

КРОССЛИНКИНГ ПОСЛЕ ПЕРЕДНЕЙ ПОСЛОЙНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

© А. Б. Петухова, В. В. Нероев, Р. А. Гундорова, О. Г. Оганесян

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздравсоцразвития России

✧ Представлены данные экспериментального исследования влияния кросслинкинга (КЛ) на процессы рубцевания раны роговицы после передней послойной кератопластики. Описана гистоморфологическая картина после воздействия процедуры КЛ, выполненного непосредственно после выполнения передней послойной кератопластики.

✧ **Ключевые слова:** кросслинкинг; роговица; послойная кератопластика; хейз.

В настоящее время наряду с хирургическими технологиями, активно внедряются новые нехирургические методики лечения патологии роговицы, одним из которых является процедура кросслинкинга роговичного коллагена (КЛ). Методика основана на фотополимеризации стромальных волокон и образовании стабилизирующих химических связей, возникающих при комбинированном воздействии фотосенсибилизирующего вещества (рибофлавин, или витамин В₂) и светового излучения ультрафиолетового диапазона спектра. Фотополимеризация увеличивает упругость и прочность коллагена, повышая сопротивляемость роговицы кератэктазии. В результате фотополимеризации образуются новые дополнительные внутри- и межфибрилярные связи (поперечные сшивки), что изменяет прочность и устойчивость материала роговицы в целом.

Метод был предложен в 1999 году G. Wollensak и профессором T. Seiler [21] и его соавторами для лечения кератоконуса. Основной целью применения метода является приостановка прогрессии кератоконуса. Однако, в последнее время показания для применения кросслинкинга заметно расширились. Так, метод успешно используется для приостановки прогрессирования кератэктазии после ЛАСИКа, пеллюцидной маргинальной дистрофии, кератомалии различного генеза, а также в лечении буллезной кератопатии с болевым синдромом [13]. Еще в 1960-х годах было показано, что ультрафиолетовое излучение (УФ) в сочетании с рибофлавином инактивирует РНК вируса табачной мозаики [18]. В связи с этим, метод КЛ используется в лечении язв роговицы и бактериальных кератитов [14, 10]. Позже, было доказано, что подобный феномен проявляется и на других вирусах, бактериях и паразитах [8].

Влияние кросслинкинга на морфофункциональные изменения клеточного состава и коллаген-

нового каркаса разносторонне [12]. В литературе есть работы, изучающие процессы эпителизации после кросслинкинга роговицы, а также динамику изменений качественного и количественного состава клеток роговицы [19]. Установлено, что в зоне УФ облучения по причине цитотоксического действия и апоптоза, роговица лишается своего клеточного состава по всей толще, вплоть до эндотелия (в зоне облучения). Установлено, что репуляция клеток происходит в течение 4–6 недель после кросслинкинга. Также показано, что под влиянием кросслинкинга происходит увеличение диаметра коллагеновых фибрилл, причём это явление более выражено в передних слоях стромы [22]. Вместе с тем доказано, что после кросслинкинга роговицы, лимбальные и конъюнктивальные клетки, находящиеся вне зоны облучения, не претерпевают никаких изменений [20].

Как и для большинства медицинских процедур, кросслинкингу свойственны осложнения. В литературе есть сообщения о таких осложнениях как: кератомалия [6], кератопатия [11], повреждение эндотелия [17].

Механизмы восстановления ткани роговицы во многом такие же, как и в любом другом органе — это процесс регенерации. Тем не менее, роговица имеет уникальные анатомические, клеточно-молекулярные и функциональные особенности, которые обуславливают важные механические и функциональные различия. Установлено, что помутнение роговицы после повреждения стромы связано с дезорганизацией фиброзной ткани [9, 7, 5] и с отложением экстрацеллюлярного матрикса, что является причиной формирования хейза роговицы [2]. Однако последние исследования указывают на то, что хейз в большей степени обусловлен рассеянием света от фибробластов и миофибробластов зоны повреждения или восстановления. Хейз — это

Таблица 1

Разновидности хейза

Характеристика	Разновидность хейза	
По времени возникновения	Ранний — первые 14 суток после операции	Поздний — сроки свыше 3 месяцев
По характеру и локализации	Субэпителиальный экссудативный — формирование рыхлой отечной соединительной ткани (подобие грануляционной)	Субэпителиальный пролиферативный. Пролиферативный (фибропластический) процесс, направленный на восстановление утраченного объема стромальной ткани
По протяженности	• очаговый • центральный • парацентральный • тотальный	
Патогистологическая картина	Структурно-пространственные нарушения коллагенового каркаса, межпластинчатый отёк располагающихся под гиперплазированным эпителием	Миграция и пролиферация активированных кератоцитов в зависимости от объема абляции стромальной ткани
Исход	Постепенный самопроизвольный регресс	Стойкий, требующий медикаментозного лечения

субэпителиальное помутнение роговицы различной локализации и продолжительности по времени, возникающее после эксимерлазерной фотоабляции или выполнения ламеллярной кератопластики [3, 4].

Ещё одним свидетельством в поддержку клеточных механизмов возникновения хейза является его флюктуация, наблюдающаяся у пациентов на протяжении долгого времени, что не может быть объяснено простыми фибролитическими механизмами. Таким образом, кросслинкинг, оказывая влияние как на клеточный, так и на внеклеточный состав стромы, может влиять на интенсивность и профилактику формирования хейза.

Морфогистологическая картина хейза в строме роговицы после хирургических вмешательств дает возможность предположить, что процедура КЛ может влиять на это осложнение, устраняя или предотвращая его.

Целью работы является изучение влияния кросслинкинга на процессы рубцевания раны роговицы после передней послойной кератопластики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились 20 кроликов породы шиншилла в возрасте 3 месяцев, весом не более 2 кг, серо-черной окраски.

Правые глаза кроликов были опытными, левые — контрольными. В данной серии экспериментальной работы, на всех 40 глазах 20 животных, в качестве модели была выполнена передняя послойная аутокератопластика диаметром 6,0 мм.

В 10 случаях сразу после наложения швов, на правых глазах кроликов была выполнена процедура кросслинкинга по стандартной методике (группа Iod).

В остальных 10 случаях кросслинкинг на правых глазах был проведен после введения «Декстралинка» под кератотрансплантат (группа IIod).

Левые глаза животных, являясь контрольными, процедуре кросслинкинга не подвергались (Группы Ios и IIos).

Техника операции и процедуры кросслинкинга.

Экспериментальное исследование проведено с соблюдением международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [1].

Хирургическое вмешательство осуществлялось стерильным инструментарием в условиях стерильного операционного поля под общей анестезией, которую осуществляли путем внутримышечного введения раствора кетамина гидрохлорида из расчета 30 мг на 1 кг веса и раствора рометара из расчета 0,2 мл на 1 кг веса. Дополнительно анестезию слизистой глазного яблока достигали инстилляцией раствора анестетика (0,5 % Алкаина) в ходе операции. После двукратной инстилляцией антибиотика (Офтаквикс) на веки накладывался векорасширитель. В оптическом центре вакуумным трепаном 6,0 мм выполнялась циркулярная кератомическая насечка на глубину около 250 мкм, что соответствует одному полному обороту (360 град) от центральной толщины роговицы кролика ($\sim 400 \pm 20$ мкм). Ножом для расслаивания стромы роговицы выкраивали стромальный диск в пределах насечки 6,0 мм. После этого, рану ушивали восьмью узловыми швами (нейлон 10—00), с погружением узлов в рану. Хирургический этап завершали субконъюнктивальной инъекцией 1,0 мг раствора дексаметазона и 10,0 мг раствора гентамицина. Затем все правые глаза подвергались процедуре КЛ, а левые — нет. По окончании манипуляций в конъюнктивальную полость всех правых и левых глаз закладывали мазь (антибиотика).

Все правые глаза кроликов (группа Iod) подвергались процедуре кросслинкинга по стандартной

методике, но без удаления эпителия, аппаратом UV-X (IROC AG, Швейцария), с использованием стерильного раствора 0,1 % рибофлавина с декстраном и изотоническим раствором в виде готового препарата «Декстралинк».

Процедуру кросслинкинга роговичного коллагена выполняли при следующих характеристиках: длина волны 370 нм, при интенсивности освещения <5 мВт/см². Зона облучения составляла 6,0 мм. Экспозиция 25–30 минут. Инстилляций «Декстралинка» проводились каждые 2 минуты.

Аналогичной процедуре были подвергнуты 10 правых глаз остальных кроликов (группа Iod), но в этой группе «Декстралинк» вводили непосредственно под стромальный диск роговицы, который предварительно был фиксирован в операционном ложе.

В послеоперационном периоде осуществлялись двукратные ежедневные инстилляций в оба глаза животных растворов антисептиков и кортикостероидов вплоть до удаления швов и ещё 3 дня. Швы удаляли на 30 суток после их наложения, в условиях стерильного операционного поля, под местной инстилляционной анестезией.

Осмотры осуществляли в первые две недели ежедневно, далее один раз в неделю. Использовали методики бокового и фокального освещения, при необходимости биомикроскопию, в сочетании с фоторегистрацией в динамике.

Спустя 6 месяцев после кератопластики, кролики были выведены из эксперимента под общей анестезией путем воздушной тромбоэмболии.

Энуклеированные глаза животных фиксировались в холодном растворе 2 % раствора глутаральдегида на фосфатном буфере (pH = 7,2). Вырезанные фрагменты роговицы размерами $1,5 \times 1,5$ см из зоны очага дофиксировали в течение 2 часов в 1 % растворе осмиевой кислоты (OsO₄). Далее образцы обезжизняли в спиртах восходящей концентрации, ацетоне и заключали в смолу (смесь эпон-аралдит — фирма SPIsupplier, USA). Полутонкие срезы (толщиной 1–1,5 мкм) готовили на ультратоме Nova (LKB, Швеция) окрашивали полихромным красителем (метиленовый синий + фуксин) и исследовали на «Фотомикроскопе III» (Ortop, Германия). Фоторегистрацию и морфометрический анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения фирмы «Мекос».

РЕЗУЛЬТАТЫ

На препаратах группы Iod (6 мес. после передней послойной кератопластики и КЛ) область сформировавшегося нежного перилимбального стромального рубца на всем протяжении была

покрыта слоем гиперплазированного переднего эпителием (рис. 1–2), отличающимся увеличенным количеством слоев клеток, нередко увеличенных в размерах (рис. 1–2). Причём поверхностные клетки, включая десквамированные, вместо плоской формы имели кубическую форму. Клетки базального слоя наоборот, имели более вытянутую форму с частыми фигурами митоза. Визуализируется оптимальная конгруэнтность между кератотрансплантатом и ложем без хейза (рис. 1–2). Под эпителием в поверхностной строме (примерно в верхней 1/3 толщины) наблюдали локальную активацию и пролиферацию кератоцитов (с появлением молодых клеток с округлыми или овальными ядрами). В проекции швов отмечается увеличение числа кератоцитов (рис. 1–2). В более глубоких стромальных слоях коллагеновые фибриллы ориентированы под острым углом друг к другу около 30 градусов. Десцеметова оболочка и задний эпителий сохраняли свое нормальное гистологическое строение (рис. 1–2).

В контрольной группе Ios (6 мес. после ранения без КЛ) также происходила заместительная гиперплазия переднего эпителия (рис. 3–4). В проекции прежних швов в строме более выраженный процесс рубцевания, что проявляется увеличением плотности кератоцитов, то есть гипертрофия кератоцитов. Отмечается отёк створки операционного ложа, прилежащего к кератотрансплантату. Не наблюдается конгруэнтности поверхности кератотрансплантата и операционного ложа, что характеризует нарушение архитектоники стромы роговицы. Как и в группе Iod, десцеметова оболочка и эндотелий оставались неизменными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют говорить о положительном воздействии КЛ на адаптацию кератотрансплантата в интрастромальном ложе роговицы:

1. КЛ служит средством профилактики формирования хейза, за счет активации кератогенеза и достижения конгруэнтности трансплантата и ложа.
2. КЛ способствует формированию правильной геометрии каркаса стромы роговицы и, как следствие, возможно, предупреждает развитие послеоперационного астигматизма.
3. Можно предположить, что КЛ способствует сокращению сроков реабилитации после ламеллярной кератопластики.

Представляется что, дальнейшее изучение влияние КЛ на регенеративные процессы роговицы

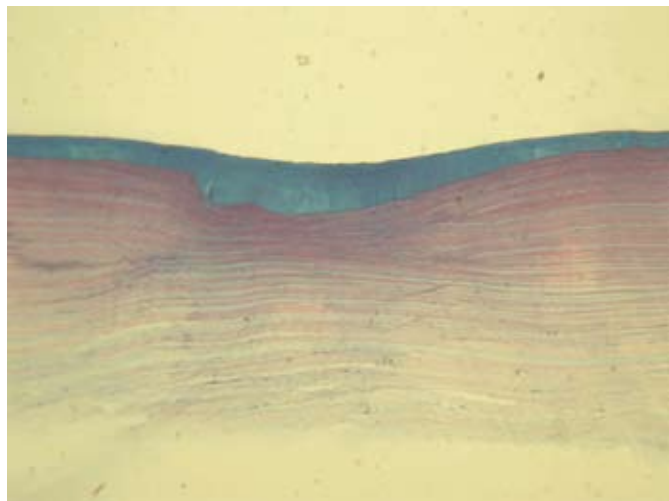


Рис. 1. Фото препарата группы Iod (6 мес. после ранения с КЛ) область сформировавшегося нежного перилимбального стромального рубца представлена гиперплазированным передним эпителием, клетки увеличены в размерах, поверхностные клетки, имеют кубическую форму, клетки базального слоя имеют вытянутую форму. Десцеметова оболочка и задний эпителий сохраняли свое нормальное гистологическое строение. $\times 250$

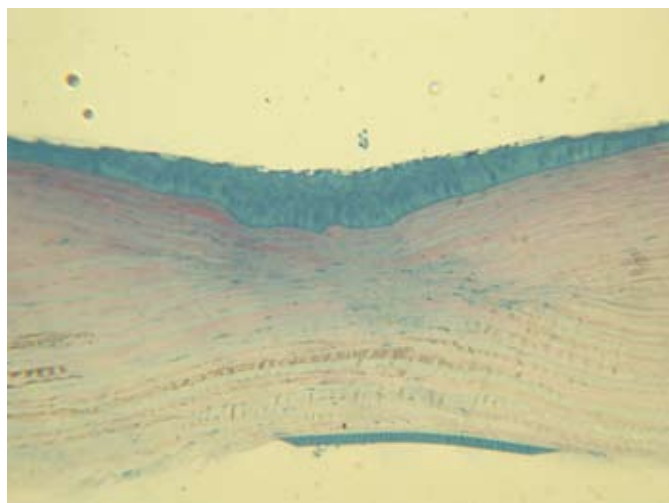


Рис. 3. Фото препарата группы Ios (6 мес. после ранения без КЛ) заместительная гиперплазия переднего эпителия: гипертрофия кератоцитов, нарушение архитектоники стромы роговицы, десцеметова оболочка и эндотелий интактны. $\times 250$

после кератопластики является перспективным и целесобразным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гоглова О. О., Богомолов А. Ф. Этика работы с экспериментальными животными // Медицинское право и этика. — 2003. — С. 4.
2. Левкоева Э. Ф. К вопросу о роли избыточной регенерации в заживлении ран глаза // Офтальмол. журн. — 1951. — № 4. — С. 186–190.
3. Федоров А. А., Куренков В. В., Каспаров А. А., Полуниин Г. С. Патоморфологическая характеристика субэпителиального флора

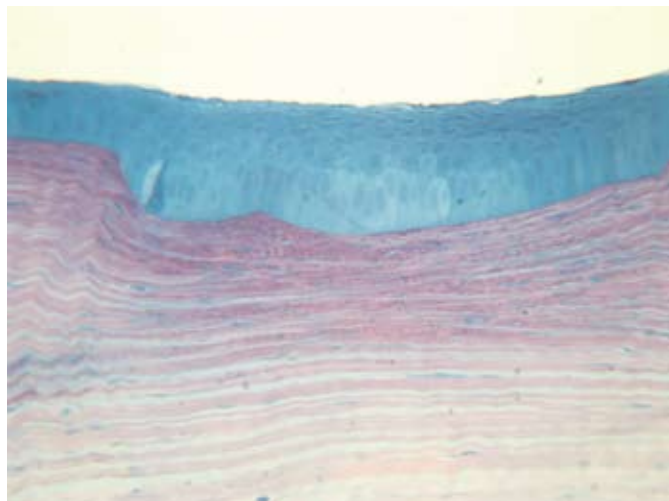


Рис. 2. Фото препарата группы Iod (6 мес. после ранения с КЛ) коллагеновые фибриллы в стромальных слоях ориентированы под острым углом друг к другу около 30 градусов. $\times 350$



Рис. 4. Фото препарата группы Ios (6 мес. после ранения без КЛ) в проекции прежних швов в строме наблюдается процесс рубцевания. $\times 350$

роговицы после фоторефракционной кератэктомии // Вестник офтальмологии. — 1999. — № 5. — С. 26–28.

4. Федоров А. А., Куренков В. В., Каспаров А. А., Полуниин Г. С. Морфологическое исследование локальных субэпителиальных помутнений роговицы после фоторефракционной кератэктомии // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2001. — Т. 1 (№ 1). — С. 21–28.
5. Хорошилова-Маслова И. П. Травматическое поражение глаз // Многоотомное руководство по патологической анатомии. Т. 1. — М.: Медгиз, 1963. — С. 575–589.
6. Cardo L. J., Rentas F. J., Ketchum L. et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light // Vox Sang. — 2006. — Vol. 90. — P. 85–91.
7. Cintron C., Schneider H., Kublin C. Corneal scar formation // Exp. Eye. Res. — 1973. — Vol. 17. — P. 251–259.

8. Corbin F. III. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer // *Int. J. Hematol.* — 2002. — Vol. 76, Suppl 2. — P. 253–257
9. Fini M. E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea // *Prog. Retin. Eye. Res.* — 1999. — Vol. 18. — P. 529–551.
10. Galperin G., Berra M., Tau Ju. et al. Treatment of Fungal Keratitis From Fusarium Infection by Corneal Cross-Linking // *Cornea.* — 2012. — Vol. 31, N 2. — P.176–180.
11. Gokhale N. S., Vemuganti G. K. Diclofenac-induced Acute Corneal Melt After Collagen Crosslinking for Keratoconus // *Cornea.* January 2010. — Vol. 29, N 1. — P. 117–119.
12. Greenstein S. A., Fry K. L., Hersh P. S. In Vivo Biomechanical Changes After Corneal Collagen Cross-linking for Keratoconus and Corneal Ectasia. 1-Year Analysis of a Randomized, Controlled, Clinical Trial // *Cornea.* — 2012. — Vol. 31, N 1. — P. 21–25.
13. Kozobolis V., Labiris G., Gkika M. et al. UV-A Collagen Cross-Linking Treatment of Bullous Keratopathy Combined With Corneal Ulcer // *Cornea.* — 2010. — Vol. 29, N 2. — P. 235–238.
14. Makdoui K., Mortensen J., Crafoord S. Infectious Keratitis Treated With Corneal Crosslinking // *Cornea.* — 2010. — Vol. 29, N 12. — P. 1353–1358.
15. Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze // *Exp. Eye Res.* — 2004. — Vol. 78. — P. 553–560.
16. Moller-Pedersen T., Li H. F., Petroll W. M. et al. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1998. — Vol. 39. — P. 487–501.
17. Rodriguez-Ausin P., Gutiérrez-Ortega R., Arance-Gil Á. et al. Keratopathy After Cross-linking for Keratoconus // *Cornea.* — 2011. — Vol. 30, N 9. — P.1051–1053.
18. Tsugita A., Okada Y., Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1965. — Vol. 103. — P. 360–363.
19. Wollensak G., Iomdina E., Dittert D.-D., Herbst H. Wound Healing in the Rabbit Cornea After Corneal Collagen Cross-Linking With Riboflavin and UVA // *Cornea.* — 2007. — Vol. 26, N 5. — P. 600–605.
20. Wollensak G., Mazzotta C., Kalinski T., Sel S. Limbal and Conjunctival Epithelium After Corneal Cross-linking Using Riboflavin and UVA // *Cornea.* — 2011. — Vol. 30, N 12. — P. 1448–1454.
21. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *Am. J. Ophthalmol.* — 2003. — Vol. 135, N 5. — P. 620–627.
22. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea After Collagen Crosslinking by Riboflavin/UVA // *Cornea.* — 2004. — Vol. 23, N 5. — P. 503–507.

CROSSLINKING AFTER ANTERIOR LAMELLAR KERATOPLASTY (EXPERIMENTAL STUDY)

*Petukhova A. B., Neroev V. V.,
Gundorova R. A., Oganessian O. G.*

✧ **Summary.** Experimental study data are presented on crosslinking (CL) influence on corneal wound healing processes after anterior lamellar keratoplasty. The histomorphological picture after crosslinking procedure performed immediately after anterior lamellar keratoplasty is described.

✧ **Key words:** crosslinking; cornea; lamellar keratoplasty; haze.

Сведения об авторах:

Петухова Анастасия Борисовна — аспирант.
ФГУ МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца.
105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская 14/19.
E-mail: igb.ru@mail.ru.

Нероев Владимир Владимирович — главный офтальмолог
Минсоцздрава РФ, директор ФГУ МНИИ ГБ им. Гельмгольца,
профессор.
ФГУ МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца.
105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская 14/19.
E-mail: igb.ru@mail.ru.

Гундорова Роза Александровна — руководитель отдела травматологии, реконструктивной, пластической хирургии и глазного протезирования.
ФГУ МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца.
105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская 14/19.
E-mail: igb.ru@mail.ru.

Оганесян Оганес Георгиевич — старший научный сотрудник,
к. м. н. ФГУ МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца.
105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская 14/19.
E-mail: oftalmolog@mail.ru.

Petukhova Anastasiya Borisovna — aspirant.
Moscow Helmholtz Eye Research Institute.
105062, Moscow, Sadovaya-Chernogriazskaya 14/19.
E-mail: igb.ru@mail.ru.

Neroev Vladimir Vladimirovich — chief ophthalmologist of the
Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation.
Moscow Helmholtz Eye Research Institute.
105062, Moscow, Sadovaya-Chernogriazskaya 14/19.
E-mail: igb.ru@mail.ru.

Gundorova Rosa Alexandrovna — MD, PhD, head of ophthalmotraumatology department.
Moscow Helmholtz Eye Research Institute.
105062, Moscow, Sadovaya-Chernogriazskaya 14/19.
E-mail: igb.ru@mail.ru.

Oganessian Oganegs Georgievich — MD, PhD.
Moscow Helmholtz Eye Research Institute.
105062, Moscow, Sadovaya-Chernogriazskaya 14/19.
E-mail: oftalmolog@mail.ru.