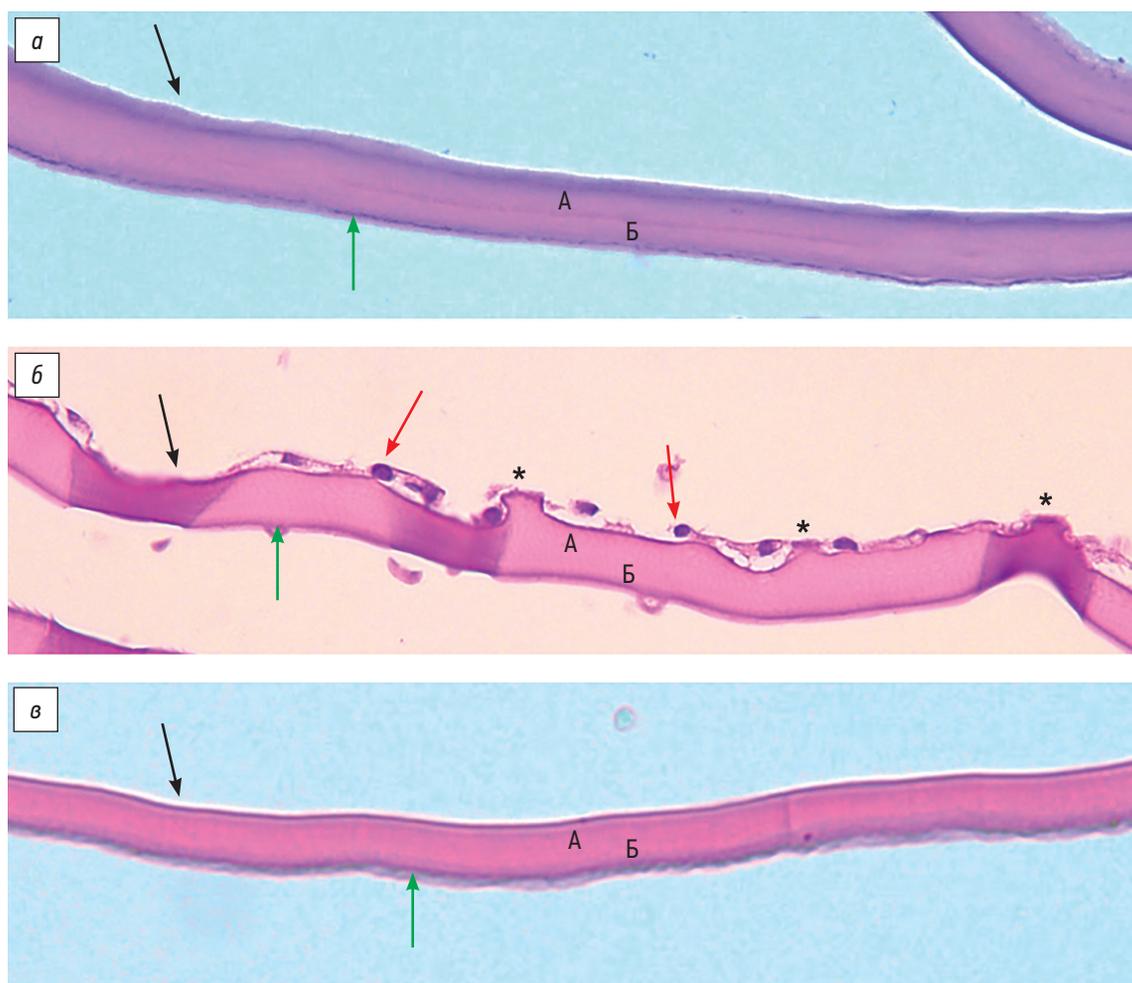


Рис. 2. Десцеметовы мембраны: а — в условиях физиологической нормы, контроль; б — при эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса; в — при псевдофакичной буллезной кератопатии. Эндотелиальные клетки (красные стрелки), эндотелиальная поверхность ДМ (чёрные стрелки), стромальная поверхность ДМ (зелёные стрелки); гутты (звёздочки); А — постнатальные слои; Б — пренатальный передний «полосатый» слой. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$.

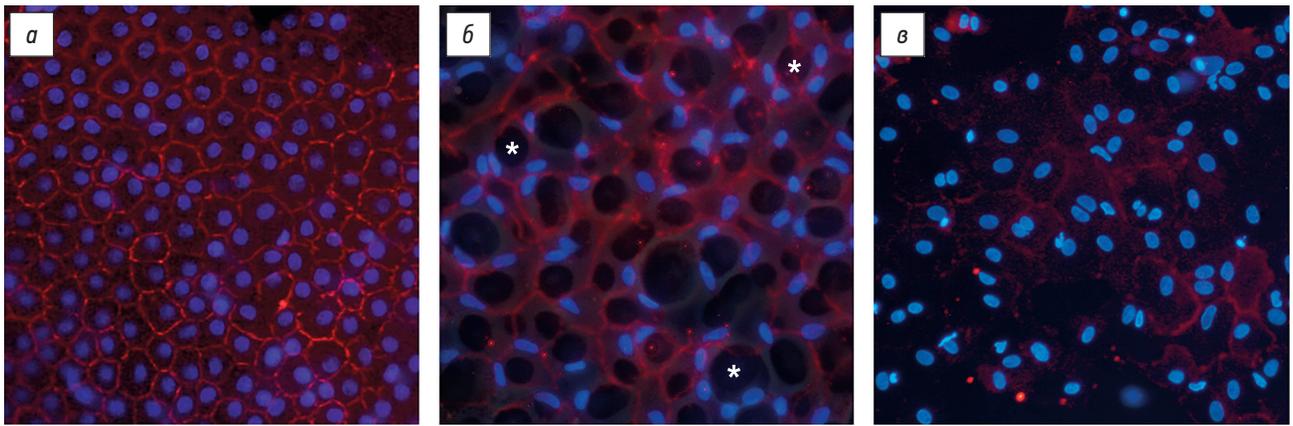


Рис. 3. Эндотелий и десцеметова мембрана: *а* — в условиях физиологической нормы, контроль; *б* — при эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса; *в* — при псевдоэпителиальной буллезной кератопатии. Съёмка в режиме детекции флуоресценции (межклеточные контакты окрашены в красный цвет, ядра — в синий цвет) и фазового контраста (гутты отмечены белыми звёздочками); $\times 200$.

отмечена выраженная продукция белка ZO-1 всеми ЭК. Ядра имеют округлую форму (соотношение сторон составляет 0,92 [0,82; 0,96]), их площадь равна 78,40 [66,99; 93,24] $\mu\text{м}^2$ (рис. 3, *а*; рис. 4, *а*, *б*).

При изучении структуры образцов ДМ-Э во всех случаях у пациентов группы 2а (ЭД Фукса) в режиме фазового контраста визуализировано большое количество гутт различного размера, расположенных между ЭК. Межклеточные контакты на месте гутт разрушены и, по данным иммунофлуоресцентного анализа, выявлено выраженное снижение количества ЭК, синтезирующих белок ZO-1. Кроме того, отмечено увеличение площади ЭК (феномен «распластывания», возникающий при нарушении целостности монослоя эндотелия в отсутствие способности клеток к делению *in vivo*) (рис. 3, *б*). Морфометрический анализ ядер ЭК свидетельствует об увеличении их площади (79,77 [62,51; 107,58] $\mu\text{м}^2$) при ЭД Фукса по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (см. рис. 4, *а*). Ядра имеют вытянутую форму, соотношение их сторон ниже (0,66 [0,53; 0,78]), чем в контрольных образцах ДМ-Э ($p < 0,05$) (см. рис. 4, *б*).

Они оттеснены к периферии клеток, вероятно за счёт деформации цитоскелета и цитоплазматических мембран ЭК, вызванной ростом гутт (см. рис. 3, *б*).

Результаты иммунофлуоресцентного анализа образцов ДМ-Э, выполненного после их окрашивания антителами к α -SMA, свидетельствуют о высоком уровне синтеза этого белка эндотелием роговицы при ЭД Фукса (рис. 5).

По данным световой микроскопии ДМ-Э (режим детекции флуоресценции), во всех случаях у пациентов группы 2б (псевдоэпителиальная БК) определяется низкая плотность ЭК по сравнению с контролем. Как и в образцах ДМ-Э пациентов группы 2а (ЭД Фукса), межклеточные контакты разрушены, отмечено значимое уменьшение числа ЭК, синтезирующих белок ZO-1. Кроме того, микроскопическая картина эндотелия подтверждает, что при псевдоэпителиальной БК, как и при ЭД Фукса, размеры ЭК увеличены по сравнению с контролем (рис. 3, *в*). Морфометрический анализ ядер показывает, что их площадь составляет 154,11 [120,73; 203,13] $\mu\text{м}^2$, что превышает

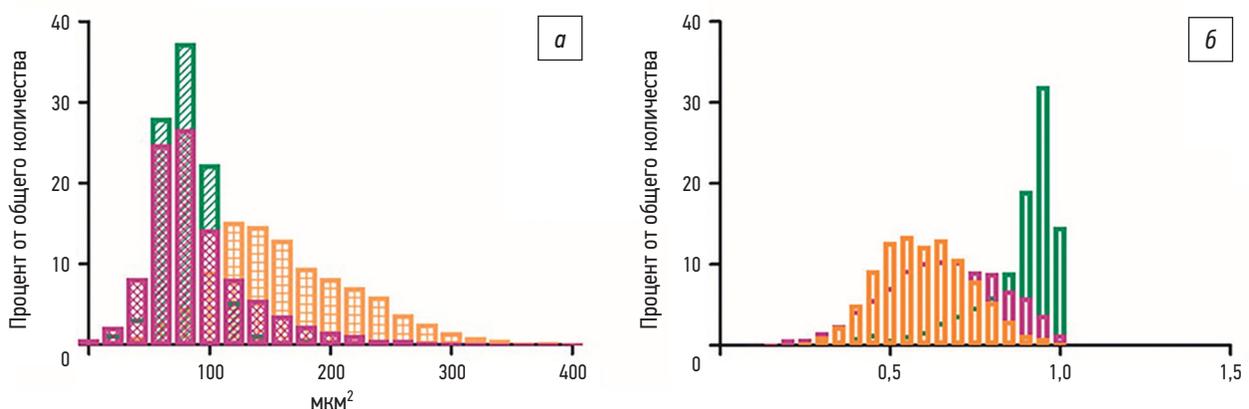


Рис. 4. Характеристика ядер эндотелиальных клеток: *а* — площадь, *б* — соотношение сторон. Контроль — зелёный цвет, эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса — фиолетовый цвет, псевдоэпителиальная буллезная кератопатия — коричневый цвет.

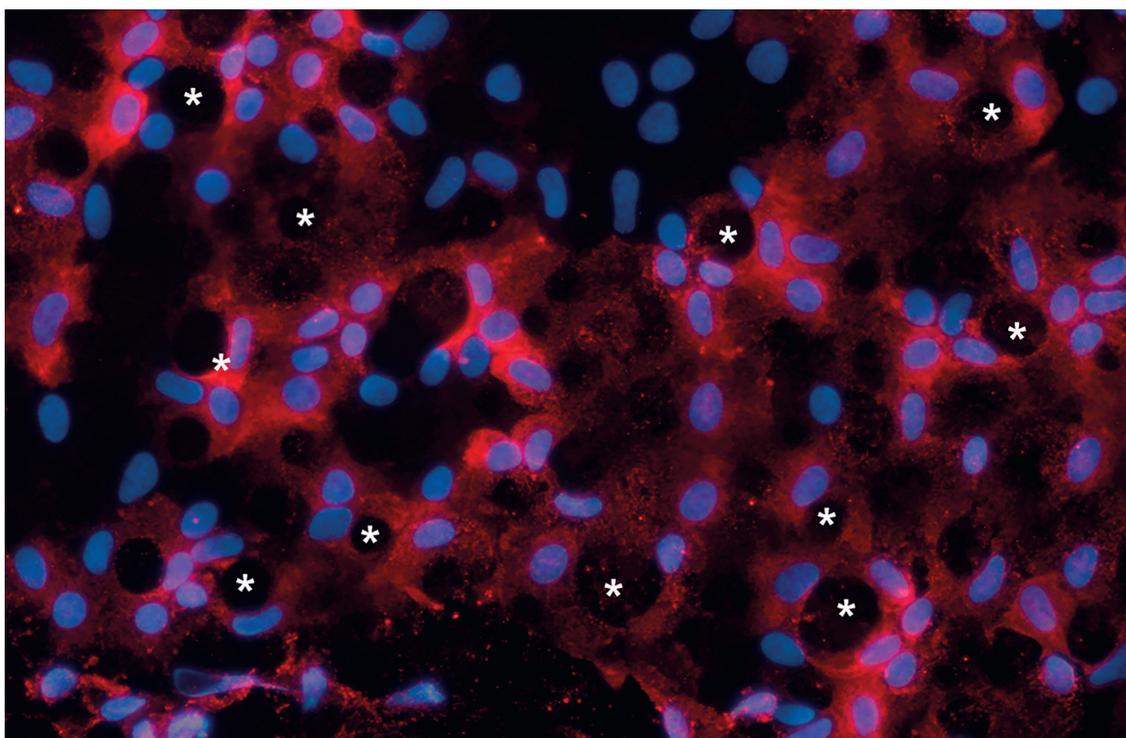


Рис. 5. Эндотелий и десцеметова мембрана при эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса. Съёмка в режиме детекции флуоресценции (микрофиламенты α -SMA окрашены в красный цвет, ядра — в синий цвет) и фазового контраста (гутты отмечены белыми звездочками); $\times 200$.

аналогичные показатели в образцах ДМ-Э группы 2а и контроля ($p < 0,05$) (см. рис. 4, а). Ядра имеют округлую форму, соотношение их сторон ниже (0,60 [0,50; 0,69]), чем в контрольных образцах ($p < 0,05$) (см. рис. 4, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Со второй половины XX века ведётся анализ возрастных и патологических изменений ДМ роговицы человека с использованием различных морфологических методов исследования [11–15]. По данным электронной микроскопии, в интактной ДМ выделяют пренатальный передний «полосатый» и постнатальный задний «неполосатый» слои. «Полосатый» слой сформирован к моменту рождения, имеет толщину 3 мкм и характеризуется специфической исчерченностью. На протяжении последующего постнатального периода ЭК роговицы секретируют новые компоненты ЭЦМ, из которых формируется задний «неполосатый» слой ДМ толщиной около 10 мкм [16].

Выполненный нами морфометрический анализ парафиновых срезов образцов ДМ пациентов с псевдофакичной БК и выделенных из донорских корнеосклеральных дисков (контрольная группа) показал сходные результаты с ранее представленными, несмотря на сложность в определении истинной границы между слоями по интенсивности их окрашивания гематоксилином и эозином. Статистически значимых различий в параметрах ДМ между псевдофакичной БК и контролем не отмечено.

Таким образом, можно заключить что псевдофакичная БК, возникающая вследствие необратимого снижения плотности ЭК, не сопровождается структурными изменениями ДМ.

Вместе с тем показано статистически значимое утолщение ДМ при ЭД Фукса по сравнению с псевдофакичной БК и контролем за счёт синтеза в постнатальном периоде заднего «неполосатого» слоя (состоящего преимущественно из компонентов ЭЦМ), коллагеновой зоны и гутт. Полученные результаты согласуются с данными W.M. Bougne и соавт. [11], которые впервые выполнили детальный анализ строения ДМ при ЭД Фукса и на основании электронограмм ДМ показали, что передний «полосатый» слой остаётся интактным, рост заднего «неполосатого» слоя замедляется, в то же время постепенно формируются дополнительный коллагеновый слой и гутты, суммарная толщина которых в среднем равна 16,6 мкм. N. Okutuga и соавт. [9] методом световой микроскопии парафиновых срезов роговиц (окрашивание гематоксилином и эозином) выявили статистически значимое утолщение ДМ при ЭД Фукса по сравнению с контролем.

Однако T. Brockmann и соавт. [10], используя аналогичный метод морфологического исследования образцов ДМ пациентов с клинической картиной ЭД Фукса и БК, не обнаружили статистически значимых различий в толщине ДМ и её слоев между группами. Возможно, это связано с включением в исследование пациентов с менее выраженной фенотипической картиной ЭД

Фукса, что подтверждают данные пахиметрии центральной зоны роговицы (666 ± 69 мкм). Вместе с тем авторами отмечено наличие гутт как признак атипичного строения ДМ при ЭД Фукса.

Как известно, ЭД Фукса относят к мультигенным заболеваниям, связанным с вовлечением различных локусов и имеющим популяционную вариабельность [17]. В настоящее время проводятся экспериментально-клинические исследования, направленные на изучение взаимосвязи между молекулярно-генетическими и структурными изменениями [9, 18–20]. Так, выявлены мутантные аллели в генах *ZEB1* и *TCF4*, которые кодируют белки ZEB1 и E2-2 — факторы, инициирующие процесс ЭМТ. Иммуногистохимический анализ ДМ-Э и полнослойных роговиц выявил выраженную продукцию TGF- β 1 в ЭК и гуттах при ЭД Фукса [9, 19–21]. Подобная картина подтвердила предположение об ЭМТ клеток эндотелия с приобретением ими фибробластоподобного фенотипа. Проведённые N. Okumura и соавт. [9] исследования показали, что в иммортализованной культуре ЭК, выделенной из ДМ-Э пациентов с ЭД Фукса при кератопластике, повышена экспрессия генов *ZEB1* и *Snail-1*. Кроме того, авторами была обнаружена продукция компонентов ЭЦМ (коллаген I, IV и VIII типов, фибронектин). Экспозиция в течение 24 ч культуры ЭК с раствором TGF- β 1 способствовала увеличению выраженности перечисленных выше изменений. Авторы предположили, что существует взаимосвязь между уровнем TGF- β 1 во ВГЖ и степенью ЭМТ ЭК с продукцией компонентов ЭЦМ и ростом гутт [9].

Для изучения этой взаимосвязи нами проведён анализ концентрации TGF- β 1 во ВГЖ. Статистически значимое повышение уровня этого биологически активного эндогенного вещества при ЭД Фукса по сравнению с псевдофакичной БК согласуется с результатами M. Matthaei и соавт. [22], которые показали, что при ЭД Фукса в стадии декомпенсации в ВГЖ определяется высокий уровень TGF- β 1, TGF- β 2 и других медиаторов ЭМТ.

При световой микроскопии плоскостных препаратов ДМ-Э в режиме детекции флуоресценции нами установлено, что при ЭД Фукса и псевдофакичной БК в одинаковой степени снижена продукция ЭК белка ZO-1, что свидетельствует о разрушении межклеточных контактов. Увеличение размеров этих клеток и их ядер в обоих случаях, очевидно, связано с попыткой эндотелия закрыть дефект слоя за счёт распластывания в отсутствие способности клеток к митотическому делению.

Ранее при использовании различных методов исследования (прижизненные зеркальная микроскопия и конфокальная микроскопия роговицы, а также иммунофлуоресцентный анализ) описаны деформация и гибель ЭК на фоне непрерывного роста гутт при ЭД Фукса [9, 23]. Вместе с тем данных об изменении формы ядер ЭК на фоне этого процесса в доступной литературе нами не обнаружено. Проведённый морфометрический анализ показал статистически значимое уменьшение

соотношения сторон ядер при ЭД Фукса и псевдофакичной БК по сравнению с контролем. Несмотря на то, что визуально ядра ЭК в образцах ДМ-Э пациентов с ЭД Фукса имеют более вытянутую форму, чем при псевдофакичной БК, статистически значимых различий в соотношении сторон между этими группами не выявлено.

Возможность наложения картин, полученных при световой микроскопии в режимах детекции флуоресценции и фазового контраста, позволяет оценить взаимное расположение ЭК и гутт. Очевидно, что накопление ЭЦМ, проявляющееся неуклонным увеличением площади гутт, приводит к давлению на цитоплазматическую мембрану и цитоскелет ЭК, что проявляется в том числе деформацией ядер и их смещением к периферии ЭК. В то же время данные изменения могут отражать процесс постепенного перехода фенотипа ЭК в фибробластоподобный. Выраженный синтез клетками белка α -SMA (компонента ЭЦМ) также служит доказательством их ЭМТ. Однако требуется проведение дополнительных исследований с увеличением количества образцов ДМ-Э в каждой из основных групп для сравнительной оценки состояния ЭЦМ при ЭД Фукса и псевдофакичной БК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В основе хронического отека роговицы, возникающего при эндотелиальной дистрофии Фукса (стадия декомпенсации) и псевдофакичной буллезной кератопатии, лежат различные изменения десцеметовой мембраны и эндотелия. Эндотелиальная дистрофия Фукса характеризуется утолщением десцеметовой мембраны за счёт синтеза фибробластоподобными клетками эндотелия волокон компонентов экстрацеллюлярного матрикса, формирующих гутты. Рост гутт вызывает нарушение межклеточного взаимодействия и деформацию ядер эндотелиальных клеток. Псевдофакичная буллезная кератопатия не сопровождается утолщением десцеметовой мембраны. Отмечены потеря межклеточных контактов и более выраженное, чем при эндотелиальной дистрофии Фукса, увеличение ядер клеток. TGF- β 1 вовлечён в патологический процесс накопления внеклеточного матрикса и формирования гутт при эндотелиальной дистрофии Фукса.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Не указан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meek K.M., Knupp C. Corneal structure and transparency // *Prog Retin Eye Res.* 2015. Vol. 49. P. 1–16. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.001
2. Joyce N.C. Cell cycle status in human corneal endothelium // *Exp Eye Res.* 2005. Vol. 81, N 6. P. 629–638. doi: 10.1016/j.exer.2005.06.012
3. Edelhauser H.F. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor lecture // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006. Vol. 47, N 5. P. 1754–1767. doi: 10.1167/iovs.05-1139
4. Pricopie S., Istrate S., Voinea L., et al. Pseudophakic bullous keratopathy // *Rom J Ophthalmol.* 2017. Vol. 61, N 2. P. 90–94. doi: 10.22336/rjo.2017.17
5. Price M.O., Mehta J.S., Jurkunas U.V., Price F.W. Jr. Corneal endothelial dysfunction: evolving understanding and treatment options // *Prog Retin Eye Res.* 2021. Vol. 82. P. 100904. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100904
6. Matthaei M., Hribek A., Clahsen T., et al. Fuchs endothelial corneal dystrophy: clinical, genetic, pathophysiologic, and therapeutic aspects // *Annu Rev Vis Sci.* 2019. Vol. 5. P. 151–175. doi: 10.1146/annurev-vision-091718-014852
7. Okumura N., Hashimoto K., Kitahara M., et al. Activation of TGF- β signaling induces cell death via the unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, N 1. P. 6801. doi: 10.1038/s41598-017-06924-3
8. Katikireddy K.R., White T.L., Miyajima T., et al. NQO1 downregulation potentiates menadione-induced endothelial-mesenchymal transition during rosette formation in Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Free Radic Biol Med.* 2018. Vol. 116. P. 19–30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.036
9. Okumura N., Minamiyama R., Ho L., et al. Involvement of ZEB1 and Snail1 in excessive production of extracellular matrix in Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Lab Invest.* 2015. Vol. 95. P. 1291–1304. doi: 10.1038/labinvest.2015.111
10. Brockmann T., Brockmann C., Maier A.B., et al. Primary Descemet's membrane endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy versus bullous keratopathy: histopathology and clinical results // *Curr Eye Res.* 2018. Vol. 43, N 10. P. 1221–1227. doi: 10.1080/02713683.2018.1490773
11. Bourne W.M., Johnson D.H., Campbell R.J. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy // *Arch Ophthalmol.* 1982. Vol. 100, N 12. P. 1952–1955. doi: 10.1001/archophth.1982.01030040932013
12. de Oliveira R.C., Wilson S.E. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration // *Exp Eye Res.* 2020. Vol. 197. P. 108090. doi: 10.1016/j.exer.2020.108090
13. Halfter W., Moes S., Halfter K., et al. The human Descemet's membrane and lens capsule: protein composition and biomechanical properties // *Exp Eye Res.* 2020. Vol. 201. P. 108326. doi: 10.1016/j.exer.2020.108326
14. Murphy C., Alvarado J., Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984. Vol. 25, N 12. P. 1402–1415.
15. Xia D., Zhang S., Nielsen E., et al. The ultrastructures and mechanical properties of the Descemet's membrane in Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. P. 23096. doi: 10.1038/srep23096
16. Johnson D.H., Bourne W.M., Campbell R.J. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas // *Arch Ophthalmol.* 1982. Vol. 100, N 12. P. 1942–1947. doi: 10.1001/archophth.1982.01030040922011
17. Iliff B.W., Riazuddin S.A., Gottsch J.D. The genetics of Fuchs' corneal dystrophy // *Expert Rev Ophthalmol.* 2012. Vol. 7, N 4. P. 363–375. doi: 10.1586/eop.12.39. PMID: 23585771
18. Gupta R., Kumawat B.L., Paliwal P., et al. Association of ZEB1 and TCF4 rs613872 changes with late onset Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from northern India // *Mol Vis.* 2015. Vol. 21. P. 1252–1260.
19. Jurkunas U.V., Bitar M., Rawe I. Co-localization of increased Transforming growth factor Beta induced protein (TGFB β) and Clusterin expression in guttae of Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009. Vol. 50, N 3. P. 1129–1136. doi: 10.1167/iovs.08-2525
20. Kuot A., Hewitt A.W., Griggs K., et al. Association of TCF4 and CLU polymorphisms with Fuchs' endothelial dystrophy and implication of CLU and TGFB β proteins in the disease process // *Eur J Hum Genet.* 2012. Vol. 20, N 6. P. 632–638. doi: 10.1038/ejhg.2011.248
21. Weller J.M., Zenkel M., Schlotzer-Schrehardt U., et al. Extracellular matrix alterations in late-onset Fuchs' corneal dystrophy // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014. Vol. 55, N 6. P. 3700–3708. doi: 10.1167/iovs.14-14154
22. Matthaei M., Gillessen J., Muether P.S., et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related cytokines in the aqueous humor of phakic and pseudophakic Fuchs' Dystrophy eyes // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015. Vol. 56, N 4. P. 2749–2754. doi: 10.1167/iovs.15-16395
23. Ong T.S., Jurkunas U. Imaging the corneal endothelium in Fuchs corneal endothelial dystrophy // *Semin Ophthalmol.* 2019. Vol. 34, N 4. P. 340–346. doi: 10.1080/08820538.2019.1632355

REFERENCES

1. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res.* 2015;49:1–16. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.001
2. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2005;81(6):629–638. doi: 10.1016/j.exer.2005.06.012
3. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(5):1754–1767. doi: 10.1167/iovs.05-1139
4. Pricopie S, Istrate S, Voinea L, et al. Pseudophakic bullous keratopathy. *Rom J Ophthalmol.* 2017;61(2):90–94. doi: 10.22336/rjo.2017.17
5. Price MO, Mehta JS, Jurkunas UV, Price FW Jr. Corneal endothelial dysfunction: Evolving understanding and treatment options. *Prog Retin Eye Res.* 2021;82:100904. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100904
6. Matthaei M, Hribek A, Clahsen T, et al. Fuchs endothelial corneal dystrophy: clinical, genetic, pathophysiologic, and therapeutic aspects. *Annu Rev Vis Sci.* 2019;5:151–175. doi: 10.1146/annurev-vision-091718-014852
7. Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, et al. Activation of TGF- β signaling induces cell death via the unfolded protein response in

- Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci Rep.* 2017;7(1):6801. doi: 10.1038/s41598-017-06924-3
- 8.** Katikireddy KR, White TL, Miyajima T, et al. NQO1 down-regulation potentiates menadione-induced endothelial-mesenchymal transition during rosette formation in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Free Radic Biol Med.* 2018;116:19–30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.036
- 9.** Okumura N, Minamiyama R, Ho L, et al. Involvement of ZEB1 and Snail1 in excessive production of extracellular matrix in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Lab Invest.* 2015;95:1291–1304. doi: 10.1038/labinvest.2015.111
- 10.** Brockmann T, Brockmann C, Maier AB, et al. Primary Descemet's membrane endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy versus bullous keratopathy: histopathology and clinical results. *Curr Eye Res.* 2018;43(10):1221–1227. doi: 10.1080/02713683.2018.1490773
- 11.** Bourne WM, Johnson DH, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(12):1952–1955. doi: 10.1001/archophth.1982.01030040932013
- 12.** de Oliveira RC, Wilson SE. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020;197:108090. doi: 10.1016/j.exer.2020.108090
- 13.** Halfter W, Moes S, Halfter K, et al. The human Descemet's membrane and lens capsule: protein composition and biomechanical properties. *Exp Eye Res.* 2020;201:108326. doi: 10.1016/j.exer.2020.108326
- 14.** Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(12):1402–1415.
- 15.** Xia D, Zhang S, Nielsen E, et al. The ultrastructures and mechanical properties of the Descemet's membrane in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci Rep.* 2016;6:23096. doi: 10.1038/srep23096
- 16.** Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(12):1942–1947. doi: 10.1001/archophth.1982.01030040922011
- 17.** Iliff BW, Riazuddin SA, Gottsch JD. The genetics of Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol.* 2012;7(4):363–375. doi: 10.1586/eop.12.39. PMID: 23585771
- 18.** Gupta R, Kumawat BL, Paliwal P, et al. Association of ZEB1 and TCF4 rs613872 changes with late onset Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from northern India. *Mol Vis.* 2015;21:1252–1260.
- 19.** Jurkunas UV, Bitar M, Rawe I. Co-localization of increased Transforming growth factor Beta induced protein (TGFBIp) and Clusterin expression in guttae of Fuchs endothelial corneal dystrophy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(3):1129–1136. doi: 10.1167/iovs.08-2525
- 20.** Kuot A, Hewitt AW, Griggs K, et al. Association of TCF4 and CLU polymorphisms with Fuchs' endothelial dystrophy and implication of CLU and TGFBI proteins in the disease process. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(6):632–638. doi: 10.1038/ejhg.2011.248
- 21.** Weller JM, Zenkel M, Schlotzer-Schrehardt U, et al. Extracellular matrix alterations in late-onset Fuchs' corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(6):3700–3708. doi: 10.1167/iovs.14-14154
- 22.** Matthaai M, Gillessen J, Muether PS, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related cytokines in the aqueous humor of phakic and pseudophakic Fuchs' Dystrophy eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(4):2749–2754. doi: 10.1167/iovs.15-16395
- 23.** Ong TS, Jurkunas U. Imaging the corneal endothelium in Fuchs corneal endothelial dystrophy. *Semin Ophthalmol.* 2019;34(4):340–346. doi: 10.1080/08820538.2019.1632355

ОБ АВТОРАХ

* **Фисенко Наталья Владимировна**, к.м.н.;
адрес: Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11а;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7198-4498>;
eLibrary SPIN: 9750-1529;
e-mail: natfisenko@mail.ru

Юсеф Наим Юсеф, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4043-456X>;
eLibrary SPIN: 6891-6138

Суббот Анастасия Михайловна, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>;
eLibrary SPIN: 3898-2570;
e-mail: kletkagb@gmail.com

Осипян Григорий Альбертович, д.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1056-4331>;
eLibrary SPIN: 1039-0470;
e-mail: gregor79@yandex.ru

Демур Татьяна Александровна, д.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6946-6146>;
eLibrary SPIN: 2198-5765;
e-mail: demura-t@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* **Natalia V. Fisenko**, MD, Cand. Sci. (Med.);
address: 11A Rossolimo street, Moscow 119021, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7198-4498>;
eLibrary SPIN: 9750-1529;
e-mail: natfisenko@mail.ru

Yusef N. Yusef, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4043-456X>;
eLibrary SPIN: 6891-6138

Anastasia M. Subbot, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>;
eLibrary SPIN: 3898-2570;
e-mail: kletkagb@gmail.com

Grigory A. Osipyan, MD, Dr. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1056-4331>;
eLibrary SPIN: 1039-0470;
e-mail: gregor79@yandex.ru

Tatiana A. Demura, MD, Dr. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6946-6146>;
eLibrary SPIN: 2198-5765;
e-mail: demura-t@yandex.ru