

М.В.Иванченко¹
Н.А.Галайда²

¹ГУ «Днепропетровская
медицинская академия
МЗ Украины»

²КУ «Днепропетровская
областная клиническая
офтальмологическая
больница».

Ключевые слова: про-
никающее ранение глаза,
роговица, рубец.

Надійшла: 13.11.2015
Прийнята: 20.12.2015

УДК 617.7-001.5:617.713

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СО- СТОЯНИЯ РУБЦОВОЙ ТКАНИ И РАЗНЫХ СЛОЕВ РОГОВИЦЫ ПОСЛЕ ПРОНИ- КАЮЩЕГО РАНЕНИЯ ГЛАЗА

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Оптимизация методов лечения воспалительных заболеваний и травматических повреждений органа зрения» (номер государственной регистрации 0108U011277).

Реферат. Целью работы было гистологическое и ультраструктурное исследование организации рубца и слоев роговицы после проникающей травмы. В результате исследования установлено, что заживление раны роговицы характеризуется активацией фиброзного ответа, однако репарация сопровождается определенными проблемами: в виде снижения прозрачности, что связано с дезорганизацией стромы роговицы, а также возникновения оптических аберраций, вызванных контракцией фиброзной ткани, вследствие ее перестройки в месте сформированного рубца.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 4. – С. 31-36.

© М.В.Иванченко, Н.А.Галайда, 2015

✉ docmarinka@gmail.com

Ivanchenko M.V., Galayda N.A. Morphological evaluation of scar tissue and corneal layers after penetrating eye injury.

ABSTRACT. Background. Penetrating eye injuries are the most serious damage in ocular trauma. They constitute, according to different authors, from 41,4% to 93,5% in the structure of ocular injuries. Corneal penetrating injury accounts 22,5-63%. **Objective.** Histologic and ultrastructural evaluations of scar in the cornea after penetrating eye injury. **Methods.** As the object of the study were used corneas over 12 month after penetrating corneal injury. The corneas were trisected and processed for conventional histologic analysis and transmission electron microscopy. **Results.** This study showed that the thickness of the cornea at the site of the scar after penetrating trauma over 9-12 months was less on 24.2% than in the adjacent intact tissue. Scarring tissue did not contain normal lamellae and lost their correct orientation. Stroma of the scar was composed from disorganized tightly packed fibrils and connective tissue cells (keratocytes and myofibroblasts). **Conclusion.** The repair of the cornea accompanied by specific problems: disorganization of the stroma reduces cornea transparency; contraction of fibrous scar tissue during the remodeling leads to optical aberrations. On the other hand, such a dense structure of the scar provides a relatively favorable condition for the reconstruction and reorganization of adjacent areas of the stroma and may also inhibit swelling of the stroma. Corneal wound healing occurs through a series of steps: activation of repair (corneal injury, proliferation and migration of corneal epithelial cells, stromal keratocytes, endothelial cells; cellular differentiations with active reduction, synthesis and accumulation of extracellular matrix) and tissue remodeling.

Key words: penetrating eye injury, cornea, scar.

Citation:

Ivanchenko MV, Galayda NA. [Morphological evaluation of scar tissue and corneal layers after penetrating eye injury]. *Morphologia*. 2015;9(4):31-6. Russian.

Введение

Травма глаза – это не только медицинская, но и важная социальная проблема, поскольку в последнее время наблюдается увеличение частоты тяжелых травм, которые приводят к потере функции зрения и инвалидности у лиц трудоспособного возраста. Проникающие ранения глаз относятся к наиболее тяжелым повреждениям органа зрения. В структуре травм они составляют, по данным разных авторов от 41,4% до 93,5%. Среди них – повреждения роговицы встречаются в 22,5-63% [1; 2].

Понимание основных механизмов заживления ран роговицы имеет важное клиническое значение для выбора корректного лечения проникающих и непроникающих травм роговицы, при этом основной проблемой после хирургического лечения является формирование рубцовой ткани в зоне ранения.

Согласно исследованиям, роговица обладает достаточно хорошими ранозаживляющими свойствами вследствие ее высокоорганизованной соединительнотканной архитектуре и клеточного состава. Примерно 90% толщины роговицы со-

ставляет строма, образованная многочисленными ламеллами. Каждая ламелла состоит из параллельно ориентированных коллагеновых фибрилл одинакового поперечного сечения и диаметра. Основными компонентами стромы неизменной роговицы являются коллаген I, V, VI и XII типов, протеогликаны, содержащие кератансульфат и дерматансульфат [3]. Считается, что прозрачность роговицы обеспечивается регулярным упорядоченным расстоянием между коллагеновыми волокнами, их толщиной и равномерностью диаметра [4].

Два основных фактора обеспечивают прозрачность роговицы: во-первых, коллагеновые волокна стромы обладают слабыми свойствами светорассеивания, потому что их диаметр поперечного сечения намного меньше, чем длина волны видимого спектра света, а показатель преломления близок к показателю преломления основного вещества матрикса; во-вторых, деструктивная интерференция, возникающая в различных участках, где фибриллы разбросаны независимо друг от друга, снижает светорассеивание [4].

В рубцовой ткани состав и организация стромы значительно изменяется. Снижение прозрачности в месте формирования рубца происходит вследствие нарушения ультраструктурной архитектуры стромы, увеличения размера коллагеновых фибрилл и степени их пространственного беспорядка. Несмотря на определенные успехи в изучении морфологических особенностей посттравматического повреждения глаза, целый ряд вопросов о ходе адаптационных, регенераторных и компенсаторных реакций тканей в течение реабилитационного периода после проникающих ранений глаз остаются неопределенными.

Целью работы было гистологическое и ультраструктурное исследование организации рубца роговицы после проникающей травмы.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 19 пациентов (19 глаз) с проникающими ранениями роговицы в возрасте от 16 до 75 лет. В хирургической обработке ран роговицы использовалась традиционная методика первичной хирургической обработки в течение первых суток после травмы. Для количественной оценки изменений толщины роговицы проводилась пахиметрия в зоне неизменной роговицы, в парарубцовой и рубцовой зонах через 1 неделю, 1, 3, 6, 9, 12-18 месяцев после травмы.

Для морфологического исследования использовался секционный материал и материал роговиц с рубцовыми изменениями в параоптической зоне через 12 месяцев после проникающего ранения, полученный интраоперационно при проведении пациентам сквозной кератопластики.

Для проведения гистологического исследования материал роговиц фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, проводили в растворах этанола возрастающих концентраций, через хлороформ, с последующим изготовлением парафиновых блоков. Гистологические срезы делали толщиной 10 мкм с помощью микротомата. Окраска депарафинированных срезов проводили гематоксилином-эозином по стандартной методике.

Для электронно-микроскопического исследования полученные образцы различных участков роговицы в течение 3-4 часов фиксировали при + 2°C в 2,5%-ном растворе глутаральдегида. Дальнейшая фиксация проводилась в 1% -ном забуференном (pH 7,4) растворе OsO₄ («SPI», США), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и пропиленоксиде. Для изготовления эпоксидных блоков использовали Epon 812 («SPI-Pon™ 812 Epoxy Embedding Kit», США).

Полутонкие срезы 1 мкм толщиной красили метиленовым синим и изучали на светооптическом уровне. Выбранные участки роговицы подвергались электронно-микроскопическому анализу.

Исследования проводили в лаборатории электронной микроскопии ГУ «ДМА МЗ Украины» с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-100-01 («SELMi», Украина) при ускоряющем напряжении 75-80 кВ и первичных увеличениях от 2000 до 80000.

Определение достоверности различий между выборками проводили с учётом парного t-критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Уилкоксона в случае отсутствия нормального статистического распределения величин. Полученные результаты обрабатывали с помощью лицензионной программы Statistica 6.1.

Результаты и их обсуждение

Проведенный анализ толщины роговицы через 1 неделю, 1, 3, 6, 12 месяцев после ранения (рис. 1) показал, что толщина роговицы центральной области в неизменной зоне достоверно не отличалась от нормы и составляла 551,38±35,27 мкм. В зоне формирующегося рубца и прилежащих участках толщина роговицы через 1 неделю после ранения достоверно превышала показатели неизменного участка на 29,4% и 23,5% соответственно, что связано с локальным отеком стромы в зоне ранения. После 1-го месяца от момента травмы и до 6-го месяца исследование динамики изменения толщины роговицы показало постепенное снижение значений до нормальных величин. Проведение пахиметрии роговицы через 9 месяцев и позднее свидетельствовало об уменьшении толщины роговицы в месте рубца по сравнению с парарубцовой зоной и неизменными участками на 23,5-24,2% (p<0,05).

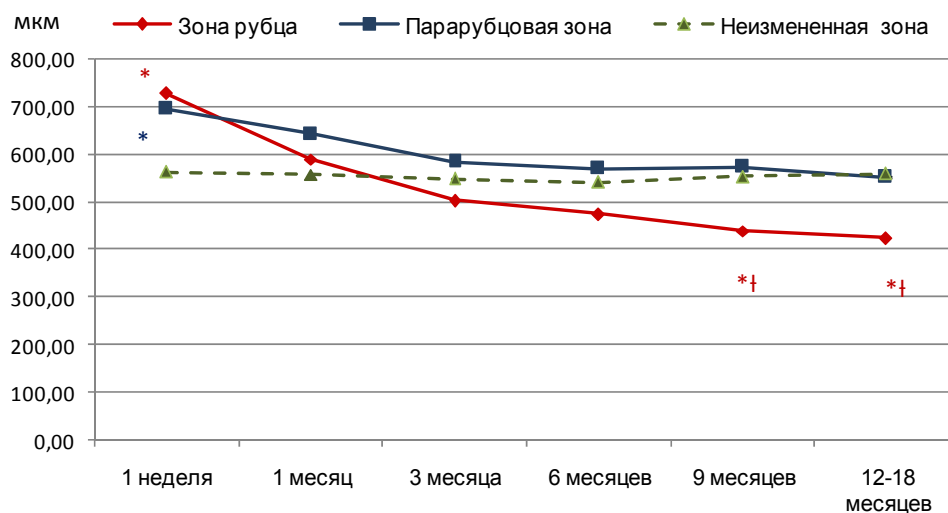


Рис. 1. Динамика изменений параметров толщины роговицы (in vivo) в рубцовой, парарубцовой и неизменной зонах (мкм). Отметки: «*» указывает на достоверное отличие от параметров толщины неизменной зоны роговицы; «†» указывает на достоверное отличие от параметров толщины парарубцовой зоны.

Проведенное свето-микроскопическое исследование гистологических полутонких срезов роговиц поперечной ориентации через 12 месяцев после травмы показало, что она содержала 5 слоев: эпителий, Боуменова мембрана, строма, Десцеметова мембрана и эндотелий. Определялось наличие рубца, проходящего через все слои роговицы, размером от 6 до 34 мкм.

Строма рубца после проникающего ранения утрачивала характерную для нормальной роговицы слоистость и прозрачность и содержала плотно переплетенные коллагеновые волокна. Его край, прилегающий к переднему эпителию, имел более грубую структуру (рис. 2), чем в центральных и парацентральных зонах по сравнению с нормальной тканью роговицы.

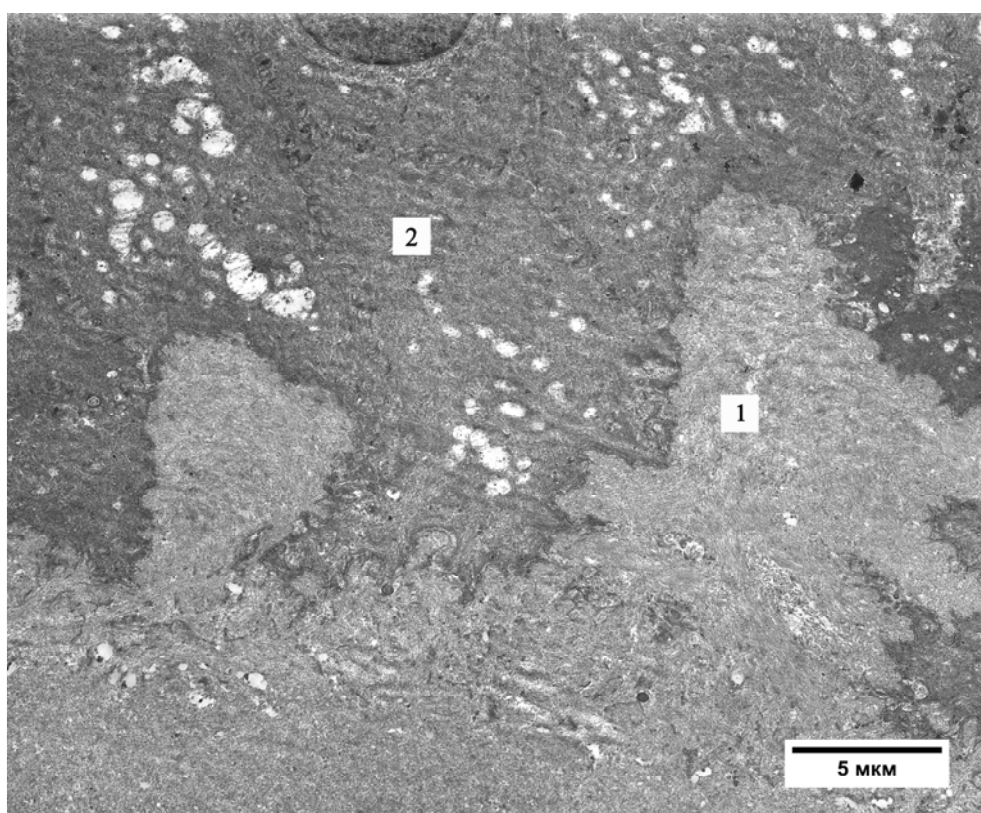


Рис. 2. Гипертрофия рубцовой ткани в области Боуменовой мембраны (1). Вростание базального эпителия (2). Электронограмма.

Отмечалось вращение базального эпителия в местах разрыва Боуменовой мембраны в строму: от микроскопических островков, до объемных фокусов, заполняющих значительной протяженности щели в рубцовой ткани. Степень гиперплазии эпителия в месте рубца зависела от варибельности ориентации краев передней пограничной мембраны. При хорошей адаптации краев формировался небольшой соединительно-тканый зазор со слабо выраженной эпителиальной гиперплазией. Часто отмечалась депрессия или элевация одного из концов Боуменовой мембраны или его относительный заворот внутрь.

Это, нередко наряду со значительной гипертрофией передней пограничной мембраны в зоне ранения, сопровождалось гипертрофией эпителиальных клеток, приводящих к увеличению толщины роговичного эпителия. Удлинение клеток базального эпителия происходило в зонах неровностей или волнистостей Боуменовой мембраны, словно клетки растягивались, заполняя впадины, без изменения поверхностного контура эпителиального пласта. Редко края передней пограничной мембраны в месте разрыва располагались на значительном расстоянии, при этом формировалась широкая щель, заполненная базальным эпителием (рис. 3). Эпителиальная гиперплазия не обнаруживалась в местах неизменной роговицы и парарубцовой зоне.

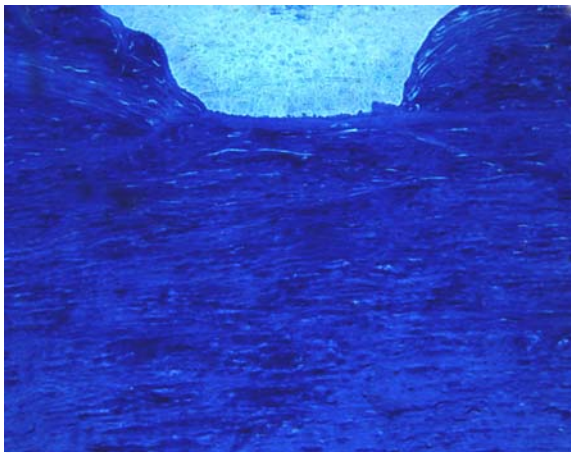


Рис. 3. Края Боуменовой мембраны в месте разрыва гипертрофированы и располагаются на значительном расстоянии. В месте рубца сформировалась широкая щель, заполненная базальным эпителием. Полутопкий срез. Окраска метиленовым синим. $\times 400$.

Количественный анализ показал, что толщина эпителиального слоя в зоне рубца составляла $67,4 \pm 13,2$ мкм. Передний эпителий был представлен более чем 8 рядами клеток. В зоне прилежащей к рубцу – $53,7 \pm 9,1$ мкм, эпителиальный пласт характеризовался 6-8 клеточными рядами, в неизменной области роговицы – $43,8 \pm 5,7$ мкм (6 рядов клеток). Вращение эпите-

лия в строму рубца наблюдалось в 78% случаев.

Наибольший компонент роговицы был представлен стромой. В неизменной зоне роговицы она состояла из ламелл. В передней части стромы ламеллы располагались в переднезаднем направлении. Отмечалось нелинейное, случайное распределение коллагеновых фибрилл чуть ниже передней пограничной мембраны. В средней и задней строме ламеллы проходили в плоскости роговицы и пересекались с соседними пластинками под разными углами. Между ламеллами определялись кератоциты. Внутри каждой пластинки плотно упаковывались упорядоченные коллагеновые фибриллы параллельными массивами.

Толщина стромы роговицы в зоне рубца составляла $371,4 \pm 46,3$, что на 23,7% меньше ($p < 0,05$) чем в неизменной зоне ($487,3 \pm 58,1$ мкм). В месте рубца строма роговицы характеризовалась нарушением типичной ламеллярной структуры и содержала хаотично направленные коллагеновые волокна. Целостность базальной мембраны эпителия, вероятно, влияла на регенеративную способность роговицы в ответ на повреждение, вызывая тем самым трансформацию фибробластов в миофибробласты в передней строме роговицы [5], что стимулировало выраженную фиброзную реакцию (рис. 4).

Известно, что в норме удельное количество кератоцитов уменьшается от передней к задней строме. Проведенный сравнительный анализ численной плотности кератоцитов показал достоверное их увеличение на 44,2% (рис. 5) в области рубца передней стромы по сравнению с передней стромой неизменной роговицы, а также отсутствие достоверного различия параметров в задней строме неизменной роговицы и в рубцовой ткани через 12 месяцев после травмы.

Исследование Десцеметовой мембраны в зоне рубца показало, что края ее в месте ранения располагались на расстоянии, при этом место разрыва было заполнено фиброзной соединительной тканью, а края неравномерно подтягивались к месту рубца. В неизменной зоне роговицы толщина Десцеменовской мембраны составляла $11,3 \pm 1$ мкм.

Эндотелиальные клетки имели большое ядро и все нормальные клеточные органеллы. Плотность эндотелиальных клеток в роговицах через 12 месяцев после травмы составляла 2307 ± 974 клеток/мм², что соответствовало норме.

Заключение

Данное исследование показало, что применение традиционной методики первичной хирургической обработки проникающих ранений роговицы приводит через 9-12 месяцев к снижению ее толщины в месте рубца на 24,2% ($p < 0,05$), чем в неизменной прилежащей ткани. Отмечается вращение и гиперплазия базального эпителия в

строму в местах разрыва Боуеновой мембраны, депрессия или элевация одного из ее концов или

его относительный заворот внутрь, гипертрофия передней пограничной мембраны в зоне ранения.

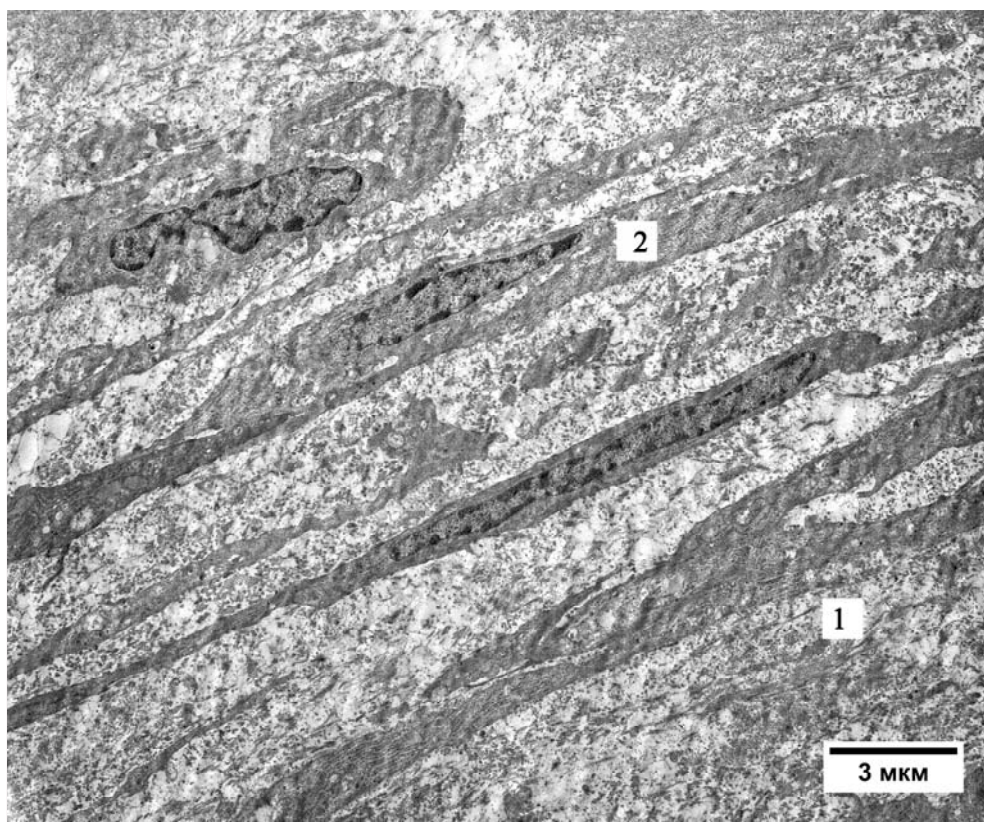


Рис. 4. Строма роговицы в месте рубца через 12 месяцев после проникающего ранения. Нарушение типичной ламеллярной структуры с дезорганизацией коллагеновых волокон (1). Миофибробласт (2). Электронограмма.

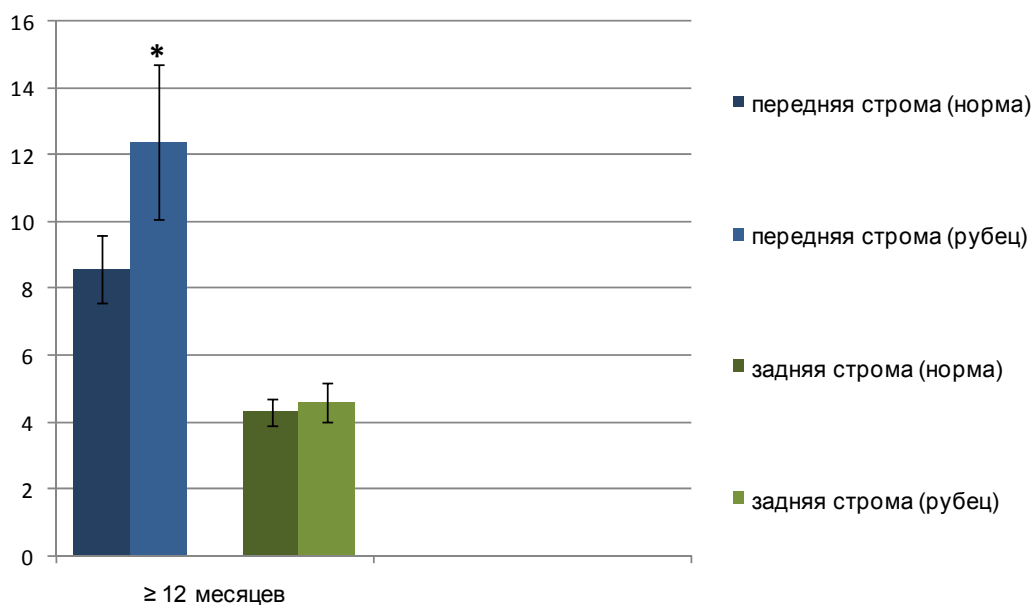


Рис. 5. Численная плотность кератоцитов в передней и задней стромах в норме и в зоне рубца через 12 месяцев после травмы ($\times 10^{-4} \text{ мкм}^{-3}$).

Примечание: «*» указывает на достоверное отличие от параметров неизменной зоны стромы роговицы.

Сформированная рубцовая ткань не содержит нормальные ламеллы и теряет их правильную ориентацию. Строма рубца представлена плотно упакованными дезорганизованными фибриллами и клетками соединительной ткани (кератоцитами и миофибробластами).

Заживление раны характеризуется активацией фиброзного ответа, в котором часто быстрого заживления приводит к значительному восстановлению функции [6]. Однако в роговице репарация сопровождается определенными проблемами: в виде снижения прозрачности, что связано с дезорганизацией стромы роговицы; возникновения оптических аберраций, вызванных контракцией фиброзной ткани вследствие ее перестройки в месте сформированного рубца. С другой стороны, такая плотная структура рубца создает относительно благоприятные условия для восстановления и перестройки соседних уча-

стков стромы, препятствуя тем самым их чрезмерной гидратации.

Заживление ранения роговицы происходит через серию этапов: активация репарации (повреждение роговицы, пролиферация и миграция клеток роговичного эпителия, кератоцитов стромы, эндотелиальных клеток; клеточная дифференциация с активным восстановлением, синтезом и накоплением экстрацеллюлярного матрикса) и ремоделирование ткани. Функция роговицы (прозрачность и целостность) обычно восстанавливается, однако, этого после завершения ремоделирования не всегда достаточно для обеспечения высокой остроты

Перспективы дальнейших исследований связаны с ультраструктурным анализом репарации и ремоделирования роговицы на этапах заживления раны после проникающей травмы.

Литературные источники References

1. Wong, T.Y., Klein, B.E., Klein, R. The prevalence and 5-year incidence of ocular trauma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2000;107:2196–202.
2. Katz J, Tielsch JM. Lifetime prevalence of ocular injuries from the Baltimore eye survey. *Arch Ophthalmol*. 1993;11:1564–8.
3. Quantock A., Young R. Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev. Dyn*. 2008;237:2607–21.
4. Farrell RA, McCally RL. Corneal transpa-

rency: DM Albert, Jakobiec FA., editors. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000:629–43.

5. Boote C, Du Y, Morgan S, Harris J, Kamma-Lorger CS, Hayes S, Lathrop KL, Roh DS, Burrow MK, Hiller J, Terrill NJ, Funderburgh JL, Meek KM. Quantitative assessment of ultrastructure and light scatter in mouse corneal debridement wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:2786–95.

6. Grillo HC, Gross J. Collagenolytic activity during mammalian wound repair. *Dev Biol*. 1967;15:300–17.

Іванченко М.В., Галайда Н.О. Морфологічна оцінка стану рубцевої тканини та різних шарів рогівки після проникаючого поранення ока.

Реферат. Метою роботи було гістологічний та ультраструктурне дослідження організації рубця рогівки після проникаючої травми. У результаті дослідження встановлено, що загоєння рани рогівки характеризується активацією фіброзної відповіді, проте репарація супроводжується певними проблемами: у вигляді зниження прозорості, що пов'язано з дезорганізацією стромы рогівки, а також виникнення оптичних аберрацій, викликаних контракцією фіброзної тканини внаслідок її перебудови в місці сформованого рубця.

Ключові слова: проникаюче поранення ока, рогівка, рубець.