

УДК 611.842.3

ОНТОГЕНЕЗ МЕМБРАНЫ БРУХА ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА**¹Новиков А.С., ^{1,3}Рева И.В., ¹Рева Г.В., ^{1,3}Ямамото Т.,
^{1,2}Абдуллин Е.А., ^{1,2}Альбрандт К.Ф.**¹*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток;*²*Краевая клиническая больница (КГБ) № 2, Владивосток, e-mail: RevaGal@yandex.ru);*³*Международный медицинский научно-образовательный центр,
Ниигата, Япония, e-mail: avers2@yandex.ru*

На современном этапе имеются немногочисленные данные по вопросу строения мембраны Бруха. Имеющиеся утверждения о её двух-, трёх- и пятислойности являются противоречивыми. Необходимость решения вопросов источников развития, онтогенеза и морфологии стекловидной пластинки, её физиологической регенерации основана на её роли в развитии возрастной макулярной дистрофии. Изучена физиологическая регенерация мембраны Бруха. Установлено, что в качестве одного из источников её развития выступает нейроглия, мигрирующая из внутреннего листка глазного бокала в эмбриональном периоде. Способность молодых нейроглиальных клеток к выработке коллагена и гиалуроновой кислоты обуславливает их морфогенетический контроль в процессах васкуляризации сосудистой оболочки по радиальному вектору и препятствует прорастанию сосудов из хориондеи в направлении пигментного эпителия и фоторецепторных клеток. В постнатальном онтогенезе физиологическая регенерация мембраны Бруха происходит за счёт секреторной активности пигментного эпителия сетчатки и эндотелиоцитов хориокапиллярного слоя. Гибель, или снижение активности клеток, вырабатывающих матрикс стекловидной пластинки, приводят к развитию возрастной макулодистрофии, ведущей к слепоте.

Ключевые слова: мембрана Бруха, нейроглия, сосудистая оболочка глаза человека, онтогенез, возрастная макулодистрофия, пигментный эпителий, межклеточный матрикс, коллаген

ONTOGENESIS OF BRUCH'S MEMBRANE OF THE HUMAN EYE**¹Novikov A.S., ^{1,3}Reva I.V., ¹Reva G.V., ^{1,3}Yamamoto T., ^{1,2}Abdullin E.A., ^{1,2}Albrandt K.F.
¹Far Eastern Federal University, Vladivostok;**²*Regional Clinical Hospital (RCH) № 2, Vladivostok, e-mail: RevaGal@yandex.ru;*³*International Medical Research Center (IMERC), Niigata, Aoyama, Japan, e-mail: avers2@yandex.ru*

At the present stage, there are few data on the structure of Bruch's membrane. Available approval of its two-, three-and five – a layer are contradictory. The need to address the roots of development, ontogeny and morphology of glassy plates, its physiological regeneration based on its role in the development of age-related macular degeneration. Physiological regeneration of Bruch's membrane has been studied. It is established that, as one of the sources of its development is neuroglia, migrating from the inner layer of the optic cup in the embryonic period. The ability of young neuroglial cells to produce collagen and hyaluronic acid is responsible for their morphogenetic control in the process of vascularization of the choroid by the radial vector and prevents germination of choroidal vessels in the direction of the pigment epithelium and photoreceptor cells. In postnatal development physiological regeneration of Bruch's membrane is due to the secretory activity of the retinal pigment epithelial and endothelial choriocapillaris layer. Death of, or reduction in the activity of cells that produce a glassy matrix plate, lead to the development of age-related macular degeneration leading to blindness.

Keywords: Bruch's membrane, glial cell, uvea, ontogenesis, age-related macular degeneration, retinal pigment epithelium, intercellular matrix, collagen

В настоящее время к наименее изученным структурам глаза человека относится мембрана Бруха, в то время как многие учёные-фундаменталисты и клиницисты подчёркивают её важную неоспоримую роль в развитии возрастной ретикулярной макулодистрофии (АМД) [5, 8, 24]. Более глубоко эта структура изучена на примере животных [6, 19]. Мембрана Бруха выполняет разнообразные и важные функции, в первую очередь по избирательному транспорту питательных веществ и воды в направлении сетчатки [1, 16]. Именно мембрана Бруха вместе с хориокапиллярным слоем сосудистой оболочки и клетками пигментного эпителия образует своеобразную структурно-функциональную единицу, обеспечивающую барьерные функции [4]. Нарушение

строения мембраны является причиной различных дегенеративных заболеваний пигментного эпителия (отслойка эпителия) и сенсорной части сетчатки (тапеторетинальная дегенерация, дегенерация макулярной области и др. [21]. Способствуют этому ее возрастные изменения и формирование друз [10, 11, 15, 20].

Изучение молекулярно-генетических аспектов проблемы заболевания АМД, биохимических сдвигов в структуре стекловидной пластинки является важным, но оно не опирается, к сожалению, на исчерпывающие морфологические данные по онтогенезу и специализации мембраны Бруха [8]. Изучение участия определённых генов в синтезе белков стекловидной пластинки в основном на экспериментальных

животных не отменяет необходимость знания источников её развития у человека. Нами в доступной литературе отмечены единичные отрывочные указания на нейро-мезенхимное происхождение мембраны Бруха, которые свидетельствуют о том, что её физиологическая регенерация в плодном периоде и постнатальном онтогенезе происходит за счёт секреции пигментного эпителия сетчатки и эндотелия капилляров хориокапиллярного слоя. В то же время не изучен вопрос о том, что именно является источником развития стекловидной пластинки, расположенной на границе сетчатой и сосудистой оболочки.

Целью нашей работы послужило проведение морфологического мониторинга развивающейся стекловидной пластинки – мембраны Бруха (МБ) и установление источников её развития.

Материал и методы исследования

В работе использован материал глаза человека в возрасте от 5 недель эмбрионального периода развития до 87 лет постнатального онтогенеза. Для выявления структуры сосудистой оболочки в целом и стекловидной пластинки в частности использованы гистологические (по классической прописи окрашивание гематоксилином-эозином), а также окрашивание Victoria blue на выявление коллагенового и эластического матрикса мембраны Бруха, а также иммуногистохимические методы исследования с использованием маркеров на выявление CD68 и CD163 [14]. Анализ материала проведён с помощью микроскопа Olympus – Vx51 и цифровой камеры PDx25 с фирменным программным обеспечением.

Результаты исследования и их обсуждение

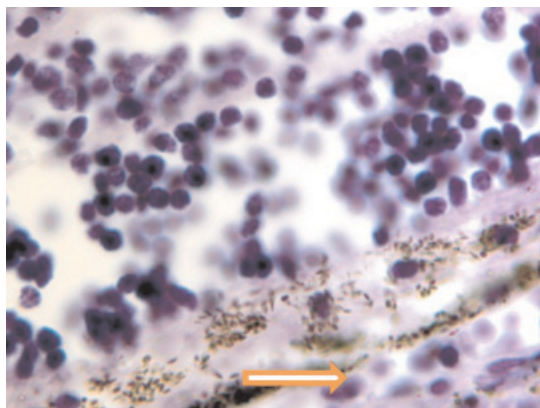
В наших исследованиях базальная мембрана пигментного эпителия сетчатки идентифицируется с 5 недели эмбриогенеза. На 11 неделе выявляется зачаток компонентов мембраны Бруха, представленный клетками веретеновидной формы, в отличие от данных Fu J., Li F.M. (1989), Takei Y., Ozanics V. (1975), идентифицировавших все 5 компонентов мембраны Бруха в эти сроки [7, 21]. По нашим данным, как и данным Sellheyer K., Spitznas M. [18], примитивная мембрана Бруха идентифицируется не ранее 8 недели в виде клеток, прилежащих к базальной мембране пигментного эпителия. С помощью морфологического мониторинга развития хориоидеи установлено, что в пренатальном онтогенезе мембрана Бруха получает развитие за счёт нейроглии, мигрирующей из внутреннего нейрального листка глазного бокала через пигментный листок в строму формирующейся сосудистой оболочки, образуя клеточную глиальную пластинку между пигментным эпителием и сосудистой оболочкой на всём

её протяжении. Морфологически под пигментным эпителием и его базальной мембраной идентифицируются два типа клеток: светлые и тёмные, с крупным гипохромным ядром и высокими ядерно-цитоплазматическими отношениями и с базофильным ядром и низкими ядерно-цитоплазматическими отношениями. Светлые клетки идентифицируются на более ранних этапах развития и морфологически идентичны глиальным клеткам по свойству окрашивания – их цитоплазма хромофобна (рисунок, а, б, в). Эти клетки имеют вытянутую веретеновидную форму и контактируют между собой (рисунок, г, д). При окрашивании по методу Victoria blue нами отмечено, что эластический каркас стекловидной пластинки в период накопления пигментными эпителиоцитами меланина имеет толщину до 25 мкм (рисунок, б). Мы считаем, что на ранних этапах онтогенеза они отвечают за выработку коллагена и гиалуриновой кислоты, препятствующих прорастанию формирующихся сосудов в хориоидею в направлении пигментного эпителия и фоторецепторов сетчатки, преобладающее трофическое обеспечение которых является ликворным на всём протяжении онтогенеза. Имеются данные, что синтез гиалуриновой кислоты наблюдается, начиная с 10 недели пренатального онтогенеза человека, и продолжается до преклонного возраста, значительно снижаясь после 50 лет [22]. Кроме этого, мы предполагаем, что нейроглия, формирующая стекловидную пластинку, осуществляет морфогенетический контроль за вектором роста сосудов в радиальном направлении.

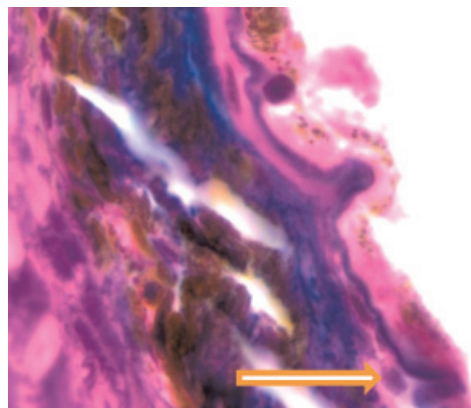
Мы считаем, что процесс миграции нейроглиальных клеток через контактные взаимодействия и изменяющуюся информацию положения индуцирует изменения в геноме пигментного эпителия и эндотелиальных клеток на экспрессию генов, отвечающих за выработку коллагена IV типа, присущего мембране Бруха [2]. По мнению Byström B., Virtanen I., Rousselle P., Gullberg D., Pedrosa-Domellöf F. (2006), именно коллаген мембраны Бруха играет важную роль в ходе морфогенеза, влияя на распространение, миграцию и дифференцировку клеток [3]. Эта функция стекловидной пластинки сохраняется и в постнатальном онтогенезе. Нарушения физиологической регенерации стекловидной пластинки приводят к развитию возрастной макулодистрофии и прорастанию сосудов в направлении сетчатки с образованием друз и даже прободанием пластинки пигментного эпителия. Loeffler K.U., McMenamin P.G. наблюдали в прилежащем к мембране Бруха пространстве

макрофагоподобные клетки, что согласуется с нашими данными о роли эффекторных иммунцитов в развитии структур глаза человека [9]. Процесс миграции нейроглиоцитов и их локальная дифференцировка и специализация в структурах глаза является иммуноиндуцированным процессом.

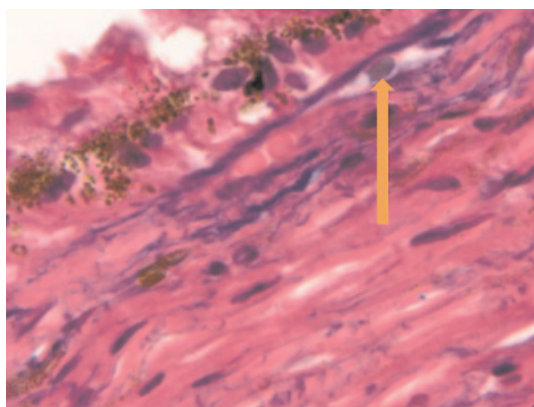
Правильные представления об источниках развития и физиологической регенерации стекловидной пластинки позволяют правильно трактовать механизмы патогенеза АМД и разработать патогенетически обоснованные профилактику и лечение этой патологии, ведущей к слепоте.



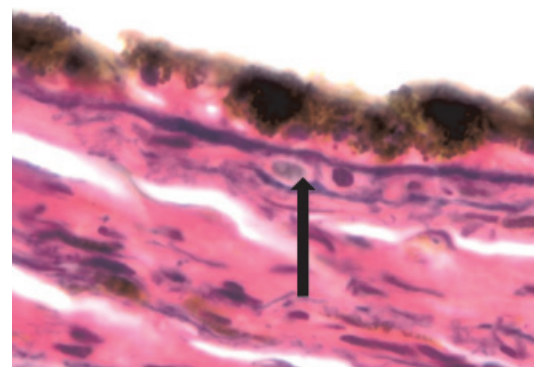
а



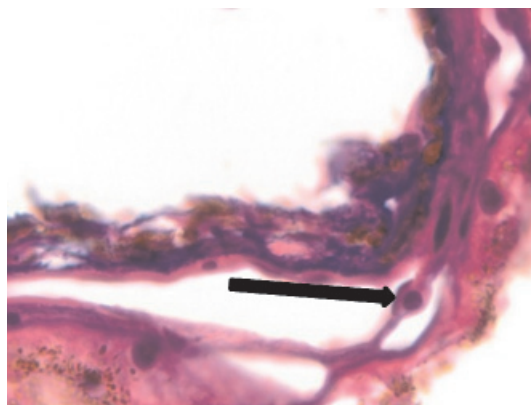
б



в



г



д

Глаз плода человека:

а – 8 недель; б – 10 недель; в – 14 недель; г, д – 16 недель.

Окраска а, в, г, д – гематоксилин-эозином; б – Victoria blue. Микрофото. Ув. x400

На современном этапе признана точка зрения, что мембрана Бруха – это тонкая пластинка, состоящая из двух слоев, служащая для фильтрации диффундирующих в сетчатку из хориокапиллярного слоя веществ. В действительности можно считать, что мембрана Бруха состоит только из трех внутренних слоев, поскольку наружные слои относятся к другим образованиям. Ряд исследователей мембрану Бруха рассматривают одновременно с сосудистой оболочкой. Гистогенетически мембрана Бруха одновременно относится как к сосудистой оболочке, так и сетчатой оболочке. При световой микроскопии ткань, лежащая между пигментным эпителием и хориокапиллярным слоем сосудистой оболочки, в постнатальном онтогенезе гомогенного строения, поэтому была названа Брухом стекловидной пластинкой (*lamina vitrea*), в последующем она получила название мембрана Бруха (*complexus (lamina) basalis (Bruch)*). При использовании более точных методов световой микроскопии в мембране Бруха выделены следующие части: наружная кутикулярная часть и более волокнистая – внутренняя часть. Поскольку внутренняя часть мембраны Бруха интенсивно окрашивается при применении методов, выявляющих эластическую ткань, ее назвали «*lamina elastica*». Особенности строения мембраны Бруха и ее толщины зависят как от локализации исследуемого участка, так и от возраста индивидуума. У взрослых толщина мембраны в перипапиллярной области равна 2–4 мкм, а в периферических – 1–2 мкм. У детей толщина ее в центральных участках равна 2 мкм. Ультраструктурные исследования позволили выделить в мембране Бруха пять слоев (зон): базальную мембрану пигментного эпителия, внутренний слой волокон (эластический), наружный коллагеновый слой, базальную мембрану клеток эндотелия хориокапилляров. Наиболее внутренний слой мембраны, представленный базальной мембраной пигментного эпителия сетчатки, имеет толщину приблизительно 0,3 мкм. Внутренняя коллагеновая зона (толщиной 1,5 мкм) состоит из плотно упакованных и строго ориентированных фибрилл коллагена (диаметр волокон – 60 нм, а периодичность исчерченности – 64 нм). Коллаген относится в основном к коллагену IV типа. Волокна погружены в основное вещество, состоящее преимущественно из протеогликанов. Средняя зона (эластический слой) имеет толщину 7 порядка 0,8 мкм, и в ней эластические волокна располагаются беспорядочно. Именно в этой зоне при старении и различных патологических состоя-

ниях отмечается накопление солей кальция и липидов. Наружная коллагеновая зона схожа по структуре с внутренней зоной. Единственным отличием является то, что она толще (0,7 мкм). Наиболее наружный слой мембраны Бруха, представленный базальной мембраной эндотелиальных клеток капилляров сосудистой оболочки, самый тонкий (0,14 мкм).

Собственные гены кодируют каждую из шести изоформ, $\alpha 1(IV)$ через $\alpha 6(IV)$, собирающиеся в одну из трех характерных *heterotrimers*. Болезнетворные мутации в каждом из шести генов у человека часто сопровождают разнообразную глазную патологию, которая охватывает общие врожденные и прогрессивно ведущие к слепоте заболевания, такие как гипоплазия зрительного нерва, глаукома и дегенерация сетчатки. Но до сих пор неизвестно, какие структуры в зоне контакта пигментного эпителия и хориокапиллярного слоя отвечают за выработку молекул коллагена IV типа, что необходимо для понимания топографии и сроков развития первичного патогенеза. Хотя известна примерная локализация изоформ коллагена IV в развитых человеческих глазах, пространственное и временное распределение IV типа коллагена на раннем этапе развития глаза человека до сих пор не установлено. Использование моноклональных антител помогло раскрыть системную локализацию всех шести изоформ коллагена IV типа в развивающихся глазах мыши. Было установлено, что $\alpha 1(IV)$ и $\alpha 2(IV)$ всегда солокализированы на протяжении всего пренатального онтогенеза. $\alpha 3(IV)$ и $\alpha 4(IV)$ также всегда солокализированы, но гораздо более пространственно, чем $\alpha 1(IV)$ и $\alpha 2(IV)$. $\alpha 5(IV)$ присутствует во всех сосудистых мембранах, но $\alpha 6(IV)$ не был обнаружен ни в базальной мембране эндотелия, ни в мембране Бруха, что свидетельствует о том, что $\alpha 5(IV)$ в мембране Бруха является частью $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ гетеротримера и относится к коллагенам, образующим сетеподобные структуры.

Понимание эффекторных клеточных источников секреции изоформ коллагена IV типа в развивающихся глазах будет способствовать более глубоким представлениям и пониманию механизмов, лежащих в основе глазных болезней, которые приводят к слепоте миллионы людей во всем мире.

В действительности можно считать, что мембрана Бруха состоит только из трех внутренних слоев, поскольку наружные слои относятся к другим образованиям.

Она очень плотно соединена с хориокапиллярным слоем хориоидеи, участвует

в регулировании поступления кислорода в сетчатку и продуктов обмена обратно в кровоток. С возрастом и при наличии предрасположенности может возникнуть нарушение функции комплекса структур: хориокапиллярный слой, мембрана Бруха и пигментный эпителий с развитием возрастной макулярной дегенерации. Некоторые авторы придерживаются точки зрения, что нарушение функции мембраны Бруха связано с накоплением в ней липидов и липопротеинов.

Наличие прогениторных клеток в раннем онтогенезе человека, отвечающих за морфогенез мембраны Бруха, может служить показателем перспективности применения нейроглиальных мигрантов из внутренней стенки глазного бокала для лечения возрастной макулодистрофии и диабетической ретинопатии.

Список литературы/References

1. Alan C. Bird. Therapeutic targets in age-related macular disease // *J Clin Invest.* 2010 September 1; 120(9): 3033–3041.
2. Bai X., Dilworth D.J., Weng Y.C., Gould D.B. Developmental distribution of collagen IV isoforms and relevance to ocular diseases // *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):194–201.
3. Byström B., Virtanen I., Rousselle P., Gullberg D., Pedrosa-Domelló F. Distribution of laminins in the developing human eye // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Mar;47(3):777–85.
4. Christine A. Curcio,1 Mark Johnson, 2 Martin Rudolf, 3,4 and Jiahn-Dar Huang. The oil spill in ageing Bruch membrane // *Br J Ophthalmol.* Author manuscript; available in PMC 2013 April 23. *Br J Ophthalmol.* 2011 December; 95(12): 1638–1645.
5. Cohen J., Bhullar S., Kasuga D., Boye S., Elhalis H., Kay C.N. Retinal Pigment Epithelial Detachment in ABCA4-Associated Stargardt's Disease // *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 2013 Jul 1;44(4):401–4.
6. Greiner J.V., Weidman T.A. Comparative histogenesis of Bruch's membrane (complexus basalis) // *Exp Eye Res.* 1991 Jul;53(1):47–54.
7. Fu J, Li FM. Embryonic development and structure of human Bruch's membrane // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 1989 Jan;25(1):18–9.
8. Kim Y.T., 1 S.W. Kang,2,* and K.H. Bai. Choroidal thickness in both eyes of patients with unilaterally active central serous chorioretinopathy // *Eye (Lond).* 2011 December; 25(12): 1635–1640.
9. Loeffler K.U., McMenamin P.G. Evaluation of subretinal macrophage-like cells in the human fetal eye // *st Ophthalmol Vis Sci.* 1990 Aug;31(8):1628–36.
10. Mario J. Isas, 1 Volker Luitl,2,3,4 Lincoln V. Johnson, 5 Rakez Kaye, 6 Ronald Wetzel, 7 Charles G. Glabe,8 Ralf Langen,1 and Jeannie Chen. Soluble and Mature Amyloid Fibrils in Drusen Deposits // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 March; 51(3): 1304–1310.
11. Miho Nozaki,*† Brian J. Raisler,*† Eiji Sakurai,*† J. Vidya Sarma,‡ Scott R. Barnum,§ John D. Lambris,¶ Yali Chen, Kang Zhang, Balamurali K. Ambati,** Judit Z. Baffi,*† and Jayakrishna Ambati. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 February 14; 103(7): 2328–2333.
12. Masashi Fujihara, a Emil Bartels, b Lars B. Nielsen,b,c and James T. Handa. A Human ApoB100 Transgenic Mouse expresses human ApoB100 in the RPE and develops features of early AMD // *Exp Eye Res.* 2009 June; 88(6): 1115–1123.
13. Murine Ccl2/Cx3cr1 Deficiency Results in Retinal Lesions Mimicking Human Age-Related Macular Degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Author manuscript; available in PMC 2007 November 1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 August; 48(8): 3827–3836.
14. Jingsheng Tuo,1 Christine M. Bojanowski,1,2 Min Zhou,1,2 Defen Shen,1,2 Robert J. Ross,1 Kevin I. Rosenberg,1 D. Joshua Cameron,3 Chunyue Yin,4 Jeffrey A. Kowalak,5 Zhengping Zhuang,4 Kang Zhang,3 and Chi-Chao Chan.
15. PILLI SUMAN, MD, ROBERT J. ZAWADZKI, PhD, JOHN S. WERNER, PhD, and SUSANNA S. PARK, MD, PhD. High-Resolution Fourier-Domain Optical Coherence Tomography Findings in Vitelliform Detachment Associated with Basal Lamina Drusen // *Retina.* 2011 April; 31(4): 812–814.
16. Ushma S. Neill. Napoleone Ferrara receives the 2010 Lasker-DeBakey Clinical Award for breakthroughs in angiogenesis research // *J Clin Invest.* 2010 October 1; 120(10): 3409–3412.
17. Sato R., Yasukawa T., Kacza J., Eichler W., Nishiwaki A., Iandiev I., Ohbayashi M., Kato A., Yafai Y., Bringmann A., Takase A., Ogura Y., Seeger J., Wiedemann P. Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Mar 11;54(3):1740–9.
18. Sugino I.K., Rapista A., Sun Q., Wang J., Nunes C.F., Cheewatrakoolpong N., Zarbin M.A. A method to enhance cell survival on Bruch's membrane in eyes affected by age and age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Dec 20;52(13):9598–609.
19. Tate D.J. Jr, Oliver P.D., Miceli M.V., Stern R., Shuster S., Newsome D.A. Age-dependent change in the hyaluronic acid content of the human chorioretinal complex // *Arch Ophthalmol.* 1993 Jul;111(7):963–7.
20. Sellheyer K., Spitznas M. The fine structure of the developing human choriocapillaris during the first trimester // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1988;226(1):65–74.
21. Sologub A.A. Role of Bruch's membrane in the process of metaplasia of the ocular pigmented epithelium of *Xenopus laevis* // *Ontogenez.* 1976;7(4):362–7.
22. Takei Y., Ozanics V. Origin and development of Bruch's membrane in monkey fetuses: an electron microscopic study // *Invest Ophthalmol.* 1975 Dec; 14(12):903–16.
23. Xianglin Yuan, Xiaorong Gu, John S. Crabb, Xiuzhen Yue, Karen Shadrach, Joe G. Hollyfield,‡§¶ and John W. Crabb Quantitative Proteomics: Comparison of the Macular Bruch Membrane/Choroid Complex from Age-related Macular Degeneration and Normal Eyes // *Mol Cell Proteomics.* 2010 June; 9(6): 1031–1046.
24. Yvonne B. D'Souza,1 Carolyn J.P. Jones,2 and Richard E. Bonshek. Comparison of lectin binding of drusen, RPE, Bruch's membrane, and photoreceptors // *Mol Vis.* 2009; 15: 906–911.

Рецензенты:

Храмова И.А., д.м.н., профессор, Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи, г. Владивосток;

Шульгина Л.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии, ФГУП ТИПРО-Центр, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 15.08.2013.