

Репаративная регенерация роговицы в условиях применения наноструктурированного биополимера гиалуроновой кислоты

В.Н. Канюков¹, А.А. Стадников², О.М. Трубина¹, О.М. Яхина¹

¹ Оренбургский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

² ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздрава России

РЕФЕРАТ

Цель. Оценка течения процессов репаративной регенерации роговицы при применении биопластического материала – наноструктурированного биополимера гиалуроновой кислоты на модели химического (щелочного и кислотного) ожога роговицы.

Материал и методы. Экспериментальное моделирование химического ожога роговицы проведено на 36 кроликах (72 глаз). В исследовании было две серии ожога роговицы: щелочного (18 кроликов – 36 глаз) и кислотного (18 кроликов – 36 глаз). В каждой из серий выделены опытная группа, где применяли аппликацию биопластического материала «Гиаматрикс» по оригинально разработанной методике, и контрольная, в которой проводили инстилляции Солкосерила.

Клиническое исследование включало осмотр переднего отрезка глаз с помощью фокального и бокового освещения и фоторегистрацию. На сроках 3, 7, 14, 30 и 90 суток животные выводились из эксперимента для проведения светооптического, иммуноцитохимического исследования и электронной микроскопии.

Результаты. При проведении аппликации «Гиаматрикса» отек и инъекция конъюнктивы, отек роговицы купировались быстрее, что способствовало снижению риска неоваскуляризации в исходе щелочного ожога роговицы. Морфологические

исследования, проведенные на различных сроках эксперимента, позволили установить последовательность процессов, протекающих от момента нанесения химического ожога роговицы до завершения ее восстановления, которые были различными в опытной и контрольной группах.

Морфологически определялись признаки токсического действия продуктов распада поврежденных клеток. Клетки эндотелия оставались интактными. Применение аппликации «Гиаматрикса» позволило сократить время восстановления с улучшением репаративных процессов роговицы.

Выводы. 1. Аппликация биопластического материала на роговицу на начальных этапах лечения повреждений роговицы (щелочной и кислотный ожог) уменьшает выраженность отека и гиперемии и, как следствие, сокращает экссудативную фазу воспаления. 2. В результате клинко-функционального анализа особенностей течения щелочного повреждения роговицы установлено, что применение «Гиаматрикса» ускоряет закрытие дефекта роговицы в 1,5 раза быстрее по сравнению с контрольной группой. 3. Применением биоматериала в исходе кислотного ожога за счет сокращения экссудативной фазы воспаления ускоряет рассасывание помутнений роговицы по сравнению с применением глазного геля Солкосерил.

Ключевые слова: химический ожог роговицы, гиалуроновая кислота, «Гиаматрикс», репарация. ■

Офтальмохирургия. – 2013. – № 4. – С. 38-42.

Для корреспонденции:

Канюков Владимир Николаевич, докт. мед. наук, профессор, директор Оренбургского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, заслуженный врач РФ, почетный работник высшего профессионального образования;

Трубина Ольга Михайловна, канд. мед. наук, доцент, зам. директора по научной работе;

Яхина Ольга Михайловна, аспирант

Оренбургский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Адрес: 460047, Оренбург, ул. Салмышская, 17

Тел.: (3532) 650-682. E-mail: nauka@ofmntk.ru

Стадников Александр Абрамович, докт. биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, почетный работник высшего профессионального образования; зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, зав. лабораторией функциональной морфологии клетки Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздрава России

Адрес: 460000, Оренбург, ул. Максима Горького, 45

Тел.: (3532) 772-275.

ABSTRACT

Reparative regeneration of cornea at nanostructured biopolymer of hyaluronic acid applicationV.N. Kanyukov¹, A.A. Stadnikov², O.M. Trubina¹, O.M. Yakhina¹¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery State Institution, Orenburg branch;² Orenburg state medical academy, Orenburg

Purpose. Estimation of corneal reparative regeneration processes course at application of bioplastic material – nanostructured biopolymer of hyaluronic acid on the model of chemical (alkaline and acid) cornea burn.

Material and methods. Experimental modeling of cornea chemical burn was carried out on 36 rabbits (72 eyes). The study had two series of cornea burn: alkaline (18 rabbits – 36 eyes) and acid (18 rabbits – 36 eyes) corneal burns. In each of the series there was identified: an experimental group, which used the applique of bioplastic material «hyamatrix» according to the method of prof. V.N. Kanyukov and control one with Solcoseryl instillations.

The clinical study included an examination of the eye anterior segment using the focus and side lighting and photographic recording. At the of period of 3, 7, 14, 30 and 90 days the animals were removed from the experiment for the light-optical, immunocytochemistry and electron microscopy studies.

Results. At conducting «hyamatrix» application conjunctiva edema and injection, corneal edema were reversed faster that reduced neovascularization risk in the outcome of corneal alkaline burn. Morphological studies at different periods of the experiment made it possible to determine the sequence of processes from the

moment of cornea chemical burns application until the completion of its restoration, which were different in the experimental and control groups.

Symptoms of toxic effect of the damaged cells decay products were determined morphologically. Endothelial cells remained intact. The use of «hyamatrix» application allowed reducing the recovery time with the improvement of cornea reparative processes.

Conclusion. 1. Application of bioplastic material to the cornea in the early stages of cornea injuries treatment (alkaline and acid burn) reduces the severity of edema and hyperemia, and as a result reduces the exudative phase of inflammation. 2. As a result of clinical and functional analysis of course peculiarities of alkaline corneal damage found that «Hyamatrix» application accelerates corneal defect closure in 1.5 times faster as compared with the control group. 3. The use of biological material in the outcome of acid burn by reducing the exudative phase of inflammation accelerates the resorption of corneal opacity compared with the eye gel Solcoseryl application.

Key words: acid burn of cornea, hyaluronic acid, «hyamatrix», reparation. ■

Ophthalmosurgery.- 2013.- No. 4.- P. 38-42.

Регенерация роговицы при травматических повреждениях переднего отрезка глаза является основополагающим фактором в восстановлении зрения у пациентов. Особую важность представляет изучение репаративных процессов в роговице после химических ожогов, так как в результате ожога нарушается не только ее структура, но и метаболизм. В связи с особенностями кровотока области лимба в зоне ожога быстро накапливаются токсические продукты, что еще более усугубляет патологический процесс [3-5, 7]. Патогенетически направленное лечение должно проводиться с целью восстановления оптических свойств роговицы, подавления аутоиммунных реакций, предупреждения избыточной васкуляризации, конъюнктивальных сращений, иридов, иридоциклитов, вторичной глаукомы и катаракты [2, 6, 9].

Механизмы патологического процесса и реакций организма при ожо-

гах глаз настолько сложны и разнообразны, что применяемые средства терапии далеко не всегда купируют развитие активного ожогового процесса [8]. Установлено, что растворы щелочей, омыляя жиры и жироподобные вещества клеточных мембран, проникают в тело клетки, изменяя pH клеточного вещества, приводят к растворению (коликвации) белков, разрушают клетку и проникают глубоко в ткани [2, 4, 5, 11]. Щелочной ожог роговицы вызывает дестабилизацию уровня гликозаминогликанов оптических сред глаза и сыворотки крови, выражающуюся в изменении их фракционного состава, при этом наблюдается активация реакций глюкуроноидной конъюгации в тканях органа зрения, наиболее выраженная в переднем отрезке глаза [9]. Иной механизм воздействия оказывают растворы кислот, вызывая некроз конъюнктивы и роговицы с коагуляцией белков, что предотвращает распро-

странение детергента вглубь тканей [2, 8, 11].

При ожоговой болезни глаз нередко происходит отторжение и некроз трансплантата вследствие нарушения микроциркуляции собственной поврежденной ткани, развития в организме иммунологического конфликта, формирования васкуляризованных бельм [3-5, 10]. Следовательно, разработка медикаментозных и хирургических методов оптимизации репаративной регенерации роговицы после химических ожогов является одним из факторов успешного лечения данной патологии.

ЦЕЛЬ

Оценка течения процессов репаративной регенерации роговицы при применении биопластического материала – наноструктурированного биополимера гиалуроно-

вой кислоты на модели химического (щелочного и кислотного) ожога роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Наноструктурированный биопластический материал «Гиаматрикс» представляет собой биополимер гиалуроновой кислоты в виде плёнки толщиной 0,3-0,5 мм (рис. 1, 2). Он разработан в научно-производственной лаборатории клеточных технологий Оренбургского государственного университета и предназначен для восстановления дефектов кожных покровов [1], разрешен к применению в общей и пластической хирургии (регистрационное удостоверение ФСР 2011/10313 от 18.03.2011 г.).

Экспериментальное моделирование химического ожога роговицы проведено на 36 кроликах (72 глаз).

В первой серии эксперимента на 36 глазах 18 экспериментальных

животных моделировали щелочной ожог роговицы. После чего животных разделили на две группы: опытную (18 правых глаз) и контрольную (18 левых глаз).

В опытной группе проводили аппликацию биопластического материала «Гиаматрикс» по оригинально разработанной методике (Патент на изобретение № 2485919 от 12.04.2012 г.). После стандартной обработки операционного поля, проведения эпibuльбарной анестезии (Sol. Inocaini 0,4% 3-кратно), веки фиксировали векорасширителем. Предварительно из биоматериала «Гиаматрикс» трепаном выкраивали диск диаметром 10 мм. Затем «Гиаматрикс» укладывали на поверхность роговицы, смачивали физиологическим раствором для улучшения эластических свойств биоматериала и накрывали мягкой контактной линзой, которую фиксировали двумя перекидными швами.

В контрольной группе закладывали глазной гель Солкосерил. В обеих группах проводили инстилляцию 0,3%-ного раствора Ципромеда.

Во второй серии формировали кислотный ожог роговицы средней степени тяжести (18 кроликов, 36 глаз). Далее в опытной группе проводили аппликацию биопластического материала по описанной выше методике (18 глаз), а в контрольной группе – закладывание глазного геля Солкосерил (18 глаз).

Клиническое исследование включало биомикроскопию переднего отрезка глаз с динамической оценкой состояния конъюнктивы, роговицы и глубже лежащих сред; флуоресцеиновую пробу.

На сроках 3, 7, 14, 30 и 90 суток животных выводили из экспери-

мента методом передозировки наркотика (3-разовых доз хлороформа). Для проведения светооптического и иммуноцитохимического исследований энуклеированные глазные яблоки фиксировали в растворе нейтрального формалина, подвергали макромикроскопическому препарированию, затем промывали проточной водой, обезжизняли в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин, выполняли серии меридиональных гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Изучение ультратонких срезов и их фотографирование проводили на электронном микроскопе ЭМВ 100АК при увеличении от $\times 8000$ до $\times 40000$.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные антитела с целью обнаружения у клеток экспрессии белков p53 и bcl2, участвующих в инициации апоптоза и выявлении интернуклеосомальной фрагментации ДНК. Во всех случаях подсчитывали процент окрашенных клеток в случайно выбранных полях зрения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Щелочной ожог сопровождался признаками роговичного синдрома: блефароспазмом, светобоязнью, слезотечением. Клиническое исследование показало, что воздействие 2,5%-ного раствора гидроксида натрия приводило к формированию эрозии роговицы в виде круга диаметром до 7 мм, что сопровождалось признаками реактивного воспаления: отеком и инъекцией конъюнктивы. Применение биопластического материала «Гиаматрикс» спо-

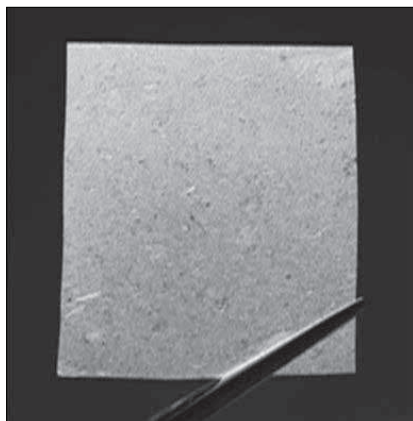


Рис. 1. Структура биоматериала

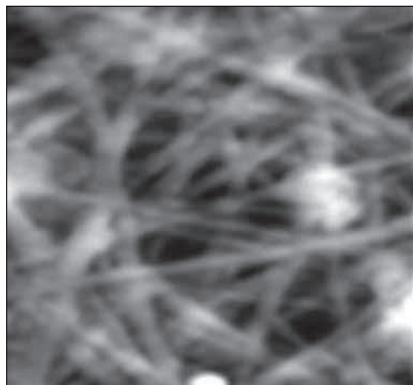


Рис. 2. Атомно-силовая микроскопия биоматериала «Гиаматрикс» (технология получения: фотохимическое наноструктурирование)

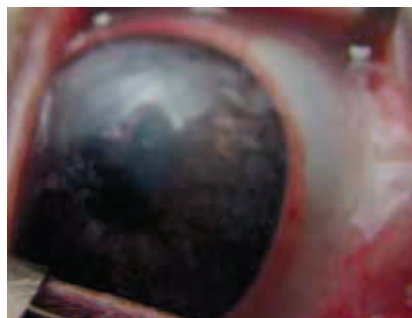


Рис. 3. Глаз кролика на четвертые сутки после щелочного ожога (опытная группа)



Рис. 4. Глаз кролика на седьмые сутки после щелочного ожога (опытная группа)

собствовало эпителизации раневого дефекта у всех животных опытной группы к 4 суткам (рис. 3), на сроке 7 суток в области воздействия щелочи отмечали нежное поверхностное помутнения (рис. 4), в то время как в контрольной группе дефект сохранялся до 7 суток. Так же было отмечено, что признаки асептического воспаления в опытной группе проходили на трое суток раньше, чем в контрольной группе.

Морфологически в зоне роговицы, подверженной действию щелочи, отмечали гибель и десквамацию клеток переднего эпителия роговицы, фрагментацию и исчезновение клеток стромы. Исследование конъюнктивы показало, что ток крови резко замедлялся, в мелких сосудах формировались тромбы, плазма выходила в окружающие ткани, что сопровождалось резким отеком конъюнктивы. Следует отметить, что характер морфологических изменений тканей глаза в условиях некроза, вызванного химической травмой, был сходным (относительно воздействия кислот и щелочей).

Существенным являлось то обстоятельство, что по мере усиления эрозивного процесса (поздние сроки наблюдений) в живых (сохраненных в гистологическом отношении тканях), прилежащих к некротизированному, возникало выраженное реактивное воспаление. Оно характеризовалось вазодилатацией кровеносных сосудов, экстравазацией плазмы и форменных элементов крови с формированием демаркационной зоны (рис. 5).

Анализ серийных гистологических препаратов показал, что демаркационная линия в исследованных участках глаза была выражена слабо, а в лимбальной зоне она отсутствовала. Это приводило к утяжелению и прогрессированию некротических процессов эпителиальных и соединительнотканых структур.

В переднем эпителии роговицы и эпителии слизистой оболочки конъюнктивы отмечались грубые повреждения, завершающиеся десквамацией эпителиоцитов и обнажением базальной мембраны. Одновременно усиливалась секреция слизь-продуцирующих элементов (бокаловидные клетки конъюнктивального эпителия) (рис. 6).

При этом альтерация тканей роговицы не сопровождалась адекватными экссудативной (сосудистой) и продуктивной (пролиферативной) реакциями, что свидетельствовало о сохранении дистрофических процессов в моделируемых условиях. Таким образом, фокус воспаления в связи с процессами экссудации не в полной мере выполняет дренажную и элиминативную функции при ожоговой травме роговицы.

Преобладающее большинство эмигрирующих лейкоцитов составили сегментоядерные нейтрофилы. Помимо них, значительно реже экстравазации подвергались лимфоциты, моноциты, базофильные гранулоциты и эозинофилы. Данные клетки продвигались в зону повреждения роговицы между волокнистыми структурами по направлению к центру воспаления, где и наблюдалось их наибольшее скопление (рис. 7).

В области повреждения роговицы и прилежащих участков конъюнктивы, по мере угасания воспалительного процесса, происходила активизация камбиальных клеток и клеток фибробластического дифферона (рис. 8). При этом образовывались волокнистые структуры без разрастаний эпителиальной ткани. Исследование показало, что травматическое (химическое) повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления. Исход альтеративного воспаления зависел от глубины поражения и повреждения тканей глаза (по срокам наблюдений) и, как правило, заканчивался рубцеванием посттравматического дефекта.

Морфологические исследования, проведенные на различных сроках эксперимента, позволили установить последовательность процессов, протекающих от момента нанесения химического ожога роговицы до завершения ее восстановления, которые были различными в опытной и контрольной группах.

Воздействие кислоты (3%-ный раствор уксусной кислоты) на неизменную роговицу приводило к поверхностному помутнению (рис. 9), но инстиляция 0,1%-ного раствора флуоресцеина натрия показала, что ткань стромы не прокрашивалась, а

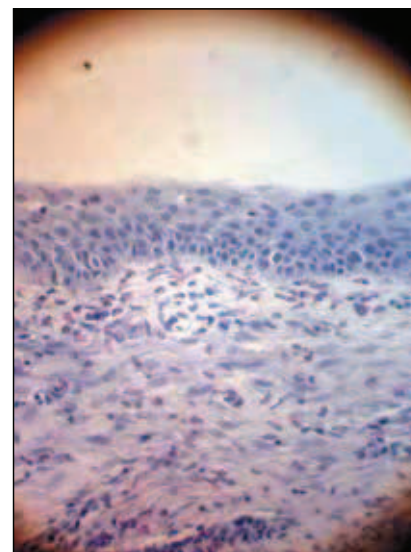


Рис. 5. Фрагмент роговицы кролика № 20 через 7 суток эксперимента. Эпителиальный регенерат. Фиксация: жидкость Буэна. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. об. 40, ок. 10

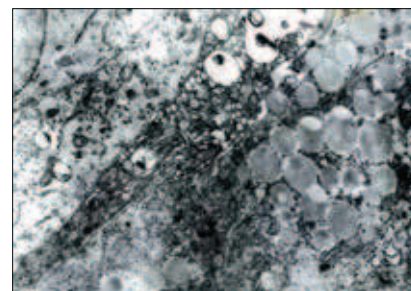


Рис. 6. Бокаловидная клетка эпителия конъюнктивы в зоне химического ожога. Кролик № 34 (III серия), стадия: 7 суток. Электронограмма. Ув. $\times 20500$

следовательно эпителиальный покров был сохранен (рис. 10). Однако гистологически выявляли коагуляционный некроз эпителия без отторжения уплотненного струпа. В процессе лечения некротизированные ткани отторгались и на более поздних сроках исследования флуоресцеиновая проба становилась положительной. Клинически было показано, что применение «Гиаматрикса» способствовало более раннему уменьшению отека роговицы и признаков реактивного воспаления по сравнению с контрольной группой, помутнение в опытной группе рассасывалось к 14 суткам, в то время как в контроле – к 30 суткам.

Морфологическое исследование глаз на сроке 3-х суток как опытной, так и контрольной групп показало, что клетки переднего эпите-

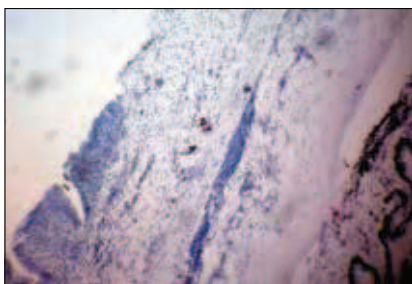


Рис. 7. Лимфоидная инфильтрация стромальных компонентов роговицы. Кролик № 36 (III серия), стадия: 7 суток. Фиксация: спирт-формол. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. об. 8, ок. 10.

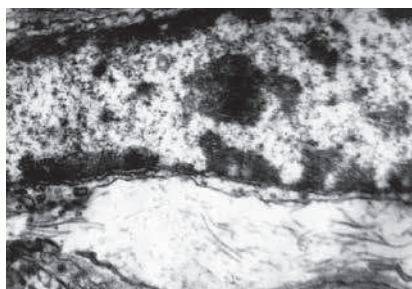


Рис. 8. Фибробласт в зоне химического ожога роговицы. Кролик № 36 (III серия), стадия: 7 суток. Электронограмма. Ув. x26000

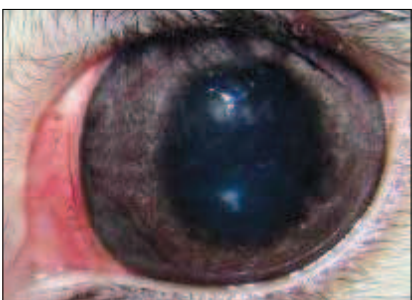


Рис. 9. Глаз кролика через 1 минуту после кислотного ожога (опытная группа)

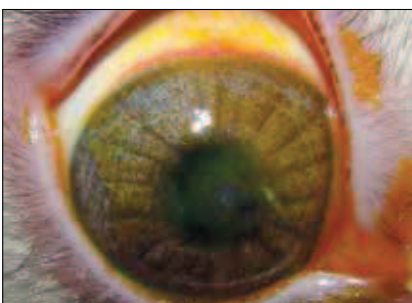


Рис. 10. Глаз кролика через 1 мин. после флюоресцеиновой пробы (опытная группа)

лия роговицы были повреждены; в мелких сосудах конъюнктивы формировались тромбы. Кроме деструктивных изменений эпителиоцитов, отмечались нарушения в строме, которые строго соответствовали участку ожога и захватывали не менее $\frac{1}{3}$ толщины стромы. В период с 7 по 14 сутки в опытной группе уже наблюдали переход экссудативной фазы воспаления в пролиферативную, в контрольной группе этот процесс был выявлен только к концу месяца.

Иммуноцитохимическое исследование показало, что при применении биопластического материала снижалась апоптотическая доминанта эпителиоцитов и фибробластов роговицы, взятой для исследования на третьи и четырнадцатые сутки эксперимента. С другой стороны, возрастала экспрессия синтеза протеина bcl2, что свидетельствовало о выраженности пролиферативной фазы воспаления, это подтверждало результаты световой микроскопии. Таким образом, иммуноцитохимическое исследование показало, что аппликация «Гиаматрикса» оптимизировала репаративные гистогенезы с включением механизмов лимитирования экспрессии проапоптатического гена p53, уменьшение иммунопозитивных эпителиоцитов в 2,5-3 раза по сравнению с контрольной группой.

ВЫВОДЫ

Аппликация биопластического материала на роговицу на начальных этапах лечения повреждений роговицы (щелочной и кислотный ожог) уменьшает выраженность отека и гиперемии и, как следствие, сокращает экссудативную фазу воспаления.

В результате клинико-функционального анализа особенностей течения щелочного повреждения роговицы установлено, что применение «Гиаматрикса» ускоряет закрытие дефекта роговицы в 1,5 раза быстрее по сравнению с контрольной группой.

Применением биоматериала в исходе кислотного ожога за счет сокращения экссудативной фазы воспаления ускоряет рассасывание помутнений роговицы по сравнению с применением глазного геля Солкосерил.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлуцкая О.И., Рахматуллин Р.Р., Адельшина Л.Р. и др. Восстановление дефектов кожи у больных ладонно-подошвенным псориазом с помощью нового биопластического материала «Гиаматрикс» // Экспериментальная клиническая дерматокосметология. – 2011. – № 3. – С. 52-54.
2. Глазные болезни. Основы офтальмологии: Учебник / Под ред. В.Г. Копаевой. – М.: Медицина, 2012. – 560 с.
3. Груша О.В., Чердниченко Л.П. Способ лечения химических ожогов роговой оболочки в условиях биологической защиты // Новое в лечении ожогов глаз: Тез. докл. симпозиума с участием иностранных специалистов. – М., 1989. – С. 39-41.
4. Мороз З.И., Ковиун Е.В., Калинин Ю.Ю. и др. Интрастромальное профилактическое укрепление истонченных бельм аутоотеноновой капсулой // Офтальмохирургия. – 2004. – № 1. – С. 4-6.
5. Пучковская Н.А. Ожоги глаз. – М.: Медицина, 2001. – 256 с.
6. Чаланова Р.И., Дегтяренко Т.В. Практическая значимость клинико-иммунологической оценки стресс-реактивности организма для офтальмокомбустиологии (третье сообщение) // Офтальмологический журнал. – 2010. – № 6. – С. 31-37.
7. Ченцова Е.В., Романова И.Ю. Клиническая апробация нового низкомолекулярного сывороточного полипептида при ожоговых и посттравматических повреждениях роговицы // Ожоги глаз и их последствия: Материалы науч.-практ. конф. – М., 1997. – С. 19-20.
8. Черныш В.Ф., Бойко Э.В. Ожоги глаз – состояние проблемы и новые подходы. – СПб.: ВМедА, 2008. – 135 с.
9. Шамратова А.Р. Гиалуриновая кислота в механизмах репаративной регенерации оптических сред глаза при ожоговой травме роговицы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2002. – 24 с.
10. Daniels J.T., Dart J.K., Tuft S.J. et al. Corneal stem cell in review // Wound Rep. Regen. – 2001. – Vol. 9, № 6. – P. 483-494.
11. Korey M., Peyman G.A., Berkowitz R. The effect of hypertonic pointment on corneal alkali burns // Am. Ophthalm. – 1977. – Vol. 9, № 11. – P. 1383-1390.

Поступила 10.09.13