DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2022.12.1.021>
УДК 617.7

Кравчик М.В.¹ ✉, Новиков И.А.¹, Суббот А.М.¹, Антонов А.А.¹, Петров С.Ю.²

¹ Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский институт глазных болезней
имени Гельмгольца, Москва, Россия

Бионеорганический компонент ретенции при открытоугольной глаукоме

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – И.А. Новиков, А.М. Суббот, С.Ю. Петров, М.В. Кравчик; сбор и обработка материала – М.В. Кравчик, С.Ю. Петров, А.А. Антонов, И.А. Новиков; статистическая обработка – М.В. Кравчик; написание текста – М.В. Кравчик; редактирование – И.А. Новиков, С.Ю. Петров.

Подана: 12.05.2021

Принята: 14.02.2022

Контакты: kravchik.mv@gmail.com

Резюме

Цель. Оценка процессов минерализации, происходящих в передней камере глаза при открытоугольной глаукоме.

Материалы и методы. На сканирующем электронном микроскопе EVO LS 10 (Zeiss, Германия) с энергодисперсионным рентгеновским спектрометром Oxford X-Max-50 (Oxford, Великобритания) проводился химический анализ полученной интраоперационно трабекулярной ткани 29 пациентов (30 глаз) в возрасте 73 (58; 78) лет с открытоугольной глаукомой II–III стадий, а также пигментного материала, полученного из радужки 5 кадаверных глаз. Поверхность всех образцов визуализировали в СЭМ с помощью детектора обратно-рассеянных электронов (BSE) в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па) при ускоряющем напряжении 21,5 кВ и токе на образце 20–60 пА. Валовый химический микроанализ и микрокартирование проводили для выборочных химических элементов: C, N, O, Ca, Cl P, Si, S.

Результаты. В 7 из 30 образцов была выявлена значимая по площади минеральная облитерация ткани дренажной зоны: силитизация – в 3 образцах, кальцификация – в 4 образцах. Также *in vitro* был получен эффект автономной кальцификации гранул пигмента: на их поверхности при моделировании витальных условий выявлялась минеральная фаза, стехиометрически соответствующая дикальциевому фосфат дигидрату (ДКФД) и аморфному фосфату кальция (АФК).

Заключение. Был выделен тип открытоугольной глаукомы, при которой кальциевая и кремниевая облитерация является потенциально значимым компонентом ретенции на уровне трабекулярной ткани. В эксперименте с пигментом был смоделирован механизм, способствующий кальцификации дренажной зоны. Был сделан вывод о нарушениях кислотно-основного баланса в области трабекулы, способствующих созданию минеральной облитерации.

Ключевые слова: открытоугольная глаукома, биоминерализация, биокальцификация, биосилитизация, энергодисперсионная спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия

Kravchik M.¹✉, Novikov I.¹, Subbot A.¹, Antonov A.¹, Petrov S.²

¹ Scientific Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

² Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russia

Bioinorganic Component of Intraocular Fluid Retention in Open-angle Glaucoma

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – Novikov I., Subbot A., Petrov S., Kravchik M.; collection and processing of material – Kravchik M., Petrov S., Antonov A., Novikov I.; statistical processing – Kravchik M.; writing – Kravchik M.; editing – Novikov I., Petrov S.

Submitted: 12.05.2021

Accepted: 14.02.2022

Contacts: kravchik.mv@gmail.com

Abstract

Purpose. To define mineralization processes that occur in the anterior chamber of the eye in case of open-angle glaucoma.

Materials and methods. The chemical composition assessment of trabecular tissue samples from 29 patients (30 eyes) aged 73 (58;78) with open-angle glaucoma (stages II–III) as well as elemental analyses of iris pigment material obtained from 5 cadaver eyes was performed using a scanning electron microscope (SEM) "EVO LS 10" (Zeiss, Germany) with an energy-dispersive spectrometer (EDS) "Oxford-X-MAX-50" (Oxford, UK). Images were acquired using a backscattered electron detector (BSE) in the SEM in a low vacuum mode (EP, 70 Pa) at an accelerating voltage of 21.5 kV and a probe current of 20–60 pA. Bulk microanalysis and micro-mapping were performed for certain chemical elements: C, N, O, Ca, Cl, P, Si, S.

Results. 7 out of 30 tissue samples obtained from the drainage area demonstrated significant mineralization: silicification in 3 samples and calcification in 4 samples. Also, the autonomous calcification effect was discovered in simulated experimental conditions (in vitro): a mineral phase was identified on pigment granules' surface with a stoichiometric correspondence to dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) and amorphous calcium phosphate (ACP).

Conclusion. A type of open-angle glaucoma associated with calcium and silicon obliteration as a potential factor for retention in trabecular meshwork tissue was determined. In a pigment experiment, a process was simulated that causes the calcification of the drainage zone. It was noted that acid-base imbalance in tissue contributes to mineral obliteration.

Keywords: open-angle glaucoma, biomineralization, biocalcification, biosilicification, energy dispersive spectroscopy, scanning electron microscopy

■ ВВЕДЕНИЕ

Известно, что процессы эктопической минерализации в человеческом организме зачастую сопровождают самые различные патологические состояния [1–5]. Данное исследование было направлено на изучение доли минерального компонента дренажной зоны при глаукоме, которая на протяжении многих лет занимает одно

из первых мест среди причин, приводящих к снижению зрительных функций. Имеющийся на текущий момент недостаток сведений о минеральном составе дренажной зоны отчасти связан с требующейся в классических случаях агрессивной пробоподготовкой тонкого образца ткани, влекущей за собой изменения в химическом составе объекта и потерю значительной части информации о минеральном веществе.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика клинического материала

В исследуемую клиническую группу вошли 29 пациентов (30 глаз) (73 (59; 78) года, 14 ж., 15 м.) с открытоугольной глаукомой II и III стадий, которым была показана антиглаукомная хирургия.

Показания к оперативному лечению определялись следующими принципами: прогрессирование глаукомной оптической нейропатии вследствие декомпенсации ВГД при невозможности достижения целевого ВГД иными методами лечения [6]. Всем пациентам (в сроки 2–4 недели до госпитализации для проведения антиглаукомной операции) было проведено стандартное офтальмологическое обследование. В рамках антиглаукомной хирургии пациентам проводилась непроникающая глубокая склерэктомия (НГСЭ). Вмешательства выполняли по стандартной методике, эксплантированные при этом образцы наружной части трабекулы использовались в дальнейшем для химического анализа. Материал был получен от пациентов, подписавших информированное согласие на участие в исследовании и использование их биопроб.

Характеристика экспериментального материала

Был изучен материал пигментных гранул радужки 5 кадаверных глаз, полученных из лаборатории консервации тканей (глазной банк) ФГБНУ «НИИГБ» после забора роговично-склеральных дисков для консервации. Время после смерти донора не превышало 24 часов. Возраст доноров варьировался в диапазоне 55–75 лет, причиной смерти являлась сердечно-сосудистая патология. До начала подготовки лабораторных образцов проводилась серологическая диагностика на инфицированность вирусами ВИЧ I/II, гепатитов В и С, сифилиса. Образцы были отобраны из «чистого» донорского материала от серонегативных трупов.

Для получения материала в стерильных условиях бокса из кадаверного глаза вырезался диск радужки. После промывки в фосфатном буферном растворе (PBS) (pH 7,4) диск помещался в пробирку с 8 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) без двухвалентных ионов. Дезагрегировался образец встряхиванием на вортекс-миксере (10 минут) и затем пропусканием через нейлоновый фильтр (Cell Strainer) с диаметром пор 40 мкм («СПЛ ЛайфСайенс Ко., ЛтД», Республика Корея) для удаления клеточных элементов и больших агрегатов. Очищенная суспензия гранул была разделена на 2 (опыт и контроль), а затем центрифугирована на скорости 2000 об/мин в течение 10 мин. (центрифуга Elmi; ELMI Ltd., Латвия). Супернатант удалялся. Учитывая то, что определенная часть внутриглазной жидкости является ультрафильтратом плазмы крови, добавление бычьей сыворотки к гранулам пигмента позволило бы смоделировать нативную витальную среду, окружающую их в передней камере. Исходя из этого опытные образцы ресуспендировались в среде D-MEM с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, HyClone), контрольные образцы ресуспендировались в D-MEM без сыворотки. Затем содержимое рассеивалось в культуральные

чашки Петри диаметром 35 мм и инкубировались во влажной атмосфере при температуре 37 °C и 5% CO₂ в течение 24 часов. После окончания срока инкубации чашки промывались дистиллированной водой (на дне чашки при этом визуальнo фиксировался окрашенный осадок) и подвергались сушке на воздухе в течение 1 часа.

Химический анализ

В рамках клинического и экспериментального этапов исследования изучали химический состав материала на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) EVO LS 10 (Zeiss, Германия), снабженном спектрометром (ЭДС) Oxford X-Max-50 (Oxford, Великобритания). Пробоподготовка перед анализом исключала классическую экспозицию образца в агрессивном растворе глутарового альдегида с последующим обезвоживанием.

Поверхность визуализировалась в СЭМ с помощью детектора обратно-рассеянных электронов (BSE) в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па) при ускоряющем напряжении 21,5 кВ и токе на образце 20–60 пА. Для получения информации о пространственном распределении химических элементов проводилось химическое микрокартирование при помощи ЭДС с использованием силы тока на образце 150–200 пА: выдержка – 3000 с., разрешение – 512×384 пикс. Общий химический микроанализ проводился для выборочных химических элементов: C, N, O, Al, Ca, Cl, K, Mg, Na, P, Si, S. Элементы, весовая доля которых по результатам анализа оказывалась ниже границы предела обнаружения в ЭДС (<0,1 вес. %), исключались из обработки. Итоговые данные о содержании химических элементов приводились к 100% весу по каждому образцу.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку осуществляли, используя программы Excel 2019 (Microsoft) и Statistica 12.6 (StatSoft). Распределение каждого из оцениваемых параметров не относили к нормальному закону, что связано с метрологическим классом химического анализа. Исходя из этого, описательные данные приводили в виде медианы (Me), дополненной интерквартильным размахом (Q25; Q75).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Пространственное распределение серосодержащих веществ в трабекулярной ткани при глаукоме

В ткани трабекулы, полученной при проведении НГСЭ, в 22 образцах из 30 по данным визуализации в обратно-рассеянных электронах (BSE) между пластинами трабекулярной ткани систематически обнаруживались значительные агрегаты пигментных гранул (рис. 1а). При этом, по данным химического микрокартирования, в совпадающей с пигментными агрегатами позиции обнаруживалась значимая по площади аккумуляция высокосернистых веществ (рис. 1б, белые стрелки), располагающихся между клетками трабекулы (рис. 1а, красные стрелки). На клетки трабекулы в свою очередь указывали локальные максимумы концентрации Р (рис. 1с, белые стрелки), соответствующие позиции их ядер. Нередко между клетками трабекулы также визуализировались рассеянные кальцификаты, на которые указывают локальные скопления Са (рис. 1д, пунктирная стрелка), соответствующие электронно-плотным участкам, обнаруживаемым на детекторе BSE (рис. 1а, пунктирная стрелка).

Рис. 1. Изображение поверхности трабекулы при ПОУГ III стадии, полученное с помощью СЭМ: а) на детекторе BSE во врезке приведено увеличенное изображение одиночного конгломерата пигментных гранул; б) на детекторе ЭДС показано распределение S; в) на детекторе ЭДС показано распределение P; г) на детекторе ЭДС показано распределение Ca (15 см)

Fig. 1. SEM images of the trabecular surface in POAG stage III: a) the BSE detector image of a single conglomerate of pigment granules (shown as inset); b) the EDS detector, S distribution; c) the EDS detector, P distribution; d) the EDS detector, Ca distribution (15 sm)

Минеральное вещество в трабекулярной ткани при глаукоме

При подготовке к визуализации в СЭМ образцов ткани трабекулы, при которой использовалась щадящая методика по отношению к минеральному веществу, в 7 образцах из 30 была выявлена облитерация ткани трабекулы минеральными депозитами (см. таблицу). Извлекаемое минеральное вещество представляло собой микроскопические блоки однородной рассыпчатой массы светло-бежевого цвета. На основании соответствия данных химического состава материала, извлекаемого из трабекулярной ткани, с данными последующего микрокартирования трабекулы был сделан вывод о значимой минерализации дренажной зоны: силитизации и кальцификации.

Весовая доля выборочных химических элементов на площади поверхности наружной части трабекулы

Weight fractions for a certain chemical elements on the surface area of the trabecular outer part

Весовая доля	Неминеральные образцы	Силитизированные образцы	Кальцифицированные образцы
S, вес. %	0,32 [0,25; 0,34]	0,34 (0,34; 0,43)	0,29 [0,27; 0,36]
Si, вес. %	0,02* [0,01*; 0,05*]	0,06* (0,06*; 0,1)	0,01* [0,01*; 0,02*]
P, вес. %	0,11 [0,05*; 0,31*]	0,12 [0,12; 0,17]	0,46 [0,32; 0,63]
Ca, вес. %	0,01* [0,01*; 0,04*]	0,01* [0,01*; 0,01*]	0,1 [0,06*; 0,20]

Примечание: * значения ниже предела обнаружения в ЭДС.

Силитизация трабекулярной ткани

В 3 образцах с выраженной минерализацией на ЭДС обнаружено увеличение доли Si (см. таблицу, рис. 2). Микрокартирование поверхности трабекулярной ткани, освобожденной от сплошной массы кремнистого минерального вещества,

Рис. 2. Изображение поверхности трабекулы при значительной силитизации, полученное с помощью СЭМ: а) на детекторе BSE; б) на детекторе ЭДС показано распределение S; в) на детекторе ЭДС показано распределение P; г) на детекторе ЭДС показано распределение Si (15 см)
Fig. 2. SEM images of the trabecular surface with significant silicification: a) BSE detector; b) the EDS detector, S distribution; c) the EDS detector, P distribution; d) the EDS detector, Si distribution (15 sm)

выявило очаги совместной импрегнации трабекулярных пластин гранулами пигмента и аморфным кремнеземом. Отмечалась пространственная связь между участками с повышенным содержанием кремния и областями у трабекулярных пластин, через которые в норме осуществляется пассивная фильтрация влаги (рис. 2, голубые стрелки, рис. 2d, белые стрелки).

Кальцификация трабекулярной ткани

В 4 образцах с выраженной минерализацией обнаружено аномально высокое по отношению к другим образцам содержание Р и Са (см. таблицу, рис. 3). Отчетливой пространственной связью между импрегнирующими ткань остаточными микросферами фосфата кальция (рис. 3а, желтые стрелки; рис. 3с, белые стрелки; рис. 3d, белые стрелки) и областями у трабекулярных пластин, через которые в норме осуществляется пассивная фильтрация влаги (рис. 3а, белые стрелки), установлено не было.

Рис. 3. Изображение поверхности трабекулы при обильной кальцификации, полученное с помощью СЭМ: а) на детекторе BSE; б) на детекторе ЭДС показано распределение S; в) на детекторе ЭДС показано распределение P; д) на детекторе ЭДС показано распределение Ca (15 см)
Fig. 3. SEM images of the trabecular surface with significant calcification: a) BSE detector; b) the EDS detector, S distribution; c) the EDS detector, P distribution; d) the EDS detector, Ca distribution (15 sm)

Классификация образцов трабекулярной ткани по доле минерального компонента

На основании потенциальной возможности патологических минеральных и органических сернистых веществ физически вызвать ретенцию, обусловленную занимаемой ими площадью, все анализируемые случаи были разделены на группы, соответствующие типу идентифицированного вещества:

- 1) «типичная» глаукома с ретенцией, вызванной сероорганическими веществами, – 22 случая из 30;
- 2) «минеральная глаукома» с силитизацией дренажной зоны – 3 случая из 30;
- 3) «минеральная глаукома» с кальцификацией дренажной зоны – 4 случая из 30.

Результаты экспериментального этапа (моделирование условий, способствующих минерализации дренажной зоны)

В образцах изолированного пигмента, подвергшихся экспозиции FBS (модель компонентов внутриглазной жидкости, являющейся ультрафильтратом плазмы крови), на изображениях, полученных с помощью детектора BSE, пигментные гранулы оказывались окружены яркой оболочкой (рис. 4а, желтые стрелки). Учитывая специфику получения изображений в BSE (наибольшей яркостью обладает элемент с наибольшим атомным весом), можно было говорить о том, что в состав оболочки входит элемент с большим атомным весом, чем тот, из которого состояли сами гранулы. Позиции гранул с визуализируемой на детекторе BSE яркой оболочкой соответствовали локальные максимумы концентрации Р (рис. 4с, белые стрелки) и Са (рис. 4д, белые стрелки). При этом весовая доля Са по данным ЭДС детектора на анализируемой площади распределялась в диапазоне 0,01 вес. % – 0,06 вес. % (медиана 0,04 вес. %), то есть систематически обнаруживалась кальцификация пигментных гранул.

В результате анализа точечных спектров с опытных образцов (рис. 5) обнаружено, что $n(P)/n(Ca) \approx 0,96$, что может соответствовать двум формам нахождения фосфата кальция в биологических системах: $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ – дигидрату дикальциевого фосфата (ДКФД) и $Ca_x(PO_4)_y \cdot zH_2O$ – аморфному фосфату кальция (АФК). Таким образом, *in vitro* был получен эффект автономной кальцификации гранул пигмента, возникающий в определенных условиях, что согласуется с выявленным фактом кальцификации трабекулярной ткани *in vivo*.

В контрольных образцах (рис. 6), инкубированных вне модели, характеризующей нативную среду передней камеры (то есть не подвергшихся экспозиции FBS), обнаруживались серосодержащие пигментные гранулы без каких-либо признаков кальциевой минерализации (весовая доля Са в контрольных образцах систематически оказывалась на границе или ниже предела обнаружения в ЭДС-детекторе). Было отмечено, что при этом пигментные гранулы оказываются связаны серосодержащим веществом, образующим пленки на поверхности чашки Петри. Этот результат частично согласуется с данными клинико-морфологического исследования, при проведении которого на поверхности части образцов трабекулярной ткани между клетками выявлялись пигментные агрегаты, склеенные между собой сероорганическим веществом.

Рис. 4. Изображение пигментных гранул, подвергшихся экспозиции FBS, полученное с помощью СЭМ: а) на детекторе BSE; б) на детекторе ЭДС показано распределение S; в) на детекторе ЭДС показано распределение P; д) на детекторе ЭДС показано распределение Ca (15 см)
Fig. 4. SEM images of pigment granules exposed to FBS: а) BSE detector; б) the EDS detector, S distribution; в) the EDS detector, P distribution; д) the EDS detector, Ca distribution (15 sm)

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы кальцификации и силитизации при патологии

Широко описаны отложения фосфатов кальция в мягких тканях [1, 2]. Процессы патологической силитизации не столь распространены. Существуют единичные данные об идентификации кремния с помощью EDS в ткани мозга при болезни Альцгеймера [3], а также – при помощи поляризационной и конфокальной микроскопии при возрастных изменениях мозга (в форме оксида SiO_2) [4, 5].

Силитизация дренажной зоны

Химическая инертность, а также низкая растворимость в воде делают кремний непригодным к широкому использованию в биологических системах. При этом ранее отмечались единичные сообщения о присутствии Si в крови при глаукоме [7, 8].

Рис. 5. А) Молярное соотношение P/Ca в гранулах пигмента по данным измерения с помощью ЭДС. Пунктирной линией обозначена линия тренда, приведено уравнение линейного тренда; б) изображение пигментных гранул, подвергшихся экспозиции FBS, полученное с помощью СЭМ на детекторе BSE. Зелеными и красными точками обозначены случайные множественные спектры (15 см)

Fig. 5. A) P/Ca molar ratio in pigment granules measured by EDS. The dotted line indicates the trend line, the linear trend equation is present; b) SEM image on BSE detector of pigment granules exposed to FBS. Colored dots (green and red) demonstrate random multiple spectra (15 sm)

Основной формой кремния в водном растворе является кремниевая кислота $\text{Si}(\text{OH})_4$. Самый простой механизм полимеризации кремниевой кислоты – это зависимый от реакции среды процесс, происходящий на мембране в зоне постоянного и длительно существующего градиента pH. Таким образом, накопление кремния свидетельствует о продолжительном локальном дисбалансе кислотно-основной реакции ткани. Это позволяет говорить о кремнии, обнаруживаемом в части образцов трабекулярной ткани, как о маркере длительно существующей локальной дисрегуляции pH.

Аутокальцификация экстрацеллюлярного пигмента как фактор формирования бионеорганического компонента ретенции при ПОУГ

Наблюдаемая нами кальцификация трабекулярной ткани закономерна, так как при глаукоме нарушается работа многих систем, в норме защищающих ткани глаза от патологической кальцификации [9–15]. Также объясним тот факт, что наблюдаемый

Рис. 6. Изображение пигментных гранул, не подвергшихся экспозиции FBS, полученное с помощью СЭМ: а) на детекторе BSE; б) на детекторе ЭДС показано распределение S; в) на детекторе ЭДС показано распределение P; д) на детекторе ЭДС показано распределение Ca (15 см)
Fig. 6. SEM images of pigment granules not exposed to FBS: a) BSE detector; b) the EDS detector, S distribution; c) the EDS detector, P distribution; d) the EDS detector, Ca distribution (15 sm)

нами фосфат кальция стехиометрически может соответствовать ДКФД и/или АФК. В отличие от минеральных фаз при процессах нормальной кальцификации (кости, дентин и эмаль зубов), где доминирует один тип фосфата кальция – биологический апатит, минеральные фазы при аномальной кальцификации обнаруживаются в виде отдельных или смешанных фаз других типов фосфатов кальция в дополнение или вместо биологического апатита. Отчасти это объясняется авторами более широкой вариацией pH раствора в местах патологической кальцификации, отличающейся от более строгой гомеостатированной реакции в норме. Также химический состав нежелательной неорганической фазы может зависеть от возраста патологического кальцификата и его локализации в организме [16].

В литературных источниках отдельно отмечена особая биологическая роль ДКФД (или «брушита») – фазы фосфата кальция, часто идентифицируемой при патологической кальцификации [17] и, по данным стехиометрического анализа, потенциально

присутствующей в части образцов исследуемой нами трабекулярной ткани. В лабораторных условиях ДКФД получают смешиванием растворов, содержащих ионы Ca^{2+} и HPO_4^{2-} при pH 3–4,5, также ДКФД легко кристаллизуется из водных растворов при $\sim 2,0 < \text{pH} < \sim 6,5$ [1]. В физиологических же растворах (при нейтральном значении pH) ДКФД является метастабильной фазой по отношению к другим ортофосфатам кальция: октакальцию фосфату ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – при pH 6–7; дефектному (нестехиометрическому) гидроксиапатиту ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$) – при pH >7 [18].

Следует отметить, что термодинамически при значениях pH >4,0 другие формы апатитов, такие как гидроксиапатит или октакальция фосфат (ОКФ), являются более стабильной и термодинамически предпочтительной фазой в сравнении ДКФД. Однако образование гидроксиапатита происходит намного медленнее, чем ДКФД, а во время одновременного образования нескольких фаз доминирующей может долгое время оставаться кинетически предпочтительная фаза, даже если она имеет гораздо меньшую термодинамическую движущую силу [19]. Кинетические факторы иллюстрируются экспериментом, в котором авторы продемонстрировали переход ДКФД в ОКФ в ростовой среде при 36,5 °C, происходящий только лишь по истечении времени, превышающего сутки [20]. Результаты эксперимента сопоставимы с результатами данного исследования, полученными при «культивировании» пигментных гранул в ростовой среде в течение времени, не превышающего 24 часа.

Другим соединением, зачастую идентифицируемым при патологической кальцификации в организме и, по данным стехиометрического анализа, потенциально присутствующим в части образцов исследуемой нами трабекулярной ткани, является аморфный фосфат кальция (АФК) – $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot z\text{H}_2\text{O}$. Стехиометрия АФК зависит от условий осаждения: сообщается о получении аморфного фосфата кальция с $n(\text{Ca})/n(\text{P}) = 1,18$ при pH 6,6 [2]. В целом АФК также является нестабильной фазой, которая почти мгновенно гидролизует до более стабильных фаз. Однако в присутствии других ионов и макромолекул или в условиях *in vivo* АФК может существовать в течение значительных периодов времени и сохранять аморфное состояние при некоторых конкретных экспериментальных условиях [19].

Осаждение минерального вещества на пигментных гранулах должно свидетельствовать о создаваемых на их поверхности условиях, благоприятных этому процессу. Такие условия могут быть достигнуты несколькими путями: резким повышением концентрации одного из субстратов (локальным перенасыщением раствора) или же локальным изменением кислотно-основного равновесия в щелочную сторону.

Перенасыщение раствора у поверхности гранул пигмента субстратом, в частности, предполагает локальное высвобождение избытка Pi из разрушающейся органеллы, в результате чего образуется минеральное вещество. При этом ожидается, что визуальнo пигментные гранулы должны иметь признаки деградации: неправильную форму, неровные, иррегулярные края. Однако по нашим данным, при визуализации в СЭМ обнаруживается, что кальцифицированные пигментные гранулы в преобладающем большинстве сохраняют нативную округлую или эллипсоидную форму.

Другой рассматриваемый механизм кальцификации предполагает довольно длительное локальное изменение pH на поверхности гранул, достаточное для образования минерального вещества, как по величине изменения кислотно-основного баланса, так и по продолжительности этого изменения во времени.

Допустимо предположить, что способностью поддерживать определенное значение pH на своей поверхности может обладать только относительно функционирующая органелла, при этом кислотно-основное постоянство достигается работой протонных насосов, встроенных в ее билипидную мембрану. Действительно, доказано, что на поверхности выделенной из клетки меланосомы довольно длительное время идет энергетический процесс расщепления ATP до ADP и Pi, обеспечивающий работой мембранный белок V-type H⁺-ATPase [21]. При работе V-type H⁺-ATPase протоны с поверхности мембраны попадают внутрь меланосомы, закисляя внутриорганелльное содержимое, а снаружи при этом достигается относительно щелочная среда. Таким образом, в результате работы V-type H⁺-ATPase на поверхности меланосомы происходит как накопление Pi-субстрата, так и образование относительно щелочной реакции среды, способствующей осаждению из раствора минерального фосфата кальция.

На основании изложенных литературных данных в совокупности с полученными при проведении собственных исследований результатами можно говорить о потенциальной аутокальцификации экстрацеллюлярного пигмента как отдельного фактора формирования бионеорганического компонента ретенции при ПОУГ.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основании химического анализа дренажной зоны выделены случаи открытоугольной глаукомы, при которых кальциевая и кремниевая облитерация является значимым компонентом ретенции на уровне трабекулярной ткани.

В эксперименте был смоделирован механизм кальцификации дренажной зоны, при котором иницирующими минерализацию дренажной зоны являются осаждаемые в дренажной зоне пигментные гранулы, на поверхности которых начинает образовываться оболочка из дикальциевого фосфат дигидрата (ДКФД) и/или АФК. Высказана гипотеза о роли протонных насосов V-type H⁺-ATPase, способствующих созданию на поверхности гранул условий (щелочной pH и избыток Pi) образования минерального фосфата кальция, способного инициировать создание минерального кальциевого компонента ретенции.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dorozhkin S. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomater*. 2011;1:121–164. Available at: <https://doi.org/10.4161/biom.18790>
2. Dorozhkin S., Epple M. *Biological and medical significance of calcium phosphates*, *Angewandte Chemie International Edition*. 2002;41:130–3146. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020902\)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1)
3. Tokutake S., Nagase H., Morisaki S., Oyanagi S. Aluminium detected in senile plaques and neurofibrillary tangles is contained in lipofuscin granules with silicon, probably as aluminosilicate. *Neuroscience letters*. 1995;185:99–102. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)11234-A](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)11234-A)
4. Figueroa M.P., Flores L., Sanchez J., Cesaratti N. Biosilicification (chalcedony) in human cerebral cortex, hippocampus and cerebellum from aged patients. *Micron*. 2008;39:859–867. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.12.005>
5. Figueroa M.P., Lihón J.S. Autofluorescent chalcedony in human brains from elderly patients. *Biotechnic & Histochemistry*. 2010;85:171–176. Available at: <https://doi.org/10.1080/10520290903203096>
6. Nesterov A., Alekseev V., Alekseev I., Amirov A., Astakhov Yu., Balalin S. *National Guide to Glaucoma, 3rd edition, revised and supplemented*. GEOTAR-Media, Moscow; 2015 (in Russ.)
7. Ermolaev A., Novikov I., Mel'nikova L., Griboedova I., Avetisov K. Elemental Composition of Aqueous Humour and Blood Serum at Various Levels of Intraocular Pressure. *Vestn oftalmol*. 2016; 132(6):43–48. Available at: <https://doi.org/10.17116/oftalma2016132643-48> (in Russ.)
8. Mustafina Zh., D'yakova G., Karzhaubaeva G., Leonova M., Zhubanov B. *Method for differential diagnosis of the initial stage of open-angle glaucoma and ocular hypertension*. RF patent 2018834 1994.08.30 (in Russ.)
9. Borras T., Comes N. Evidence for a calcification process in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res*. 2009;88:38–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.11.027>

10. Evenas J., Malmendal A., Forsen S. Calcium. *Curr Opin Chem Biol.* 1998;2:293–302. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(98\)80072-0](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(98)80072-0)
11. Donegan R.K., Hill S.E., Turnage K.C., Orwig S.D., Lieberman R.L. The glaucoma-associated olfactomedin domain of myocilin is a novel calcium binding protein. *J Biol Chem.* 2012;287:43370–7. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408906>
12. Resch Z.T., Fautsch M.P. Glaucoma-associated myocilin: a better understanding but much more to learn. *Exp Eye Res.* 2009;88:704–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.08.011>
13. DeToma A.S., Dengler-Criss C.M., Deb A., Braymer J.J., Penner-Hahn J.E., van der Schyf C.J., Lim M.H., Crish S.D. Abnormal metal levels in the primary visual pathway of the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Biometals.* 2014;27:1291–301. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9790-z>
14. Kielty C.M., Shuttleworth C.A. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett.* 1993;336:323–6. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80829-j](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80829-j)
15. Xue W., Comes N., Borrás T. Presence of an established calcification marker in trabecular meshwork tissue of glaucoma donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3184–94. Available at: <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1403>
16. LeGeros R. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Advances in dental research.* 1988;2:164–180. Available at: <https://doi.org/10.1177/08959374880020011101>
17. LeGeros R. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. *Zeitschrift für Kardiologie.* 2001;90:116–124. Available at: <https://doi.org/10.1007/s003920170032>
18. Veresov A., Putyaev V., Tret'yakov Y. The chemistry of calcium phosphate-based inorganic biomaterials. *Russ. Khim. Zh.* 2004;48(4):52–64 (in Russ.)
19. Wang L., Nancollas G.H. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical reviews.* 2008;108:4628–4669. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr0782574>
20. Mandel S., Tas A.C. Brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) to octacalcium phosphate ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) transformation in DMEM solutions at 36.5 °C. *Materials Science and Engineering: C.* 2010;30:245–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.009>
21. Pelkonen L., Reinisalo M., Morin-Picardat E., Kidron H., Urtti A. Isolation of intact and functional melanosomes from the retinal pigment epithelium. *PLoS One.* 2016;11:e0160352. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160352>