Катарактальная

ISSN 1681-5904

и рефракционная хирургия

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Том 13/№ 2 июнь 2013



Фрагментация ядра при зрелой катаракте по типу «pizza-cuts» (стр. 18)





СТАТЬИ

УДК 617.713

© 2013 МНИОЦ «НОВЫЙ ВЗГЛЯД»

Поступила 24.04.13. Принята к печати 27.05.13

Сравнительное гистохимическое исследование структуры коллагена нормальной и кератоконусной роговицы в ходе моделирования процедуры кросслинкинга с применением фемтолазера *in vitro*

В. В. Зотов¹, Н. П. Паштаев¹, Е. В. Ларионов², Н. А. Поздеева¹, С. И. Анисимов²

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение структурных изменений роговичного коллагена после проведения различных вариантов ультрафиолетового кросслинкинга в норме и при кератоконусе.

Методы. Исследование проводили на изолированных роговицах пациентов с кератоконусом, которым выполнялась сквозная кератопластика. В качестве контрольной была взята нормальная донорская роговица. Процедура кросслинкинга проводилась по стандартной методике, а также с использованием фемтолазера. Выкроенные роговичные диски через 2 часа после кросслинкинга фиксировали в растворе глютаральдегида с последующим гистоморфологическим и иммуногистохимическим исследованием.

Результаты. Гистоморфологическое изучение результатов стандартного кросслинкинга показало, что наибольшее

количество сшивок определяется в передней и средней строме роговицы в основном между волокнами коллагена типа I, а после проведения кросслинкинга с фемтолазерным сопровождением количество и плотность сшивок увеличивается.

Заключение. На основании экспериментального исследования показана эффективность модификации кросслинкинга с применением фемтолазера, которую можно использовать наравне со стандартной методикой.

Ключевые слова: кератоконус, кросслинкинг, фемтолазер

Катарактальная и рефракционная хирургия. 2013. Т. 13, № 2. С. 32-36

Разработанный доктором G. Wollensak с соавторами в 2003 г. кросслинкинг роговичного коллагена (КРК) представляет метод лечения кератоконуса, в основе которого лежит фотополимеризация стромальных роговичных волокон путем комбинированного действия фотосенсибилизирующего вещества (рибофлавин) и ультрафиолетового света длиной волны 360 нм. Цель лечения заключается в улучшении биомеханических свойств роговицы и ее устойчивости к лизосомальным и протеолитическим ферментам [9] за счет создания дополнительных химических связей внутри стромы роговицы при минимальном воздействии на другие структуры глаза. Этот метод является технически простым и менее инвазивным, чем другие способы лечения кератоконуса, оставаясь единственным методом, направленным на патофизиологические механизмы. Кроме того, эта процедура успешно применяется при язвах роговицы, коллагенозах, а также с целью уменьшения отека при эндотелиальных дистрофиях роговицы [1].

Актуальность тонких сравнительных исследований структуры роговицы в норме и при кератоконусе определяется отсутствием ясной картины патогенеза многих эктазий [2]. До конца не изучен и характер структурных изменений роговичного коллагена после процедуры кросслинкинга различного типа в случаях невоспалительных дистрофий роговицы [6]. Также представляет интерес изучение особенностей КРК при введении фотомедиатора в глубокие слои роговицы с помощью предварительно сформированного кармана [3, 5, 8].

Целью данного исследования явилось изучение структурных изменений роговичного коллагена после проведения различных вариантов ультрафиолетового $(У\Phi)$ кросслинкинга в норме и при кератоконусе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали роговицы пациентов с кератоконусом, полученные при кератопластике. В качестве контрольной была взята нормальная донорская роговица, полученная из глазного банка. Процедуру УФ кросслинкинга выполняли с использованием аппарата для фототерапии роговицы производства ООО «Трансконтакт» (Москва).

¹ Чебоксарский филиал ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова Минздрава России, Чебоксары, Россия

² Глазной центр «Восток-прозрение», Москва, Россия



Рисунок 1. Ультраструктурная картина участка передней стромы нормальной донорской роговицы после стандартной процедуры кросслинкинга. А — кератоцит удлиненной формы с типичными постмортальными изменениями. В — уплотнения (сшивки) по ходу пучков волокон коллагена (электронная трансмиссионная микроскопия, увеличение x8000).

Стандартная процедура КРК на нормальной и кератоконусной роговице включала удаление роговичного эпителия диаметром 9 мм с помощью шпателя, инстилляцию 0,1% раствора рибофлавина в течение 15 минут, затем облучение ультрафиолетовым светом длиной волны 375-376 нм и плотностью мощности 3 мвт/см² в течение 30 минут.

В другой группе процедура КРК проводилась после формирования интрастромальных карманов с помощью фемтосекундного лазера IntraLase FS 60 кГц (Advanced Medical Optics). Для этого на заданной глубине (от 150-190 мкм) формировали кольцевидный канал внутренним диаметром 5,0 мм и внешним 8,5 мм, после чего в радиальном направлении проводили входной разрез длиной 2 мм. Ось входного надреза зависела от глаза пациента и варьировала от 0° для левого глаза до 180° для правого. Энергия импульса составила 1,5-1,8 мкДж. В сформированный таким образом тоннель вводили 0,1% раствор рибофлавина до полного пропитывания стромы вокруг области тоннеля. Затем проводили локальное облучение ультрафиолетовым светом при стандартных параметрах в течение 30 минут.

Через 2 часа после КРК проводили сквозную кератопластику трепаном 7,0 мм. Выкроенные роговицы фиксировали в растворе глютаральдегида на фосфатном буфере в течение 24 часов, фиксировали осмием и готовили препараты для электронной микроскопии. Гистоморфологические исследования по влиянию стандартного и интрастромального введения рибофлавина



Рисунок 2. Иммуногистохимическая картина участка распределения и локализации коллагена в нормальной роговице после процедуры кросслинкинга по авидин-биотиновой метке, конъюгированной пероксидазой, окрашенной диаминобезидином, где а — коллаген типа I (A); б — коллаген типа VI (A). Титр 1:500 (увеличение x3600).

в карманы после фемтолазерного воздействия кросслинкинга на строму роговицы проводили на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 1200 EX (Jeol) в лаборатории микроскопии Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (проф. С. В. Петров, В. В. Сальников).

Для иммуногистохимических исследований типов коллагена использовали непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) с помощью системы стрептавидин-биотин, конъюгированной пероксидазой (LSAB), DAKO (США). Для этого стекла со срезами помещали на 20 минут в 1% раствор перекиси водорода, промывали буферным раствором, раскапывали блокирующий реагент и инкубировали 5 минут во влажной камере. Затем на срезы наносили приготовленные в рабочем разведении моноклональные антитела к коллагенам типа I, II, III, IV и VI (Acris antibodies inc., США) в рабочем разведении 1:500. Инкубировали 30 минут во влажной камере, промывали в трех сменах буферного солевого раствора, после чего наносили связывающие анти-антитела (смесь антикроличьих и антимышиных антител против антител к коллагену) и инкубировали 15 минут.

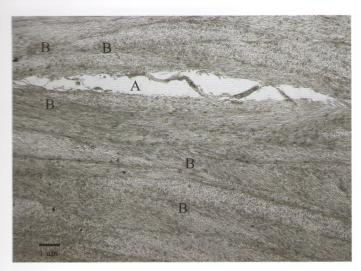


Рисунок 3. Ультраструктурная картина стромы нормальной роговицы с тоннелем после процедуры фемтокросслинкинга. Тоннель сформирован фемтолазером (А). Зоны сшивок (В) (электронная трансмиссионная микроскопия, увеличение x8000).

Срезы промывали буферным солевым раствором, раскапывали конъюгированный с пероксидазой стрептавидин, инкубировали 15 минут и проводили гистохимическое выявление пероксидазной активности с помощью раствора диаминобензидина DAB (Novocastra, США) в течение 5-15 минут. Заключение препаратов, окрашенных хромогеном DAB, устойчивым в органических растворителях, производили с помощью канадского бальзама.

С помощью лицензионных программ Leica application suite 3.6.0 (Германия) и Микроанализ (Россия), используемых для компьютерной морфометрии, осуществляли анализ локализации различных типов коллагена (Е.В. Москвичев, РКОД, Чебоксары). Статистическая обработка осуществлялась с использованием лицензионного пакета программ MS Office 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предполагается, что в результате комбинированного воздействия раствора рибофлавина и ультрафиолета появляются свободные радикалы кислорода, которые образуют дополнительные связи (сшивки) между гликопротеиновыми полимерами (протеогликанами), располагающимися на поверхностях коллагеновых волокон [7]. Вероятно, данные межволоконные сшивки и определяют эффект кросслинкинга [10].

Гистоморфологическое изучение результатов кросслинкинга стромы нормальной донорской роговицы показало, что пучки коллагена стромы сшиваются между собой с формированием уплотнений бок в бок (рис. 1).

Наибольшее количество сшивок определяется в передней и средней строме роговицы. Часть кератоцитов имеет посмертные изменения, которые выражаются в деструкции мембран и ядер клеток (рис. 1). Такие же результаты описаны в исследованиях G. Wollensak [11].

Иммуноферментный анализ, проведенный нами на нормальной донорской роговице человека, подвергавшейся процедуре кросслинкинга, позволил выявить

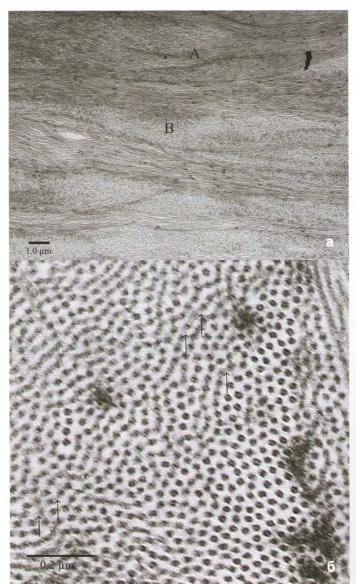


Рисунок 4. Ультраструктурная картина участка роговицы пациента с кератоконусом после стандартной процедуры кросслинкинга: а) продольные (А) и поперечные (В) волокна «сшитого» коллагена (электронная трансмиссионная микроскопия, увеличение х8000); б) поперечные волокна сшитого коллагена (обозначены стрелками) (электронная трансмиссионная микроскопия, увеличение х100000).

коллаген типа I стромы роговицы посредством окрашивания комплексов моноклональных антител с сайтами связывания (рис. 2a).

На рисунке 2а показано равномерное распределение волокон, содержащих коллаген типа I (A), в основной массе коллагеновых волокон стромы, что указывает на его доминирование по отношению к другим типам коллагенов. Кроме того, видно, что сшивки (обозначены стрелками) в результате кросслинкинга возникают в основном между волокнами коллагена типа I. Количественное определение коллагена типа I показало, что его содержание находится в пределах 50-55%. Эти данные также согласуются с результатами других авторов [4, 12]. Количественное содержание коллагена типа II, являющегося основным структурным элементом боуменовой и десцеметой мембраны, определяется в пределах 30%.

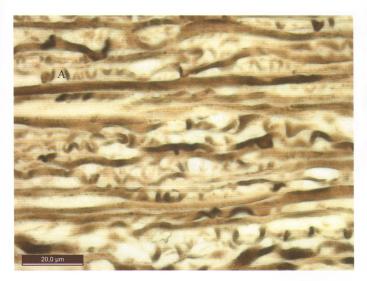


Рисунок 5. Иммуногистохимическая картина участка кератоконусной роговицы после $У\Phi$ кросслинкинга. А — дезориентированное и скрученнное волокно коллагена типа І. Титр 1:500 (увеличение х9000).

Морфометрический анализ локализации и содержания других типов коллагена в донорской роговице показал, что коллаген типа VI распределен наравне с коллагеном типа I в виде длинных волокон без характерной для коллагена типа I исчерченности (рис. 2б). Количественное содержание коллагена типа VI в нормальной роговице составило 25-30% [4, 12].

При проведении кросслинкинга на нормальной роговице с фемтолазерным формированием тоннеля для введения рибофлавина возникают плотные сшивки коллагена как в продольных, так и в поперечных волокнах вокруг зоны тоннеля (рис. 3).

Количество зон сшивок при тоннельном способе введения рибофлавина значительно больше, чем при стандартном кросслинкинге. Возможно, это связано с более высокой концентрацией рибофлавина в зоне тоннеля и прямой реакцией с коллагеном стромы и, следовательно, с более эффективным процессом кросслинкинга.

В роговице с кератоконусом после стандартной процедуры кросслинкинга наибольшее количество сшивок определяется в передней и средней строме как между сохранными, так и между разволокненными фибриллами. В основном сшивке подвергаются продольные и поперечные волокна коллагена типа I (рис. 4a, б).

Проведенные нами иммуногистохимические исследования роговиц пациентов с кератоконусом показали значительные изменения всех типов коллагенов в результате деструкции. Так, количество коллагена типа I, по данным гистоморфометрии, падает до 35-45% по сравнению с нормой (55%). В результате развития патологического процесса строма роговицы теряет свою ориентацию в волокнах коллагена, которые также скручиваются по своей оси (рис. 5). Другие типы коллагенов стромы также изменяются в количественном и качественном отношении. Так, количество коллагена типа III, IV и VI (рис. 6) уменьшается в среднем на 25-30% по сравнению с нормой, но изменений в их локализации не обнаруживается.



ООО «Трансконтакт» и группа компаний

ООО «Трансконтакт» (495) 605-39-38 ООО «Дубна-Биофарм» (495) 921-36-97

ACRYSTYLE

Мягкие интраокулярные линзы



КСЕНОПЛАСТ

Коллагеновый антиглаукоматозный дренаж и материалы для склеропластики



ОКВИС

Протектор тканей глаза -глазные капли



ЛОКОЛИНК

Аппарат для фототерапии роговицы методом локального кросслинкинга



☆ БИОСОВМЕСТИМОСТЬ

⇔ БЕЗОПАСНОСТЬ

☆ ЭФФЕКТИВНОСТЬ



Рисунок 6. Иммуноферментное окрашивание стромы при кератоконусе после УФ кросслинкинга. Распределение и локализация коллагена типа VI (A) по авидин-биотиновой метке конъюгированной пероксидазой, окрашенной диаминобезидином. Титр 1:500 (увеличение x3600).

выводы

- 1. В нормальной и кератоконусной роговице под действием УФ кросслинкинга образуются устойчивые сшивки, в основном между фибриллами коллагена типа I.
- 2. При проведении кросслинкинга с фемтолазерным формированием тоннеля количество и плотность сшивок увеличивается, что, вероятно, связано с более эффективным распределением рибофлавина непосредственно в строме.
- 3. Распределение и локализация в роговице различных типов коллагена под действием УФ кросслинкинга не изменяются, а возникающие сшивки концентрируются в основном на коллагене типа I.



Первый автор: Зотов Вадим Валерьевич, врач-офтальмолог Чебоксарского филиала ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. С. Н. Федорова, Чебоксары, Россия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Хабибуллин А.Ф. Применение кросслинкинга роговичного коллагена в лечении буллезной кератопатии // Офтальмохирургия. 2011.
 № 1. С. 24-27.
- 2. Зотов В.В., Сальников В.В., Поздеева Н.А. Изменения ультраструктуры стромы роговицы после проведения кросслинкинга // Практ. медицина. 2012. Т.1, № 4. С. 95-96.
- Зотов В.В., Паштаев Н.П. Новый метод кросслинкинга роговичного коллагена в лечении больных с кератоконусом. Отдаленные результаты // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии — 2011: сб. науч. ст./ФГУ МНТК «Микрохирургия глаза». М., 2011. С. 299-302.
- Engel J., Furthmayr H., Odermatt E., et al. Structure and macromolecular organization of type VI collagen // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1985. V. 460. P. 25-37.
- Kanellopoulos A.J. Collagen cross-linking in early keratoconus with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket: initial clinical results // J. Refract. Surg. 2009. V. 25. P. 1034-1037.

- Messmer E. M, Meyer P., Herwig M. C., et al. Morphological and immunohistochemical changes after corneal cross-linking // Cornea. 2013. V. 32. P. 111-117.
- Spoerl E., Huhle M., Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue // Exp. Eye Res. 1998. V. 66. P. 97-103.
- Samaras K., O'brart D. P., Doutch J., et al. Effect of epithelial retention and removal on riboflavin absorption in porcine corneas // J. Refract. Surg. 2009. V. 25. P. 771-775.
- 9. Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. Increased resistance of cross linked cornea against enzymatic digestion // Curr. Eye Res. 2004. V. 29. P. 35-40.
- Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // Am.J. Ophthalmol. 2003. V. 135. P. 620-627.
- Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M., et al. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment // Cornea. 2004. V. 23. P. 43-49.
- 12. Zimmermann D.R., Trueb B., Winterhalter K.H., et al. Type VI collagen is a major component of the human cornea // FEBS Letters. 1986. V. 197. P. 55-58.

ABSTRACT

Comparative histochemical study of the structure collagen of normal cornea and in keratoconus modeling crosslinking with the use of femtolazer in vitro

V. V. Zotov, N. P. Pashtaev, E. V. Larionov, N. A. Pozdeeva, S. I. Anisimov

Purpose: To study the structural changes of corneal collagen after various options UV crosslinking in normal cornea and in the case of keratoconus.

Methods: The study was conducted on patients with keratoconus. The control was taken normal donor cornea. Crosslinking performed by standard methods, as well as using femtolazer. Corneal disc 2 hours after crosslinking were fixed in glutaraldehyde solution and subjected to histomorphological and immunohistochemical studies.

Results: Histomorphological study of crosslinking results showed that the highest number of cross-links is defined in the anterior and middle corneal stroma is mainly between the fibers of collagen type I, and after femtolazer crosslinking number and density of cross-links increases.

Conclusion: Based on the experimental research proved the effectiveness of the modification crosslinking using femtolazer, which can be used along with a standard method.

Key words: keratoconus, crosslinking, femtolazer