

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ «ПЕРЕКРЕСТНОГО СШИВАНИЯ» КОЛЛАГЕНА РОГОВИЦЫ

Вардан Рафаелович МАМИКОНЯН, Алексей Витальевич КУЗНЕЦОВ, Ирина Алексеевна БУБНОВА, Наталия Владимировна БОРОДИНА, Анатолий Александрович ФЕДОРОВ, Татьяна Михайловна ВОЕВОДИНА, Мария Викторовна БУДЗИНСКАЯ

*ГУ НИИ глазных болезней РАМН
119021, г. Москва, ул. Россолимо, 11*

Данное экспериментальное исследование, проведенное на девятнадцати кроликах (38 глаз), доказывает, что результатом действия фотосенсибилизаторов (фотосенс, рибофлавин) в сочетании с ультрафиолетовым излучением на строму роговицы является образование «перекрестных сшивок» коллагеновых волокон роговой оболочки глаз кроликов.

Ключевые слова: перекрёстное сшивание коллагена, лечение кератоконуса, экспериментальное исследование, эктазия, фото динамический эффект, фотосенсебилизаторы, рибофлавин, фотосенс.

Многие заболевания роговицы сопровождаются образованием эктазий в результате значительного уменьшения прочности коллагеновых волокон. Для стабилизации патологического процесса в последние годы был предложен новый способ лечения, в основе которого лежит фотодинамический эффект, приводящий к «перекрестной сшивке» (cross-linking) коллагена, «уплотнению» стромы и, тем самым, увеличению прочности роговицы. При этом в качестве фотосенсибилизатора используется рибофлавин [1, 2]. Стабилизация молекулы коллагена осуществляется благодаря электростатическим и гидрофобным взаимодействиям, а также водородным и ковалентным поперечным связям между α -цепями. Естественные сшивки между α -цепями обусловлены ковалентными связями, тогда как «перекрестные сшивки» возникают в результате образования альдимinov путем взаимодействия остатков 6-оксогексановых кислот с группой NH_2 лизина или 5-гидроксилизина [3–6].

В нашем исследовании представлен сравнительный анализ морфологической картины стромы роговицы после проведения «перекрестных сшивок» с использованием различных фотосенсибилизаторов (ФС): 0,1% водного раствора рибофлавина и препарата «Фотосенс», в основе которого лежит фталоцианин алюминия.

Материал и методы

Экспериментальное исследование было выполнено на 19 здоровых кроликах породы шиншилла массой 2–2,5 кг. Все животные были разделены на пять групп. В первой группе (5 животных — 10 глаз) в качестве фотосенси-

билизатора использовали препарат «Фотосенс» (0,2% раствор в общем объеме 2 мл) производства ФГУП «ГНЦ НИОПИК», разрешенный для медицинского применения при проведении фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики злокачественных онкологических заболеваний (регистрационное удостоверение Р № 000199/02-2001 от 25.07.2001). Во второй группе (5 животных — 10 глаз) в качестве фотосенсибилизатора применяли 0,1% водный раствор рибофлавина. Всем животным I и II групп осуществляли деэпителизацию роговицы, после чего закапывали в течение 3 минут соответствующий фотосенсибилизатор и проводили облучение ультрафиолетовым светом (длина волны 376–375 нм) на расстоянии 1 см и плотностью мощности 3 мВт/см². В работе использовали три контрольных группы: кроликам III группы (3 животных — 6 глаз) закапывали препарат «Фотосенс», IV группы (3 животных — 6 глаз) 0,1% водный раствора рибофлавина, без облучения ультрафиолетом; в V группе (3 животных — 6 глаз) проводили только облучение ультрафиолетовым светом.

В ходе выполнения экспериментальной работы использовали специальные офтальмологические методы. Так, при оценке состояния переднего отдела глаза применяли метод фокального бокового освещения. Биомикроскопические исследования проводили с помощью щелевой лампы по методике Н.Б. Шульпиной. Конфокальную микроскопию с использованием конфокального микроскопа «Confoscan-4» (Nidek, Япония) при увеличении $\times 500$ проводили до, через 1 и 24 часа после проведения облучения.

*Мамиконян В.Р. — д.м.н., профессор, зам. директора
Кузнецов А.В. — лаборант исследователь, e-mail: lost06@yandex.ru.
Бубнова И.А. — канд.м.н., н.с., e-mail: bubnovai@mail.ru
Бородина Н.В. — канд.м.н., н.с.
Федоров А.А. — вед.н.с.
Воеводина Т.М. — младш.н.с., e-mail: tusichkin@bk.ru
Будзинская М.В. — канд.м.н., e-mail: m_budzinskaya@mail.ru*

Во всех группах животных выводили из эксперимента через 1, 24 часа и 2 месяца. Животных забивали методом воздушной эмболизации в ушную вену. Энуклеированные глаза подвергались обязательному патогистологическому исследованию. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезжизняли в спиртах и заливали в парафин. Серийные парафиновые срезы глаза окрашивали гематоксилином-эозином. Препараты исследовались на «Фотомикроскопе-Ш» («Opton», Германия), совмещенным с аппаратно-программным комплексом автоматической морфоденситометрии «ДиаМорф Объектив», компании «ДиаМорф» (Россия). Фоторегистрация осуществлялась на цифровую фото-видеокамеру «ДиаМорф» в составе комплекта.

Результаты и обсуждение

У животных первых четырех групп в течение первых суток офтальмоскопически наблюдался отек стромы роговицы.

При проведении конфокальной микроскопии в I–IV группах через 1 час отмечали резкое увеличение общей рефлексивности, ступенчатость границ ядер кератоцитов, что свидетельствовало о наличии отека стромы (рис. 1, 2). Через 24 часа отечность стромы уменьшалась, восстанавливалась обычная ее картина. На этом фоне в I и II группах регистрировали появление в экстрацеллюлярном матриксе разнонаправленной 3-мерной исчерченности, «скрепляющей» строму (рис. 3).

При гистологическом исследовании наибольшая степень межпластинчатого отека стромы наблюдалась через 1 час после закапывания сенсибилизатора, особенно в случае применения водного раствора рибофлавина. Через 24 часа отек становился значительно меньше. При этом в группах I и II можно было отметить повышение плотности кератоцитов в поверхностных слоях и относительное снижение в средних слоях стромы. Наряду с изменением объема и конфигурации коллагеновых пластин отмечалась поперечная исчерченность в виде «мостиков» между ними (рис. 4).

В III и IV контрольных группах через 24 часа отмечался только интрастромальный отек и небольшое увеличение плотности кератоцитов в поверхностных слоях стромы (рис. 5). У животных V группы строение роговицы практически не отличалось от нормального.

Через 2 месяца в контрольных группах патологических изменений в роговице не наблюдалось.

В I и II группах к этому времени произошло полное восстановление целостности роговицы. Явления отека отсутствовали, кератоциты распределялись по всей строме равномерно. Отмечался волнообразный ход коллагеновых волокон в передних слоях стромы (во II группе) или

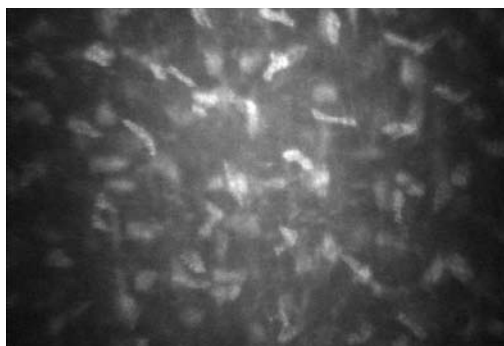


Рис.1. Контрольная группа. Изображение нормальной стромы роговицы. Конфокальная микроскопия.

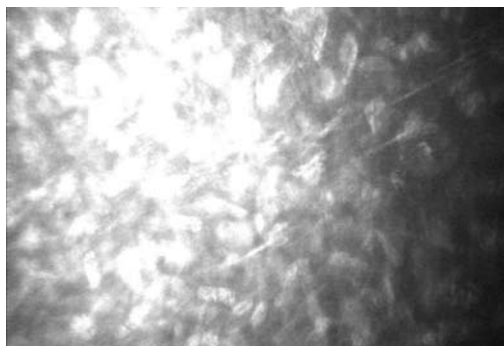


Рис.3. Состояние роговицы через 24 часа после ФДТ. В строме роговицы I-II группы появляется «исчерченность». Конфокальная микроскопия.



Рис.2. Состояние роговицы через 1 час после ФДТ. Отек стромы, не позволяющий визуализировать клеточные структуры. Конфокальная микроскопия.



Рис.4. Межпластинчатый стромальный отек и поперечные сшивки (↑) в I группе. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х 250.



Рис.5. Межпластинчатый стромальный отек и повышенная плотность кератоцитов в поверхностной строме в III контрольной группе. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x 250.



Рис.6. Слабовыраженные межпластинчатые «сшивки» в I группе через 2 месяца после ФДТ. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x 250.

в задних отделах стромы (в I группе), а также межпластинчатые «сшивки», менее выраженные к этому сроку (рис. 6).

Таким образом, образование поперечных «сшивок» в строме роговицы за счет фотодинамических реакций происходило в одинаковой степени в случаях применения обоих ФС. При облучении сенсibilизированной ткани роговицы ультрафиолетовым источником с длиной волны, соответствующей спектру поглощения ФС, в ней предположительно происходят следующие процессы. Молекула ФС, поглотив квант излучения, переходит в возбужденное триплетное состояние и затем вступает в фотохимические реакции. Переход молекулы кислорода из основной, триплетной, формы в активную, синглетную, форму, представляющую собой сильный окислитель и повреждающий агент для аминокислот, вызывает «сшивки» коллагеновых волокон как между собой, так и внутри спирали. Происходит изменение

физико-химических свойств коллагенового каркаса роговицы: увеличение жесткости и температуры денатурации, увеличение устойчивости к действию протеолитических ферментов.

Литература

1. Spoerl E., Huhle M., Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue // Exp. Eye Res. 1998. 66. 97–103.
2. Spoerl E., Schreiber J., Hellmund K. et al. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen // Ophthalmologie. 2000. 97. 203–206.
3. Andley U., Albert D.M., Jakobiec F.A. Photooxidative stress // Principles and Practice of Ophthalmology. 1992. 1. 575–590.
4. Bailey A.J. Structure, function and ageing of the collagens of the eye // Eye. 1987. 1. 175–183.
5. Bailey A.J., Paul R.G., Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen // Mech. Ageing Dev. 1998. 106. 1–56.
6. Faulborn J., Dunker S., Bowald S. Diabetic vitreopathy—Findings using the celloidin embedding technique // Ophthalmologica. 1998. 212. 369–36.

EXPERIMENTAL STUDY «CROSS-LINKING» OF CORNEAL COLLAGEN

Vardan Rafaelovich MAMIKONYAN, Aleksey Vitalevich KUZNETSOV, Irina Alekseevna BUBNOVA, Natalya Vladimirovna BORODINA, Anatoliy Aleksandrovich FYODOROV, Tatyana Mixailovna VOEVODINA, Mariya Viktorovna BUDZINSKAYA

State Research Institute of Eye Disease of Russian Academy of Medical Sciences
11, Rossolimo, Moscow, 119021

The current experimental study was done on nineteen (38 eyes) rabbits. It confirms positive effect by combined of photosensitizes (0,1% riboflavin, photosens) with ultraviolet irradiance on corneal stroma. Result of photosensitizes and ultraviolet irradiance action was formation of cross-linked collagen fibers in rabbits corneal stroma. Purpose of this study was development of a new minimally invasive method for treatment corneal stroma.

Key words: Cross-linking, cornea, keratoconus treatment, experimental study, photodynamic effect, photosensitizers, riboflavin, photosens.

Mamikonyan V.R. — doctor of Medicine, professor, deputy director
Kuznetsov A.V. — laboratory assistant-researcher, e-mail: lost06@yandex.ru
Bubnova I.A. — candidate of Medicine, research fellow, e-mail: bubnovai@mail.ru
Borodina N.V. — candidate of Medicine, research fellow
Fyodorov A.A. — research fellow
Voevodina T.M. — research fellow, e-mail: tusichkin@bk.ru
Budzinskaya M.V. — candidate of Medicine, e-mail: m_budzinskaya@mail.ru