

О.В. Юзич¹
О.В. Дудок¹
І.В. Твердохліб²
В.Б. Фік¹

¹ Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького
Львів

² Дніпровський державний
медичний університет Дніпро,
Україна

Надійшла: 14.08.2024

Прийнята: 15.06.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.63-68>

УДК:611.84:611.16/.018.7.019

СТРОМАЛЬНО-КЛІТИННІ АСПЕКТИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ РОГІВКИ ПРИ ТРАВМАТИЧНИХ УШКОДЖЕННЯХ ОЧНОГО ЯБЛУКА

Yuzuch O.V. , Dudok O.V. , Tverdokhlib I.V.  ✉, Fik V.B.  Stromal-cellular aspects of corneal reparative regeneration in traumatic ocular globe injuries.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv; Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The cornea is a crucial component of the eye's refractive apparatus. Its unique structure ensures perfect transparency and provides its light-refracting properties. Addressing the challenges of reconstructing the eye following traumatic injuries of various origins is a pressing concern in contemporary theoretical and practical medicine. Among these injuries, penetrating traumas and damage to the ocular globe often require reconstructive surgery to maximize the restoration of affected structures, including the cornea. However, a frequent complication following postoperative reparative regeneration of the cornea is the formation of a connective tissue scar, which significantly reduces its optical properties and overall visual acuity. **Objective.** This study aimed to investigate the micro- and submicroscopic structural organization of corneal scars following penetrating mechanical trauma to the eye. **Methods.** Samples of corneas exhibiting scarring were obtained from 19 patients 12 months after the occurrence of penetrating trauma. Light microscopy was employed to examine transverse sections of the cornea, and electron microscopy was utilized for ultrastructural analysis. Quantitative analysis of corneal thickness changes in the parascar and scar zones was conducted over time. **Results and conclusion.** The morphologic investigation of the corneal state following penetrating injuries revealed epithelial ingrowth and proliferation into the corneal stroma at sites of anterior limiting membrane rupture, accompanied by hypertrophy of the membrane at the defect margins. Beyond keratocytes, the cellular composition of the scar included fibroblasts, atypical for normal corneal tissue, responsible for the synthesis of fibrous elements and proteoglycans, as well as myofibroblasts, whose contractile properties contribute to maximal scar compaction. Thus, corneal repair is accompanied by challenges in the form of reduced transparency, linked to stromal disorganization, and the emergence of optical aberrations induced by the contraction of fibrous tissue during its remodeling within the scar site.



Key words: eye, ocular tunics, penetrating eye injury, ocular trauma, pathology, cornea, regeneration, scar.

Citation:

Yuzuch OV, Dudok OV, Tverdokhlib IV, Fik VB. [Stromal-cellular aspects of corneal reparative regeneration in traumatic ocular globe injuries]. Morphologia. 2023;17(1):63-8. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.63-68>

 Yuzuch O.V. 0000-0002-9552-1874;  Dudok O.V. 0000-0001-9513-3460;

 Tverdokhlib I.V. 0000-0002-8672-3773;  Fik V.B. 0000-0002-2284-4488

✉ ivt@dmu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Рогівка є важливим компонентом діоптричного апарату ока. Її унікальна структура забезпечує ідеальну прозорість та надає їй світлозаломлювальних властивостей. На сьогоднішній день актуальними проблемами теоретичної та практи-

чної медицини є опрацювання методів реконструкції ока при його травматичних ушкодженнях різного генезу. Серед останніх чільне місце займають проникаючі травми очного яблука, які вимагають проведення реконструктивної хірургії [1, 2] з метою максимального відновлення ура-

жених структур в тому числі і роگیвки. Проте, частим ускладненням післяопераційної репаративної регенерації роگیвки є формування у ній сполучнотканинного рубця, що значно знижує її оптичні властивості і якість бачення в цілому.

Механізми загоєння роگیвки є складними і є, по суті, каскадом опосередкованих цитокінами взаємодій між клітинними та стромальними елементами її будови [3-5], а, отже, їхнє розуміння має визначальне значення для адекватного лікування. У розрізі сучасних уявлень речовина роگیвки утворена 5-ма шарами різних структур: поверхневого епітелію, мембрани Боумена, власної речовини (стромального елемента), мембрани Десцемета та ендотелію (різновиду епітелію). Поверхневий епітелій виконує захисну і чутливу функції, має високу здатність до самообновлення завдяки присутності стовбурових клітин, локалізованих у ділянці лімба (місці переходу склери у роگیвку) [6]. Мембрана Боумена і Десцемета утворені безладно упакованими колагеновими фібрилами [7-9] та виконують в основному опорну функцію, зберігаючи кривизну роگیвки. 90% загальної товщини роگیвки становить її стромальний компонент (власна речовина). Саме стромальний шар, в основному, є відповідальним за прозорість для світла, заломлювання та фокусування світла на сітківку. Основним складником стромального компонента є тонкі колагенові фібрили із щільним паралельним орієнтуванням у вигляді пластинок (ламель). Між ламелами лежить гідратований матрикс з високим вмістом протеогліканів, глікопротеїнів. [10] Між ламелами залягають кератоцити, відповідальні за синтез вказаних речовин. [11-12] Основна маса строми роگیвки складається з білків колагену I, V, VI та XII типів та протеогліканів – дерматансульфату, кератансульфату, декорину, люмікану, кератокану. [13-17] Клітини кератоцити, подібно до фібробластів здійснюють постійний ресинтез компонентів екстрацелюлярного матриксу. [18,19] Проте, при ушкодженнях роگیвки кератоцити набувають ознак фібробластів, а у пізні терміни після травми стають міофібробластами. [20,21] Саме фібробластам та міофібробластам відводять провідну роль у формуванні рубця, який і знижує оптичні якості роگیвки. Тому, перспективним напрямком у запобіганні утворення сполучнотканинного рубця є розробка методів депресії фенотипу міофібробластів з наступним поверненням їх у клітинну нішу кератоцитів.

Метою роботи було мікро- та субмікроскопічне дослідження структурної організації рубця роگیвки після проникаючої механічної травми ока.

Матеріали та методи

Матеріалом для досліджень слугували зразки роگیвки з ознаками рубцювання 19-ти пацієнтів після 12-ти місяців від моменту виникнення проникаючої травми. Забір матеріалу здійснюва-

ли під час проведення в умовах клініки відповідними спеціалістами наскрізної кератопластики. Для гістологічних досліджень отриманий матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, проводили у розчинах етанолу зростаючих концентрацій та через хлороформ з наступним виготовленням парафінових блоків. За допомогою мікротома отримували зрізи товщиною 10 мкм. Отримані зрізи депарафінували та забарвлювали гематоксиліном і еозином за стандартною методикою.

Для електронно-мікроскопічних досліджень отримані зразки роگیвки фіксували упродовж 4-х год у 2,5% розчині глутарового альдегіду та завершували фіксацію в 1% забуференому (pH 7,4) розчині чотириокису осмію ("SPI", США). Обезводнювали у спиртах у висхідних концентраціях та пропіленоксиді. Заливали у суміш епоксидних смол Epon 812 ("SPI-Pon тм 812 Epoxy Embedding Kit", США). Ультратонкі зрізи отримували традиційно та переглядали у лабораторії електронної мікроскопії ДУ "ДМА МОЗ України" за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 ("SELM", Україна) з напругою прискорення 75-80 кВ.

В умовах клініки за допомогою пахіметрії проводили кількісний аналіз змін товщини роگیвки у парарубцевій та рубцевій зонах у динаміці.

Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили із врахуванням парного t-критерія Стьюдента, а також непараметричного критерію Уїлкінсона, у випадку відсутності нормального статистичного розподілу величин. Отримані результати опрацьовували за допомогою ліцензійної програми Statistica 6.1.

Результати та їх обговорення

Виконаний аналіз товщини роگیвки після поранення у динаміці відображено на рис. 1. Задokumentовано поступове зниження показників товщини роگیвки до нормальних величин у місці рубця у порівнянні з парарубцевою зоною та незмінними ділянками на 23,5-24,2% ($p \leq 0,05$).

За допомогою світлової мікроскопії вивчали поперечні зрізи роگیвки через 12 міс. після травми. Встановлено, що у всіх досліджуваних випадках пошарова будова в цілому збережена, а саме передній епітелій утворений кількома шарами клітин, нижче яких залягає гомогенна, злегка оксифільна смужка мембрани Боумена. Власна речовина роگیвки здебільшого мала збережену ламелярну будову, але у місцях травми помітний рубець, який пронизував всі шари сітківки та мав товщину від 6 до 34 мкм.

Електронно-мікроскопічні дослідження засвідчили, що строма рубця у місці проникаючої травми втрачала притаманну для нормальної роگیвки пластинчасту (ламелярну) будову і була представлена грубоволокнистими тяжами, які здебільшого були переплетеними без якої-небудь паралельної орієнтації (рис. 2).

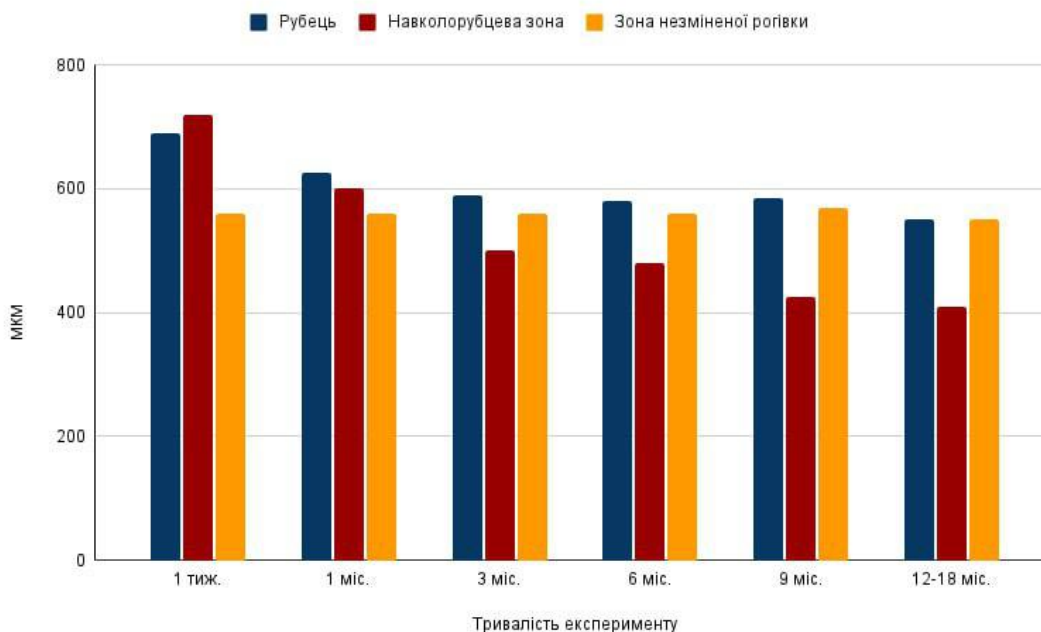


Рис. 1. Графічне зображення динаміки показників товщини рогівки в рубцевій, парарубцевій та інтактній зонах.

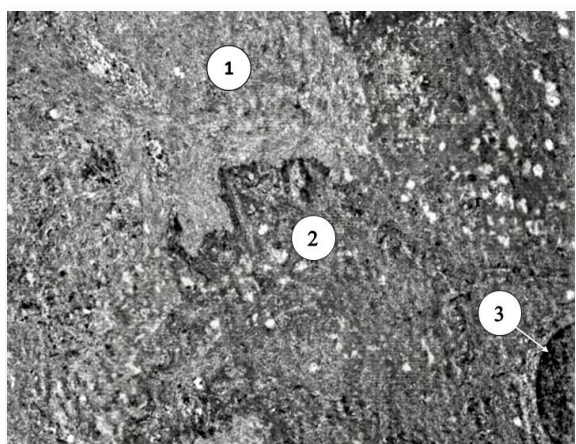


Рис. 2. Електронна мікрофотографія ділянки рогівки ока після проникаючої травми. $\times 8000$. 1 – втрата ламелярної будови строми, підвищений вміст аморфного компонента; 2 – інвазія переднього епітелію у власну речовину рогівки; 3 – ядро базального епітеліоцита.

Край рубця, який прилягав до переднього епітелію мав більш щільну структуру, на відміну від центральних і парацентральных зон, де волокнисті нашарування були більш електронно-світлими.

Відмічено вrostання базального шару переднього епітелію у місці розриву передньої пограничної мембрани вглиб строми рогівки. Такі вrostання були доволі варіабельними – від невеликих острівців скупчень клітин до масивних інкорпорацій у місцях просторів між грубоволокнистими структурами. При цьому такі епітеліальні кітини мали збільшені розміри, цитоплазма

була просвітленою, у ядрах спостерігався підвищений вміст гетерохроматину. Важливо підкреслити, що вираженість виявлених змін була більшою у місцях розривів мембрани Боумена.

В результаті кількісного аналізу встановлено, що товщина переднього епітелію у зоні рубця коливається у межах $67,4 \pm 13,2$ мкм. Такий епітелій складався переважно з 6-8 шарів клітин. У зоні, що прилягала безпосередньо до рубця товщина епітелію становила $57,3 \pm 9,1$ мкм із незміненою кількістю шарів його клітин. У цей же час товщина епітеліального пласта у нешкоджених ділянках рогівки була нижчою – $43,8 \pm 5,7$ мкм і з меншою кількістю шарів клітин (5-6).

Найбільш виражені зміни у травмованій рогівці торкалися її стромального компонента. У незмінених ділянках рогівки її основна речовина мала традиційну будову у вигляді паралельно розташованих пластинок (ламел), кожна з яких була утворена тонкими колагеновими фібрилами. Між ламелами залягали кератоцити сплюсненої форми і з доволі щільною цитоплазмою (рис. 3).

Водночас зустрічалися випадки нелінійних розташувань колагенових фібрил нижче передньої пограничної мембрани. У передній зоні та поблизу внутрішньої пограничної мембрани ламели залягали у площині рогівки і перетиналися під різними кутами.

Товщина строми рогівки в зоні рубця складала $371,4 \pm 46,3$ мкм, що на 23,7% менше ($p \leq 0,05$), ніж у незміненій зоні ($487,3 \pm 58,1$ мкм). Ламелярна впорядкованість у зоні рубця була значно порушена і була представлена безладно розташованими потовщеними колагеновими во-

локнами. Мікроскопічно у таких ділянках передній епітелій зазнавав змін, описаних вище і, ймовірно, була зруйнована базальна мембрана. Не можна виключати можливість потрапляння крізь дефекти базальної мембрани цитокінів, які і зумовлювали трансформацію кератоцитів у фібробласти, а у подальшому у міофібробласти. Як відомо, клітини фібробластичного ряду забезпечують синтез компонентів екстрацелюлярного матриксу, які і призводять до погіршення оптичних якостей рогівки (рис. 4).

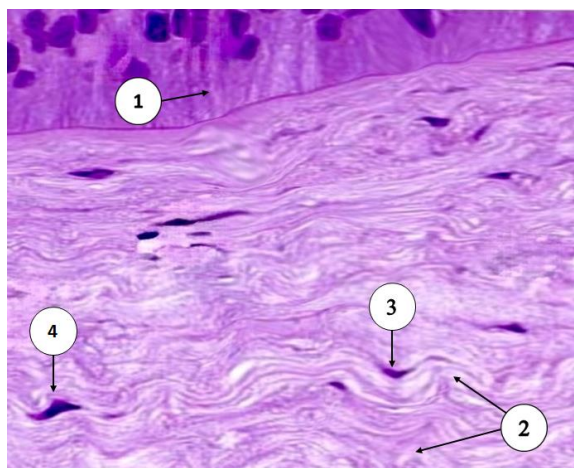


Рис. 3. Світлова мікрофотографія рогівки ока у парарубцевій зоні. Забарвлення гематоксилином та еозинном. $\times 320$. 1 – передній епітелій; 2 – незначна дезорієнтація сполучнотканинних пластинок; 3 – кератоцит; 4 – кератоцит з ознаками фібробластної трансформації.

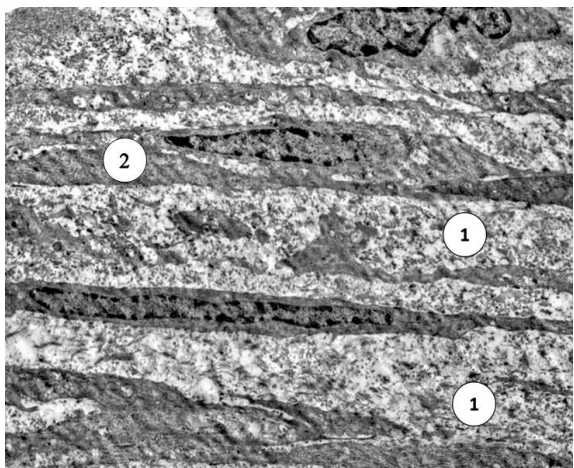


Рис. 4. Електронна мікрофотографія власної речовини (стромі) рогівки у ділянці рубця через 12 місяців після проникаючої травми. $\times 10000$. 1 – дисконкомплексація ламелярної структури; 2 – міофіброblast.

Прямим підтвердженням такого механізму є морфометричні дослідження, які засвідчили достовірне підвищення вмісту кератоцитів на 44,2% у зоні рубця у порівнянні з незміненими ділянками рогівки.

Стосовно стану задньої пограничної мембрани (мембрани Десцемета), то в ділянках рубця вона мала порушену суцільність, у місцях її дефекту накопичувалися фіброзні структури. Задній епітелій (ендотелій) рогівки був утворений шаром клітин здебільшого полігональної форми. Щільність ендотеліальних клітин через 12 міс після травми становила 2307 ± 974 клітин на 1 мм^2 і відповідала нормі.

Підсумок

Проведене морфологічне дослідження стану рогівки ока після проникаючих травм засвідчило ряд змін, що торкалися усіх структурних компонентів. Відмічено вrostання і проліферацію епітелію в строму рогівки у місцях розриву передньої пограничної мембрани та її гіпертрофію по краях дефекту. Утворена рубцева тканина не містить волокнистих пластинок правильної конфігурації. Строма рубця утворена товстими різнопрямованими колагеновими фібрилами та територіями, заповненими основною аморфною речовиною. Серед клітинних елементів окрім кератоцитів з'являються не характерні для нормальної рогівки фібробласти та міофібробласти. Як відомо, такі клітини якраз і відповідальні за синтез волокнистих елементів та таких компонентів як протеоглікани. Накопичення вказаних продуктів призводить до порушення світлопроникливої і діоптричної функції рогівки і, як наслідок, погіршення зору. Стосовно міофіброblastів, то вони завдяки своїм контрактильним властивостям забезпечують максимальне ущільнення рубця.

Перспективи подальших досліджень

Доцільним, на нашу думку, є вивчення міжклітинної кооперації у механізмах репарації рогівки та ідентифікації міофіброblastів за допомогою імуноцитохімічних методів (виявлення маркерного для них білка α -SMA). Такий підхід дасть можливість для пошуку супресорів активності міофіброblastів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Морфофункціональні особливості органів у пре- та постнатальному періодах онтогенезу, при впливі опіоїдів, харчових добавок, реконструктивних операціях та ожирінні» (номер державної реєстрації 0120U002129).

Літературні джерела References

1. Wong TY, Klein BE, Klein, R. The prevalence and 5-year incidence of ocular trauma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2000;107(12):2196–202. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(00\)00390-0](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(00)00390-0)
2. Katz J, Tielsch JM. Lifetime prevalence of ocular injuries from the Baltimore Eye Survey. *Archives of ophthalmology*. 1993;111(11):1564–8. <https://doi.org/10.1001/archophth.1993.01090110130038>
3. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian journal of ophthalmology*. 2003;51(1):5–15.
4. Chin JY, Liu C, Lee IXY, Lin MTY, Cheng CY, Wong JHF, Teo CL, Mehta JS, Liu YC. Impact of Age on the Characteristics of Corneal Nerves and Corneal Epithelial Cells in Healthy Adults. *Cornea*. 2024;43(4):409–18. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000003363>
5. Eraslan M, Toker E. Mechanisms of corneal wound healing and its modulation following refractive surgery. *Marmara Med. J*. 2009;22:169–78.
6. Sutphin J.E. Basic and Clinical Science Course. 1st. American Academy of Ophthalmology; External Disease and Cornea. San Francisco, CA, USA: 2011–2012. 458 p.
7. Germain L, Carrier P, Auger FA, Saless C, Guérin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?. *Progress in retinal and eye research*. 2000;19(5):497–527. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(00\)00005-7](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(00)00005-7)
8. Guérin LP, Le-Bel G, Desjardins P, Couture C, Gillard E, Boisselier É, Bazin R, Germain L, Guérin SL. The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(3):1291. <https://doi.org/10.3390/ijms22031291>
9. Gouveia RM, Cannon CJ. The effects of retinoic acid on human corneal stromal keratocytes cultured in vitro under serum-free conditions. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(12):7483–91. <https://doi.org/10.1167/iov.13-13092>
10. Skuta GL, Cantor LB, Weiss JS. Refractive Surgery, Section 13 Basic and Clinical Science Course. 1st. American Academy of Ophthalmology; San Francisco, CA, USA. 2011:2–44.
11. Lim M, Ye H, Panoskaltsis N, Drakakis EM, Yue X, Cass AE, Radomska A, Mantalaris A. Intelligent bioprocessing for haematopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments. *Biotechnology advances*. 2016;25(4):353–68. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.002>
12. Mirveis Z, Howe O, Cahill P, Patil N, Byrne HJ. Monitoring and modelling the glutamine metabolic pathway: a review and future perspectives. *Metabolomics*. Official journal of the Metabolomic Society. 2023;19(8):67. <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02031-9>
13. Bron A. The architecture of the corneal stroma. *Br. J. Ophthalmol*. 2001;85:379–381. doi: 10.1136/bjo.85.4.379.
14. Komninou MA, Seiler TG, Enzmann V. Corneal biomechanics and diagnostics: a review. *International ophthalmology*. 2024;44(1):132. <https://doi.org/10.1007/s10792-024-03057-1>
15. Koudouna E, Winkler M, Mikula E, Juhasz T, Brown DJ, Jester JV. Evolution of the vertebrate corneal stroma. *Progress in retinal and eye research*. 2018;64:65–76. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.01.002>
16. Carlson EC, Wang IJ, Liu CY, Brannan P, Kao CW, Kao WW. Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. *Molecular vision*. 2013;9:615–23.
17. Jhanji V, Billig I, Yam GH. Cell-Free Biological Approach for Corneal Stromal Wound Healing. *Frontiers in pharmacology*. 2021;12:671405. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.671405>
18. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(10):1625–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.010>
19. Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Experimental eye research*. 2016;142:110–8. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.012>
20. Bernstein AM, Twining SS, Warejcka DJ, Tall E, Masur S.K. Urokinase receptor cleavage: a crucial step in fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(7):2716–27. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-10-0912>
21. Zhu R, Liu TW, Liu F. Exogenous Urokinase Inhibits Proteasomal Degradation of Its Cognate Urokinase Plasminogen Activator Receptor. *Frontiers in pharmacology*. 2022;13:754271. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.754271>

Юзич О.В., Дудок О.В., Твердохліб І.В., Фік В.Б. Стромально-клітинні аспекти репаративної регенерації рогівки при травматичних ушкодженнях очного яблука.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Рогівка є важливим компонентом діоптричного апарату ока. Її унікальна структура забезпечує ідеальну прозорість та надає їй світлозаломлювальних властивостей. Актуальними проблемами теоретичної та практичної медицини сьогодення є опрацювання методів реконструкції ока

при його травматичних ушкодженнях різного генезу. Серед яких, проникаючі травми та пошкодження очного яблука, які вимагають проведення реконструктивної хірургії з метою максимального відновлення уражених структур в тому числі і рогівки. Проте, частим ускладненням післяопераційної репаративної регенерації рогівки є формування у ній сполучнотканинного рубця, що значно знижує її оптичні властивості і якість бачення в цілому. **Метою** роботи було мікро- та субмікроскопічне дослідження структурної організації рубця рогівки після проникаючої механічної травми ока. **Методи.** Матеріалом для досліджень слугували зразки рогівки з ознаками рубцювання 19-ти пацієнтів після 12-ти місяців від моменту виникнення проникаючої травми. За допомогою світлової мікроскопії вивчали поперечні зрізи рогівки, проводили електронно-мікроскопічні дослідження та вивчали кількісний аналіз змін товщини рогівки у парарубцевій та рубцевій зонах у динаміці. **Результати та підсумок.** Проведене морфологічне дослідження стану рогівки ока після проникаючих травм засвідчило вrostання і проліферацію епітелію в строму рогівки у місцях розриву передньої пограничної мембрани та її гіпертрофію по краях дефекту. Серед клітинних елементів окрім кератоцитів з'являються не характерні для нормальної рогівки фіброласти, які відповідають за синтез волокнистих елементів та протеогліканів та міофіброласти, які, завдяки своїм контрактильним властивостям, забезпечують максимальне ущільнення рубця. Тому, репарація супроводжується певними проблемами у вигляді зниження прозорості, що пов'язано з дезорганізацією стромы рогівки, а також виникнення оптичних аберацій, викликаних контракцією фіброзної тканини внаслідок її перебудови в місці сформованого рубця.

Ключові слова: очне яблуко, оболонки ока, патологія, поранення ока, травма ока, рогівка, регенерація, рубець.