

МЕХАНИЗМЫ ЗАЖИВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ РОГОВИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОКРЫТИЯ СИЛИКОВЫСУШЕННОЙ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОЙ**Е.С. Милюдин, Д.А. Дроздетская**

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара

Для цитирования: Милюдин Е.С., Дроздетская Д.А. Механизмы заживления дефектов роговицы с использованием покрытия силиковысушенной амниотической мембраной // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 1–2. – С. 80–84. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.1.80-84>

Поступила: 04.02.2019

Одобрена: 28.02.2019

Принята: 18.03.2019

▪ **Цель** данного исследования — изучение механизма заживления дефекта эпителия роговицы с использованием силиковысушенной амниотической мембраны на цитоморфологическом уровне. На базе больницы ГБУЗ СОКОБ им. Т.И. Ерошевского наблюдались 7 пациентов, составивших исследуемую группу, с рецидивирующими трофическими язвами эпителия и стромы роговицы которым было выполнено покрытие дефекта роговицы силиковысушенной амниотической мембраной. Контрольная группа из 5 пациентов с таким же диагнозом получала терапию без покрытия амниотической мембраной. Контроль за регенерацией дефектов роговицы осуществлялся путем биомикроскопии с окрашиванием флюоресцеином, а также с помощью цитологического исследования мазков-отпечатков с поверхности роговицы на 1-й, 7-й и 15-й день после начала лечения. Наблюдение за пациентами продолжалось в течение 6 месяцев в амбулаторных условиях.

Результаты. Цитоморфологическое исследование на 1-й день после покрытия роговицы амниотической мембраной показало наличие отдельных длинных отростчатых клеток неправильной формы, у контрольной группы наряду с пластами более мелких эпителиальных клеток определялись множественные нейтрофилы. К 7-му дню на цитограммах у пациентов исследуемой группы обнаружены зрелые клетки, у больных контрольной группы в мазках-отпечатках наблюдались эпителиальные клетки округлой формы, с более темной цитоплазмой и с большим количеством включений. На 15-й день у пациентов обеих групп цитограммы практически не отличались. При дальнейшем наблюдении в течение 6 месяцев у пациентов контрольной группы отмечались рецидивирующие дефекты эпителия роговицы с присоединением воспалительного процесса, что у исследуемой группы не выявлено.

Выводы. Силиковысушенная амниотическая мембрана способствует увеличению количества эпителиоцитов, перемещению и прочной фиксации их на поверхности роговицы, а также уменьшению воспалительного процесса.

▪ **Ключевые слова:** силиковысушенная амниотическая мембрана; трофические язвы роговицы; регенерация роговицы.

MECHANISMS OF HEALING OF CORNEAL DEFECTS WITH THE USE OF SILICA DESICCATION AMNIOTIC MEMBRANE**E.S. Milyudin, D.A. Drozdetskaya**

Samara State Medical University, Samara, Russia

For citation: Milyudin ES, Drozdetskaya DA. Mechanisms of healing of corneal defects with the use of silica desiccation amniotic membrane. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2019;(1-2):80-84. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.1.80-84>

Received: 04.02.2019

Revised: 28.02.2019

Accepted: 18.03.2019

▪ **The purpose of this work** is to study the mechanism of healing of corneal epithelium defect by using silica desiccation amniotic membrane at the cytomorphological level. 7 patients of Samara Regional Clinical Ophthalmologic Hospital named after T.I. Eroshevsky formed the main group of the performed study. They were diagnosed with recurrent trophic ulcers of the epithelium and corneal stroma. Their corneal defects were covered with the silica desiccation amniotic membrane. A control group included 5 patients with the same diagnosis. They were observed and treated without amniotic membrane application. Control over the regeneration of corneal defects was carried out by biomicroscopy with fluorescein staining, as well as by cytological examination of impression smears from the surface of the cornea on the 1st, 7th and 15th day after the treatment onset. Patient were being followed up for 6 months.

Results. Cytomorphological examination on the 1st day after covering the cornea with the amniotic membrane showed the presence of separate long cells of irregular shape. Both layers of smaller epithelial cells and multiple neutrophils were revealed in the control group. By the 7th day cytograms of the patients in the main group had shown mature cells, impression smears in patients of the control group demonstrated epithelial cells of round shape with darkened

cytoplasm and a large number of inclusions. On the 15th day cytograms of patients of both groups almost did not differ. During the following 6 months' observation recurrent corneal epithelial defects with the inflammatory process were noted in patients of the control group. The main group didn't show such conditions. **Conclusions.** Silica desiccation amniotic membrane contributes to the increase in the number of epithelial cells, movement and their firm fixation on the corneal surface as well as reduction of the inflammatory process.

▪ **Keywords:** silica desiccation amniotic membrane; trophic corneal ulcers; corneal regeneration.

Введение

Проблема лечения язв роговицы различной этиологии на сегодняшний день весьма актуальна как в России, так и за рубежом [6]. Чистые трофические язвы роговицы (не осложненные бактериальной флорой) встречаются гораздо реже, чем инфицированные, довольно длительно протекают без выраженной воспалительной симптоматики, особенно если дефект локализуется в парацентральной зоне. Такие язвы роговицы отличаются особой тяжестью клинического течения, неоднократными рецидивами и частыми неблагоприятными исходами [3]. Покрытие амниотической мембраной эпителиальных дефектов ускоряет сроки эпителизации ран, способствует клеточной миграции, пролиферации и ремоделированию тканей, что обусловлено биологически активными веществами, входящими в состав амниотической мембраны [1]. С повреждением или частичной утратой передней пограничной мембраны дефекты роговицы сопровождаются воспалительной реакцией, что замедляет восстановление стромы, а также эпителиального покрова роговицы [5]. Стромальная ткань восстанавливается после регенерации поверхностного слоя эпителия, а эпителий регенерирует по передней пограничной мембране. Амниотическое покрытие позволяет моделировать, протезировать и временно создавать условия для образования новой передней пограничной мембраны, а также миграции и закрепления на ее поверхности молодых эпителиоцитов. Амниотическая мембрана обладает всеми необходимыми свойствами биологической подложки. Прежде всего, в структуре амниона, так же как и в структуре роговицы, содержатся коллаген I, III, IV, V и VII типов, ламины, фибронектин. К. Fukuda et al. в 1999 г. доказали схожесть структуры ламинина-1,-5, фибронектина и коллагена VII типа в базальных мембранах конъюнктивы, роговицы и амниотической мембраны, что объясняет высокую способность амниона к биоинтеграции в ткани глаза. Данные гликопротеиды способствуют адгезии к внеклеточному матриксу клеток регенерирующего эпителия [2; 4, с. 49].

Цель данного исследования — изучение механизма регенерации дефекта эпителия

при лечении трофических язв роговицы глаза с покрытием силиковысушенной амниотической мембраной.

Материал и методы

Дизайн исследования: проведено проспективное исследование типа «случай-контроль» на базе травматологического отделения больницы ГБУЗ СОКОБ им. Т.И. Ерошевского г. Самара. Проведенное исследование получено на основании данных, собранных за 2018 г. За данный период с трофическими язвами наблюдалось 15 пациентов. Из них в наше исследование были включены 12 пациентов.

Критерии включения: неоднократно рецидивирующие трофические язвы роговицы различной этиологии, возраст пациентов до 60 лет, отсутствие у пациентов за последние 6 месяцев острых бактериальных, грибковых и вирусных сопутствующих заболеваний, информированное добровольное согласие на участие в исследовании. **Критерии исключения:** активная форма воспаления трофических язв, системные хронические заболевания в фазе обострения, отказ от участия в исследовании. **Критерии оценки эффективности:** наличие полной эпителизации на 15-й день послеоперационного периода, срок закрытия дефекта роговицы, частота рецидивов в течение 6 месяцев после проведенного лечения.

Средний возраст пациентов составил 43 ± 5 года. При поступлении все больные подвергались стандартному офтальмологическому обследованию и консервативному лечению в течение трех дней, после чего рандомизированным способом были разделены на две группы. В исследуемой группе наблюдались 7 человек (7 глаз) с неоднократно рецидивирующими дефектами эпителия и стромы роговицы (язва роговицы трофическая). Пациентам из исследуемой группы было выполнено покрытие дефекта роговицы силиковысушенной амниотической мембраной. Метод покрытия дефекта роговицы амниотической мембраной прост и доступен в условиях реальной клинической практики врача-офтальмолога. В первую очередь выполняют асептическую обработку операционного поля, анестезию 2 %

раствором лидокаина и устанавливают веко-расширитель. Выкраивают лоскут силиковосушенной амниотической мембраны округлой формы диаметром, равным диаметру поврежденного участка роговицы. Трофическую язву очищают от некротизированных тканей, накладывают на подготовленное ложе амниотическую мембрану и фиксируют ее на поверхности узловыми швами. Возможна модификация — фиксация мягкой контактной линзой вместо фиксации узловыми швами. После этого в некоторых случаях выполняют частичную блефарографию с наложением асептической повязки. Помимо наложения амниотической мембраны пациенты получали противовоспалительное и кератопластическое лечение.

Контрольная группа включала больных с таким же диагнозом — 5 человек (5 глаз). Пациентам контрольной группы проведено противовоспалительное и кератопластическое лечение, но без покрытия амниотической мембраной.

Острота зрения не являлась критерием наблюдения, так как у всех пациентов очаг повреждения располагался на неоднотипных участках роговицы, как с захватом оптической зоны, так и на периферии.

Контроль за регенерацией дефектов роговицы осуществлялся путем биомикроскопии с окрашиванием флюоресцеином, а также с помощью цитологического исследования мазков-отпечатков с поверхности роговицы. Мазки-отпечатки с поверхности роговицы у исследуемой и контрольной группы на 1-й, 7-й и 15-й день от начала лечения окрашены гематоксилин-эозином и изучены под свето-

вым микроскопом. Наблюдение за пациентами двух групп продолжалось в течение 6 месяцев в амбулаторных условиях.

Результаты и обсуждение

Обследование щелевой лампой на первый день после покрытия роговицы силиковосушенной амниотической мембраной у больных исследуемой группы показало сохранение дефекта эпителия, но была отмечена тенденция к закрытию дефекта. У контрольной группы при обследовании с помощью щелевой лампы динамики не наблюдалось. Цитоморфологическое исследование, выполненное на данный срок, показало наличие отдельных длинных отростчатых эпителиоцитов неправильной формы у пациентов исследуемой группы (рис. 1).

У больных контрольной группы в мазках-отпечатках через день после начала кератопластического лечения наряду с пластинами более мелких эпителиальных клеток определялись множественные клетки воспалительного типа — нейтрофилы (рис. 2).

Биомикроскопия на 7-й день у всех больных исследуемой группы выявила отсутствие эпителиального дефекта роговицы. У четырех пациентов контрольной группы наблюдалось частичное закрытие дефекта роговицы, и лишь у одного отмечено отсутствие эпителиального дефекта. К 7-му дню на цитogramмах у пациентов после покрытия силиковосушенной амниотической мембраной обнаружены зрелые клетки, характерные для поверхностных слоев эпителиального покрова роговицы (рис. 3).

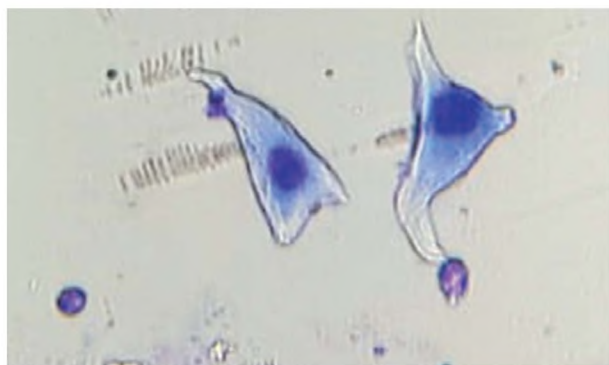


Рис. 1. Цитогамма больной А. Диагноз: OD трофическая язва роговицы. Вторые сутки после покрытия силиковосушенной амниотической мембраной. Окраска Лейкодиф 200 (LDF 200). Увеличение $\times 400$.

Fig. 1. Cytogram of the patient A. Diagnosis: OD trophic corneal ulcer. The second day after coating with silica desiccation amniotic membrane. Leucodif 200 staining (LDF 200). 400X magnification

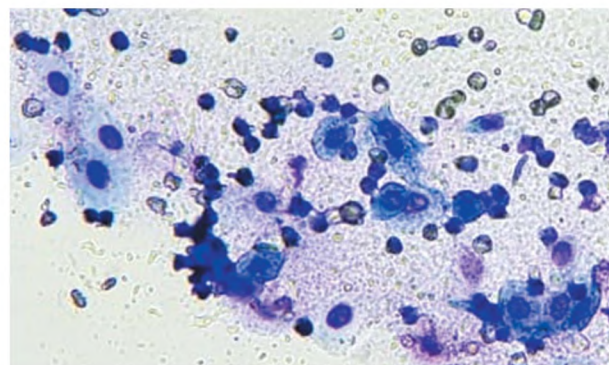


Рис. 2. Цитогамма больной Р. Диагноз: OS трофическая язва роговицы. Третьи сутки после начала консервативной терапии. Окраска Лейкодиф 200 (LDF 200). Увеличение $\times 400$.

Fig. 2. Cytogram of the patient R. Diagnosis: OS trophic corneal ulcer. The third day after the conservative therapy onset. Leucodif 200 staining (LDF 200). 400X magnification

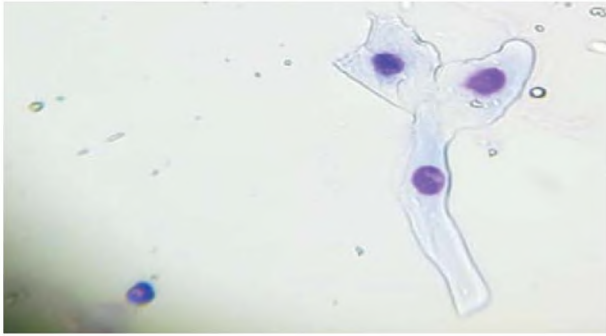


Рис. 3. Цитограмма больной Р. Диагноз: OD трофическая язва роговицы. 10 суток после покрытия силиковывсушенной амниотической мембраной. Окраска Лейкодиф 200 (LDF 200). Увеличение $\times 400$

Fig. 3. Cytoqram of the patient R. Diagnosis: OD trophic corneal ulcer. 10 days after coating with silica desiccation amniotic membrane. Leucodif 200 staining (LDF 200). 400X magnification

На 7-й день консервативного лечения в мазках-отпечатках больных контрольной группы наблюдались эпителиальные клетки округлой формы, меньшие по размеру, чем на мазках-отпечатках более ранних сроков, с более темной цитоплазмой, и сохранялись единичные нейтрофилы (рис. 4).

Анализ цитоморфологического исследования у пациентов контрольной группы позволяет сделать вывод о сохранении признаков воспалительного процесса.

Эффективность лечебных мероприятий выявлена у 7 человек (100 %) из исследуемой группы и у 1 человека из контрольной группы ($p = 0,004$).

На 15-й день при биомикроскопии пациентов обеих групп наличие эпителиального

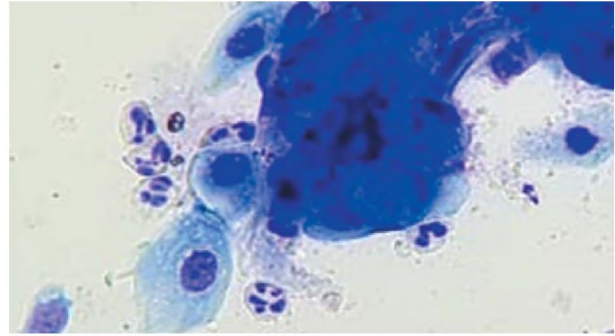


Рис. 4. Цитограмма больной Н. Диагноз: OD трофическая язва роговицы. 10 суток после начала консервативной терапии. Окраска Лейкодиф 200 (LDF 200). Увеличение $\times 400$

Fig. 4. Cytoqram of the patient N. Diagnosis: OD trophic corneal ulcer. 10 days after the conservative therapy onset. Leucodif 200 staining (LDF 200). 400X magnification

дефекта роговицы не обнаружено. У трех пациентов исследуемой группы наблюдалось небольшое поверхностное нарушение прозрачности роговицы, в то время как у всех пациентов контрольной группы обнаружено более плотное и распространенное помутнение роговицы. Цитограммы пациентов обеих групп практически не отличались (рис. 5) и характеризовались наличием зрелых эпителиоцитов. Однако у больных контрольной группы (рис. 6) слущенные эпителиоциты наблюдались в виде конгломератов округлой формы ($p = 0,039$).

Более выраженное формирующееся помутнение роговицы у пациентов контрольной группы, по нашему мнению, объясняется замедленной эпителизацией дефектов и более выраженным воспалительным процессом.

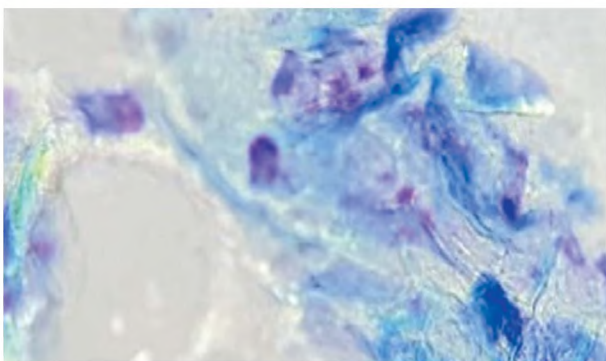


Рис. 5. Цитограмма больной Р. Диагноз: OD трофическая язва роговицы. 15 суток после покрытия силиковывсушенной амниотической мембраной. Окраска Лейкодиф 200 (LDF 200). Увеличение $\times 400$

Fig. 5. Cytoqram of the patient R. Diagnosis: OD trophic corneal ulcer. 15 days after coating with silica desiccation amniotic membrane. Leucodif 200 staining (LDF 200). 400X magnification

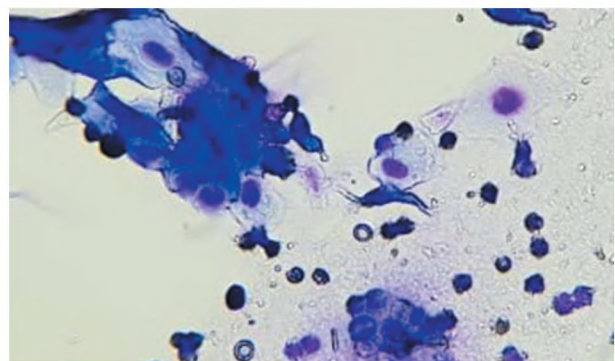


Рис. 6. Цитограмма больной Н. Диагноз: OD трофическая язва роговицы. 15 суток после начала консервативной терапии. Окраска Лейкодиф 200 (LDF 200). Увеличение $\times 400$

Fig. 6. Cytoqram of the patient N. Diagnosis: OD trophic corneal ulcer. 15 days after the conservative therapy onset. Leucodif 200 staining (LDF 200). 400X magnification

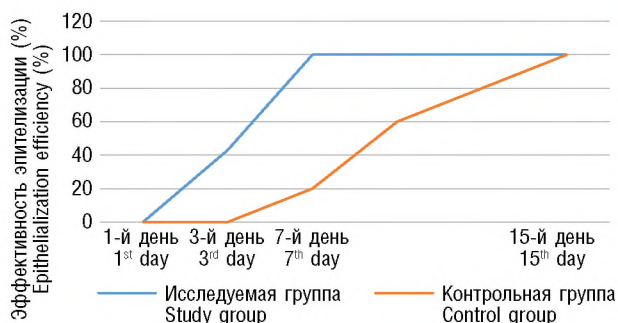


Рис. 7. Зависимость эффективности эпителизации от времени послеоперационного периода в исследуемой и контрольной группах

Fig. 7. The dependence of the epithelialization efficiency on the postoperative period in the study and control groups

Дефект эпителия замещался у всех 7 пациентов исследуемой группы (7 глаз — 100 %) к 5–7-му дню после покрытия силиковысушенной амниотической мембраной. Эпителизация у пациентов контрольной группы завершалась на 12–15-й день (рис. 7).

При наблюдении в амбулаторных условиях в течение последующих 6 месяцев у пациентов исследуемой группы рецидивов трофической язвы не отмечено. Однако у всех пациентов контрольной группы в течение периода наблюдения отмечались случаи рецидивирующих эрозий роговичного эпителия.

Выводы

Приведенные данные, несмотря на малую выборку, позволяют утверждать, что стойкий положительный эффект связан именно с тем, что амниотическая мембрана стимулирует пролиферацию эпителиоцитов и способствует их миграции с краев роговичного дефекта, а также более прочной фиксации эпителиальных клеток на поверхности роговицы.

Фиксация вновь образующихся зрелых эпителиальных клеток способствует ускорению восстановления стромальных дефектов роговицы у пациентов исследуемой группы.

Исследование механизмов стимуляции регенераторных процессов у пациентов с чистыми трофическими язвами роговицы с использованием цитоморфологического контроля планируется продолжить.

Конфликт интересов отсутствует.

Информация об авторах

Евгений Сергеевич Милюдин — доктор медицинских наук заместитель директора НИИ глазных болезней, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», Самара. E-mail: miljudin@mail.ru.

Дарья Андреевна Дроздетская — студентка 6 курса лечебного факультета, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», Самара. E-mail: dashush0k@rambler.ru.

Литература

1. Бржеская И.В., Сомов Е.Е. Коллагенолитическая активность конъюнктивальной жидкости у здоровых людей и больных с асептической язвой роговицы различной этиологии // РМЖ. Клиническая офтальмология». – 2018. – Т. 18. – № 2. – С. 77–80. [Brzheskaya IV, Somov EE. Collagenolytic activity of conjunctival fluid in healthy people and patients with aseptic ulcer of the cornea of various etiologies. *RMZh. Klinicheskaya oftal'mologiya*. 2018;18(2):77-80. (In Russ.)]
2. Волова Л.Т., Золотарев А.В., Российская В.В., и др. Метод получения культуры клеток роговичного эпителия, фиксированного на поверхности силиковысушенной амниотической мембраны // Сборник трудов научно-практической конференции «Регенеративная медицина и трансплантация тканей в офтальмологии». – М., 2005. – С. 14–15. [Volova LT, Zolotarev AV, Rossiyskaya VV, et al. Metod polucheniya kul'tury kletok rogovichnogo epiteliya, fiksirovannogo na poverkhnosti silikovysushennoy amnioticheskoy membrany. In: *Sbornik trudov nauchno-prakticheskoy konferentsii "Regenerativnaya meditsina i transplantatsiya tkaney v oftal'mologii"*. Moscow, 2005. P. 14-15. (In Russ.)]
3. Милюдин Е.С., Золотарев А.В., Милюдин А.Е. Возможности местной иммуносупрессии при повторной кератопластике // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2014. – Т. 14. – № 3. – С. 160–164. [Milyudin ES, Zolotarev AV, Milyudin AE. Possibilities of local immunosuppression in repeated keratoplasty. *RMZh. Klinicheskaya oftal'mologiya*. 2014;14(3):160-164. (In Russ.)]
4. Милюдин Е.С., Кучук К.Е., Братко О.В. Консервированная амниотическая мембрана в структуре тканеинженерного комплекса переднего эпителиального слоя роговицы // Пермский медицинский журнал. – 2016. – Т. 33. – № 5. – С. 47–53. [Milyudin ES, Kuchuk KE, Bratko OV. Preserved amniotic membrane in tissue-engineering complex structure of anterior epithelial corneal layer. *Permskii meditsinskii zhurnal*. 2016;33(5):47-53. (In Russ.)]
5. Труфанов С.В., Маложен С.А., Полунина Е.Г., и др. Синдром рецидивирующей эрозии роговицы (обзор) // Офтальмология. – 2015. – Т. 12. – № 2. – С. 4–12. [Trufanov SV, Malozhen SA, Polunina EG, et al. Recurrent corneal erosion syndrome (a review). *Ophthalmology*. 2015;12(2):4-12. (In Russ.)] <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2015-2-4-12>.
6. Raj A, Dhasmana R, Bahadur H. Factors associated with surface epithelial keratopathy after optical penetrating keratoplasty. *J Curr Ophthalmol*. 2017;29(2):108-115. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2017.01.002>.

Information about the authors

Evgeny S. Milyudin — Doctor of Medical Sciences Deputy Director of the Research Institute of Eye Diseases, Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: miljudin@mail.ru.

Daria A. Drozdetskaya — Student of the 6th course of the Medical faculty, Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: dashush0k@rambler.ru.