

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

В эксперименте смоделированы химические (щелочной и кислотный) ожоги роговицы. Проведен сравнительный анализ лечения данной патологии с применением «гиаматрикса» и консервативного лечения с применением кератопластических средств. Нами отмечены особенности репаративной регенерации роговицы при применении нового метода лечения.

Ключевые слова: заболевания роговицы, «гиаматрикс», ожоги глаз, экспериментально-гистологическое исследование, гиалуроновая кислота.

Актуальность

Заболевания роговой оболочки в общей структуре глазной патологии составляют около 35% и являются социально значимой проблемой, так как поражают в основном трудоспособное население [3]. Обусловлено это тем, что роговица наряду с оптическими функциями выполняет и барьерную, защищая внутренние структуры глаза от внешнего воздействия и, таким образом, находится в неблагоприятных условиях [4]. Этиопатогенетические факторы, приводящие к нарушению целостности и прозрачности роговой оболочки весьма разнообразны [5], к ним относятся воспалительные заболевания [3], дистрофии роговицы, травматические повреждения органа зрения. Нарушение целостности структуры роговой оболочки вследствие ее заболеваний и травм приводят к различным осложнениям: присоединение вторичной инфекции, выраженной васкуляризации, грубым помутнениям, что ухудшает функции пораженного глаза [7].

На I конгрессе EuCornea (2011) обозначено, что роговичная слепота играет существенную роль в структуре инвалидности по зрению, а также то, что сквозная кератопластика, к сожалению, не решает всех проблем, а необходимость разработки и использования искусственных роговиц является непреложным и насущным фактом сегодняшнего дня [6]. Вследствие чего современные передовые научные разработки посвящены методам, основанным на применении веществ, оказывающих разнообразные биологические эффекты на клетки организма (деление, биосинтез, миграция, выживаемость клеток) [1].

В последнее время в литературе все чаще встречаются работы по применению препара-

тов гиалуроновой кислоты [9]. Исследование ранозаживляющего действия гиалуроновой кислоты показало, что она является основой, на которой организуется нормальная тканевая архитектура. Кроме того, гиалуроновая кислота, являясь основным межклеточным веществом организма, способствует активации макрофагов, стимулирует физиологические репарационные процессы, ангиогенез и в определенной степени подавляет фиброгенез, обладает выраженной антибактериальной активностью и рядом других свойств [8]. Кроме того доказано, что прозрачность роговицы и оптических сред глаза в значительной степени определяется наличием в них гликозаминогликанов. При неблагоприятных условиях происходит деполимеризация гликозаминогликанов, задерживается развитие грануляционной ткани, происходит васкуляризация роговицы. Также установлено, что содержание гиалуроновой кислоты – несulfатированного представителя гликозаминогликанов в роговице и слезной жидкости увеличивается при некоторых заболеваниях глаза [9]. В связи с этим заслуживает внимания новый биопластический материал «гиаматрикс».

Он разработан в научно-производственной лаборатории клеточных технологий Оренбургского государственного университета и производится на основе гиалуроновой кислоты [2]. Биопластический материал «гиаматрикс» применялся авторами для восстановления дефектов кожного покрова при псориазе, лечения язв и трофических ран и трофических язв у больного с врожденным буллезным эпидермолизом. В результате применения биоматериала наступала длительная ремиссия заболева-

ния, и повышалось качество терапии [2]. Эти данные позволяют предположить эффективность биопластического материала «гиаматрикс» для лечения дефектов роговицы.

Цель исследования

Изучение процессов регенерации роговицы при применении биопластического материала «гиаматрикс» в эксперименте.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проведены на 26-ти глазах 18-и половозрелых кроликов весом 3,5-4,0 кг. Наблюдение, уход, операции на животных, а также выведение их из эксперимента выполнялось согласно Хельсинской декларации об использовании животных в экспериментальных исследованиях. В эксперименте получены модели химических (щелочного и кислотного) ожогов глаз, эрозии роговицы. В каждой серии экспериментальные животные были разделены на две группы: опытную и контрольную. Клинические методы исследования включали осмотр переднего отрезка глаз с помощью фокального и бокового освещения и биомикроскопию с флюоресцеиновой пробой и фоторегистрацией. Оценку состояния глаз проводили по следующим признакам: степени выраженности воспалительной реакции, величине и глубине дефекта роговицы, степени неоваскуляризации роговицы, интенсивности помутнения роговицы. На сроке 3, 7, 14, 30 суток животных выводили из эксперимента, ткани глазной поверхности забирали для светооптического и иммуноцитохимического исследования.

Моделирование эрозии роговицы проводилось на 4-х кроликах (8 глаз) в оптической зоне роговицы, поскольку регенеративная активность клеток переднего эпителия в центре и на периферии различна, а именно в периферической части она выше. Использовалась методика формирования эрозии роговицы в эксперименте, которая была описана ранее Г.Р. Дамбите (1950), М.Л. Рохлиной и Т.В. Зубаревой (1955). Под местной анестезией (Sol. Inocaini 0,4% 3-х кратная инстилляция) легким прижатием трепана с поршнем диаметром 4 мм к роговице наносилась метка, которая окрашивалась 0,01% раствором флюоресцеина. В пределах метки лезвием соскабливался эпителий роговицы. Дефект эпителия снова окрашивался 0,01% раствором флюоресцеина для того, чтобы отчетливее были видны его форма и раз-

мер. В опытной группе проводилась аппликация биопластического материала «гиаматрикс» по разработанной проф. В.Н. Канюковым методике, в послеоперационном периоде проводились инстилляции Sol. Laevomycetini 0,25%×4 раза в день. В контрольной группе проводилось лечение эрозии по методике: Sol. Riboflavini 0,01%×4 раза в день, Corneregel×3 раза в день, Sol. Laevomycetini 0,25%×4 раза в день. Состояние животных оценивали динамически ежедневно в течение семи дней, последующие наблюдения проводили 2 раза в неделю в течение 30 суток.

В качестве экспериментальной модели щелочного ожога роговицы у 5 кроликов (10 глаз) использован метод, описанный Обенбергером. Эта модель широко используется в нашей стране и за рубежом как для исследования репаративных процессов в глазу при воспалении, вызванном повреждением, так и для разработки методов их лечения, поскольку процессы, развивающиеся после щелочного ожога роговицы у кроликов, включают все компоненты, имеющие место при повреждении глаза у человека. Щелочной ожог II степени был вызван аппликацией фильтровальной бумаги в виде круга диаметром 8 мм, смоченного 2,5% раствором гидроксида натрия с экспозицией 5 секунд на роговицу (площадь дефекта роговицы $65,37 \pm 1,68 \text{ мм}^2$) под местной анестезией (Sol. Inocaini 0,4% 3-х кратная инстилляция). В опытной группе проводилась аппликация биопластического материала «гиаматрикс», в послеоперационном периоде проводились инстилляции Sol. Laevomycetini 0,25%×4 раза в день. В контрольной группе проводилось консервативное лечение ожога: Sol. Citrali 0,01%×4 раза в день, Corneregel×3 раза в день, Sol. Laevomycetini 0,25%×4 раза в день в течение первых 14 дней. Состояние животных оценивали динамически ежедневно в течение семи дней, последующие наблюдения проводили 2 раза в неделю в течение 30 суток.

Кислотный ожог роговицы в эксперименте смоделирован у 4 кроликов (8 глаз) аппликацией фильтровальной бумаги в виде круга диаметром 8 мм, смоченной 3% раствором уксусной кислоты с экспозицией 5 секунд на роговицу под местной анестезией (Sol. Inocaini 0,4% 3-х кратная инстилляция). В опытной группе проводилась аппликация биопластического материала «гиаматрикс», в послеоперационном периоде проводились инстилляции Sol. Laevomycetini

0,25%×4 раза в день. В контрольной группе проводилось консервативное лечение ожога: Sol. Citrali 0,01%×4 раза в день, Corneregel×3 раза в день, Sol. Laevomycetini 0,25%×4 раза в день в течение первых 14 дней. Состояние животных оценивали динамически ежедневно в течение семи дней, последующие наблюдения проводили 2 раза в неделю в течение 30 суток.

Результаты

В ходе экспериментальных исследований были установлены особенности течения репаративных процессов глазной поверхности при таких видах патологии роговицы, как эрозия, химические (щелочной и кислотный) ожоги. Степень выраженности воспалительной реакции в опытной и контрольной группах была различной. В течение первых 5-ти суток после щелочного ожога в опытной группе сохранялась инъекция конъюнктивы, на 6 сутки отмечалась положительная динамика – инъекция конъюнктивы уменьшалась. В то время как в контрольной группе инъекция конъюнктивы уменьшалась в течение первых 6-ти суток и исчезала к 15 суткам. Кислотный ожог роговицы протекал с менее выраженной воспалительной реакцией, которая угасала к 5 суткам в обеих группах. При формировании эрозии инъекция была слабо выражена, воспалительная реакция угасала к 3-тним суткам как в опытной, так и в контрольной группе. Протяженность дефекта роговицы при щелочном ожоге роговицы определялась по площади окрашивания глазной поверхности в желтовато-зеленый цвет 0,5% раствором флюоресцеина натрия, характерного для отсутствия эпителиального покрова. Дефект ткани роговицы оставался глубоким на протяжении всего периода наблюдения и незначительно уменьшался в размерах к 30 суткам (контрольная группа), напротив, в опытной группе уже на 6 сутки после щелочного ожога роговицы отмечалась полная эпителизация. Восстановление эрозии роговицы в опытной группе наблюдалось ко 2 суткам, а в контрольной группе к 6 суткам. При формировании кислотного ожога роговицы дефекта роговицы не отмечалось. При щелочном ожоге рогови-

цы у 4-х кроликов (4 глаза) в опытной группе и у 3-х кроликов (3 глаза) в контрольной группе отмечалась неоваскуляризация. При формировании эрозии и кислотного ожога неоваскуляризации не было. Помутнение роговицы в опытной группе было интенсивным глубоким после щелочного ожога, а в контрольной группе поверхностным. Кислотный ожог не вызывал помутнения роговицы. Восстановление роговицы после эрозии не сопровождалось помутнением.

Светооптические и иммуноцитохимические исследования показали позитивное влияние «гиаматрикса» на фазы воспалительного процесса в поврежденной роговице. Это проявилось в оптимизации процессов эпителизации раневой зоны, стимуляции митотической активности базальных и шиповатых клеток переднего эпителия, лимитировании апоптотической доминанты эпителиоцитов и фибробластов собственного вещества роговицы.

На препаратах фрагмента роговицы кролика в условиях химического (щелочного) ожога на стадии 3 суток наблюдались десквамация клеток переднего эпителия, лимитирование эпителизации раневой поверхности роговицы отек и дисконфлексация волокон собственного вещества роговицы. В условиях химического (щелочного) ожога и применения «гиаматрикса» на стадии 6 суток были обнаружены эпителиальные пролифераты (погружного и покровного характера), новообразованный эпителиальный пласт в зоне повреждения тканей роговицы.

Иммуноцитохимическое исследование показало, что количество антиапоптотических клеток в опытной группе преобладало, наблюдалось уменьшение апоптотических клеток, в то время как в контрольной группе наблюдалась прямо противоположная динамика клеток апоптоза.

Заключение

Первые серии экспериментального исследования показали позитивное влияние «гиаматрикса» на репаративные процессы роговицы.

18.10.2012

Список литературы:

1. Ватников, Ю.А. Адгезивные гликопротеиды – новые вещества, стимулирующие репаративную регенерацию роговицы животных / Ватников Ю.А. Константиновский А.А. // Материалы 15 Московского международного ветеринарного конгресса по болезням мелких домашних животных. – Москва. – 2007., издательство ЗАО «Издательский дом». – С. 97-98.
2. Восстановление дефектов кожи у больных ладонно-подошвенным псориазом с помощью нового биопластического материала «гиаматрикс» / С.Н. Летута с соавт. / Экспериментальная клиническая дерматокосметология. – №3. – 2011. – С.52-54.

3. Душин, Н.В. Клиническое изучение возможностей межслойной пересадки роговой оболочки / Н.В. Душин // Автореф. дисс. ... к.м.н. – Москва. – 1990. – 25 с.
4. Зыбин, М.Е. Сквозная субтотальная кератопластика в лечении неотложных состояний роговицы / М.Е. Зыбин // Автореф. дисс. ... к.м.н. – Москва. – 2004. – 23 с.
5. Каноков, В.Н. Тектоническая кератопластика альтернативным донорским материалом / В.Н. Каноков, Е.Ф. Чеснокова // Вестник ОГУ. – 2004 – С.88-90.
6. Клаес, Х.Д. Искусственная роговица / Х.Д. Клаес // Новое в офтальмологии №1. – 2011. – С. 53-56
7. Севостьянов, А.Е. Использование фитоекдистероида (эксдистен) при заболеваниях роговицы с повреждением переднего эпителия (экспериментально-клиническое исследование) // автореф. дисс. ... к.м.н. – Самара. – 2010. – 24с.
8. Эгембердиев, М.Б. Структурная характеристика регенераторных процессов при щелочных ожогах роговицы и конъюнктивы глаза в условиях применения куриозина / М.Б. Эгембердиев // Автореф. дисс. ... к.м.н. – Новосибирск – 2005.– 24с.
9. Шамратова, А.Р. Гиалуроновая кислота в механизмах репаративной регенерации оптических сред глаза при ожоговой травме роговицы / А.Р. Шамратова // Автореф. дисс. ... к.б.н. – Уфа. – 2002. – 24с.

Сведения об авторах:

Каноков В.Н., доктор медицинских наук, профессор, директор Оренбургского филиала ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова Минздрава России, Заслуженный врач РФ, Почетный работник Высшего профессионального образования, академик РАМТН, РАЕН, ПАНИ, член-корреспондент РАПК, заведующий кафедрой медико-биологической техники ГБОУ ВПО Оренбургского государственного университета, заведующий Проблемной научно-исследовательской лабораторией «Экспериментально-гистологическое изучение биотрансплантатов в офтальмохирургии» Оренбургского филиала ЮУНЦ РАН, отличник здравоохранения республики Казахстан

Стадников А.А., доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, действительный член Международной академии информатизации (НА), член-корреспондент Российской академии естествознания, член Международного общества Neuroscience, Соровский профессор (1998); заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, заведующий лабораторией функциональной морфологии клетки Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, директор Оренбургского филиала ЮУНЦ РАН

Трубина О.М., кандидат медицинских наук, доцент, врач-офтальмолог высшей категории, заместитель директора Оренбургского филиала ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова Минздрава России по научной работе, член-корреспондент РАЕН

Яхина О.М., аспирант ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова Минздрава России

UDC 617.713-089.843-003.93

Kanyukov V.N., Stadnikov A.A., Trubina O.M., Yakhina O.M.

PECULIARITIES OF CORNEA REGENERATION AT APPLICATION OF BIOPLASTIC MATERIAL ON THE BASE OF HYALURONIC ACID

There were simulated chemical (alkalotic and acid) cornea burns in experiment. Comparative analysis of this pathology treatment with «hyamatrix» application and conservative treatment with keratoplastic means was carried out. We noticed peculiarities of cornea reparative regeneration at new method of treatment application.

Key words: cornea diseases, «hyamatrix», eye burns, experimental and histological investigation, hyaluronic acid.

Bibliography:

1. Vatnikov, Yu.A. Adhesive glycoproteids – new agents stimulating reparative regeneration of animal cornea. / Vatnikov Yu.A. Konstantinovskiy A.A. // Materials of 15 Moscow international veterinarian congress at diseases of small pets. – Moscow. – 2007., ZAO «Izdatelskiy dom». – P. 97-98.
2. Recovery of skin defects at patients with palmoplantar psoriasis with the help of new bioplastic material «hyamatrix» / S.N.Letuta et al. / Experimental clinical dermatocosmetology. – №3. – 2011. – P.52-54.
3. Dushin, N.V. Clinical investigation of possibilities of cornea membrane interlayer transplantation / N.V.Dushin // Author's abstract ... cand. of med. sciences. – Moscow. – 1990. – 25 p.
4. Zybin, M.E. Penetrated subtotal keratoplasty in treatment of urgent cornea states / M.E.Zybin // Author's abstract ... cand. of med. sciences. – Moscow. – 2004. – 23 p.
5. Kanyukov, V.N. Tectonic keratoplasty by alternative donor material. / V.N.Kanyukov, E.F.Chesnokova // Vestnik OSU. – 2004 – P.88-90.
6. Klaves, Kh.D. Artificial cornea / Kh.D. Klaves // New in ophthalmology №1. – 2011. – P. 53-56
7. Sevostyanov, A.E. Application of phytoecdysteroids (ecdysten) at diseases of cornea with anterior epithelium damages (experimental and clinical investigation) // Author's abstract ... cand. of med. sciences – Samara. – 2010. – 24p.
8. Egemberdiyev, M.B. Structural characteristics of regenerative processes of cornea and eye conjunctiva under curiosin application circumstances. / M.B. Egemberdiyev // Author's abstract ... cand. of med. sciences – Novosibirsk – 2005.– 24p.
9. Shamratova, A.R. Hyaluronic acid in mechanisms of reparative regeneration of eye optic spheres at cornea burning injury / A.R. Shamratova // Author's abstract ... cand. of biol. sciences. – Ufa. – 2002. – 24p.