



В.В. НЕРОЕВ, А.Б. ПЕТУХОВА, Р.А. ГУНДОРОВА, О.Г. ОГАНЕСЯН
Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ

УДК 617.713

Влияние кросслинкинга на заживление экспериментальных хирургических ранений роговицы

Петухова Анастасия Борисовна

аспирант отдела травм органа зрения и глазного протезирования

117447, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, 9-2-13, тел. 8-916-804-86-40, e-mail: Petuhova-a-b@mail.ru

Представлены данные клинко-лабораторного экспериментального исследования влияния кросслинкинга на раневой процесс роговицы. Описана гистоморфологическая картина непроникающих ранений роговицы после воздействия процедуры кросслинкинга роговичного коллагена на рану роговицы в 1-е или 7-е сутки.

Ключевые слова: роговица, раневой процесс, кросслиндинг.

V.V. NEROEV, A.B. PETUKHOVA, R.A. GUNDOROVA, O.G. OGANESYAN
Helmholtz's Research Institute of Eye Diseases MH of RF, Moscow

Cross-linking effect on experimental surgical corneal wounds healing

Results of clinical and laboratory experimental research of cross-linking effect on corneal traumatic process is described. Histological and morphological aspects of nonpenetrating corneal injuries after corneal collagen cross-linking exposure on corneal wound in 1st and 7th day after trauma are performed.

Keywords: cornea, traumatic process, cross-linking.

ЦВЕТНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ НА СТР. 327

Метод роговичного кросслинкинга, разработанный G. Wollensak с соавт. [1] как способ лечения кератоконуса, в настоящее время занимает основное место среди нехирургических способов лечения кератэктазий различного генеза [2]. Механизм кросслинкинга основан на повышении продукции короткоживущих свободных радикалов кислорода под воздействием низкоинтенсивного ультрафиолетового света на строму роговицы в присутствии фоточувствительной субстанции (рибофлавина). В свою очередь высвободившиеся радикалы кислорода вызывают образование дополнительных поперечных связей между коллагеновыми фибриллами стромы роговицы, повышая ее прочность, ригидность и биомеханическую стабильность.

Влияние кросслинкинга на морфофункциональные изменения клеточного состава и коллагенового каркаса разнонаправлено [3]. В литературе есть работы, изучающие процессы эпителизации после кросслинкинга роговицы, а также динамику изменений качественного и количественного состава клеток роговицы [4]. Установлено, что в зоне УФ-облучения по при-

чине цитотоксического действия и апоптоза роговица лишается своего клеточного состава по всей толщине, вплоть до эндотелия (в зоне облучения). Показано, что репопуляция клеток происходит в течение 4–6 недель после кросслинкинга. Также показано, что под влиянием кросслинкинга происходит увеличение диаметра коллагеновых фибрилл, причем более выражено в передних слоях стромы [5]. Вместе с тем доказано, что после кросслинкинга роговицы лимбальные и конъюнктивальные клетки, находящиеся вне зоны облучения, не претерпевают никаких изменений [6].

В настоящее время показания к кросслинкингу существенно расширяются. Методику, в качестве паллиативной, применяют при буллезной кератопатии [7] и язвенных поражениях роговицы, в том числе инфекционного характера [8, 9]. Последнее обстоятельство связано с тем, что еще в 1960-х годах было показано, что ультрафиолет в сочетании с рибофлавином инактивирует РНК вируса табачной мозаики [10]. Позже, было доказано, что подобный феномен проявляется и на других

вирусах, бактериях и паразитах [11]. В то же время, как и для большинства медицинских процедур, кросслинkinгу свойственны осложнения — кератомалация [12], кератопатия [13], повреждение эндотелия [14]. Изучение возможности расширения сферы применения кросслинkinга, представляющего собой эффективный нехирургический метод лечения патологий роговицы, является актуальным.

Целью работы является экспериментальное изучение влияния кросслинkinга на образование и реорганизацию рубца в различные сроки раневого процесса в строме роговицы.

Материал и методы

Объектом исследования явились 20 кроликов породы шиншлла возраста 3 мес., весом не более 2 кг, серо-черной окраски.

Правые глаза кроликов были опытными, левые — контрольными. В первой (данной) серии экспериментальной работы, на всех 40 глазах 20 животных, в качестве модели механического повреждения роговицы и раневого процесса было выбрано центральное непроникающее (несквозное) ранение роговицы длиной 5 мм и глубиной 300 мкм, незамедлительно ушитое посередине одним X-образным швом (нить нейлон, 10-00) с погружением узла в рану. Стандартизация длины разреза осуществлялась микрохирургическим циркулем, а глубины — использованием алмазного ножа с микрометром.

В 10 случаях сразу после наложения шва на правых глазах кроликов была выполнена процедура кросслинkinга (группа Iod). В остальных 10 случаях кросслинkinг на правых глазах был проведен на 7 суток после ранения и ушивания роговицы (группа IIod). Левые глаза животных, являясь контрольными, процедуре кросслинkinга не подвергались (группы Ios и IIos).

Экспериментальное исследование проведено с соблюдением международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [15].

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. Анестезию слизистой глазного яблока достигали инстилляцией 0,5% раствора Алкаина в ходе операции. В условиях стерильного операционного поля, после инстилляций офтаквикса в конъюнктивальную полость накладывался векорасширитель. В оптическом центре циркулем Кастровьево на эпителии отмечались границы планируемого разреза длиной 5,0 мм. Алмазным ножом с микрометром, осуществлялся непроникающий в переднюю камеру линейный разрез глубиной 300 мкм строго в пределах разметки и перпендикулярно поверхности роговицы. После этого рану ушивали X образным швом нейлоновой нитью 10-00, с погружением узла в рану. Хирургический этап завершали субконъюнктивальной инъекцией 1,0 мг раствора дексаметазона и 10,0 мг раствора гентамицина. В конъюнктивальную полость всех левых глаз (группы Ios и IIos) и 10 правых глаз (IIod) закладывали мазь флоксал.

Остальные 10 правых глаз кроликов (группа Iod) подвергались процедуре кросслинkinга аппаратом UV-X (IROC AG, Швейцария) с использованием стерильного раствора 0,1% рибофлавина с декстраном и изотоническим раствором в виде готового препарата «Декстралинк» (ГУ «Уфимский НИИ ГБ» АН РБ).

Процедуру кросслинkinга роговичного коллагена выполняли при следующих характеристиках: длина волны 370 нм, интенсивность освещения <5 мВт/см². Зона облучения составляла

6,0 мм. Экспозиция 25-30 минут. Инстилляцией «Декстралинка» проводились каждые 2 минуты.

Аналогичной процедуре были подвергнуты 10 правых глаз остальных кроликов (группа IIod), но на 7-е сутки после ранения и ушивания роговицы.

В послеоперационном периоде осуществлялись двукратные ежедневные инстилляцией в оба глаза животных растворов антисептиков и кортикостероидов вплоть до удаления швов и еще 3 дня. Швы удаляли на 14-е сутки 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 (Canon IXUS 7,0). Спустя 6 месяцев после экспериментального ранения роговицы кролики были выведены из эксперимента под общей анестезией (аналогичной вышеописанной) путем воздушной тромбоземболии.

Энуклеированные глаза животных фиксировали в холодном 2%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН=7.2). Вырезанные фрагменты роговицы размерами 1,5x1,5 см из зоны очага дофиксировали в течение 2 часов в 1%-ном растворе осмиевой кислоты (OsO₄). Далее образцы обезжировали 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» (Opton, Германия). Фотрегистрацию на цифровую фотовидеокамеру и морфометрический анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения фирмы «Мекос».

Результаты

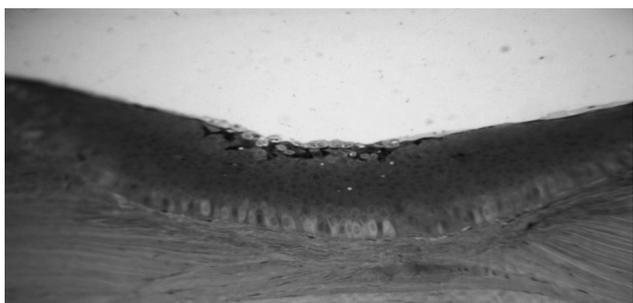
На препаратах группы Iod (6 мес. после ранения и КЛ) область сформировавшегося нежного стромального рубца на всем протяжении была покрыта слоем гиперплазированного переднего эпителием, отличающимся увеличенным количеством слоев клеток, нередко увеличенных в размерах. (рис. 1а) Причем поверхностные клетки, включая десквамированные, вместо плоской формы имели кубическую форму. Клетки базального слоя наоборот имели более вытянутую форму с частыми фигурами митоза. (рис. 1б) Причем заместительная гиперплазия была направлена в основном в сторону дефекта стромы, заполняя его. Под эпителием, в поверхностной 1/3 стромы роговицы, наблюдали локальную активацию и пролиферацию кератоцитов с появлением молодых клеток с округлыми или овальными ядрами, которые постепенно восполняли объем «утраченной» стромы. На более поздних сроках в результате дифференцировки молодых кератоцитов фиброцеллюлярная ткань преобразуется в полноценную строму с нормальными оптическими свойствами. Более глубокие стромальные слои роговицы, десцеметова мембрана и задний эпителий сохраняли свое нормальное гистологическое строение. (рис. 1в)

В контрольной группе Ios (6 мес. после ранения без КЛ) также происходила заместительная гиперплазия переднего эпителиа. (рис. 2а). При этом субэпителиальная область фиброцеллюлярной пролиферации отличалась большим объемом, пирамидальной формой и более высокой плотностью клеточных элементов. Как и в группе Iod, десцеметова оболочка и эндотелий оставались неизменными. В отличие от группы Iod, рубцовая ткань формировалась более плотная и менее прозрачная, что требовало более длительный период ее трансформации в обычную стромальную ткань.

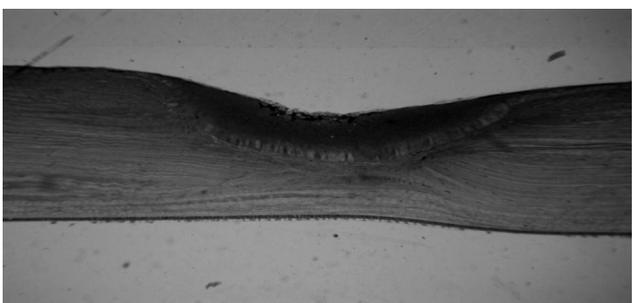
В случае выполнения кросслинкинга на 7-е сутки после ранения в условиях восстановленного эпителиального слоя (гр. II od) влияние кросслинкинга становится менее выраженным, по сравнению с гр. Iod, однако, несмотря на наличие эпителиальной фасетки в месте ранения, морфологическая картина соответствовала активации кератогенеза.

Рисунок 1.

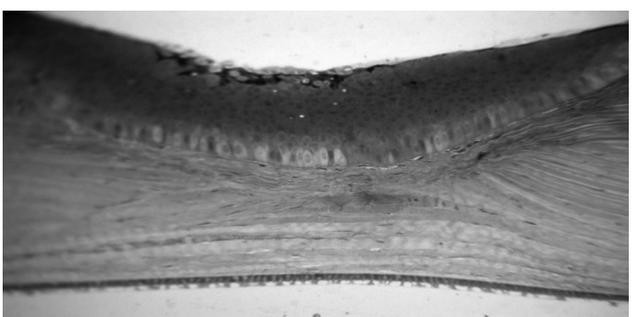
Гистологический срез роговицы кролика из группы Iod с кросслинкингом, выполненным сразу после ушивания раны:



а — ОКРАШИВАНИЕ X250: углубление в месте раны, которое не полностью заполнено гиперплазированным эпителием; фасетка, в которой визуализируется переход от нормального эпителия к гиперплазированному эпителию; в поверхностном слое клетки имеют цилиндрическую форму, находятся в стадии десквамации; клетки базального слоя более вытянуты, наблюдается компенсаторное деление эпителия в условиях дефекта стромы;



б — под базальным слоем эпителия наблюдается поверхностная активация кератоцитов в прилежащей строме, которые по своей форме напоминают фибробласты, эндотелий не изменен. ОКРАШИВАНИЕ (метиленовый синий+фуксин) УВЕЛИЧЕНИЕ X125;

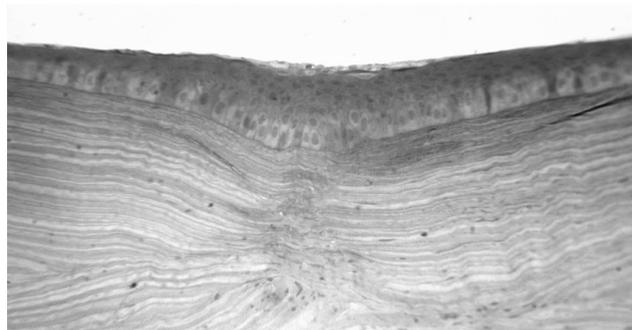


в — строма состоит из фиброцеллюлярной ткани, клеточные компоненты преобладают над фибробластами; наблюдается пролиферация с целью восстановления де-

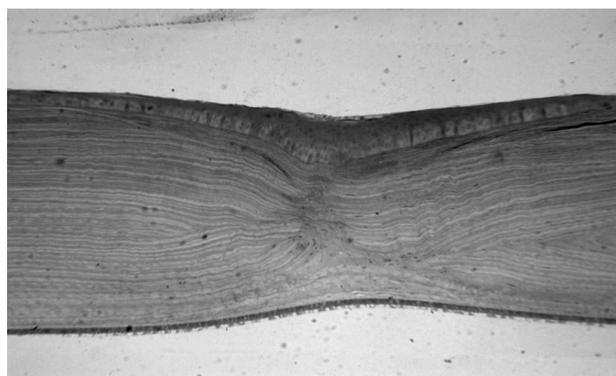
фекта стромы; десцеметова оболочка и эндотелий интактны. ОКРАШИВАНИЕ (метиленовый синий+фуксин) X250

Рисунок 2.

Гистологический срез роговицы кролика из группы Iod без кросслинкинга:



а — визуализируется гиперплазия переднего эпителия по заместительному типу; в строме имеется участок, идущий перпендикулярно эпителию, который имеет повышенную плотность кератобластов. ОКРАШИВАНИЕ (метиленовый синий+фуксин) X300;



б — четко визуализируется рубцовая ткань в виде пирамиды, основание которой обращено к заднему эпителию. ОКРАШИВАНИЕ X125 (метиленовый синий+фуксин)

В группах Ios и Ilos никаких морфологических отличий не выявлено. При сравнении между собой экспериментальных групп Iod и IIod выявленные морфологические отличия характеризуются замедленной активацией кератогенеза в группе IIod. Основные отличия морфологических результатов представлены в таблице 1.

Обсуждение

У млекопитающих заживление ранений, как правило, происходит путем заполнения раневого канала фиброзной тканью. Такое восстановление, как правило, способствует сохранению органа, но не его функций. Кроме того, такой процесс часто приводит к чрезмерному рубцеванию и контрактуре [16], что в офтальмологии проявляется деформирующими рубцами, пролиферативной витреоретинопатией, тракционной отслойкой сетчатки и другой патологией. В роговице фиброзное восстановление представляет особую проблему [17], так как приводит к снижению зрения не только по причине формирования непрозрачной рубцовой ткани, но также из-за нарушения сферичности роговицы. В настоящее время в связи со значи-

Таблица 1.
Основные отличия гистологических результатов в группах Iod, IIod, и I-Ilos

Группа Iod	Группа IIod	Группа Ios/Ilos
Фасетка максимально выражена и глубже	Степень гиперплазии эпителия менее выражена	Фасетка менее выражена, менее глубокая по типу гипертрофии
В строме плотная фиброцеллюлярная ткань	В строме более рыхлая и менее объемная фиброцеллюлярная ткань	Небольшая пролиферация в виде наличия кератобластов
Тип регенерации в виде фибропластической пролиферации (haze)	По типу более нежного и прозрачного рубца	Репаративный тип регенерации

тельным ростом «популярности» офтальмологических операций, минимизирующих рефракционные изменения роговицы (факоэмульсификация, ламеллярная хирургия, фемтолазерные технологии) поиск механизмов и путей восстановления поврежденной роговицы с минимизацией негативных последствий приобретает особое значение.

Возможность влияния на репаративные процессы с восстановлением целостности, прозрачности роговицы и образованием тонкого и нежного рубца путем использования кросслинкинга представляется нам актуальным и перспективным направлением в офтальмотравматологии. Возможность исключения формирования или минимизации интенсивности хейза после ламеллярной кератопластики, снижение интенсивности помутнения рубцовой ткани и ее астигматизмогенности после приносящих ранений роговицы, а также поиск новых показаний к применению кросслинкинга являются сферой наших интересов.

Механизмы восстановления ткани роговицы во многом такие же, как и в любом другом органе. Тем не менее роговица имеет уникальные анатомические, клеточно-молекулярные и функциональные особенности, которые обуславливают важные механистические и функциональные различия. Установлено, что помутнение роговицы после стромального повреждения связано с дезорганизацией фиброзной ткани [18-20] и с отложением экстрацеллюлярного матрикса, что является причиной формирования хейза роговицы [21]. Однако последние исследования указывают на то, что хейз в большей степени обусловлен рассеянием света от фибробластов и миофибробластов зоны повреждения/восстановления [23].

Еще одним свидетельством в поддержку клеточных механизмов возникновения хейза является флюктуация хейза наблюдающаяся у пациентов на протяжении долгого времени, что не может быть объяснено простыми фибротическими механизмами. Таким образом, кросслиндинг оказывает влияние как на клеточный так и на внеклеточный состав стромы может влиять на интенсивность и (не)формирование хейза.

Ультрафиолетовое облучение роговицы, приводит к гибели кератоцитов, в том числе без использования фотосенсибилизирующего агента (рибофлавин) [24]. В то же время клиническое значение массивной потери кератоцитов не совсем понятно потому, что их потеря может легко компенсироваться миграцией из соседних участков. Есть сообщения, что потеря кератоцитов после LASIK [25] и ФПК провоцируют хейз [26]. Однако ни наш клинический опыт (неопубликованные данные) ни литературные данные не указывают на потерю прозрачности роговицы после кросслинкинга, что также подтверждают другие авторы [27, 28].

Заключение

Полученные нами морфологические результаты в данной серии эксперимента свидетельствуют о влиянии кросслинкинга на раневую процесс. В указанные сроки использованной экспе-

риментальной модели это влияние осуществляется в зоне воздействия на весь клеточный и внеклеточный состав роговицы за исключением десцеметовой мембраны эндотелия. Эксперимент показал, что влияние кросслинкинга характеризуется:

1. Клетки базального слоя имеют более вытянутую форму с частыми фигурами митоза.

2. В строме роговицы (примерно в верхней его 1/3) наблюдалась локальная активация кератогенеза в виде появления молодых клеток с округлыми или овальными ядрами, которые постепенно восполняли объем «утерянной» стромы.

3. В результате дифференцировки молодых кератоцитов фиброцеллюлярная ткань преобразуется в полноценную строму с нормальными оптическими свойствами (в сроки наблюдения 6 мес.)

Таким образом, с целью определения клинических перспектив дальнейшее изучение влияния кросслинкинга на раневую процесс в различные сроки, в том числе с использованием других экспериментальных моделей оправдано.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *Am. J. Ophthalmol.* — 2003. — V. 135, N 5. — P. 620-627.
2. Snibson G.R. Collagen crosslinking: a new treatment paradigm in corneal disease — a review // *Clin Exp Ophthalmol.* — 2010. — V. 38. — P. 141-153.
3. Greenstein Steven A., Fry Kristen L., Hersh Peter 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. — V. 31, N 1. — P. 21-25.
4. Wollensak G., Iomdina E., Dittert D.D. Wound Healing in the Rabbit Cornea After Corneal Collagen Cross-Linking With Riboflavin and UVA // *Cornea.* — 2007. — V. 26, N 5. — P. 600-605.
5. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E. et al. Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea After Collagen Crosslinking by Riboflavin/UVA // *Cornea.* — 2004. — V. 23, N 5. — P. 503-507.
6. Wollensak G., Mazzotta C., Kalinski Th. Limbal and Conjunctival Epithelium After Corneal Cross-linking Using Riboflavin and UVA // *Cornea.* — 2011. — V. 30, N. 12. — P. 1448-1454.
7. Kozobolis V., Labiris G., Gkika M. UV-A Collagen Cross-Linking Treatment of Bullous Keratopathy Combined With Corneal Ulcer // *Cornea.* — 2010. — V. 29, N 2. — P. 235-238.
8. Makdoui K., Mortensen J.C. Infectious Keratitis Treated With Corneal Crosslinking // *Cornea.* — 2010. — V. 29, N 12. — P. 1353-1358.
9. Galperin Gustavo, Berra Martín, Tau Julia. Treatment of Fungal Keratitis From Fusarium Infection by Corneal Cross-Linking // *Cornea.* — 2012. — V. 31, N 2. — P. 176-180.

*Полный список литературы на сайтах
www.mfvf.ru, www.parchive.ru*