

И.А. Злобин, В.Ф. Черныш, С.В. Чурашов,
В.С. Чирский, А.С. Рудько, В.Е. Курносов

Роль импрессионной цитологии в оценке фенотипа эпителия роговицы при решении вопроса о показаниях к операции оптической кератопластики

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Усовершенствованная методика импрессионной цитологии при проведении морфологического, визуально-количественного анализа позволяет определить морфологический статус эпителия роговичного бельма и по его характеру разделить пациентов на две группы. Из 40 глаз с сосудистыми бельмами роговицы роговичный фенотип имел место на 28 (70%) глазах. Случаи с конъюнктивальным эпителием составили 12 (30%) глаз. Данные импрессионной цитологии во всех случаях были подтверждены при гистологическом исследовании эпителия роговичных дисков. Полученные результаты являются основанием для разделения пациентов по показаниям к выполнению сквозной кератопластики (на глазах с роговичным эпителием бельма) или лимбальной трансплантации (при бельмах с эпителием конъюнктивального фенотипа). В отдаленном периоде контроля (через 3 месяца) у 28 пациентов отмечалась быстрая эпителизация и прозрачное бессосудистое приживание роговичных трансплантатов. Острота зрения была равна 0,2–0,4 (средняя 0,36). Через 10–12 мес. у 12 пациентов роговичные трансплантаты были полностью эпителизованы и оставались прозрачными без признаков васкуляризации. Острота зрения колебалась в пределах 0,3–0,6 (средняя 0,45). Еще у 3 пациентов наблюдался отек и помутнение стромы трансплантата с активным врастанием сосудов. Тем не менее, при импрессионной цитологии у всех пациентов кератотрансплантаты оказались покрытыми эпителием роговичного фенотипа. Полученные данные подтвердили возможность исследования характера роговичного эпителия на глазах с сосудистыми бельмами с помощью импрессионной цитологии при решении вопроса о показаниях к оптической кератопластике.

Ключевые слова: эндотелиально-эпителиальная дистрофия, сосудистое бельмо, роговица, лимб, эпителизация, импрессионная цитология, офтальмологическое обследование, деструкция базальной мембраны, сквозная кератопластика, лимбальная трансплантация.

Введение. Традиционная оптическая сквозная кератопластика (СК) на глазах с сосудистыми бельмами роговицы зачастую малоэффективна и относится к кератопластике «высокого риска», так как связана с серьезными проблемами эпителизации пересаженного трансплантата и нередко ведет к рецидиву бельма [2].

В последние десятилетия установлено, что одной из причин сосудистого помутнения роговицы является гибель стволовых клеток роговичного эпителия, расположенных в роговичной части лимба. Дисфункция этих клеток получила название недостаточности эпителиальных стволовых клеток лимба или лимбальной недостаточности (ЛН). Клинически при этом в роговице могут возникать персистирующие и рецидивирующие эрозии с явлениями светобоязни, деструкция базальной мембраны, хроническое стромальное воспаление и рубцевание. На роговице постепенно нарастает конъюнктивальный эпителий, содержащий бокаловидные клетки (конъюнктивализация), что сопровождается врастанием в строму сосудов с формированием тотального фиброваскулярного паннуса, т.е. сосудистого бельма. Пересадка ро-

говицы на глазах с тотальной ЛН неизбежно ведет к рецидиву сосудистого бельма [2, 3, 9].

Причинами возникновения ЛН могут быть ожоги, травмы, хроническое воспаление, процессы рубцевания, нарушения увлажнения глазной поверхности, излишняя хирургическая активность в лимбальной зоне и т.п. [1].

Оптическая пересадка роговицы на таких глазах может рассчитывать на успех только после восстановления роговичного фенотипа ее эпителия. Это возможно, если устранить состояние тотальной ЛН посредством операции пересадки со здорового на больной глаз стволовых клеток роговичного эпителия – лимбальной трансплантации (ЛТ), которая выполняется в комплексе с предварительной поверхностной кератэктомией (ПК). При относительной прозрачности стромы бельма хороший визуальный исход можно ожидать даже при одной только ЛТ (без кератопластики) [2, 4].

С другой стороны, при бактериальных и аллергических кератитах, обширных язвах роговицы, травмах, и др. врастание сосудов в роговицу с формированием сосудистого помутнения стромы возможно и без ЛН. В этих случаях сосудистое

бельмо может сохранять эпителий роговичного фенотипа.

В связи с этим, при планировании оптической операции на глазу с сосудистым бельмом роговицы очень важно определить фенотип покрывающего ее эпителия. Одним из наиболее характерных признаков эпителия конъюнктивального фенотипа является наличие в нем бокаловидных клеток (отсутствующих в эпителии роговичного фенотипа). В литературе [5–8] имеются сообщения, что выявить их присутствие в эпителии роговицы (бельма) позволяет, в частности, морфологически неинвазивный метод импрессионной цитологии (ИЦ).

Цель исследования. Изучить возможности импрессионной цитологии как метода оценки фенотипа эпителия сосудистого бельма при решении вопроса о показаниях к оптической кератопластике.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 40 пациентов (40 глаз) из них 26 мужчин и 14 женщин в возрасте от 25–80 лет с тотальными сосудистыми бельмами роговицы.

Причинами формирования сосудистых бельм на глазах были: эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) в IV стадии (n=10); рецидивирующий метагерпетический кератит (n=4); рецидив бельма после традиционной оптической сквозной кератопластики (n=10); тяжелые химические ожоги (n=8); посттравматическое бельмо (n=5); бельмо в исходе обширной язвы роговицы (n=2); болезнь Стивенса – Джонсона (n=1). Васкуляризация носила как поверхностный, так и глубокий (или смешанный) характер и обычно охватывала большую часть бельма. Прозрачность роговицы была снижена; структуры передней камеры в большинстве случаев просматривались неотчетливо или не определялись совсем. Пациенты обратились в клинику офтальмологии для решения вопроса о хирургическом лечении с целью зрительной реабилитации.

Всем пациентам было выполнено общеклиническое и офтальмологическое обследование. Предоперационная острота зрения колебалась от движения руки у лица до 0,06. По данным ультразвукового исследования в режиме В-сканирования, патологии со стороны сетчатки, сосудистой оболочки и стекловидного тела не выявлено. Электрическая чувствительность и критическая частота исчезновения фосфена зрительно-нервного аппарата были в пределах нормы. Суммарная слезопродукция – проба Ширмера I – 11,31±8 мм/5 мин. Внутриглазное давление составляло от 16 до 25 мм рт. ст.

Для определения фенотипа эпителия поверхности бельм применяли ИЦ по методу Egbert – Adams [8]. При этом роговицу условно делили на 4 равных квадранта. После предварительной эпибульбарной анестезии посредством трехкратного закапывания 0,4% раствором инокаина забор клеточного материала выполняли путем аппликации ацетатцеллюлозного диска «Мсе мемbrane» 0,45 мм диа-

метром 8 мм на поверхность из каждого квадранта роговицы. Для лучшего охвата и прилегания к поверхности роговицы предварительно диск частично разрезали по границе его четырех квадрантов (секторов) до центральной зоны. Экспозиция аппликации – 10 с. После забора материала диск фиксировали в 96% об. этиловом спирте в течение 5 мин. Затем его промывали дистиллированной водой в течение 2 мин, окрашивали гематоксилином и альциановым синим. После окраски диск промывали водой в течение 1 мин. Для улучшения качества микропрепаратов к стандартной методике окраски по Граму применяли проводку через спирты (96% этиловый спирт на 5–10 мин, далее 70% об. изопропиловый спирт 10 мин). Диск выкладывали на предметное стекло, просветляли ксилолом и заключали под покровное стекло. Бокаловидные клетки определяли по характерной голубой окраске цитоплазмы клеток и смещенному к периферии фиолетовому ядру. Наличие или отсутствие бокаловидных клеток в микропрепарате соответственно свидетельствовало о конъюнктивальном или роговичном фенотипе эпителия (рис. 1)

По результатам ИЦ все наблюдения были разделены на 2 группы: 1-я группа – 28 пациентов, у которых бокаловидные клетки (БК) в эпителии бельма не обнаружены; 2-я группа – 12 пациентов с наличием в эпителии БК.

Пациентам 1-й группы проводилась сквозная кератопластика (СК). Пациентам 2-й группы с целью восстановления нормального эпителиального покрова роговицы выполняли ЛТ (в комплексе с ПК) в варианте конъюнктивально-лимбальной ауто- или аллотрансплантации, а также роговично-лимбальной аллотрансплантации [3]. Пациентам, у которых после ЛТ острота зрения из-за глубокого помутнения стромы оставалась низкой, планировали через 3 мес. дополнительно СК.

Для морфологического подтверждения достоверности метода ИЦ (наличия или отсутствия в эпителии бокаловидных клеток) эпителий трепанированного при СК диска сосудистого бельма или удаленного в ходе ПК фиброваскулярного паннуса роговицы направляли на гистологическое исследование. Приготовление препаратов проводили по стандартной методике. Для выявления мукополисахаридов как маркера бокаловидных клеток в эпителии роговицы (трансплантата) проводили ШИК-реакцию. Цитологическое и гистологическое исследование препаратов проводили с помощью светооптического микроскопа «Микмед-6» при увеличении 400.

Всем пациентам через 3 мес. после хирургического вмешательства, а также в отдаленном послеоперационном периоде (10–12 мес.) наряду с определением остроты зрения оценивали состояние прозрачности роговицы (трансплантата) и повторно выполняли ИЦ.

Результаты и их обсуждение. Эпителий роговичного фенотипа (без наличия БК) на поверхности бельма был выявлен у всех пациентов 1-й группы. Причиной бельма у них были: ЭЭД в IV стадии (n=10); рецидивирующий метагерпетический кератит (n=4); рецидив бельма после традиционной оптической СК (n=8); тяжелый химический ожог (n=1); посттравматическое бельмо (n=4); бельмо в исходе обширной язвы роговицы (n=1). 22 пациентам 1-й группы была выполнена СК. При гистологическом исследовании эпителия роговичных дисков, иссеченных при СК у всех пациентов 1-й группы, бокаловидных клеток в его составе также обнаружено не было. Через 3 месяца у всех пациентов 1-й группы после СК наблюдали прозрачное приживление и бессосудистую эпителизацию пересаженных кератотрансплантатов. Острота зрения в группе была равна 0,2 – 0,4 (средняя 0,36).

У всех пациентов 2-й группы был выявлен эпителий конъюнктивального фенотипа. Причиной бельма у них были: рецидив бельма после оптической СК по поводу термо-химического ожога (n=2); тяжелый химический ожог глаз (n=7); обширный посттравматический рубец роговицы (n=1); язва роговицы (n=1), синдром Стивенса – Джонсона (n=1).

Конъюнктивально-лимбальная аутоаллотрансплантация была проведена 5-и пациентам 2-й группы с бельмами после тяжелых химических ожогов. Еще одному пациенту с послеожоговым бельмом была выполнена конъюнктивально-лимбальная аллотрансплантация (донор – мать). Эта же операция проводилась пациенту с синдромом Стивенса – Джонсона (донор – сестра). Еще одному пациенту выполняли роговично-лимбальную аллотрансплантацию (с использованием лимба кадаверного глаза). Остальным пациентам (n=4) операция не проводилась. У всех 8 прооперированных пациентов 2-й группы в эпителии иссеченного в ходе ЛТ и ПК фиброваскулярного паннуса роговицы, по данным гистологического исследования, в составе покровного цилиндрического эпителия также были обнаружены БК.

Через 3 месяца у всех пациентов 2-й группы после ЛТ наблюдали приживление лимбальных аутоаллотрансплантатов и полную эпителизацию роговицы с заметным уменьшением васкуляризации стромы и ее некоторым просветлением. Острота зрения в группе – 0,03–0,4 (средняя 0,05). Однако у одного пациента послеожоговое бельмо в исходе эпителизации после роговично-лимбальной аллотрансплантации оказалось покрыто эпителием конъюнктивального фенотипа с наличием БК. У этого пациента эпителизация роговицы после роговично-лимбальной аллотрансплантации шла медленно и завершилась через 4 недели после операции рецидивом фиброваскулярного паннуса. Такое заживление, по-видимому, было обусловлено субклиническим лизисом пересаженной тропной лимбальной ткани (регенеративный потенциал которой всегда не определен) с исходом в конъюн-

ктивализацию роговицы. В связи с этим СК этому пациенту не проводили.

В остальных 7 случаях роговица была покрыта эпителием роговичного фенотипа (без БК). Из них 1 пациент в операции СК не нуждался, так как строма роговицы была практически прозрачной, и острота зрения глаза равнялась 0,4. У других 6 пациентов в связи с остаточным помутнением стромы и низкой остротой зрения выполнили СК. У них наблюдали прозрачное приживление и нормальную эпителизацию кератотрансплантатов. Через 3 мес. после операции кератотрансплантаты также были покрыты эпителием роговичного фенотипа. Острота зрения у этих пациентов составила от 0,03 до 0,4 (средняя 0,1).

В отдаленном послеоперационном периоде (через 10–12 мес.) повторно, используя ИЦ, было обследовано 22 пациента: в 1-й группе – 15, во 2-й группе – 7. У 12 пациентов 1-й группы роговичные трансплантаты были полностью эпителизированы и оставались прозрачными без признаков васкуляризации. Острота зрения колебалась в пределах 0,3–0,6 (средняя 0,45). Еще у 3 пациентов наблюдали отек и помутнение стромы трансплантата с активным врастанием сосудов (у 1-го пациента с диагнозом ЭЭД и 2 пациентов с рецидивом бельма после традиционной оптической кератопластики по поводу бельма в исходе герпетического кератита и посттравматического бельма). Тем не менее, при ИЦ – исследовании у всех 15 пациентов группы кератотрансплантаты оказались покрытыми эпителием роговичного фенотипа.

Во 2-й группе у пациента, которому ограничились только ЛТ (без СК), в поздний послеоперационный период наблюдали дальнейшее просветление роговичной стромы и повышение, остроты зрения до 0,5. Прозрачное бессосудистое приживление кератотрансплантатов после СК наблюдали у 5 пациентов (рис. 2).

У всех этих пациентов роговица была покрыта эпителием роговичного фенотипа; острота зрения у составила от 0,1 до 0,5 (средняя 0,37). Еще у одного пациента (которому выполнили конъюнктивально-лимбальную аллотрансплантацию на послеожоговое бельмо) произошел рецидив фиброваскулярного паннуса, который, по данным ИЦ, оказался покрытым эпителием конъюнктивального фенотипа с наличием БК. Это могло быть связано с постепенным замещением пересаженной аллогенной лимбальной ткани конъюнктивальным эпителием реципиента по причине недостаточной гистосовместимости.

Усовершенствованная методика ИЦ при проведении морфологического, визуально-количественного анализа позволяет определить морфологический статус эпителия роговичного бельма и по его характеру разделить пациентов на две группы. Оказалось, что из 40 глаз с сосудистыми бельмами роговицы роговичный фенотип имел место на 28 (70%) глазах. Случаи с конъюнктивальным эпителием составили 12 (30%) глаз.

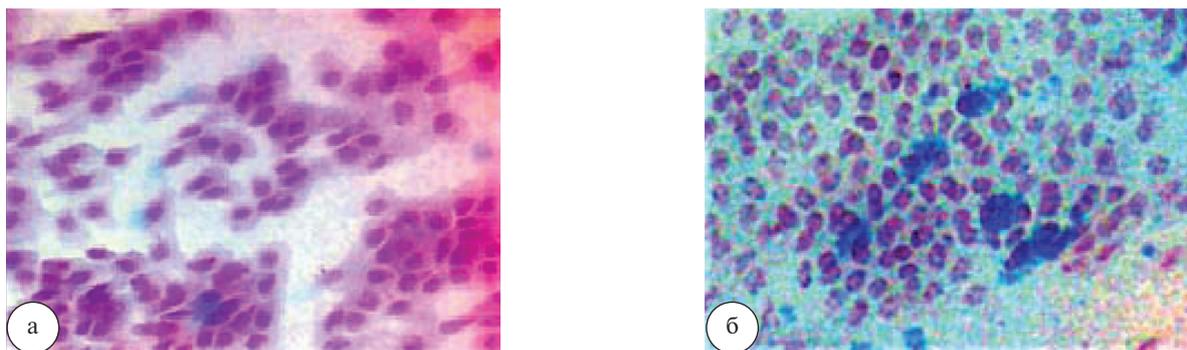


Рис. 1. Препараты импрессионной цитологии: а – роговичный эпителий; б – конъюнктивальный эпителий (бокаловидные клетки окрашены синим цветом)



Рис. 2. Пациентка Ф., диагноз: болезнь Стивенса – Джонсона, синдром сухого глаза, тотальное сосудистое бельмо роговицы обоих глаз: а – левый глаз до операции (по данным ИЦ, эпителий бельма не содержит бокаловидные клетки); б – глаз после конъюнктивно-лимбальной аллотрансплантации (донор – сестра пациентки) и последующей успешной сквозной кератопластики

Данные ИЦ во всех случаях были подтверждены при гистологическом исследовании эпителия роговичных дисков, иссеченных из бельм при сквозной кератопластике, и эпителия фиброваскулярного паннуса, удаленного при ЛТ в ходе поверхностной кератэктомии. Результаты ИЦ являются основанием для разделения пациентов по показаниям к выполнению СК (на глазах с роговичным эпителием бельма) или ЛТ (при бельмах с эпителием конъюнктивального фенотипа).

Проведенное пациентам оперативное лечение подтвердило правильность выделения этих групп. У 22 (55%) пациентов 1-й группы и 6 (15%) пациентов 2-й группы отмечалась быстрая эпителизация и преимущественно прозрачное бессосудистое приживление роговичных трансплантатов. У пациентов 1-й группы, имевшее место в отдаленном периоде после СК постепенное помутнение стромы на 3 глазах (с роговичным фенотипом эпителия), по-видимому, было обусловлено тканевой несовместимостью тканей донора и реципиента с развитием болезни кератотрансплантата.

Полученные данные подтвердили возможность исследования характера роговичного эпителия на глазах с сосудистыми бельмами с помощью ИЦ при решении вопроса о показаниях к оптической кератопластике.

Выводы

1. ИЦ является доступной и достаточно точной методикой диагностики, позволяющей производить оценку фенотипа эпителия, покрывающего роговицу.

2. Результаты ИЦ позволяют разделять пациентов по показаниям к выполнению СК (на глазах с роговичным эпителием бельма) или ЛТ (при бельмах с эпителием конъюнктивального фенотипа).

Литература

1. Танаева, Х.Д. Лимбальная трансплантация как способ индукции локальной иммунной толерантности при кератопластике высокого риска / Х.Д. Танаева, Н.А. Онищенко, С.А. Борзенко // Вестн. трансплантол. и искусственных органов, 2011. – Т. 8, № 2. – С. 95–102.
2. Черныш, В.Ф. Ожоги глаз – состояние проблемы и новые подходы / В.Ф. Черныш, Э.В. Бойко. – СПб.: ВМА, 2008. – 133 с.
3. Holland, E.J. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system / E.J. Holland, G.S. Schwartz // Cornea. – 1996. – Vol. 15. – P. 549–556.
4. Kenyon, K.R. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders / K.R. Kenyon, S.C.G. Tseng // Ophthalmology. – 1989. – Vol. 96. – P. 709–722.
5. Nelson, J.D. Impression cytology / J.D. Nelson // Cornea. – 1988. – Vol. 7, № 1. – P. 71–81.

6. Nolan, G.R. Application of impression cytology to the diagnosis of conjunctival neoplasms / G.R. Nolan [et al.] / Diagn. Cytopathol. – 1994. – Vol. 11, № 1. – P. 246–249.
7. Pellegrini, G. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface / G. Pellegrini [et al.] // J. Cell. Biol. – 1999. – Vol. 145, № 4. – P. 769–782.
8. Singh, R. Impression cytology of the ocular surface / R. Singh, A. Joseph, T. Umapathy // Br. J. Ophthalmol. – 2005. – Vol. 89. – P. 1655–1659.
9. Zuazo, F. Conjunctival impression cytology in patients with normal and impaired OSDI scores / F. Zuazo, D. López-Ponce // Arch. soc. esp. oftalmol. – 2014. – Vol. 89, № 10. – P. 391–396.

I.A. Zlobin, V.F. Chernysh, S.V. Churashov, V.S. Chirsky, A.S. Rudko, V.E. Kurnosov

Role of impression cytology in cornea epithelium phenotype assessment at solution of question of indications to operation of optical keratoplasty

Abstract. *The advanced technique of an impression cytology when carrying out morphological, a visual quantitative analysis allows to define the morphological status of an epithelium of a corneal cataract and on its character to divide patients into two groups. From 40 eyes with vascular cataracts of a cornea the corneal phenotype took place on 28 eyes (70%). There were only 12 cases with a conjunctival epithelium (30%). Data of an impression cytology in all cases were confirmed at histologic research of an epithelium of corneal disks. The received results are the basis for division of patients according to indications to realization of a through keratoplasty (in the eyes with a corneal epithelium of a cataract) or limb transplantation (at cataracts with an epithelium of a conjunctival phenotype). At 28 patients the fast epithelization and the transparent unvascular engraftment of corneal transplants in the remote period of monitoring was noted (in 3 months). Visual acuity was equal to 0,2–0,4 (average 0,36). After 10–12 months. 12 patients corneal grafts were completely epithelized and remained clear with no evidence of vascularization. Visual acuity ranged between 0,3–0,6 (average 0,45). Another 3 patients experienced swelling and stromal haze graft vascular ingrowth active. However, with impression cytology all patients keratoplasts were covered with corneal phenotype epithelium. The obtained data confirmed possibility of research of character of a corneal epithelium in the eyes with vascular cataracts by means of an impression cytology at the solution of a question of indications to an optical keratoplasty.*

Key words: *endothelial-epithelial degeneration, vascular cataract, corneal, limbus, epithelization, impression cytology, ophthalmic examination, the destruction of the basement membrane, through keratoplasty, limb transplantation.*

Контактный телефон: 8-962-689-10-40; e-mail: sasha.vmeda@yandex.ru