

Д.П. Скачков, А.А. Григоренко, А.Л. Штилерман

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ РОГОВИЦЫ ПОСЛЕ ИНТРАСТРОМАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ АМНИОНА ПРИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УДК 617.713 – 089.843:616-091-001.6

Представлены результаты морфологических изменений в роговице при интрастромальной имплантации амниона на экспериментальной модели эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы у кролика.

Ключевые слова: роговица, кератопатия, амнион.

Presents the results of the morphological changes in the cornea by intrastromal implantation of amnion in an experimental model of endothelial epithelial corneal dystrophy in the rabbit.

Key words: cornea, keratopathy, amnion.

Введение. Лечение вторичных эпителиально-эндотелиальных дистрофий (ЭЭД) роговицы продолжает оставаться одной из наиболее сложных проблем в современной офтальмологии. Данное заболевание является следствием воспалений, травм глазного яблока. Большую группу среди вторичных дистрофий составляют послеоперационные дистрофии. Пусковым механизмом развития данной патологии роговицы является повреждение ее эндотелиального слоя. В поврежденных клетках нарушается выработка цитокинов, ответственных за коллагеногенез, что приводит к прогрессивно нарастающей гидратации стромы роговицы с перерождением кератоцитов, отслоением эпителия и появлением роговичного синдрома. Последнее обстоятельство делает жизнь пациентов мучительной вследствие постоянных и ничем не снимаемых болей в глазу, блефароспазма и слезотечения [3]. По данным ряда авторов, частота ЭЭД как осложнение после офтальмологических вмешательств в целом составляет от 0,6 до 13 % [4]. В связи с этим проблема профилактики развития и лечения ЭЭД остается чрезвычайно актуальной.

Все существующие методы лечения ЭЭД делятся на консервативные и хирургические [3]. Консервативная терапия, несмотря на использование современных медикаментозных средств, физиотерапевтическое воздействие (гелий-неоновая лазерстимуляция, магнитотерапия), дает временный эффект, так как не устраняет причину

патологической трансформации роговицы [3,4,5].

Сегодня в клинике широко используется селективная замена патологически измененных участков роговицы, при этом предложено множество модификаций сквозной кератопластики: грибковидная, криокератопластика, ступенчатая кератопластика, интрастромальная имплантация имплантов из полимеров, трансплантация десцеметовой оболочки и т.д. [3,4,5,6,7].

В последние годы все чаще для лечения ЭЭД стали использовать амниотическую мембрану. Одни авторы предлагают покрывать поверхность роговицы для защиты эпителия и скорейшей его регенерации. Другие имплантируют амнион под конъюнктиву для подавления избыточной воспалительной реакции в комплексной терапии ЭЭД [1,2,5,6,7].

Как известно, механизм лечебного действия амниона основан на улучшении эпителизации и сохранении нормального эпителиального морфотипа, тормозящего образование грубой рубцовой ткани. Достоинством амниотической мембраны является ее биологическая антигенная инертность [1,2,6,7]. В связи с этим вполне оправданным является использование интрастромальной имплантации амниона в лечении далекозашедших стадий кератопатии.

Целью данной работы являлось изучение морфологических изменений роговицы после интрастромальной имплантации амниона при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Изучение влияния амниотической мембраны на структурные элементы роговицы с моделированной эндотелиально-эпителиальной дистрофией в эксперименте.

2. Проведение количественной оценки морфологических изменений в роговице и амниотической мембране при её интрастромальной имплантации на модели эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы.

Материалы и методы. При проведении данного этапа исследования соблюдались все нормы гуманного обращения с экспериментальными животными, условия содержания и проведения работы с ними, установленные Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 года и Европейской конвенцией ETS № 123 (Страсбург 18.03.1986 год). Проведена экспертиза этическим комитетом ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия Росздрава», получено разрешение на проведение данной работы.

Экспериментальная часть основана на результатах исследования 20 кроликов (40 глаз) породы шиншилла весом 2,5-3,5 кг в возрасте 6 месяцев. Кролики были разделены на 4 группы. В первую группу, контрольную, вошли 5 кроликов (10 глаз) с моделированной ЭЭД, забор глаз проводился через 7 дней после начала эксперимента. Вторую группу составили кролики с моделированной ЭЭД и интрастромально имплантированным амнионом 5 кроликов (10 глаз), забор глаз проводился через 1 неделю после имплантации амниона. Третью группу составили кролики с моделированной ЭЭД и интрастромально имплантированным амнионом 5 кроликов (10 глаз), забор глаз проводился через 4 недели после имплантации амниона. В четвертую группу вошли 5 кроликов (10 глаз) с моделированной ЭЭД и интрастромально имплантированным амнионом, забор глаз проводился через 12 недель после имплантации амниона.

1 этап. На 40 глазах экспериментальных животных выполнялось мо-

делирование эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы. Методика предложена в 1971 г. сотрудниками московского Научно-исследовательского института микрохирургии глаза и заключается во введении раствора фториды натрия 0,2-0,5% в переднюю камеру (авторское свидетельство SU 1463284). При осмотре через 24 часа у животных имел место блефароспазм, слезотечение, выраженный отек всех слоев роговицы. Данные изменения сохранялись в течение всего периода наблюдения.

2 этап. Через 10 дней на 30 глазах после моделирования ЭЭД выполнялась интрастромальная имплантация амниотической мембраны.

Операция проводилась под внутривенным наркозом (10% гексенал из расчета 10-15 мг/кг веса животного). Веки фиксировали блефаростатом, глазное яблоко - фиксационным пинцетом, захватывающим лимбальную конъюнктиву. Под контролем операционного микроскопа, используя одно-разовые инструменты, первым этапом выполняли отслаивание и удаление измененного эпителия роговицы. Затем в верхней половине роговицы выполняли надрез до задней пограничной пластинки, вдоль лимба, в 1-2 мм от него. Затем расслаивали строму роговицы в пределах площади имплантируемого диска амниона. Имплант предварительно обрабатывали раствором антибиотика – гентамицина и пинцетом для имплантации интраокулярной линзы заводили в роговичный карман. Местоположение импланта окончательно корригировали шпателем. Края роговичной раны адаптировали двухрядным швом 10-0. После операции на протяжении 14 дней в конъюнктивальную полость 6 раз в день инстиллировался раствор ципрофлоксацина 0,3%, и раствор диклофенака 0,1%.

В операции использовалась нативная амниотическая мембрана человека.

Всем кроликам проводилось послеоперационное обследование при помощи ручной щелевой лампы HEINE HSL 150 (Германия) с фоторегистратией. Выведение животных из эксперимента проводилось согласно правилам, изложенным в приложении №4 «Порядок проведения эвтаназии» Приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 года. В большую ушную вену вводился воздух из расчета 3 мл³ на 1 кг массы тела кролика.

Энуклеированные глаза фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону,

Количественная оценка морфологических изменений в роговице при интрастромальной имплантации амниона

Гистологические элементы	1-я группа (контрольная) (10 глаз)	2-я группа 1 неделя (10 глаз)	3-я группа 4 недели (10 глаз)	4-я группа 12 недель (10 глаз)
Клетки эпителия роговицы с явлениями дистрофии, ед.	20±1,13	20±4,65*	1,5±0,28*	0,7±0,005*
Толщина покровного эпителия, мкм	33,06±0,75	33,3±1,59*	30±2,1*	25,6±2,5*
Кератоциты, ед.	245±6,29	248±25,23*	15±1,27*	13±1,32*
Тканевые щели стромы, мкм ²	1372±150,1	1190±180,5*	465±159,3*	195±44,1*
Толщина амниона, мкм		71,9±6,02	82,3±6,01	63±4,62
Толщина роговицы, мкм	835,07±74,07	860,3±26,62*	422,8±17,54*	390,4±43,26*

* P < 0,05 – достоверность различий по отношению к контрольной группе.

толуидиновым синим. Окрашенные препараты изучали на фотомикроскопе (Opton, Германия) при увеличении × 100. Полученные данные обрабатывали методом компьютерной морфометрии.

Морфологические исследования проводились на кафедре патологической анатомии с курсом судебной медицины Амурской государственной медицинской академии.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены средние значения количественной оценки морфологических изменений роговицы при интрастромальной имплантации амниотической мембраны.

При морфологическом исследовании роговиц в контрольной группе наблюдались изменения, свойственные эндотелиально-эпителиальной дистрофии. Эпителий многослойный, в состоянии баллонной дистрофии. Число клеток в состоянии дистрофии 20±1,13 на 100000 мкм². Граница между эпителием и стромой нечетко прослеживается. Строма представлена гидратированными коллагеновыми волокнами, среди которых имеется большое количество полостей (тканевые щели), занимающих площадь 1372±150,1 мкм² на 100000 мкм². Десцеметова мембрана состоит из сети плотно расположенных тонких коллагеновых волокон. Эндотелий представлен одним слоем уплощенных клеток. Толщина роговицы 835,07±74,07 мкм.

При наблюдении во второй группе получены следующие данные: в течение первых 7 суток после проведения интрастромальной имплантации амниотической мембраны у экспериментальных животных стихали явления роговичного синдрома: уменьшались блефароспазм, слезотечение, сохранялась перикорнеальная инъекция, незначительно снижалась степень выраженности роговичного отека, на 2-е–3-и сутки начиналась эпителизация. К 7-м суткам у всех кроликов происходи-

ла полная эпителизация роговицы. Амнион нечетко контурировался в строме роговицы. Гистологическое исследование препаратов, 10 глаз, показало, что к этому времени эпителизация роговицы завершилась. Эпителий многослойный в состоянии баллонной дистрофии, клетки с гиперхромными ядрами, цитоплазма умеренно вакуолизована. Число клеток с явлениями дистрофии 20±4,65 на 100000 мкм² по отношению к группе сравнения (p<0,05). Граница между эпителием и подлежащей стромой неотчетлива. Строма представлена коллагеновыми волокнами с явлениями отека, среди которых имеется значительное количество полостей разной величины, частично выстланных кератоцитами, имеющими вытянутую форму с гиперхромными ядрами. Полости занимают площадь 1190±180,5 мкм² на 100000 мкм², по отношению к группе сравнения (p<0,05). Амниотическая мембрана представлена аваскулярным стромальным матриксом с выраженной периферической клеточной реакцией с наличием модифицированных фибробластов, толщина 71,9±6,02 мкм (рис.1). Строма ближе к десцеметовой мембране представлена утолщенными коллагеновыми волокнами. Десцеметова мембрана состоит из сети плотно расположенных тонких коллагеновых волокон. Эндотелий представлен одним слоем уплощенных клеток. Толщина роговицы 860,3±26,62 мкм, по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

В третьей группе наблюдалось практически полное стихание воспалительных явлений. Отсутствовала инъекция глазного яблока, значительно уменьшился отек роговицы, буллезные изменения эпителия. Амнион четко контурировался в строме роговицы. При исследовании гистологических препаратов, 10 глаз, роговица становилась тоньше, по сравнению с предыдущим сроком за счет уменьшения стромальной гидратации. В эпители-

альных клетках уменьшается вакуолизация цитоплазмы. Уменьшается количество клеток с явлениями баллонной дистрофии $1,5 \pm 0,28$ на 100000 мкм^2 по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Становится меньше полосей между коллагеновыми волокнами, уменьшается их размер и площадь с $1372 \pm 150,1 \text{ мкм}^2$ в контрольной группе до $465 \pm 159,3 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,05$) на 100000 мкм^2 в основной, что свидетельствует об уменьшении степени гидратации. Менее выраженная клеточная реакция вокруг амниотической мембраны. Сам амнион становится более гомогенным, отмечается отек, набухание и разволокнение стромального матрикса. Толщина его увеличивается и составляет $82,3 \pm 6,01 \text{ мкм}$. Уменьшается толщина роговицы $422,8 \pm 17,54 \text{ мкм}$ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) (рис.2).

В четвертой группе отсутствовали явления воспалительной реакции глазного яблока. Роговица блестящая, гладкая, продолжает увеличиваться ее прозрачность. Амнион четко не контурировался в строме роговицы за счет его разволокнения. При исследовании препаратов, 10 глаз, значительно уменьшилось количество клеток с явлениями баллонной дистрофии по сравнению с контрольной группой с $20 \pm 1,13$ до $0,7 \pm 0,005$ на 100000 мкм^2 ($p < 0,05$). Коллагеновые волокна плотно прилежат друг к другу, что свидетельствует о значительном уменьшении избыточной гидратации стромы роговицы. Амнион уменьшается в объеме, уплотняется, плотно прилежит к окружающему его веществу. Отсутствуют явления клеточной реакции вокруг него. Его толщина составляет $63 \pm 4,62 \text{ мкм}$. Появились единичные кератоциты в стромальном матриксе амниона. Толщина роговицы статистически достоверно уменьшилась по сравнению с контрольной группой до $390,4 \pm 43,26 \text{ мкм}$ ($p < 0,05$) (рис. 3).

После 3 месяцев динамики в состоянии роговицы и амниона не наблюдалось.

На основании проведенных исследований отмечается хорошая приживаемость амниона. Морфологически это проявляется активной клеточной реакцией с привлечением в область трансплантата клеток фибропластического ряда – кератоцитов. В дальнейшем происходит уменьшение клеточной инфильтрации, стромальной гидратации и восстановление покровного эпителия. Сам трансплантат полностью интегрируется в стромальные элементы роговицы и становится трудно дифференцируемым. В соединительной ткани

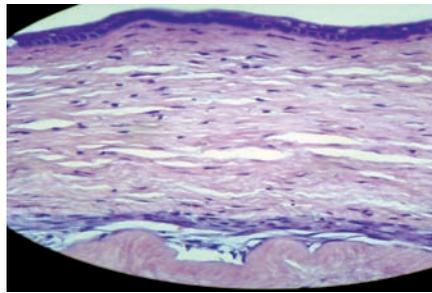


Рис.1. Выраженный отек эпителия, стромы. Скопление кератоцитов на границе с амнионом. 1 неделя после интрастромальной имплантации амниона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

не отмечается каких-либо структурных изменений, свойственных ткани, подвергшейся реакции отторжения или гипоксическому влиянию. Трансплантат по количеству соединительнотканых волокон не отличается от стромы роговицы. При окраске толуидиновым синим лишь на единичных участках отмечаются признаки метахромазии, что говорит о дистрофических изменениях, а точнее о мукоидном набухании – полностью обратимой стадии в амнионе. Данные изменения незначительны и полностью элиминируются со временем. Особенность воспалительной реакции мы связываем со слабыми антигенными свойствами амниотической мембраны, помещенной в новое «окружение».

Выводы

1. Данные, полученные при гистологическом исследовании, свидетельствуют об успешной интеграции амниотической мембраны в строму роговицы, уменьшении воспалительной реакции, гидратации стромы, ускорении эпителизации роговицы при интрастромальной имплантации амниона.

2. Амниотическая мембрана подвергается трансформации в полупрозрачную соединительную ткань.

Литература

1. Батманов Ю.Е. Применение свежего амниона в лечении заболеваний роговицы / Ю.Е. Батманов, К.С. Егоров, Л.Н. Колесникова // Вестн. офтальмологии. - 1990. - Т.106, №5. - С. 17-19.
2. Batmanov Y.E. Use of fresh amnion in treatment of diseases of the cornea / Y.E. Batmanov, K.S. Egorov, L.N. Kolesnikova // Vestn. Ophthalmology. - 1990. - Т. 106, №5. - P.17-19.
3. Гундорова Р.А. Применение амниотической мембраны в офтальмологии: обзор литературы // Р.А. Гундорова, О.В. Киселева, Н.В. Сороколетова // Рефракционная хирургия и офтальмология. - 2007. - № 2. - С. 27-31.
4. Gundorova R.A. Application of amniotic membrane in ophthalmology: a literature review / R. A. Gundorova, O.V. Kiselev, N.V. Sorokoletova // Refractive surgery and ophthalmology. -2007. - №2. -P.27-31.

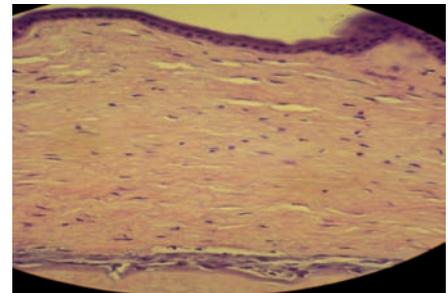


Рис.2. Уменьшилась гидратация стромы роговицы. 4 недели после интрастромальной имплантации амниона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

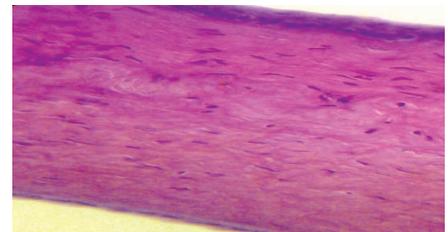


Рис.3. Значительно уменьшилась гидратация стромы роговицы, кератоциты равномерно распределены в строме, встречаются единичные клетки (кератоциты) в амнионе. 12 недель после интрастромальной имплантации амниона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

3. Каспаров А.А. Послеоперационная буллезная кератопатия: трансплантационные и нетрансплантационные методы лечения / А.А. Каспаров, Е.А. Каспарова, С.В. Труфанов, Н.В. Бородин // Тезисы докладов. Девятого съезда офтальмологов России. - М., 2010. - С. 307.

Kasparov A.A. Postoperative bullous keratopathy: transplant and netransplantatiionnye treatment / A.A. Kasparov, E.A. Kasparov, S.V. Trufanov, N.V. Borodin // Abstracts. Ninth Congress of Ophthalmologists of Russia. - M., 2010. - P. 307.

4. Мороз З.И. Современные направления хирургического лечения патологии роговицы / З.И. Мороз // Там же. - М., 2010. - С. 298-299.

Moroz Z.I. Modern trends of surgical treatment of corneal pathology / Z.I. Moroz // Ibid. - M., 2010. - P. 298-299.

5. Полянская Н.К. Кератоамниопластика в лечении глубоких воспалительных, трофических заболеваний и травм роговицы / Н.К. Полянская // Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры: Сб. науч. ст науч.-практ. конф. - М.: Пульс, 2007. - Т.2. - С. 133-140.

Polyanskaya N.K. Keratoamnioplastika in the treatment of profound inflammatory vnosidiseases and injuries of the cornea / N.K. Polyanskaya // Modern methods of diagnosis and treatment diseases of the cornea and sclera: Sci.-Practical. conference.: Sat. researcher. of Art. - AM, -2007. -Vol.2. -P.133-140.

6. Mahadevappa V. Amniotic membrane graft for corneal surface disorders and primary progressive pterygium / V. Mahadevappa // Department of ophthalmology government medical college Mysore. -2006. -P.17-25.

7. Dua H.S. The amniotic membrane nophthalmology / H. S. Dua, G. Gomes, A. King // Surg. Ophthalmol. -2004. - Vol. 49, № 1. - P. 51-77.