

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СУСПЕНЗИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В ХИРУРГИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ

Екатерина Олеговна ФИЛИППОВА, Ольга Ивановна КРИВОШЕИНА

*Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

Цель исследования – изучить эффективность хирургического лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы с помощью оперативного вмешательства, включающего внутрикамерное введение суспензии аутологичных моноклеаров крови с последующим ее наложением на внутреннюю поверхность роговой оболочки. **Материал и методы.** Клинические исследования проведены среди 44 пациентов, составивших две группы: основную (21 пациент) и сравнения (23 пациента). В основной группе лечение проводилось новым методом, в группе сравнения применялась традиционная фармакотерапия. **Результаты и их обсуждение.** Уменьшение гидратации роговицы в основной группе отмечалось в течение первых 5 дней после хирургического лечения, в группе сравнения незначительное уменьшение отека роговицы начиналось на 10–12 день. Через 1 мес. после лечения показатель пахиметрии в основной группе уменьшился на 11 %, в группе сравнения – на 3,1 %, острота зрения повысилась в 5,0 и 2,0 раза соответственно. **Вывод.** Применение метода хирургического лечения ЭЭД роговицы способствует более быстрому уменьшению гидратации роговицы с восстановлением ее нормальной толщины и значительным и стабильным улучшением остроты зрения в послеоперационном периоде по сравнению с курсом консервативного лечения.

**Ключевые слова:** эндотелиально-эпителиальная дистрофия, аутологичные моноклеары крови, цитокины, эндотелий, пролиферация.

В основе эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы лежит развитие хронического отека ткани роговой оболочки, сопровождающееся значительным снижением остроты зрения и выраженным болевым синдромом [1]. Многие аспекты патогенеза данного заболевания до настоящего времени остаются мало изученными, однако ведущим патогенетическим фактором считается прогрессирующее и необратимое уменьшение численности клеток эндотелия роговицы и, как следствие, утрата ими барьерной и насосной функции [2].

Патогенетически ориентированным и радикальным способом лечения ЭЭД роговицы является кератопластика в различных модификациях с заменой эндотелиального слоя, позволяющая достичь как лечебного, так и оптического эффекта [3, 10]. Однако, как и при всяком хирургическом вмешательстве, в послеоперационном периоде высок риск развития гнойных осложнений и отторжения трансплантата [6]. Использование клеточной терапии, на наш взгляд, является альтернативой радикальной хирургии [4, 11]. Особый интерес в связи с этим представляют монокле-

ары крови, являющиеся источником большого числа биологически активных веществ и применяемые в клинической офтальмологии для коррекции воспалительно-репаративных реакций в тканях глазного яблока при различной патологии органа зрения [5, 9].

Цель исследования – изучить эффективность хирургического лечения ЭЭД роговицы с помощью нового метода оперативного вмешательства, включающего внутрикамерное введение суспензии аутологичных моноклеаров крови с последующим ее наложением на внутреннюю поверхность роговой оболочки.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинические исследования проведены на базе офтальмологической клиники Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) среди 44 пациентов (31 женщина и 13 мужчин в возрасте от 52 до 71 года) с ЭЭД роговицы, которые в зависимости от способа лечения были разделены на две группы: основную и сравнения. Протокол проведения исследова-

*Филиппова Е.О. – к.т.н., ассистент кафедры офтальмологии, e-mail: katerinabosix@mail.ru  
Кривошеина О.И. – д.м.н., зав. кафедрой офтальмологии, e-mail: oikr@yandex.ru*

ния утвержден локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета от 24.11.2014, регистрационный № 3898.

Основная группа представлена 21 пациентом (21 глаз), которым проводилось лечение новым хирургическим методом. В условиях операционной обработки операционного поля с соблюдением правил асептики и антисептики выполнялась местная анестезия (инстилляцией 0,4%-го раствора инокаина, ретробульбарно 3,0 мл 2%-го раствора лидокаина) больного глаза. После выполнения в роговице двух парацентезов в один из них устанавливалась ирригационная система с подачей стерильного воздуха в переднюю камеру. Через второй парацентез с помощью шприца в переднюю камеру на границе между внутренней поверхностью роговой оболочки и воздухом аккуратно на роговицу изнутри насаивалась суспензия аутологичных мононуклеаров крови. Далее ирригационная система удалялась, края парацентезов гидратировались. Субконъюнктивально вводился раствор антибиотика. Накладывалась монокулярная повязка. Аутологичные мононуклеары крови выделялись методом фракционирования в градиенте плотности смеси фиколла и верографина. Чистота полученных мононуклеаров составляла 96 %, жизнеспособность в тесте с трипановым синим – 97–98 %. Группа сравнения представлена 23 пациентами (23 глаза), получавшими традиционное лечение в виде инстилляций и субконъюнктивальных инъекций метаболитических средств, кортикостероидов, кератопротекторов.

Пациенты обеих групп в зависимости от стадии заболевания были распределены на подгруппы: А – II степень заболевания (стромальная стадия), Б – III степень ЭД роговицы (буллезная). Группы были сопоставимы по полу, возрасту и тяжести поражения роговицы. При обследовании учитывались данные анамнеза: сопутствующие заболевания, срок давности поражения роговицы, проводимое ранее лечение. Необходимо отметить, что из общего числа обследованных больных 41 пациенту (93,18 %) до поступления в стационар в течение продолжительного времени регулярно проводились курсы консервативного лечения, однако без достижения стабильного положительного клинического эффекта. Всем пациентам проводилось офтальмологическое обследование: визометрия, биомикроскопия переднего отрезка глаза, транспальпебральное измерение внутриглазного давления, оптическая пахиметрия, конфокальная биомикроскопия, фоторегистрация. Для корректной обработки значений визометрии данные были преобразованы

в единицы LogMAR. Срок наблюдения составил шесть месяцев.

Цифровой материал обработан общепринятыми методами вариационной статистики с расчетом среднего арифметического значения  $M$  и ошибки среднего  $m$ . Для оценки значимости различий при сравнении средних величин двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна – Уитни ( $p_U$ ). Статистически значимым считался уровень различий  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациентов основной группы составил  $61,5 \pm 9,5$  года, группы сравнения –  $63 \pm 7,0$  года. Согласно данным анамнеза, поражение роговицы в большинстве случаев (63,63 %, 28 глаз) развилось после факэмульсификации с имплантацией интраокулярной линзы, в 36,4 % (16 глаз) – после экстракапсулярной экстракции катаракты. Среди системной патологии наиболее часто встречались: ишемическая болезнь сердца – 4 пациента (19,04 %) в основной группе, 7 пациентов (30,43 %) в группе сравнения; гипертоническая болезнь – 9 пациентов (42,85 %) в основной группе, 9 пациентов (39,13 %) в группе сравнения; сахарный диабет 2 типа – 5 пациентов (23,8 %) в основной группе, 6 пациентов (26,08 %) в группе сравнения.

Клиническая картина ЭД роговицы у пациентов обеих групп на момент госпитализации в стационар имела сходные черты. У больных выявлялись затуманивание и значительное снижение остроты зрения (табл. 1). При биомикроскопии обнаруживался диффузный отек всех слоев роговицы, складки десцеметовой оболочки, единичные небольшие буллы. Оптический срез роговой оболочки был утолщен, что подтверждалось результатами пахиметрии (табл. 2). Уровень внутриглазного давления у всех обследованных пациентов составлял 19–20 мм рт. ст. Средняя плотность эндотелиальных клеток с учетом возраста  $61,5 \pm 9,5$  года была снижена на 27–29 % от нормальной и составляла  $1653 \pm 233$  кл/мм<sup>2</sup> в основной группе,  $1590 \pm 247$  кл/мм<sup>2</sup> в группе сравнения. Средний размер эндотелиальных клеток был увеличен на 43–47 % и составлял  $510 \pm 34$  мкм<sup>2</sup> в основной группе,  $619 \pm 29$  мкм<sup>2</sup> в группе сравнения. Частота шестигранных клеток была снижена на 31 %:  $39 \pm 11$  % в основной группе,  $39 \pm 10$  % в группе сравнения.

Сравнительный анализ результатов лечения выявил значительную эффективность разработанного метода хирургического лечения ЭД роговицы с локальным применением суспензии

Таблица 1

Динамика остроты зрения в единицах LogMAR у больных ЭЭД роговицы в зависимости от вида лечения

| Группа больных    | Подгруппа | До лечения | Сроки наблюдения после начала лечения |       |       |        |        |        |        |
|-------------------|-----------|------------|---------------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
|                   |           |            | 1 дн.                                 | 3 дн. | 5 дн. | 10 дн. | 1 мес. | 3 мес. | 6 мес. |
| Основная, n = 21  | А         | 1,3        | 1,3                                   | 1,2   | 1,0   | 0,5**  | 0,5**  | 0,2**  | 0,2**  |
|                   | Б         | 1,4        | 1,4                                   | 1,3   | 1,2   | 1,0    | 0,7*   | 0,4**  | 0,4**  |
| Сравнения, n = 23 | А         | 1,3        | 1,6                                   | 1,6   | 1,2   | 1,2    | 1,0    | 1,1    | 1,2    |
|                   | Б         | 1,4        | 1,4                                   | 1,4   | 1,3   | 1,3    | 1,2    | 1,2    | 1,3    |

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих исходных данных: \* – при  $p < 0,05$ , \*\* – при  $p < 0,01$ .

Таблица 2

Динамика толщины роговицы у больных ЭЭД роговицы в зависимости от вида лечения

| Группа больных    | Подгруппа | До лечения  | Сроки наблюдения |              |              |               |              |
|-------------------|-----------|-------------|------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
|                   |           |             | 5 дн.            | 10 дн.       | 1 мес.       | 3 мес.        | 6 мес.       |
| Основная, n = 21  | А         | 590,2 ± 1,3 | 582,7 ± 1,3      | 534,4 ± 1,2* | 512,1 ± 1,2* | 511,8 ± 1,2** | 509,6 ± 1,2* |
|                   | Б         | 638,3 ± 1,3 | 632,4 ± 1,3      | 601,3 ± 1,2* | 592,9 ± 1,2* | 568,6 ± 1,2** | 561,7 ± 1,2* |
| Сравнения, n = 23 | А         | 600,9 ± 1,3 | 598,5 ± 1,3      | 592,3 ± 1,2  | 582,2 ± 1,2  | 583,6 ± 1,2   | 601,5 ± 1,2  |
|                   | Б         | 639,1 ± 1,3 | 631,3 ± 1,3      | 628,8 ± 1,2  | 612,5 ± 1,2  | 608,2 ± 1,2   | 612,7 ± 1,2  |

аутологичных мононуклеарных лейкоцитов. Положительная динамика биомикроскопической картины роговой оболочки в виде постепенного уменьшения гидратации всех слоев роговицы, расправления складок десцеметовой оболочки у пациентов основной группы отмечалась уже в течение первых 5 дней после хирургического лечения. Повышение прозрачности роговицы наблюдалось на 10–12 день у пациентов основной группы, у пациентов группы сравнения – к концу первого месяца лечения.

Согласно результатам пахиметрии (см. табл. 2), через 10 дней после хирургического вмешательства толщина роговицы у пациентов основной группы уменьшилась на 9,4 % (подгруппа А) и на 5,8 % (подгруппа Б) ( $p < 0,01$ ), в то время как у пациентов группы сравнения – на 1,5–1,6 %. Через 1 мес. после проведенного лечения данный показатель у пациентов основной группы уменьшился на 13,2 и 7,1 % в подгруппах А и Б соответственно от первоначального значения, через 3 мес. – на 13,2 и 10,8 % ( $p < 0,01$ ), сохраняясь на достигнутом уровне в течение 6 мес. наблюдения. У пациентов группы сравнения через 1 мес. от начала лечения толщина роговицы уменьшилась на 3,1 и 4,1 % в подгруппах А и Б соответственно и сохранялась на достигнутом уровне всего периода наблюдения. Согласно результатам эндотелиальной микроскопии, через 1 мес. после хирургического вмешательства плотность эндотелиальных клеток у пациентов основной группы

увеличилась на 7,4 %, через 3 мес. – на 16,9 % от исходного уровня, в то время как у пациентов группы сравнения величина данного показателя была меньше исходного соответственно на 0,2 и 0,7 %. В то же время средний размер эндотелиальных клеток и частота шестигранных клеток статистически значимо не различались у пациентов обеих групп до и после лечения.

Согласно результатам визометрии, уже через 5 дней после проведения оперативного вмешательства средние десятичные значения остроты зрения у пациентов основной группы составляли 0,1 (подгруппа А) и 0,08 (подгруппа Б), в то время как у пациентов группы сравнения – 0,07 и 0,05 подгруппы А и Б соответственно (см. табл. 1). Через 10 дней данный показатель у больных основной группы составил 0,3 и 0,1 ( $p < 0,01$ ), через 1 мес. – 0,3 и 0,2 подгруппы А и Б соответственно. Спустя 3 месяца после проведенного лечения острота зрения у пациентов основной группы увеличилась до значений 0,6 (подгруппа А) и 0,4 (подгруппа Б) и сохранялась на достигнутом уровне в течение всего периода наблюдений (6 мес.). У пациентов же группы сравнения наилучший показатель остроты зрения – 0,09 – был достигнут через 3 мес. после проведенного курса консервативного лечения. В дальнейшем отмечено постепенное снижение величины данного показателя – до 0,08 и 0,06 в подгруппах А и Б соответственно через 6 мес. от начала лечения (см. табл. 1).

Средний период стационарного лечения пациентов основной группы составил  $9 \pm 1$  день, пациентов группы сравнения –  $12 \pm 2$  дня ( $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно общепризнанному мнению [7], эндотелий роговицы обладает крайне низкой пролиферативной активностью. Это обусловлено, с одной стороны, эффектом контактного торможения, в котором ведущее значение принадлежит не клеточной плотности клеток эндотелия роговицы, а состоянию межклеточных взаимосвязей и взаимодействий, с другой стороны – малой концентрацией во влаге передней камеры биологически активных веществ, в частности, цитокинов, обладающих способностью активировать пролиферацию клеток различных популяций, в том числе эндотелия роговицы [8]. В экспериментах *in vitro* убедительно показано значительное (до 4,5 раза) повышение митотической активности клеток эндотелия роговицы при добавлении в культуру различных цитокинов [12]. При этом необходимо отметить, что важнейшими свойствами данных биологически активных веществ являются плеiotропность, отсутствие антигенной специфичности, формирование каскадной цепи [12]. В связи с этим использование естественного комплекса цитокинов, а не отдельных пептидов, с одной стороны, максимально приближает их действие к физиологическому, а с другой – обеспечивает возможность более разносторонне корригировать спектр репаративных процессов в патологическом очаге.

Мононуклеарные лейкоциты являются одним из источников цитокинов, вовлеченных в патофизиологию воспалительного процесса, и цитокинов, регулирующих ангиогенез и фиброгенез [13]. Предположительно, введенные в переднюю камеру и адгезированные при модулирующем влиянии направленного движения внутриглазной жидкости к внутренней поверхности роговицы аутологичные мононуклеарные лейкоциты создают концентрацию биологически активных веществ, которые ослабляют межклеточные контакты и стимулируют митоз, уменьшают выраженность воспалительных реакций, оказывают индуцирующее влияние на клетки эндотелия с повышением их пролиферативной активности и регенераторной способности [3, 14].

Дополнительным механизмом действия введенных в переднюю камеру аутологичных мононуклеарных лейкоцитов может быть их индуцирующее действие на стволовые клетки, локализующиеся в области кольца Швальбе [15], однако данное предположение требует дополнительных экспериментальных исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение нового метода хирургического лечения ЭЭД роговицы способствует более быстрому уменьшению гидратации роговой оболочки с восстановлением ее нормальной толщины и значительным и стабильным улучшением остроты зрения в послеоперационном периоде по сравнению с курсом консервативного лечения. Это, в свою очередь, позволяет сократить продолжительность стационарного лечения в 1,4 раза.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00048.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляковский П.В., Лобанок Е.С. Перспективы применения стволовых клеток в офтальмологии // Офтальмология в Беларуси. 2009. (2). 81–91.
2. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б. Цитокины в клинической офтальмологии. Уфа: Уфимский полиграфкомбинат, 2008. 152 с.
3. Запускалов И.В., Кривошеина О.И. Современная фармакотерапия язвенных поражений роговицы: применение аутологичных мононуклеаров крови. Саабрюкен: Lambert Academic Publishing, 2013. 121 с.
4. Каспаров А.А. Локальная экспресс-аутоцитокинотерапия (комплекс цитокинов) в лечении вирусных и невирусных поражений глаз // Вестн. офтальмологии. 2001. (3). 45–47.
5. Каспаров А.А., Каспарова Е.А., Фадеева Л.Л. Персонализированная клеточная терапия ранней буллезной кератопатии (экспериментальное обоснование и клинические результаты) // Вестн. офтальмол. 2013. (5). 53–61.
6. Каспарова Е.А. К вопросу о теоретическом обосновании методики локальной экспресс-аутоцитокинотерапии // Вестн. офтальмологии. 2002. (3). 25–27.
7. Каспарова Е.А., Суббот А.М. Проллиферативный потенциал заднего эпителия роговицы человека // Вестн. офтальмологии. 2013. (3). 82–88.
8. Левченко Н.А. Интрастромальное введение аутологичных мононуклеаров крови в комплексном лечении язвенных кератитов различной этиологии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Красноярск, 2012.

9. Филиппова Е.О., Кривошеина О.И. Закономерности регенерации роговицы при эндотелиально-эпителиальной дистрофии на фоне локального применения аутологичных мононуклеаров крови // *Соврем. технология в офтальмологии*. 2016. (4). 234–238.
10. Филиппова Е.О., Кривошеина О.И. Методы консервативного и хирургического лечения эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы // *Точка зрения. Восток – Запад*. 2017. (1). 83–86.
11. Филиппова Е.О., Кривошеина О.И., Запущалов И.В. Локальное применение аутологичных мононуклеаров крови в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // *Бюл. сиб. мед*. 2016. 15. (2). 70–75.
12. Acar B.T., Akdemir M.O., Acar S. Visual acuity and endothelial cell density with respect to the graft thickness in Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: One year results // *Int. J. Ophthalmol.* 2014. 7. 974–979.
13. Bhandari V., Reddy J.K., Siddharthan K.S., Singhanian N. Simultaneous Descemet's membrane endothelial keratoplasty and posterior iris-claw-fixated intra ocular lens implantation (IOL) in management of aphakic bullous keratopathy // *Int. Ophthalmol.* 2016. 36. (3). 305–311.
14. Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy // *Mol. Vis.* 2014. 20. 683–690.
15. Forest F., Thuret G., Gain P., Dumollard J.M., Peoc'h M., Perrache C., He Z. Optimization of immunostaining on flat-mounted human corneas // *Mol. Vis.* 2015. 21. 1345–1356.

## EFFECTIVENESS OF MONONUCLEAR LEUKOCYTE SUSPENSION APPLICATION IN BULLOUS KERATOPATHY SURGERY

Ekaterina Olegovna FILIPPOVA, Olga Ivanovna KRIVOSHEINA

*Siberian Medical State University of Minzdrav of Russia  
634050, Tomsk, Moskovskiy tract, 2*

The aim of the research was to study the effectiveness of bullous keratopathy surgical treatment by modified method of operative intervention including intra-chamber injection of autologous blood mononuclear cells suspension with subsequent layering on the inner surface of the cornea. **Material and methods.** Clinical studies were conducted among 44 patients who comprised two groups: the main group (21 patients) and comparison group (23 patients). The treatment of the main group was carried out by a new method. The treatment of the comparison group was traditional pharmacotherapy. **Results and discussion.** The cornea hydration reduction in the main group was noted during the first 5 days after surgical treatment. The moderate decrease of corneal oedema in the comparison group started on 10–12 days. The pachymetry index decreased by 11 % in the main group and by 3.1 % in the comparison group after 1 month of treatment. Visual acuity increased fivefold in the main group and twofold in the comparison group. **Conclusion.** The use of the modified surgical treatment of the bullous keratopathy promotes a faster decrease in the cornea hydration and stable improvement in visual acuity in the postoperative period compared with the course of conservative treatment.

**Key words:** bullous keratopathy, autologous blood mononuclear cells, cytokines, endothelium, proliferation.

*Filippova E.O. – candidate of technical sciences, assistant of the department of ophthalmology,  
e-mail: katerinabosix@mail.ru*

*Krivosheina O.I. – doctor of medical sciences, head of the department of ophthalmology, e-mail: oikr@yandex.ru*