

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ХИТОЗАНОВОГО ИЗДЕЛИЯ «БОЛ-ХИТ» ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПРОНИКАЮЩИХ РАНЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Лозбина Н.В.¹, Большаков И.Н.², Лазаренко В.И.², Песоцкая А.В.³, Макогон А.С.¹, Попов В.А.¹

¹ ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул, e-mail: molniya86@mail.ru;

² ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, e-mail: bol.bol@mail.ru;

³ КГБУЗ «Городская больница № 8», Барнаул, e-mail: pao_gb8@mail.ru

В статье представлены результаты оценки эффективности изделия медицинского назначения (далее ИМН) «Бол-хит» в сравнении с традиционным методом лечения на модели проникающего ранения роговицы у кроликов. Изучена морфология рубца в сроки 2 недели, 1 и 3 месяца. В опытной группе кроликов в условиях применения ИМН «Бол-хит» установлено благоприятное течение раневого процесса без осложнений, отмечена удовлетворительная противовоспалительная активность изделия. С помощью оптической когерентной томографии и гистологического анализа после всего срока лечения и наблюдения в опытной группе в области сформировавшегося рубца выявлены минимальная деформация эпителиального слоя и стромы роговицы, что предполагает более высокие зрительные функции. ИМН «Бол-хит» рекомендуется в качестве протектора и стимулятора регенерации роговицы.

Ключевые слова: изделие медицинского назначения (ИМН) «Бол-хит», проникающее ранение роговицы, репарация рубца, оптическая когерентная томография.

PRELIMINARY RESULTS OF CLINICAL AND MORPHOLOGICAL STUDY OF CORNEAL REGENERATION USING "BOL-HIT" CHITOSAN MEDICAL PRODUCT IN TREATING OF EXPERIMENTAL PENETRATING CORNEAL WOUNDS

Lozbina N.V.¹, Bolshakov I.N.², Lazarenko V.I.², Pesotskaya A.V.³, Makogon A.S.¹, Popov V.A.¹

¹ Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: molniya86@mail.ru;

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, e-mail: bol.bol@mail.ru;

³ KGBUZ City Hospital № 8, Barnaul, e-mail: Pao_gb8@mail.ru

The article presents the results of evaluating the effectiveness of "Bol-hit" medical product in comparison with the traditional method of treatment on the pattern of penetrating corneal wounds in rabbits. The morphology of the scar in terms of 2 weeks, 1 and 3 months has been studied. In the rabbits' experimental group under condition of "Bol-hit" medical product application the favorable course of the wound process without complications was set, satisfactory resolvent activity of the product was marked. The optical coherence tomography and histological analysis revealed minimal epithelial and stromal deformation of corneal scar after the whole period of treatment and observation that assumes higher visual functions. «Bol-hit» medical product is recommended as a corneal protector and stimulator of regeneration.

Keywords: "Bol-hit" medical product, a penetrating corneal wound, scar repair, optical coherence tomography.

В структуре глазного травматизма поражения роговицы и их последствия составляют 30 % и более [2]. Большая часть пациентов с травмами глаза – молодые мужчины, в большинстве случаев поражается передний сегмент глаза [9]. Несмотря на активную терапию травматических повреждений роговицы, исходы чаще сопровождаются значительным стойким снижением остроты зрения, что связано с формированием рубца в оптической зоне, развитием роговичного астигматизма, повреждением внутриглазных

структур. Необходим поиск и внедрение новых препаратов, способствующих улучшению регенеративных свойств роговицы и формированию более нежного рубца [3].

Цель исследования – оценка эффективности применения ИМН «Бол-хит» на модели проникающего ранения роговицы у кроликов.

Материал и методы. Использованное в исследовании ИМН «Бол-хит» содержит 2 % хитозан молекулярной массы от 100 до 700 kDa и степени дезацетилирования свыше 95 %, аскорбиновую кислоту – 1,8 г, хондроитинсерную кислоту – 5-100 мг, гиалуроновую (Д-глюкуроновую) кислоту – 10–100 мг, сывороточный фактор роста крупного рогатого скота «адгелон» – 11–220 мкг, гепарин – 2,5–5 мг. Изделие запатентовано на территории Российской Федерации [4–8], на базе лабораторно-испытательного центра НИИ ФХМ МЗ РФ подтверждено разрешение к использованию по показателю «токсичность» (аттестат № ФС 02-ПТИ-04 от 10.03 2004 г., регистрация в реестре ФС 16.08.2004 г.), проведены санитарно-химические и токсикологические испытания продукта для офтальмологии (протокол № 1612.007 от 13.08.2007 г.). Изделие отвечает требованиям, предъявляемым к изделиям медицинского назначения [1].

Исследование проводили на 6 кроликах обоего пола (12 глаз) массой 1,5–2,5 кг. Кролики были разделены на две группы – опытную и контрольную, по 3 кролика (6 глаз) в каждой группе. Кроликам обеих групп в условиях операционной под общим и местным обезболиванием наносили типовые линейные проникающие роговичные разрезы на протяжении от 11 до 19 часов условного циферблата стальным кератомом «Оптимед» 2,75 мм. В послеоперационном периоде при условии адаптации краев раны проводили лечение: кроликам опытной группы – инстилляций ИМН «Бол-хит» 4 раза в сутки, кроликам контрольной группы – инстилляций водного раствора левомецетина 0,25 % и декспантенола 3 раза в сутки. В послеоперационном периоде в течение месяца ежедневно проводили офтальмологический осмотр, который включал оценку состояния век, конъюнктивы, роговицы, передней камеры, радужки, хрусталика, стекловидного тела, сетчатки. Осмотр производился прямым офтальмоскопом WelchAllyn (США). В течение двух недель производили биомикроскопию глаз при помощи щелевой лампы и выполняли флюоресцеиновую пробу для оценки формирования роговичного рубца. Результаты осмотра фиксировали в дневнике наблюдений. Оценивали степень выраженности и вид инъекции глазного яблока, состояние роговицы (степень выраженности отека, динамику заживления раны, наличие неоваскуляризации). Кроликов выводили из эксперимента методом воздушной эмболии в следующие сроки: 2 недели (2 кролика), 1 месяц (2 кролика), 3 месяца (2 кролика). Производили энуклеацию глаз для последующего проведения оптической когерентной томографии роговицы глаза и гистологического исследования срезов роговицы

методом окраски гематоксилин-эозином. Все манипуляции с экспериментальными животными производились с соблюдением принципов гуманного обращения согласно приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977, европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18. 03. 1986).

Оптическую когерентную томографию роговицы энуклеированных глаз выполняли на томографе RTVue-100 (компания – производитель «Optovue», США) на базе КГБУЗ «Краевая офтальмологическая больница», г. Барнаул. Гистологический анализ срезов роговицы производился на базе патолого-анатомического отделения КГБУЗ «Городская больница № 8», г. Барнаул с помощью светового микроскопа Leica (Leica Microsystems, Германия – Швейцария), фотографирование препаратов осуществлялось с помощью цифровой камеры Canon и персонального компьютера.

Результаты и их обсуждение. Послеоперационный период в контрольной и опытной группах протекал без особенностей. На второй день после операции отмечались умеренные светобоязнь, слезотечение, слизисто-гнойное отделяемое из конъюнктивальной полости, умеренный отек роговицы в области раны. Адаптация краев раны, восстановление передней камеры отмечены у всех кроликов ко второму дню после операции. Воспалительные явления глаз у кроликов контрольной группы стихли к седьмому дню после операции, у кроликов опытной группы – к девятому дню. Остаточные явления воспаления (гиперемия конъюнктивы) в обеих группах сохранялись до 14 дней после операции. В обеих группах лечение протекало благоприятно, препараты хорошо переносились, не отмечено побочных явлений и аллергических реакций.

Известно, что на томограммах участки с высокой светоотражающей способностью имеют красно-белые оттенки, в более прозрачных участках преобладает черный цвет. Например, неизменное оптически прозрачное стекловидное тело на томограмме имеет черный цвет, а слой нервных волокон и пигментный эпителий сетчатки, обладающие хорошей фоторефлексивностью, создают красный цвет [10]. По данным проведенной нами оптической когерентной томографии оценена интенсивность и плотность роговичного рубца по интенсивности и преобладанию красно-белых, теплых оттенков в строме роговицы. На томограммах роговицы кроликов достаточно четко визуализируются пять слоев: эпителий, боуменова оболочка, строма, десцеметова мембрана, эндотелий. В опытной группе через две недели после ранения видно уплотнение поверхностных слоев стромы, раневой канал закрыт, однако со стороны эндотелия в области раны имеется утолщение стромы, эндотелий слабо визуализируется. Возможно, это связано с отеком роговицы (рис. 1А). В контрольной группе в области ранения видно сформированное уплотнение стромы на 2/3 толщины

роговицы, втяжение эндотелия в область раневого канала, истончение роговицы и разрежение стромы в этой области (рис. 2А).

Спустя 1 месяц после ранения, в опытной группе кроликов в области ранения просматривается практически сформированный рубец в виде уплотнения стромы на 2/3 роговицы, её истончение и втяжение эндотелия, со стороны эндотелия в области рубца роговица более прозрачна в сравнении с контрольной группой (рис. 1В). В контрольной группе наблюдается не только большая плотность стромы в области рубца, но и более глубокий дефект стромы со стороны эндотелия (рис. 2В).

На томограммах роговицы кроликов, выведенных из эксперимента после трехмесячного срока лечения и наблюдения, достаточно четко видны все слои роговицы. В области сформировавшегося рубца контрольной группы со стороны эпителия имеется углубление, что может свидетельствовать о деформации слоев роговицы, сформированный рубец более грубый, плотный, видна деформация стромы роговицы (рис. 2С), что не наблюдается в опытной группе животных. Оптически роговица наиболее прозрачна в области рубца в опытной группе (рис. 1С).

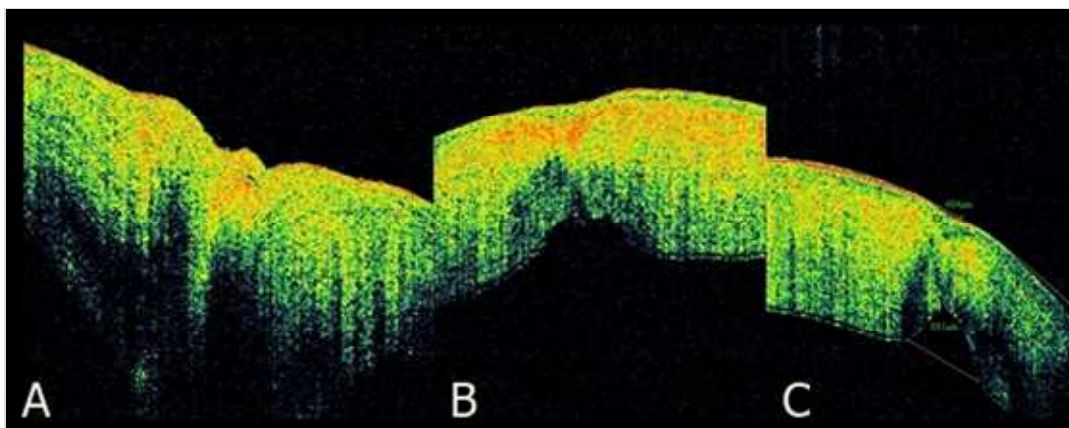


Рис. 1. Оптическая когерентная томограмма роговицы кроликов в условиях применения ИМН «Бол-хит»: А – 2 недели после лечения; В - 1 месяц после лечения; С - 3 месяца после лечения.

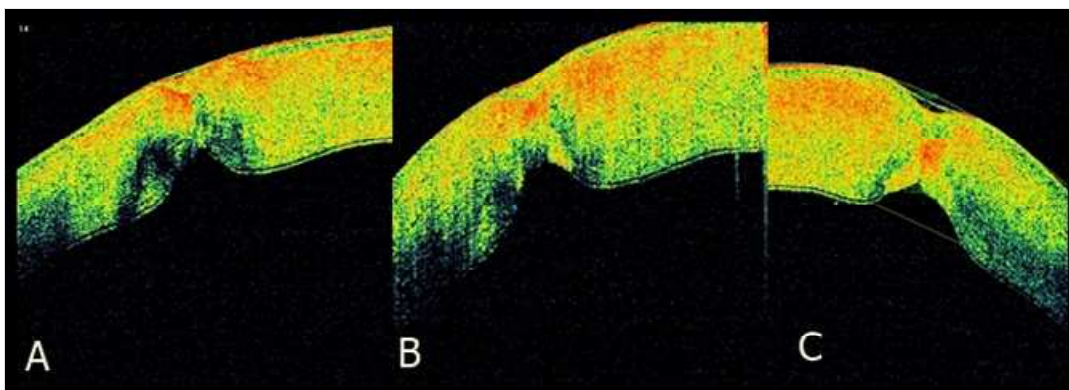


Рис. 2. Оптическая когерентная томограмма роговицы кроликов в условиях применения комплекса «декспантенол+0,25% раствор левомецетина»: А – 2 недели после лечения; В - 1 месяц после лечения; С - 3 месяца после лечения.

Гистологическое исследование, были направлены представленные выше образцы.

В опытной группе (ИМН «Бол-хит») на 14-е сутки после лечения (рис. 3А) гистологический анализ показал утолщение эпителиального слоя за счет активно пролиферирующего базального слоя, выявил многочисленные фигуры митоза с сохранением незначительного отека эпителия в виде вакуолизации. Волокна собственного вещества, рыхлые, набухшие, с образованием складок роговицы, отмечена активная пролиферация и миграция фибробластов стромы в область повреждения, беспорядочное расположение новообразующихся волокон. Воспалительный инфильтрат отсутствовал.

К концу первого месяца (рис. 3В) отек эпителия и собственного вещества сохранялся, однако ткани роговицы оставались спокойными, воспалительный инфильтрат отсутствовал. В эпителии – участки пролиферации, количество слоев до 5–6. Новообразованные волокна в большом числе располагались правильно, сохранялась слабая активность фибробластов.

В срок 3 месяца (рис. 3С) сохранялся слабо выраженный отек собственного вещества. Эпителий состоял из 5 слоев клеток, базальные клетки преимущественно вытянутые, регенерация отсутствовала. Воспалительные клетки в эпителии и строме отсутствовали. Фибробласты единичные, располагались параллельно базальной мембраны. Определялись значительные участки, где собственная ткань роговицы имела нормальное строение.

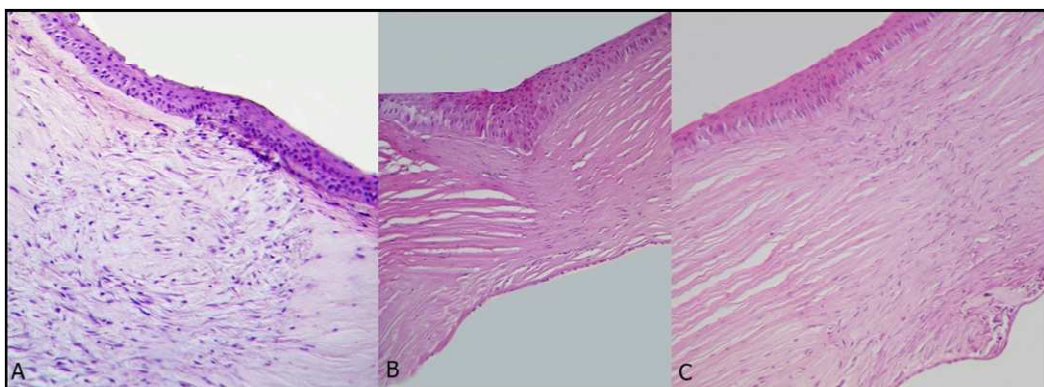


Рис. 3. Гистологический срез роговицы кроликов в условиях применения ИМН «Бол-хит», ув.×400 : А – 2 недели после лечения; В - 1 месяц после лечения; С - 3 месяца после лечения.

Таким образом, лечение с помощью ИМН «Бол-хит» приводит к формированию рубца с минимальной деформацией эпителиального слоя и стромы роговицы.

В группе контроля (декспантенол и раствор левомицетина 0,25 %) гистологический анализ на 14-е сутки (рис. 4А) выявил умеренный выраженный отек эпителия и собственного вещества: вакуолизацию эпителия, набухание и разрыхление волокон, складки Боуменовой капсулы. Отмечена активная пролиферация молодых элементов фибропластического ряда с формированием нежной волокнистой грануляционной ткани. Воспалительный инфильтрат отсутствовал. Эпителий резко утолщен, состоит из 9 слоев. Клетки выстроены с нарушением

стратификации слоев. Ядра базального слоя вытянутые или округлые, митозов нет – пролиферация эпителия завершена.

К концу 1-го месяца (рис. 4В) – уменьшение отека собственного вещества и формирование нежной волокнистой соединительной ткани с выраженной активностью фибробластов, а также регенерация эпителия в виде толстого пласта на значительном протяжении, состоящего из 8 слоев клеток.

В срок 3 месяца (рис. 3С) эпителий роговицы имел четко выстроенную структуру, состоял из 8 слоев клеток, отек и признаки регенерации отсутствовали. В строме сохранялся умеренный отек. Фибробласты единичные, с минимальной активностью, располагались параллельно базальной мембране, единичные участки с нормальным строением собственной ткани роговицы.

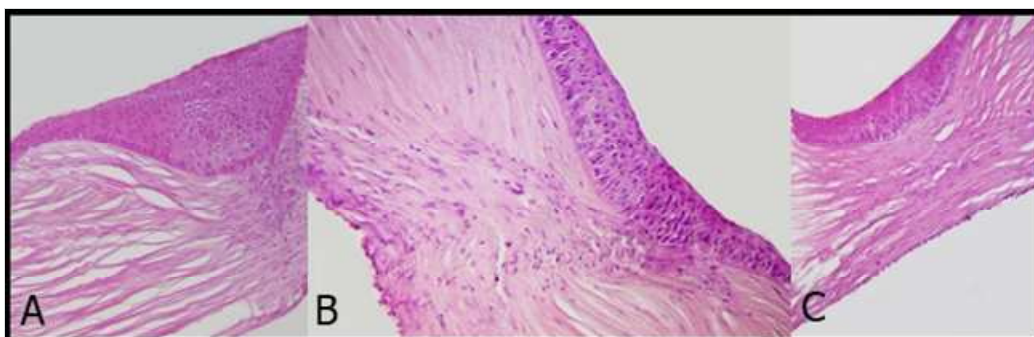


Рис. 4. Гистологический срез роговицы кроликов в условиях применения комплекса «декспантенол+0,25% раствор левомицетина», ув.×400: А – 2 недели после лечения; В - 1 месяц после лечения; С - 3 месяца после лечения.

Таким образом, в результате лечения комплексом декспантенол-левомицетин 0,25 % формируется рубец с утолщённым эпителиальным слоем роговицы, небольшой деформацией стромы.

Заключение

Динамика заживления роговичной раны и процесс формирования рубца после проникающего ранения с помощью сопоставления данных оптической когерентной томографии и гистологического анализа показали, что лечение указанного дефекта роговицы как с использованием декспантенола и 0,25 % раствора левомицетина, так и ИМН «Бол-хит», способствовало благоприятному течению раневого процесса без осложнений. В результате применения ИМН «Бол-хит» сформирован рубец с нормальным количеством слоев эпителиальных клеток, минимальной деформацией структуры стромы, что предполагает обеспечение более высоких зрительных функций в отдаленные сроки после ранения. ИМН «Бол-хит» рекомендуется в качестве протектора роговицы, стимулятора процессов регенерации при её травматических повреждениях и заболеваниях.

Список литературы

1. Большаков И. Н., Лазаренко В. И., Ильенков С. С., Шатилова Р. И., Кузовников В. В., Осипова О. В., Гарькавенко В. В., Симко И. В., Иванов В. В. Безопасность изделий медицинского назначения «бол-хит» и «коллахит-бол» для применения в офтальмологии // Ж. Сибирское медицинское обозрение. – 2011. – № 2. – С. 42–44.
2. Кун. Ф. Травматология глазного яблока / Пер. с англ.; [под ред. В.В. Волкова]. – Москва: Изд-во Логосфера, 2011. – 576 с.
3. Лозбина Н. В. Исходы и эффективность лечения ранений роговицы в Алтайском крае // Современные медицинские и информационные технологии в офтальмологии. Материалы научно-практической конференции офтальмологов, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Павла Гавриловича Макарова. – Красноярск, 2013. – С. 211-214.
4. Патент РФ № 2265441, 10.12.2005.
5. Патент РФ № 2281775, 20.08.2006.
6. Патент РФ № 2301675, 27.06.2007.
7. Патент РФ № 2309749, 10.11.2007.
8. Патент РФ № 2275917, 10.05.2006.
9. Рапуано К. Д., Хенг Ви-Джин. Роговица / Пер. с англ.; [под ред. А. А. Каспарова]. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 282.
10. Щуко А.Г., Малышев В.В. Оптическая когерентная томография в офтальмологии. – Иркутск: Иркутский филиал МНТК "Микрохирургия глаза", 2005. – 105 с.