

УДК 617.711–044.4–092.9:616–091.8:617.713

Патоморфологічні особливості рогівково-лімбальної зони у експериментальних тварин при моделюванні дегенеративно-проліферативного процесу, пов'язаного з наростанням кон'юнктиви на рогівку

Е. В. Мальцев¹, д-р мед. наук, проф., В. Я. Усов¹, д-р мед. наук, Н. Ю. Крицун², асп.

¹ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім.

В. П. Філатова НАМН України», Одеса (Україна)

²Івано-Франківський медичний університет, Івано-Франківськ (Україна)

E-mail: ussov2002@rambler.ru

Ключові слова: рогівка, лімб, птеригіум, моделювання дегенеративно-проліферативного процесу

Ключевые слова: роговица, лимб, птеригиум, моделирование дегенеративно-пролиферативного процесса

Цель исследования: выявить гистологические особенности в лимбально-роговичной зоне у экспериментальных животных в разные сроки моделирования дегенеративно-пролиферативного процесса, связанного с нарастанием конъюнктивы на роговицу, максимально приближенного к клиническим проявлениям птеригиума.

Результаты: в эксперименте на 28 глазах 14 кроликов породы шиншилла изучены патоморфологические особенности последствий развития лимбальной недостаточности в разные сроки моделирования дегенеративно-пролиферативного процесса.

Pathomorphological features of corneal — limbal zone in experimental animals when modeling degenerative — proliferative processes associated with the growth of the conjunctiva on the cornea

E. V. Maltsev, V. Ya. Usov, N. Yu. Krytsun

State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine, Odessa, (Ukraine)
Ivano-Frankivskyi medichnyi universitet, Ivano-Frankivsk (Ukraine)

Key words: the cornea, the limb, pterygium, degenerative and proliferative modeling process,.

Objective: to identify the histological features in the limbal-corneal zone in experimental animals at different periods of the experiment, after modeling degenerative and proliferative process associated with the growth of the conjunctiva to the cornea, as close as possible to clinical manifestations of pterygium.

Results: In an experiment on 28 eyes of 14 rabbit's chinchilla studied pathological features of development of limbal insufficiency in different terms modeling degenerative and proliferative process.

Вступ. Птеригіум — це доброякісне фіброваскулярне утворення, яке представляє собою наростання кон'юнктивальної тканини на рогівку в напрямку від лімба до її центру, можливо, за рахунок гіперпроліферації лімбальних епітеліальних клітин, яке супроводжується формуванням новоутворених судин [10].

При патоморфологічних дослідженнях більшість авторів відмічають, що дистрофічні зміни в епітелії, базальній мембрані та сполучній тканині передують появі птеригіуму і відіграють велику роль у його розвитку [1]. Ряд авторів вважають, що причина, яка викликає дистрофічні зміни, підтримується порушенням мікроциркуляторного русла [10]. Вони відмічають взаємозв'язок значного розширення

периферичного судинного русла і шляхів венозного відтоку з ростом птеригіуму. Гістологічно, птеригіум утворений рихлою волокнистою сполучною тканиною, з великою кількістю судин мікроциркуляторного русла і вираженими явищами мукоїдного і фібриноїдного набухання міжклітинних структур. Еластичні волокна фрагментовані, нерівномірної товщини. Кровоносні судини розширені, спостерігаються ознаки розладів гемоциркуляції (сладж-феномен). В гемокапілярах є ультраструктурні пошкодження ендотеліоцитів. Базальна мембрана — з локальними дефектами за рахунок розривлення і

© Е. В. Мальцев, В. Я. Усов, Н. Ю. Крицун, 2014

лізису аморфного компонента. В поверхневих зонах птерігіуму знайдені епітеліальні розростання. При цьому в кон'юнктивальній частині покривні пласти складаються переважно із високодиференційованих циліндричних та келихоподібних клітин [9]. По своєму фенотипу вони нагадують слизепродукуючі епітеліоцити [4, 5]. Ці зміни в сполучній тканині та судинах виникають під дією росту птерігіуму, створюють замкнуте коло, що і обумовлює прогресуючий розвиток птерігіуму [2,3].

Відомо, що птерігіум характеризується еластоїдною дегенерацією і фрагментацією колагенових волокон, а також активною проліферацією епітелію, в якому відмічають потовщення шару, різний ступінь кератинізації, іноді спонгіоз в поєднанні з субепітеліальним набряком або запаленням [8]. Група закордонних дослідників виявила ознаки молодої, новоутвореної сполучної тканини у безсудинній частині голівки прогресуючого птерігіуму. Ця тканина досить подібна рогівковій сполучній тканині, крім цього, пластинки є більш тонкими і безладно переплетеними. Вона має значно більше клітинних елементів сполучної тканини круглої форми, у порівнянні із нормальною рогівковою оболонкою. Незрілий характер цієї новоутвореної безсудинної сполучної тканини також підтверджений гістохімічними аналізами. Виявлено потовщення та розшарування базальної мембрани. У дистальних відділах голівки стаціонарного птерігіуму виявлено компактнішу сполучну тканину, ніж у прогресуючому птерігіумі, яка складається із товстіших рогівкоподібних пластин, але не так регулярно організованих. Ця тканина вміщує значно меншу кількість клітинних елементів, тонких і ледве видимих, у порівнянні із новоутвореною сполучною тканиною у прогресуючому птерігіумі. Ці дані вказують, що відбувається руйнування сполучної тканини. Базальна епітеліальна мембрана у безсудинній частині стаціонарного птерігіуму є менш потовщеною та менш дешарованою, ніж у прогресуючому птерігіумі. Новоутворена структура у пінгвекулярній частині птерігіуму розміщена субепітеліально та розвивається в сторону рогівкової оболонки. У рогівковій частині птерігіуму ця новоутворена та добре васкуляризована тканина розміщена між епітелієм (включаючи шар Боумена) та грубо розташованими шарами строми. Основна частина птерігіуму складається із сполучної тканини, яка в процесі еволюції птерігіуму, зазнає патологічних змін, що супроводжуються збільшенням маси самого птерігіуму [7, 8].

Мета дослідження — виявити гістологічні особливості лімбальної — рогівкової зони у експериментальних тварин в різні терміни експерименту, після моделювання дегенеративно-проліферативного процесу, пов'язаного з наростанням кон'юнктиви на рогівку і максимально наближеного до клінічних проявів птерігіуму.

Матеріал і методи

Експериментальне дослідження проведено на 28 очях 14 кроликів породи шиншила масою 2,5–3,5 кг, самцях. Експериментальне моделювання проводили на базі віварію ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України». Спостереження, догляд, оперативне втручання на тваринах, а також виведення їх з експерименту виконувались у відповідності до міжнародних правил по роботі з дослідними тваринами.

Для моделювання дегенеративного процесу в лімбальній частині очей експериментальних тварин застосовували хірургічне видалення частини лімбальної зони, аплікації спирту — *n*-гептанолу та фіксацію лоскута кон'юнктиви на рогівці вузловими швами [6].

Усі кролики були поділені на 3 дослідні групи: в I групі проводили моделювання дегенеративного процесу на п'яти кроликах (10 очей), де застосовували видалення частини лімбальної зони та фіксували кон'юнктиву на рогівці одним вузловим швом; в II групі проводили моделювання дегенеративного процесу на п'яти кроликах (10 очей), де поєднували видалення частини лімбальної зони з використанням *n*-гептанолу та фіксацією кон'юнктиви на рогівці одним вузловим швом; в III групі піддослідних тварин поєднали видалення частини лімбальної зони з використанням *n*-гептанолу та фіксацією лоскута кон'юнктиви на рогівці десятьма вузловими швами.

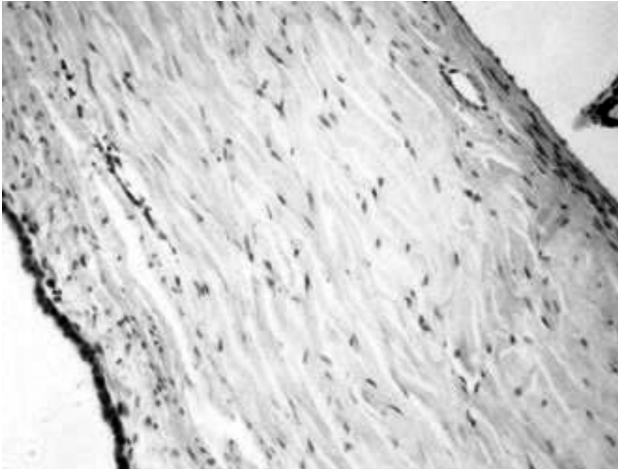
Морфологічне дослідження очного яблука було проведено через 1, 2, 3 та 5 місяців після експерименту. При цьому в третій групі спостережень термін був обмежений 2 місяцями, в другій групі, де був використаний *n*-гептанол, він був продовжений до 3 місяців, а в першій, де цей алкоголь взагалі не використовувався, він був продовжений аж до 5 місяців. Матеріал фіксували в 10 % розчині формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, обробляли в ксилолі, ушільнювали і заливали в парафін. З парафінових блоків робили серійні зрізи товщиною (5 ± 1) мкм. Після депарафінізації зрізи фарбували гематоксилін-еозином та ставили гістохімічну ШИК-реакцію.

Вивчення препаратів проводилось на мікроскопі «Laboval 4, Carl Zeiss, Jena», а їх мікрофотографування — на цифрову фотокамеру «Canon Power Shot A480» з використанням зумеру, на малюнках вказані відповідні збільшення (об'єктив та окуляр).

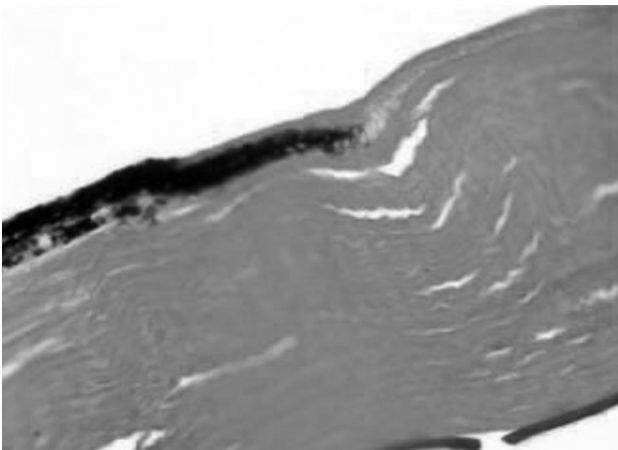
Результати та їх обговорення

Після проведеного гістологічного дослідження отримані наступні результати. В I групі піддослідних тварин, де застосовували видалення частини лімбальної зони та фіксацію відсепарованої кон'юнктиви одним вузловим швом, через 1 місяць, а також через 3 та 5 місяців після видалення лімба місце операції майже не візуалізувалось, вся поверхня рогівки була звичайно епітелізована переднім епітелієм, диференційованим по шарам.

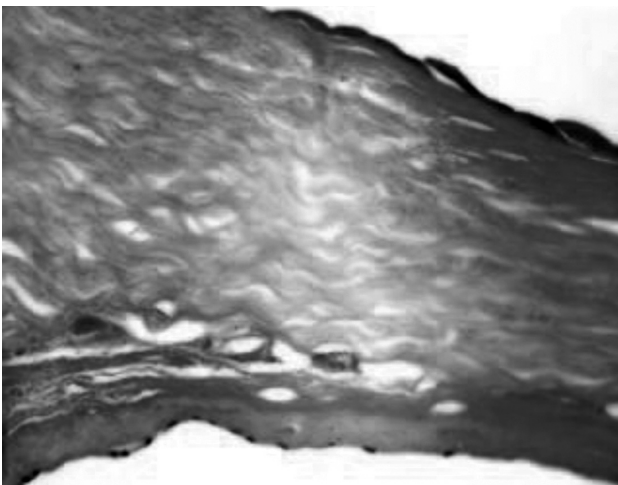
В клітинах цього епітелію на кордоні з лімбом було виявлено багато гранул меланіну, а іноді цей епітелій утворював акантогітні вростання в струму рогівки, в якій спостерігалась збільшена кількість клітинних елементів і дрібні кровоносні судини. Іноді в зоні операції, в окремих ділянках переднього епітелію не спостерігалось поверхневих плоских



Мал. 1. Васкуляризація глибоких шарів рогівки біля десцеметової мембрани. 3 місяці спостереження. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення (10×16).



Мал. 2. Прилімбальна зона прооперованої рогівки при постановці ШИК-реакції. 5 місяців спостереження. Збільшення (10×16).



Мал. 3. Вуглеводні компоненти рогівки, в тому числі в фіброваскулярному вrostанні та бокаловидних клітинах переднього епітелію через 1 місяць спостереження. ШИК-реакція. Збільшення (10×16)

клітин, а під цими ділянками містились порожнини та круглоклітинні елементи, ці зміни носили вогнищевий характер. В деяких випадках відмічались ознаки васкуляризації навіть біля десцеметової мембрани (мал.1). Виявлялась деформація препаративної ділянки у вигляді «втягування» трабекулярної тканини.

При проведенні ШИК-реакції було виявлено, що її інтенсивність у рогівці більш виражена, ніж у райдужній оболонці та циліарному тілі. При цьому вона найбільш висока в десцеметовій мембрані, а також в келихоподібних клітинах епітелію кон'юнктиви. Посилена вона також і в деформованій області глибоких шарів лімба.

При ШИК-реакції в передньому епітелію контурувались світлі ядра його клітин, менш інтенсивно зафарбованих, ніж цитоплазма, навіть по сусідству з пігментованими клітинами зони лімбу (мал. 2).

Залишається констатувати, що просте хірургічне видалення стовбурових клітин разом з частиною лімбальної зони рогівки не призводить до появи якихось ознак птеригіума навіть при подовженні строку спостереження за тваринами до 5 місяців після операційного втручання. Можливо, це пов'язано з тим, що в краях операційної рани залишаються стовбурові клітини, які проліферують, мігрують та вистилають донну частину рани, тим самим відновлюючи функції лімбальної зони рогівки.

В II групі експериментальних тварин поєднували видалення частини лімбальної зони з використанням спирту n-гептанолу та фіксацією кон'юнктиви на рогівці одним вузловим швом. Через 1 місяць після операції спостерігалось масивне фіброваскулярне розростання, яке починалось між склерою та кон'юнктивою і продовжувалось в рогівку між її строною та переднім епітелієм. Воно складається з різних клітин, які містять круглі, овальні або видовжені ядра, кровоносних судин та міжклітинної речовини. В ділянці склери це розростання тягнеться за межі плоскої частини циліарного тіла, ця ділянка вкрита кон'юнктивою, а в рогівці — її переднім епітелієм. В цьому місці спостерігається явище кон'юнктивалізації з наявністю келихоподібних клітин, які чітко візуалізуються у випадку проведення ШИК-реакції і розповсюджуються приблизно до середини фіброваскулярної тканини в рогівці (мал.3).

При гістологічному дослідженні в трьохмісячний термін експерименту спостерігається певна динаміка. Перш за все, звертає на себе увагу те, що і надалі визначаються ділянки оперативного втручання, а саме, спостерігаються потовщення рогівки у порівнянні з прилеглою тканиною. Епітелій в цій зоні складається з декількох рядів клітин (плоских клітин серед них немає), що свідчить про кон'юнктивальну природу цього епітелію (мал.4).

В цій фіброваскулярній тканині ШИК-реакція трохи слабша, ніж у власній речовині рогівки, а в

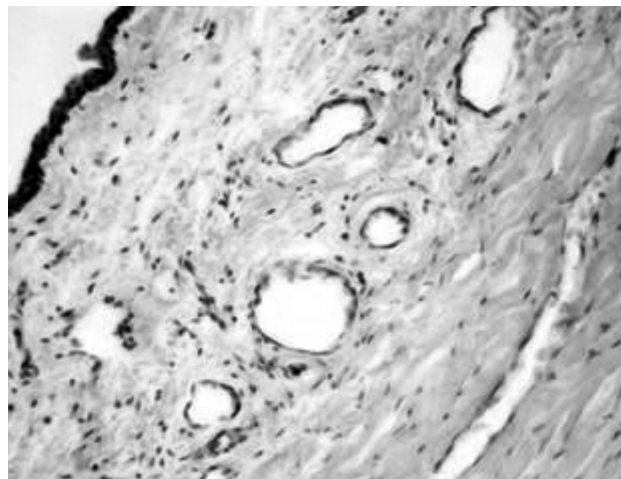
її передньому кон'юнктивалізованому епітелію є келихоподібні клітини. Важливо, що площа фіброваскулярної проліферації може бути різною (більшою або меншою) на різних очах (мал.5). У всій товщі розростання спостерігається велика кількість кровоносних судин, деякі з них проникають у глибше розташовану строму рогівки, а в загальному васкуляризація навіть більш виражена, ніж через 1 місяць після втручання. Передній епітелій кон'юнктивалізований, в ньому при проведенні ШИК-реакції можна побачити келихоподібні клітини у значній кількості. Сама фіброваскулярна тканина побудована з міжклітинної речовини та клітин з овальними, рідше круглими ядрами. Трапляються іноді і такі місця, де клітин значно більше, ніж зазвичай (мал. 6).

В III групі піддослідних тварин поєднали видалення частини лімбальної зони з використанням н-гептанолу та фіксацією лоскута кон'юнктиви на рогівці десятима вузловими швами. Через 1 місяць після операції переміщена тканина кон'юнктиви піддалася певній трансформації, що, в поєднанні з вrostанням клітинних елементів і судин з області дна рани, призвело до утворення підепітеліальної фіброваскулярної тканини (мал.7).

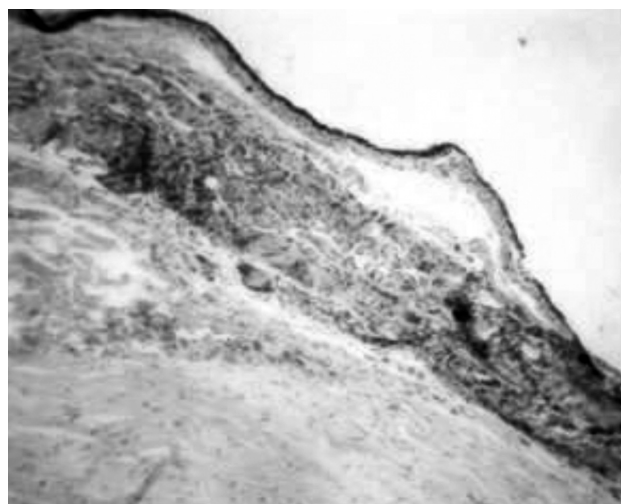
Остання проростає в рогівці на протязі приблизно до рівня середньої третини або навіть середини райдужки, і являє собою васкуляризовану міжклітинну речовину з різною кількістю клітинних елементів. Вони представлені фібробластами / фіброцитами, лімфоцитами, рідше плазматичними клітинами. Цікаво, що клітини цієї тканини можуть розташовуватися попереду наступних за ними кровоносних судин, що характерно і для тканини птеригіума (мал.8). Епітелій над цим утворенням може бути кон'юнктивальним, далі переходячи в рогівковий. Однак в останньому відзначаються явища акантозу (мал.9), і до нього наближаються келихоподібні клітини, добре помітні при ШИК — реакції. Іноді можна спостерігати в цій зоні і залишки меланіну, що були в клітинах епітелію прилімбальної області до операції і зруйнованих при ній, причому особливо чітко вони візуалізуються на тлі ШИК-позитивних речовин (мал.10).

До кінця двомісячного терміну експерименту структура оперованої області рогівки принципово така ж — фіброваскулярна тканина під переднім епітелієм, що досягає іноді рівня внутрішньої третини райдужки (мал. 11).

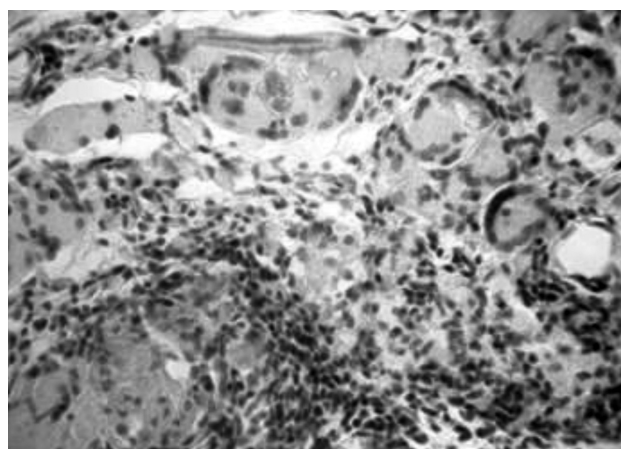
Деякі з клітин цієї тканини (фібробласти, лімфоцити) розташовуються перед врастаючими судинами. Розташований над нею передній епітелій може бути як типовим багат шаровим плоским, так і мати дещо іншу будову — наприклад: зменшення числа шарів шипуватих клітин, різке сплюснення плоских клітин, що свідчить про його субатрофію. Слід зазначити, що фібробласти в цьому місці



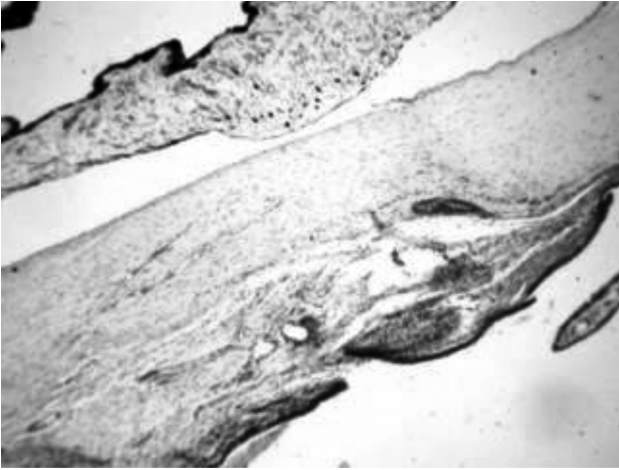
Мал. 4. Кон'юнктивальний епітелій, що покриває підлеглу фіброваскулярну тканину через 3 місяці спостереження. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення (10×16).



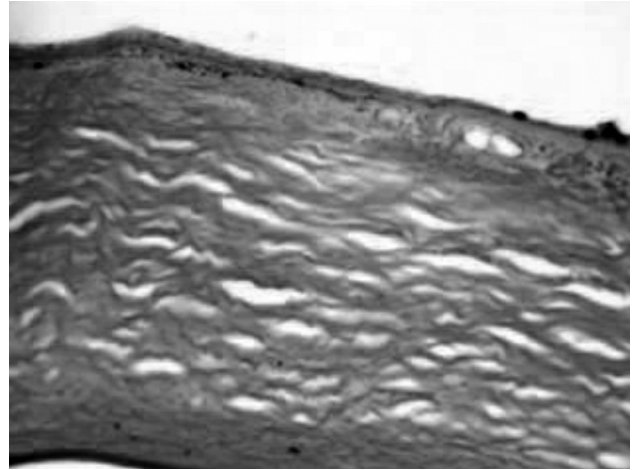
Мал. 5. Масивне фіброваскулярне вrostання під передній епітелій рогівки через 3 місяці спостереження. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення (3,2×16).



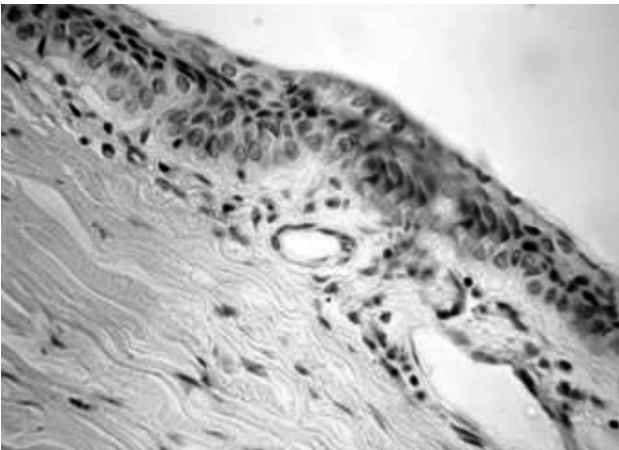
Мал. 6. Ділянка фіброваскулярної тканини зі значною кількістю клітин через 3 місяці експерименту. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення (40×7).



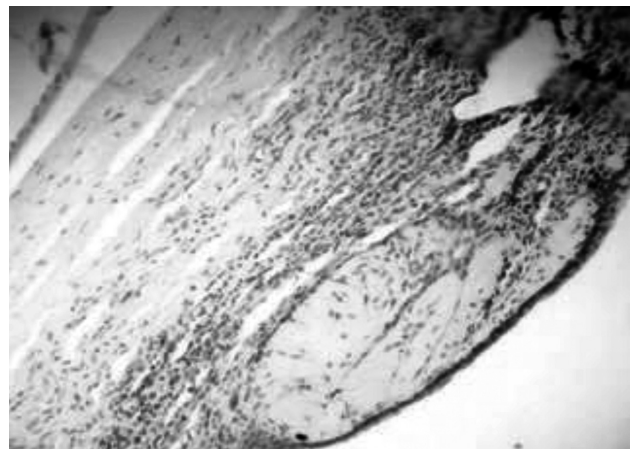
Мал. 7. Фіброрваскулярна тканина в рогівці, розташована на рівні середньої третини райдужки через 1 місяць після операції. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення (3,2x16).



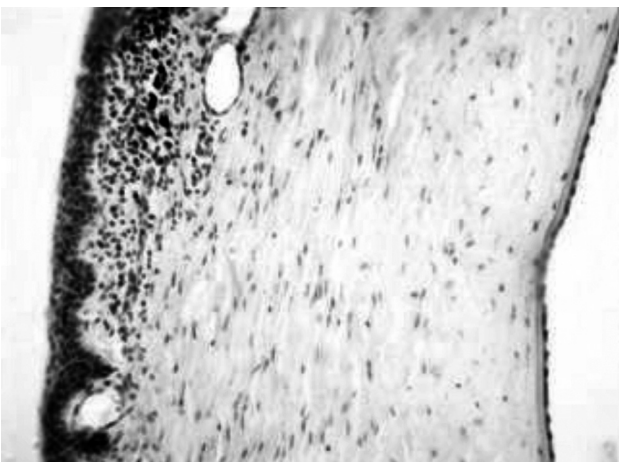
Мал. 10. Гранули меланіну в фіброрваскулярній тканині серед ШИК-позитивного матеріалу через 1 місяць після операції. ШИК-реакція. Збільшення (10 × 16).



Мал. 8. Клітини фіброрваскулярної тканини, мігруючі попереду наступних за ними судин через 1 місяць після операції. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення (40x7).



Мал. 11. Фіброрваскулярна тканина під переднім епітелієм рогівки через 2 місяці після операції. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення (10x7).



Мал. 9. Фіброрваскулярна тканина під акантотично змінним переднім епітелієм рогівки через 1 місяць після операції. Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення (10x16).

кон'юнктиви подовжилися, а їхні ядра ущільнились. Але таких клітин у ній більше, ніж в стромі рогівки. ШИК -позитивні речовини розподіляються по структурам рогівки аналогічно попередньому терміну спостереження.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що завдяки поєднанню видалення частини лімбальної зони та використанню аплікацій n-гептанолу, з максимальною фіксацією лоскута кон'юнктиви на рогівці великою кількістю швів, в лімбально-рогівковій зоні розвивається лімбальна недостатність, яка провокує розвиток дегенеративно-проліферативного процесу, який посилюється зі збільшенням тривалості експерименту, в результаті чого розвивається клінічний симптомокомплекс, який відповідає птерігіуму [7].

Висновки

1. Оперативне видалення фрагмента лімба не призводить до розвитку в рогівково-лімбальній зоні дегенеративно-проліферативного процесу при давності спостереження за експериментальними тваринами до 5 місяців.

2. Часткове видалення лімбальної тканини механічним шляхом та застосування аплікацій н-гептанолу викликає значне фіброваскулярне вросання зміненої кон'юнктивальної тканини з перилімбальної зони в строму рогівки. Розміщується така фіброваскулярна тканина під переднім епітелієм рогівки, який може піддаватись кон'юнктивалізації, тобто втрачати типову для переднього епітелію диференціацію по шарам і перетворюватись в епітелій, який характерний для кон'юнктиви, в якому розмі-

щуються келихоподібні клітини, що є характерною ознакою дистрофічного процесу.

3. Дія н-гептанолу поширюється в сторони на значну відстань від просякнутого ним шматка фільтрувального паперу, здійснюючи токсичний вплив на невидалені механічним шляхом стовбурові клітини, посилюючи ефект лімбальної недостатності, який ми побачили у вигляді фіброваскулярного розростання.

4. В третій серії експериментальних тварин, коли до видалення частини лімбу та дії н-гептанолу було додано надійну пластику кон'юнктиви, отримано максимально приближену клінічну картину птеригіуму, що було нашою основною метою при експериментальному моделюванні дегенеративно-проліферативного процесу.

Література

1. **Билалов Э. Н., Бахритдинова Ф. А.** Локальная микроциркуляция с первичным птеригиумом по данным флюоресцеин-ангиографических исследований // Вестн. офтальмол. — 2005. — № 6. — С.14–16.
2. **Волоховская З. П., Байраммурадов Р. А., Гапурова Г. Н.** Атипизм конъюнктивального эпителия на месте удаленного птеригиума // Здравоохр. Туркменистана. — 1988. — № 6 (342). — С.19–22.
3. **Волоховская З. П.** Морфологические изменения микроциркуляции конъюнктивы при птеригиуме// Здравоохр. Туркменистана: теорет. и клин. медицина. — 1992. — № 3. — С.40–44.
4. **Канюков В. Н., Стадников А. А., Ломухина Е. А.** Морфологический анализ птеригиумов // Матер Міжнар. наук. конф., присв 100-річчю академіка Н. О. Пучковської «Сучасні аспекти клініки, діагностики та лікування очних хвороб». 29–30 травня 2008 р. — Одеса, 2008. — С.363.

5. **Канюков В. Н., Стадников А. А., Ломухина Е. А.** Морфофункциональная характеристика птеригиумов // Материалы докл. IX Конгреса МАМ Морфология. — 2008. — С.58.
6. **Мальцев Е. В., Усов В. Я., Крицун Н. Ю.** Моделирование птеригиума // Офтальмол. журн. — 2013. — С.79–82.
7. **Титаренко З. Д., Гончар П. Ф., Титаренко И. В.** Птеригиум. — Кишинев, 1992. — 86 с.
8. **Dzunic B., Jovanovich P., Vaseinovic D.** Analysis of pathophysiological characteristics of pterygium // Bosnian J. basic medical sciences. — 2010. — Vol. 10(4). — P.307–313.
9. **Golu T., Mogoanta L., Streba C. T., Pirici D. N., Malaescu D., Mateescu G. O.** Pterygium: histological and immunohistochemical aspects // Rom J Morphol. Embryol — 2011. — Vol.52, (1). — P.153–158.
10. **Isyaku M.** Treatment of pterygium // Annals African Medicine — 2011. — Vol.10. № 3 — P.197–203.

Поступила 12.03.2014

References

1. **Bilalov EN, Bakhritdinova FA.** Local microcirculation with primary pterygium according to fluorescein-angiographic studies. Vestn oftalmol. 2005;6:14–6. Russian.
2. **Volokhovskaya ZP, Bairammuradov RA, Gapurova GN.** Conjunctival epithelial atypia on the place of remote pterygium. Zdravookhraneniie Turkmenistana. 1988; 6 (342):19–22. Russian.
3. **Volokhovskaya ZP.** Morphological changes of the conjunctival microcirculation in pterygium. Zdravookhraneniie Turkmenistana. 1992;3:40–4. Russian.
4. **Kanyukov VN, Stadnikov AA, Lomukhina EA.** Morphological analysis of pterygium. Proceedings of International scient. Conf., dedicated to 100 ann. Of acad. NA Puchkovskaya. 29–30 May, 2008. Odessa, 2008. 363.

5. **Kanyukov VN, Stadnikov AA, Lomukhina EA.** Morphofunctional characteristic of pterygium. Proceedings of IX Congress MAM Morphology. 2008. 58.
6. **Maltsev EV, Usov VYa, Kritsun NYu.** The pterygium modeling. Oftalmol Zh. 2013;2:79–82. Ukrainian.
7. **Titarenko ZD, Gonchar PF, Titarenko IV.** Pterygium. Kishinev; 1992. 86 p.
8. **Dzunic B, Jovanovich P, Vaseinovic D.** Analysis of pathophysiological characteristics of pterygium. Bosnian J. basic medical sciences. 2010;10(4):307–13.
9. **Golu T, Mogoanta L, Streba CT, Pirici DN, Malaescu D, Mateescu GO.** Pterygium: histological and immunohistochemical aspects. Rom J Morphol. Embryol. 2011;52(1):153–8.
10. **Isyaku M.** Treatment of pterygium. Annals African Medicine. 2011;10(3):197–203.

Received 12.03.2014