

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-1-66-69>
УДК 615: 617.713

Морфологическая оценка изменений в роговице экспериментальных животных после ультрафиолетового кросслинкинга

А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов

ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», Уфа

РЕФЕРАТ

Цель. Исследовать динамику морфологических изменений в роговице крыс после ее ультрафиолетового кросслинкинга с использованием различных растворов фотосенсибилизатора.

Материал и методы. Исследования проведены на 20 крысах в трех группах: в первой группе для насыщения использовали 0,1%-й раствор рибофлавина, во второй – 0,1%-й рибофлавин и 20%-й декстран; третья – интактные (контроль). Воспроизводили модель стандартного УФ кросслинкинга (370 нм, 3 мВт/см², 10 мин.) с депителизацией роговицы диаметром 3 мм. Обработку гистоматериала проводили по общепринятой методике на 3, 7 и 30 сутки после вмешательства. Гистологические срезы толщиной 1-4 мкм готовили на ротационном микротоме RM 2145 (Leica Microsystems, Германия), окра-

шивали гематоксилином-эозином и по методу Ван Гизона. Световая микроскопия проводилась с помощью микроскопа LEICA DM 2500 с цифровой фотокамерой LEICA DFC 450 (Leica Microsystems, Германия).

Результаты. Основные морфологические изменения роговицы крыс после УФ кросслинкинга с 0,1%-м раствором рибофлавина были связаны с разрыхлением пучков коллагеновых волокон, обусловленные развитием отека стромы в ранний послеоперационный период (3-7 сут.), сохраняющегося до 30 суток эксперимента. Морфологической особенностью применения раствора Декстралинк в процессе кросслинкинга роговицы является менее выраженное разволокнение стромы, связанное с дегидратирующим эффектом декстрана. В обеих группах установлено снижение плотности кератоцитов стромы.

Ключевые слова: роговица, ультрафиолетовый кросслинлинг роговицы, морфология роговицы. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;1:66–69.

ABSTRACT

Morphological assessment of changes in the cornea of experimental animals after ultraviolet corneal cross-linking

A.R. Khalimov, E.L. Usubov

Ufa Eye Research Institute, Ufa

Purpose. To investigate the dynamics of morphological changes in the rat cornea after its ultraviolet cross-linking using various photosensitizer solutions.

Material and methods. Studies were conducted on 20 rats in three groups. In the first group, 0.1% Riboflavin solution was used for saturation, in the second – 0.1% Riboflavin and 20% dextran; the third – intact (control). A UV cross-linking model (370 nm, 3 mW/cm², 10 min) with corneal deepithelization with a diameter of 3 mm was used. Histomaterial processing was performed according to the standard procedure on the 3rd, 7th, and 30th days after surgery. Histological sections 1-4 microns thick were prepared on a rotary microtome RM 2145 (Leica Microsystems, Germany), stained with hematoxylin-eosin and using the van Gieson method. Light microscopy was performed using a

LEICA DM 2500 microscope with a Leica DFC 450 digital camera (Leica Microsystems, Germany).

Results. The main morphological changes in the rat cornea after UV cross-linking with 0.1% Riboflavin solution were associated with loosening of bundles of collagen fibers. This was caused by the development of stroma edema in the early postoperative period (3-7 days), which persisted up to 30 days of the experiment. A morphological feature of the use of Dextralink solution in corneal cross-linking is less pronounced stroma disfoliation, which is associated with the dehydrating effect of dextran. In both groups, a decrease in the density of stroma keratocytes was found.

Key words: cornea, ultraviolet corneal cross-linking, corneal morphology. ■

Point of View. East – West. 2021;1:66–69.

Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы успешно применяется с целью приостановки прогрессирования кератэкта-

зий. Способ основан на комбинированном воздействии ультрафиолетового (УФ) излучения длиной волны 370 нм и фотосенсибилизатора ри-

бофлавина на оптическую оболочку глаза [1]. В результате происходит повышение прочностно-механических свойств роговицы за счет фо-

тохимического «сшивания» коллагеновых фибрилл стромы [2].

Метод хорошо зарекомендовал себя в клинической практике, однако описаны случаи, в которых кросслинкинг мог быть причиной развития ряда осложнений, таких как кератомалация, кератопатия или эндотелиальная дистрофия [3, 4]. Было показано, что после кросслинкинга в наиболее чувствительной, лимбальной зоне роговицы наблюдается уменьшение числа жизнеспособных клеток [5] и снижается способность эпителиоцитов лимба к делению [6]. Вместе с тем имеются сведения, что УФ кросслинкинг не вызывает значимого клеточного эпителиального повреждения, а лимбальные и эндотелиальные клетки не претерпевают никаких превращений [7].

Очевидно, что морфологические и физиологические изменения в роговице после кросслинкинга могут весьма отличаться [8]. S. Kling et al. [9] отмечают, что основными кросслинкинг-опосредованными факторами, влияющими на особенности функционального состояния оптической оболочки, являются ее исходная толщина, флюенс УФ облучения и качество пропитывания стромы рибофлавином, которое зависит от техники дезэпителизации роговицы [10]. Общеизвестно, что в свете возникающих противоречий при описании результатов УФ сшивания, необходимы дальнейшие углубленные исследования кросслинкинг-индуцированных изменений в роговице, в частности, морфологического характера. В связи с этим, с научной точки зрения весьма значимым может быть воспроизведение экспериментальных моделей кросслинкинга на лабораторных животных [9, 11].

ЦЕЛЬ

Исследовать морфологические изменения в роговице крыс после ее ультрафиолетового кросслинкинга с использованием различных растворов фотосенсибилизатора.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 15 крысах-самцах линии Вистар весом

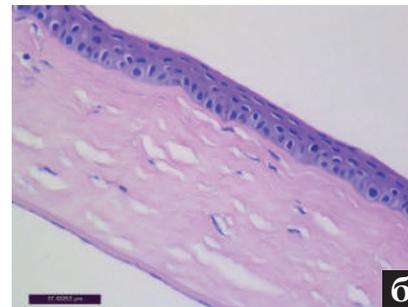
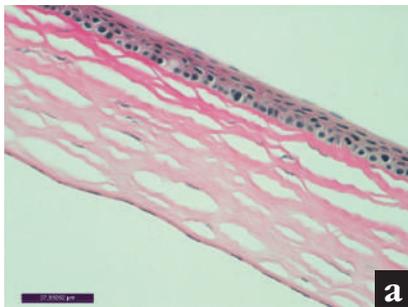


Рис. 1. Гистологическая картина роговицы крыс. 3-и сутки после УФ кросслинкинга с рибофлавиновым изотоническим (а) и раствором Декстрилинк (б). В обоих случаях отмечается отек стромы роговицы, снижение плотности кератоцитов. Окраска по Ван Гизону (а), гематоксилином и эозином (б)

280-320 г. Животные были разделены на 3 группы: в первой (8 крыс, 16 глаз) группе строму роговицы насыщали 0,1%-м раствором рибофлавина. Во второй (8 крыс, 16 глаз) группе в качестве фотосенсибилизатора использовали раствор «Декстрилинк», содержащий 0,1%-й рибофлавин и 20%-й декстран. И, наконец, третья (4 крысы, 8 глаз) группа была контрольной (интактные глаза).

Модель стандартного УФ кросслинкинга роговицы глаза крыс *in vivo* воспроизводилась под наркозом («Ксилазин», Беларусь) и местной анестезией («Инокаин», Индия). Дезэпителизация проводилась микрохирургическим шпателем на участке роговицы, отмеченном метчиком диаметром 3 мм с использованием операционного микроскопа Carl Zeiss (Германия). Облучение роговицы выполнялось с помощью устройства «УФалинк» (Россия) длиной волны 370 нм при мощности 3 мВт/см² в течение 10 минут. В послеоперационном периоде двукратно в течение 3 дней закапывались антибактериальные средства (0,5%-й левофлоксацин).

Энуклеацию глазных яблок производили у животных, предварительно выведенных из опыта передозировкой паров эфира, на 3, 7 и 30 сутки после вмешательства. Энуклеированные глаза фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Производили обезвоживание гистоматериала в спиртах возрастающей концентрации, проводку и заливку в парафин выполняли по общепринятым методикам. Гистологические срезы толщиной 1-4 мкм готовили на ротационном микротоме RM 2145 (Leica Microsystems, Гер-

мания), окрашивали гематоксилином-эозином и по методу Ван Гизона. Световая микроскопия гистологических срезов проводилась с помощью микроскопа LEICA DM2500 с цифровой фотокамерой LEICA DFC 450 (Leica Microsystems, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Во всех группах животных на 2-3 сутки после кросслинкинга наблюдалось полное восстановление эпителия роговицы, механически удаленного перед выполнением этапа УФ облучения.

В роговице большинства экспериментальных животных первой группы на 3-и сутки после процедуры обнаруживали морфологические изменения в виде выраженного отека стромы и незначительной инфильтрации. В 2 случаях отмечали утолщение десцеметовой мембраны. В эпителии определялись все слои клеток (*рис. 1 а*). Седьмые сутки после кросслинкинга роговицы крыс характеризовались снижением клеточной инфильтрации стромы; сохранялись явления отека пучков коллагеновых волокон (*рис. 2 а*), который наблюдали до 30-х суток эксперимента. При этом регистрировали снижение относительной плотности кератоцитов. Структура роговицы в целом соответствовала норме, эндотелиальные клетки – без изменений (*рис. 3 а*).

Во 2-й группе на 3-и сутки после УФ кросслинкинга с раствором Декстрилинк визуализировался полностью восстановленный эпителиальный покров с дифференциацией всех слоев. Однако имели место

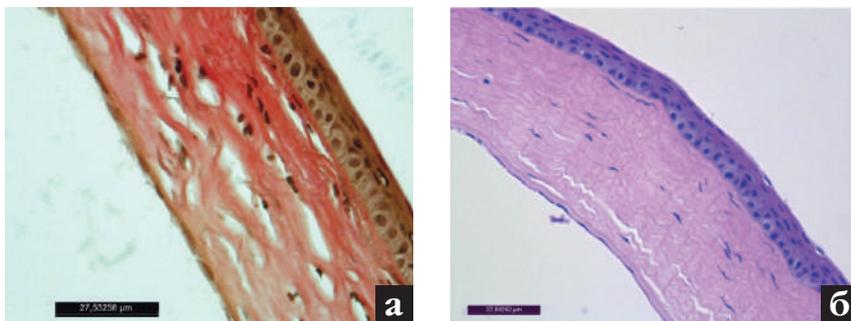


Рис. 2. Гистологическая картина роговицы крыс. 7-е сутки после УФ кросслинкинга: а – с рибофлавином изоосмотическим, отмечается значительный отек стромы роговицы; б – с раствором Декстралинк, менее значимый отек стромы. Окраска по Ван Гизону (а), гематоксилином и эозином (б)

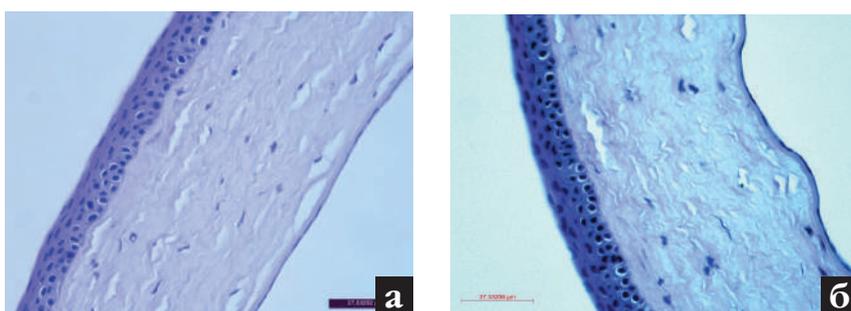


Рис. 3. Гистологическая картина роговицы крыс. 30-е сутки после УФ кросслинкинга: А – с рибофлавином изоосмотическим, отмечается отек стромы роговицы; Б – с раствором Декстралинк, очаговый характер отечности стромы. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б)

небольшие изменения формы клеток базального слоя. Строма роговицы была представлена пучками волокон коллагена с явлениями отека, выраженность которого была значительно меньше, чем в 1-й группе (рис. 1 б). На 7-е сутки видимых патоморфологических изменений в эпителии роговицы не отмечали. Архитектоника роговичных пластин стромы роговицы была близка к показателям контроля. Сохранялось некоторое набухание пучков коллагеновых волокон, которое в ряде гистопрепаратов затрагивало глубокие ламеллярные слои, прилегающие к десцеметовой мембране. Эндотелий роговицы визуализировали в виде непрерывного слоя (рис. 2 б). На 30-е сутки эксперимента эпителиальный покров роговицы имел обычное строение (рис. 3 б). Отечность стромы роговицы приобретала очаговый характер. Восстановления дооперационной популяции кератоцитов не отмечали. В эндотелии каких-либо патологических изменений не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные морфологические изменения роговицы крыс после УФ кросслинкинга с 0,1%-м раствором рибофлавина были связаны с разрыхлением пучков коллагеновых волокон, обусловленные развитием отека стромы в ранний период (на 3-7-е сутки). При этом явления незначительного набухания стромы сохранялись до 30 суток наблюдений.

Имеются данные исследований кадаверных глаз человека *ex vivo* после стандартного УФ кросслинкинга, которые также показали нарушение правильной архитектоники волокон коллагена с наличием разволокнения структуры стромы и гибели кератоцитов в передних слоях роговицы [12].

G. Wollensak et al. [13] называют одним из главных патоморфологических эффектов УФ кросслинкинга роговицы потерю кератоцитов, которую они наблюдали в пределах

передней и средней (до 300 мкм) стромы роговицы кроликов в условиях рибофлавин-УФ-дозозависимого воздействия.

Особенностью морфологии роговицы крыс после УФ кросслинкинга с препаратом Декстралинк был менее существенный, по сравнению с использованием обычного раствора рибофлавина, отек слоев стромы на 3-7-е сутки наблюдения. Ранее было описано характерное декстран-опосредованное снижение гидратации тканей роговицы под действием Декстралинка [14].

Методом конфокальной прижизненной микроскопии было показано, что у пациентов с кератоконусом в раннем послеоперационном периоде (через 7 суток) после кросслинкинга с рибофлавин-декстраном определялись признаки эпителиопатии с полиморфизмом клеток базального эпителия. Отмечено снижение общего количества кератоцитов передних и средних слоев стромы [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфологические изменения роговицы крыс после стандартного УФ кросслинкинга с раствором рибофлавина были связаны с разрыхлением пучков волокон коллагена, обусловленные развитием отека стромы в ранний (3-7-е сутки) период наблюдений, сохраняющегося до 30 суток эксперимента. Кросслинкинг с раствором Декстралинк вызывает менее выраженное разволокнение стромы, обусловленное противоотечным эффектом полимера декстран. В обеих группах установлено снижение плотности кератоцитов передних и средних слоев стромы роговицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am. J. Ophthalmol.* 2003; 135(5): 620-627.
2. Бикбоб М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2016; 71(3): 224-232.
3. Gokhale N., Vemuganti G. Diclofenac-induced acute corneal melt after collagen crosslinking for keratoconus. *Cornea.* 2010; 29(1): 117-119.

4. Al-Amry M., Mudhaiyan T., Al-Huthail R., Al-Ghadeer H. Infectious crystalline keratopathy after corneal cross-linking. Middle East Afr. J. Ophthalmol. 2017; 24(2): 100-102.

5. Vimalin J., Gupta N., Jambulingam M., Padmanabhan P., Madhavan H. The effect of riboflavin-UV-A treatment on corneal limbal epithelial cells-A study on human cadaver eyes. Cornea. 2012; 31(9): 1052-1059.

6. Thorsrud A., Nicolaissen B., Drolsum L. Corneal collagen crosslinking in vitro: inhibited regeneration of human limbal epithelial cells after riboflavin-ultraviolet-A exposure. J. Cataract. Refract. Surg. 2012; 38(6): 1072-1076.

7. Wollensak G., Mazzotta C., Kalinski T., Sel S. Limbal and conjunctival epithelium after corneal cross-linking using riboflavin and UVA. Cornea. 2011; 30(12): 1448-1454.

8. Халимов А.Р., Суркова В.К., Халимова Л.И. Морфологические изменения в ро-

говице при кератоконусе. Научно-практический журнал «Точка зрения. Восток-Запад». 2019; (1): 82-84.

9. Kling S., Hammer A., Conti A., Hafezi F. Corneal cross-linking with riboflavin and UV-A in the mouse cornea in vivo: morphological, biochemical, and physiological analysis. Transl. Vis. Sci. Technol. 2017; 6(1): 1-15.

10. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. Динамика уровня рибофлавина во влаге передней камеры глаза экспериментальных животных при стандартном насыщении стромы растворами для УФ кросслинкинга роговицы. Вестник офтальмологии. 2016; 132(6): 29-35.

11. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Муслимов С.А. Морфологическая оценка изменений в роговице после кросслинкинга. Морфология. 2016; 149(3): 35.

12. Зотов В.В., Сальников В.В., Поздеева Н.А. Изменения ультраструкту-

ры стромы роговицы после проведения кросслинкинга. Офтальмология. 2012; 1: 95-96.

13. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M., Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. Cornea. 2004; 23(1): 43-49.

14. Халимов А.Р. Роль декстрана в офтальмологическом растворе рибофлавина для УФ кросслинкинга роговицы. Научно-практический журнал «Точка зрения. Восток-Запад». 2018; 1: 136-138.

15. Бикбова Г.М., Заболотная В.А. Гистоморфология роговицы в отдаленный период после кросслинкинга по поводу кератоконуса. Сборник научн. трудов научно-практич. конф. с международным участием по офтальмохирургии «Восток-Запад». Уфа; 2011: 64-67.



УФИМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

3-4 ИЮНЯ
ОНЛАЙН

ВОСТОК-ЗАПАД

МЕЖДУНАРОДНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
ПО ОФТАЛЬМОЛОГИИ



www.eastwestufa.ru

east-west-ufa@yandex.ru

www.ufaeyeinstitute.ru

ufaeyenauka@mail.ru

450008, г. Уфа, ул. Пушкина, 90

тел. (347) 273-49-97