



<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-3-74-78>

Применение нового способа лечения персистирующих дефектов роговицы различного генеза

Е.В. Ченцова¹, Н.В. Боровкова², Д.А. Боженко¹ ✉, И.Н. Пономарев², П.В. Макаров¹

¹ ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

² ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения города Москвы, Большая Сухаревская площадь, д. 3, Москва, 129090, Россия

Цель работы — сравнить эффективность применения обычного консервированного амниона и амниона, насыщенного лизатом богатой тромбоцитами плазмы (БоТП), для лечения эрозий после ожогов роговицы II–III степени и язв после кератитов. **Материал и методы.** Для сравнения эффективности консервированного амниона и пропитанного лизатом БоТП выделены 2 группы пациентов: основная (амнион, насыщенный лизатом БоТП) и группа сравнения (амнион без лизата БоТП). Использовали покрытие роговицы амниотической мембраной на 7–14 дней, после чего амнион удаляли и проводили контроль состояния роговицы. В каждую группу вошли пациенты с эрозиями после свежих ожогов площадью в среднем 60% роговицы и язвами после кератитов с толщиной роговицы на дне язвы в среднем 382 мкм в опытной группе и 393 мкм в группе сравнения. Лизат БоТП изготавливали из аутологичной крови пациентов в лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского по запатентованной технологии. Для этого из крови доноров выделяли БоТП с содержанием тромбоцитов свыше 1000 тыс/мкл, которую затем замораживали при -80°C и размораживали при $0-4^{\circ}\text{C}$ с целью разрушения клеточных мембран для получения лизата. **Результаты.** Использование амниотической мембраны, насыщенной лизатом БоТП, приводило к эпителизации эрозий после свежих ожогов за 1,3 мес и уменьшению отека роговицы в среднем на 247 мкм, эпителизации язв после кератитов за 1,3 мес и увеличению толщины роговицы на дне язвы на 62,5 мкм. Лечение с помощью обычного консервированного амниона занимало 1,8 мес до полной эпителизации при свежих ожогах с уменьшением отека стромы роговицы на 193 мкм, а эпителизация язв после кератитов требовала 1,6 мес и заканчивалась увеличением толщины роговицы в месте язвы на 42 мкм. **Заключение.** Представленный метод лечения эрозий и язв роговицы различного генеза с использованием амниотической мембраны, насыщенной лизатом аутологичной БоТП, позволяет достичь полной и стойкой эпителизации в более короткие сроки и с меньшим количеством покрытий амнионом, чем в группе сравнения. При этом пациентам не требуется дополнительное консервативное лечение эпителиопатий.

Ключевые слова: амнион; богатая тромбоцитами плазма; эрозии роговицы; язвы роговицы; ожоги глаз; лизат тромбоцитов; ростстимулирующий эффект

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Ченцова Е.В., Боровкова Н.В., Боженко Д.А., Пономарев И.Н., Макаров П.В. Применение нового способа лечения персистирующих дефектов роговицы различного генеза. Российский офтальмологический журнал. 2024; 17 (3): 74–8. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-3-74-78>

Usage of a new method of treatment of persistent corneal defects of various genesis

Ekaterina V. Chentsova¹, Natalia V. Borovkova², Dmitry A. Bozhenko¹ ✉, Ivan N. Ponomarev², Pavel V. Makarov¹

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

² N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Bolshaya Sukharevskaya Square 3, Moscow, 129090, Russia
panacelium@gmail.com

Purpose. The aim of the work is to compare the time of epithelialization and the change in the thickness of the cornea in the treatment of erosions after corneal burns of 2–3 degrees and ulcers after keratitis with preserved amnion and amnion saturated with autologous PRP lysate. **Materials and methods.** To compare the effectiveness of preserved amnion and lysate-soaked PRP, 2 groups of patients were identified: the main group (amnion saturated with lysate PRP) and the comparison group (amnion without lysate PRP). Each group included patients with erosions after recent burns with an average area of 60% of the cornea and ulcers after keratitis with a corneal thickness at the bottom of the ulcer of 382 microns in the experimental group and 393 microns in the comparison group. In the comparison group, ulcers were treated by covering the cornea with an amniotic membrane for 7–14 days, after which the amnion was removed and the condition of the cornea was monitored. An amniotic membrane saturated with PRP lysate was used in the experimental group. PRP lysate was made from autologous blood of patients in the laboratory of cell transplantation and immunotyping of the N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine using a patented technology. To do this, platelet-rich plasma (PRP) with a platelet content of over 1000 thousand/ml was isolated from the blood of donors, which was then frozen at –80 °C and thawed at 0–4 °C in order to destroy cell membranes. Assessment of the condition of the cornea was carried out using clinical and instrumental studies, including biomicroscopy with fluorescein staining, photoregistration and OCT on the Heidelberg Engineering “OCT Spectralis” apparatus. **Results.** The use of an amniotic membrane saturated with PRP lysate led to epithelialization of erosions after recent burns in 1.3 months and a decrease in corneal edema by 247 microns, epithelialization of ulcers after keratitis in 1.3 months and an increase in the thickness of the cornea at the bottom of the ulcer by 62.5 microns. Treatment with conventional preserved amnion took 1.8 months before complete epithelialization in recent burns with a decrease in corneal stroma edema by 193 microns, and epithelialization of ulcers after keratitis required 1.6 months and ended with an increase in the thickness of the cornea at the site of the ulcer by 42 microns. **Conclusion.** The study showed that the presented method of treating erosions and ulcers of the cornea of various genesis using an amniotic membrane saturated with autologous PRP lysate allows achieving complete and persistent epithelialization in a shorter time and with fewer amnion coatings, unlike the comparison group. At the same time, patients do not need additional conservative treatment of epitheliopathies.

Keywords: amnion; platelet-rich plasma; corneal erosion; corneal ulcers; eye burns; platelet lysate; growth-stimulating effect

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Chentsova E.V., Borovkova N.V., Bozhenko D.A., Ponomarev I.N., Makarov P.V. Usage of a new method of treatment of persistent corneal defects of various genesis. Russian ophthalmological journal. 2024; 17 (3): 74-8 (In Russ.). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-3-74-78>

По данным ВОЗ, заболевания роговицы составляют четверть всех болезней глаз и являются причиной от 4 до 5% слепоты во всем мире [1]. При ряде патологических состояний процессы эпителизации роговицы нарушаются, что приводит к извращению регенераторных механизмов [2–4]. За долгие годы изучения и борьбы с дефектами роговицы накоплено множество способов лечения. Трансплантация амниотической мембраны (АМ) широко используется при лечении пациентов с язвами роговицы, в том числе после свежих ожогов и кератитов. Опубликовано множество работ, описывающих эффективность применения амниона в лечении дефектов роговицы [5–10]. Для обеспечения длительного хранения АМ ее подвергают консервированию. Однако консервация имеет недостаток — заметную потерю факторов роста, важнейшей составляющей успешного заживления дефектов эпителия.

Перспективным способом насыщения консервированного амниона факторами роста является его пропитывание лизатом богатой тромбоцитами плазмы (БоТП), который несет в себе 30 биоактивных протеинов, а также цитокины.

БоТП эффективна и безопасна в качестве коадьювантного лечения глазной поверхности [11–14]. По нашему мнению и по данным литературы, сочетание и одновременное воздействие амниона и лизата БоТП на дефекты эпителия роговицы позволят ускорить регенерацию и сохранить прозрачность роговицы.

ЦЕЛЬ работы — сравнить эффективность применения обычного консервированного амниона и амниона, насыщенного лизатом БоТП, для лечения эрозий после ожогов роговицы II–III степени и язв после кератитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находилось 26 пациентов с эрозиями после свежих ожогов II–III степени и язв после кератитов. Срок наблюдения составил 3 мес. Местное лечение пациентов включало покрытие роговицы АМ. При этом основную группу составили 13 пациентов, у которых АМ была пропитана лизатом аутологичной БоТП, тогда как в группе сравнения (13 пациентов) использовали только амнион.

В основную группу с эрозиями после свежих ожогов вошло 8 пациентов (5 мужчин и 3 женщины) в возрасте от 29 до 67 лет и 5 пациентов (2 мужчин и 3 женщины) в возрасте от 41 до 80 лет с язвами после кератитов. Применялось покрытие АМ, насыщенное лизатом аутологичной БоТП после безуспешного стандартного лечения, включающего инстилляции антибиотика, дексаметазона, антиоксиданта, кератопротектора, парабульбарных инъекций стероидов и стимуляторов регенерации.

В группе сравнения наблюдалось 9 пациентов (7 мужчин и 2 женщины) со свежими ожогами в возрасте от 31 года до 52 лет и 4 пациента с кератитами (2 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 47 до 74 лет с чистыми язвами после кератитов.

Площадь деэпителизации роговицы в обеих группах была сопоставимой и составляла в среднем 60 % роговицы. Толщина роговицы у пациентов с кератитами также была схожа и составляла 382 и 393 мкм в основной группе и группе сравнения соответственно.

Изготовление лизата аутологичной БоТП для насыщения амнионов у пациентов основной группы проводилось по запатентованной технологии в научном отделении биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ [15]. Для получения лизата БоТП у пациентов за сутки до операции из кубитальной вены забирали 36 мл крови в вакуумные пробирки с антикоагулянтom EDTA. Из крови изготавливали БоТП с концентрацией тромбоцитов более $1000 \times 10^9/\text{л}$. Далее путем быстрой заморозки БоТП до -40°C и медленной дефростации при $+2-4^\circ\text{C}$ производили криодеструкцию мембран тромбоцитов. Затем разрушенные клеточные оболочки жестко центрифугировали для осаждения всех разрушенных клеточных структуры на дно пробирки. Вся жидкость над осадком — лизат БоТП, супернатант концентрированных факторов роста без клеточных элементов и мембран.

Ранее экспериментальным путем был определен оптимальный способ подготовки амниона и его совмещения с лизатом БоТП для максимального насыщения факторами

роста [16]. Лучшим вариантом консервации амниона оказалось лиофилизирование, так как лиофилизированный амнион способен впитать больший объем лизата БоТП, чем криоконсервированный или силиковосушенный амнион такой же массы. Мы установили, что для насыщения амниона факторами роста достаточно 3–5 мин пропитывания в пробирке с 2 мл лизата БоТП.

Интраоперационно АМ, как насыщенную лизатом БоТП, так и не насыщенную, накладывали на роговицу, пришивали по лимбу непрерывным швом нитью 10-0, сверху покрывали мягкой контактной линзой. Конструкцию сохраняли 7–14 дней, после чего производилось удаление амниона для оценки состояния роговицы. При необходимости процедуру повторяли.

Оценка состояния роговицы проводилась с помощью клинко-инструментальных исследований, включавших биомикроскопию с окраской флуоресцеином, фоторегистрацию и оптическую когерентную томографию (ОКТ). Подсчет площади деэпителизации проводился по фотографиям глаз пациентов после окрашивания флуоресцеином в программе Paint с помощью инструмента «Линии сетки» и подсчета закрасенных клеток.

Критериями оценки эффективности для пациентов с эрозиями после свежих ожогов были сроки эпителизации, количество покрытий АМ и уменьшение отека роговицы по данным ОКТ; для пациентов с поствоспалительными язвами — сроки эпителизации, количество покрытий амнионом и увеличение толщины роговицы в месте изъязвления по данным ОКТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В представленном клиническом исследовании применение АМ способствовало полной эпителизации дефектов роговицы во всех случаях. На следующий день после применения АМ в каждой из групп жалобы на боль, светобоязнь и слезотечение значительно уменьшались или прекращались, независимо от этиологии, глубины и площади поражения.

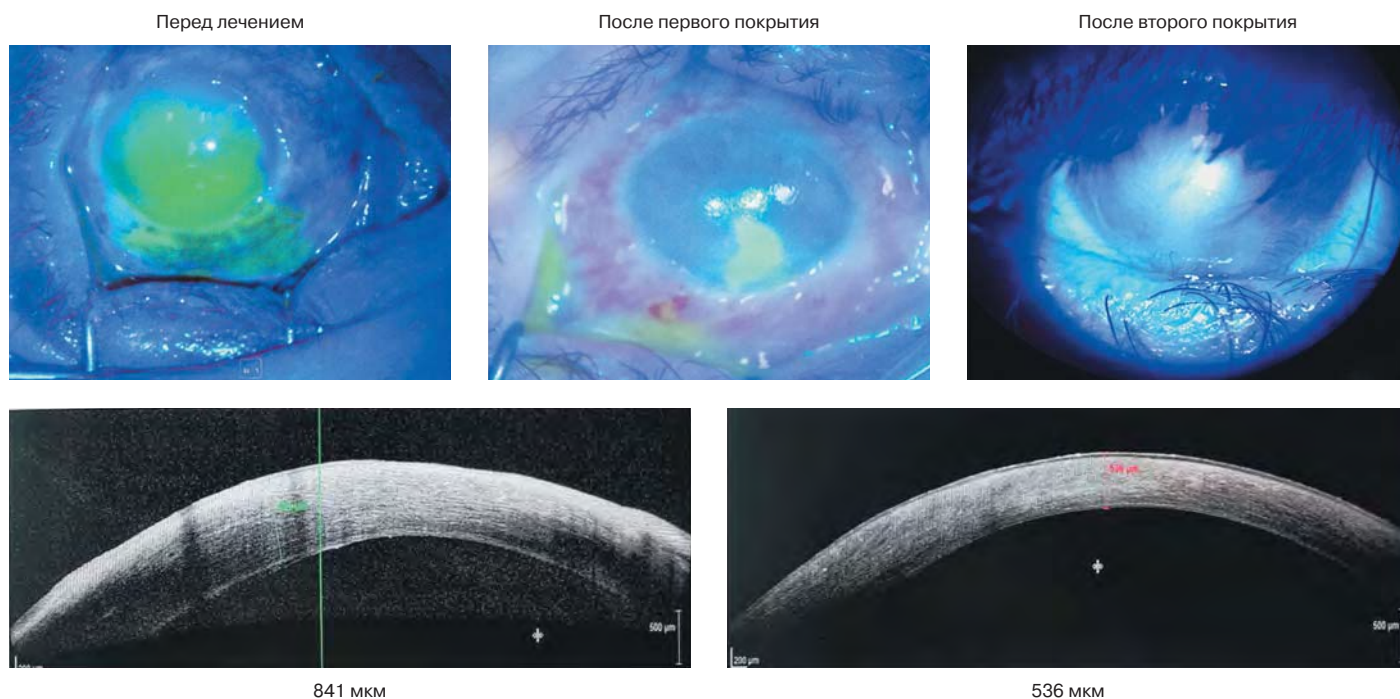


Рис. 1. Клинический пример применения насыщенной амниотической мембраны у пациента с тяжелым химическим ожогом глаза щелочью
Fig. 1. A clinical example of the use of a saturated amniotic membrane in a patient with severe chemical burns of the eye with alkali

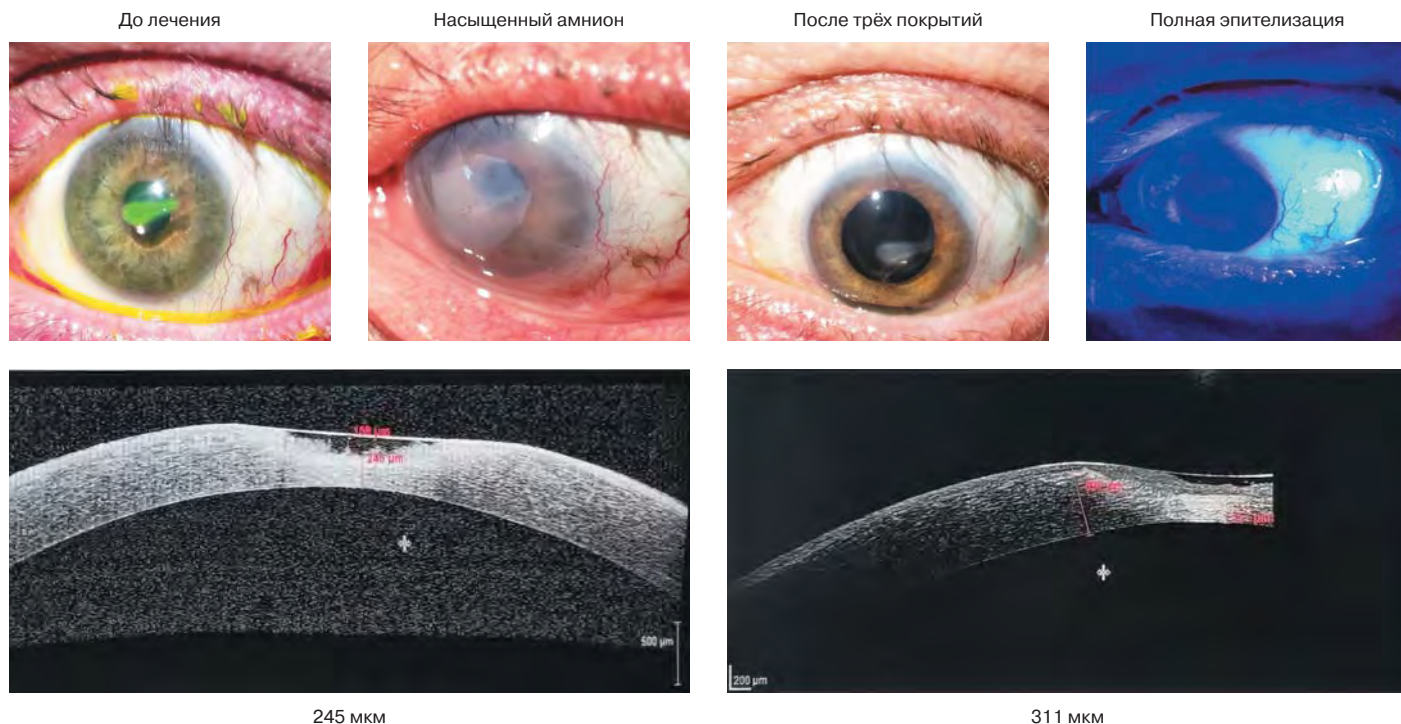


Рис. 2. Клинический пример применения насыщенного амниотической мембраны у пациента с язвой после герпес-вирусного кератита
Fig. 2. Clinical example of the use of a saturated amniotic membrane in a patient with an ulcer after herpesvirus keratitis

В основной группе у пациентов, как со свежими ожогами, так и с язвами после кератитов, среднее время полной эпителизации составило $1,28 \pm 0,21$ мес. У пациентов со свежими ожогами повторное применение амниона с лизатом аутологичной БоТП понадобилось в 6 случаях из 8. У пациентов с язвами после кератитов требовалось 3–5 покрытий при вирусной этиологии поражения роговицы и 2 покрытия при бактериальной инфекции. За 3 мес не зафиксировано ни одного рецидива. У пациентов с ожогами роговицы толщина стромы к моменту полной эпителизации по данным ОКТ сократилась на $247,7 \pm 38,5$ мкм, что свидетельствует об уменьшении отека (рис. 1).

У пациентов с язвами после кератитов толщина роговицы в месте язвы к моменту полной эпителизации по данным ОКТ увеличилась в среднем на $62,5$ мкм (рис. 2).

У пациентов группы сравнения для достижения полной эпителизации роговицы потребовалось $1,75 \pm 0,17$ мес. При этом у пациентов как со свежими ожогами, так и с язвами после кератитов использовали в среднем 2 покрытия амнионом. Особо отметим, что 4 пациентам из 9 с ожоговым поражением роговицы и у 3 из 4 больных с кератитами потребовалась дальнейшая стандартная консервативная терапия после снятия амниона в связи с сохранившимися эрозиями и эпителиопатиями, различия с основной группой статистически значимы (точный критерий Фишера, $p = 0,02$). Толщина роговицы у пациентов с ожогами в момент эпителизации сократилась на $193,0 \pm 45,1$ мкм, что меньше, чем в основной группе. Толщина роговицы в месте язвы после кератитов увеличилась в среднем на 42 мкм, что также меньше, чем в основной группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что представленный метод лечения эрозий и язв роговицы различного генеза с использованием амниотической мембраны, насыщенного лизатом аутологичной БоТП, позволяет достичь полной

и стойкой эпителизации роговицы в более короткие сроки и с меньшим количеством покрытий амнионом, чем в группе сравнения. При этом пациентам не требуется дополнительное консервативное лечение эпителиопатий. Однако для получения статистически значимых отличий необходимо дальнейшее изучение клинических эффектов предложенного метода лечения у большего количества пациентов.

Литература/References

1. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years: evaluating the prevalence of avoidable blindness in relation to "VISION 2020: the Right to Sight". *Lancet Global Health* 2020. doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30489-7
2. Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф. и др. Современные подходы к проблеме выбора носителя для культивирования стволовых клеток роговицы в лечении лимбальной недостаточности. *Офтальмологические ведомости*. 2018; 11 (2): 48–56. [Kulikov A.N., Churashov S.V., Chernysh V.F., et al. Modern approaches to the problem of choosing a carrier for the cultivation of corneal stem cells in the treatment of limbal insufficiency. *Ophthalmological statements*. 2018; 11 (2): 48–56 (In Russ.)]. doi: 10.17816/OV11248-56
3. Cabral JV, Jackson CJ, Utheim TP, Jirsova K. Ex vivo cultivated oral mucosal epithelial cell transplantation for limbal stem cell deficiency: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):301. doi: 10.1186/s13287-020-01783-8
4. Шевлюк Н.Н., Гатиатуллин И.З., Стадников А.А. Особенности репаративных гистогенезов при использовании биопластических материалов. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2020; 9 (1): 86–93. [Shevlyuk N.N., Gatiatullin I.Z., Stadnikov A.A. Features of reparative histogenesis using bioplastic materials. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020; 9 (1): 86–93 (In Russ.)]. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-86-93
4. Nejad AR, Hamidieh AA, Amirkhani MA, Sisakht MM. Update review on five top clinical applications of human amniotic membrane in regenerative medicine. *Placenta*. 2021; 103: 104–19. doi: 10.1016/j.placenta.2020.10.026
6. Cirman T, Beltram M, Schollmayer P, Rožman P, Kreft ME. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. *Cell and Tissue Banking*. 2013; 15 (2): 177–92. doi: 10.1007/s10561-013-9417-6
7. McDaniel JS, Wehmeyer JL, Cornell LE, Johnson AJ, Zamora DO. Amniotic membrane allografts maintain key biological properties post SCCO₂ and lyophilization processing. *J Biomater Appl*. 2021; 35 (6): 592–601. doi: 10.1177/0885328220952585

8. Le Q, Deng SX. The application of human amniotic membrane in the surgical management of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf.* 2019; 17 (2): 221–9. doi: 10.1016/j.jtos.2019.01.003
9. Борзенко С.А., Ролик О.И., Онищенко Н.А., Комах Ю.А. О возможности совершенствования консервации донорских роговиц путем применения регуляторных пептидов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2011; 13 (4): 101–5. [Borzenok S.A., Roller O.I., Onishchenko N.A., Komakh Yu.A. On the possibility of improving the preservation of donor corneas by using regulatory peptides. *Bulletin of Transplantation and Artificial Organs.* 2011; 13 (4): 101–5 (In Russ.)]. doi:10.15825/1995-1191-2011-4-101-105
10. Walkden A. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology: An updated perspective. *Clin Ophthalmol.* 2020 Jul 22; 14: 2057–72. doi: 10.2147/OPHTN.S208008
11. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; (4): 67. doi: 10.1186/scrt218
12. Gupta S, Paliczak A, Delgado D. Evidence-based indications of platelet-rich plasma therapy. *Expert Rev Hematol.* 2021; 14 (1): 97–108. doi: 10.1080/17474086.2021.1860002
13. Макаров М.С., Сторожева М.В., Конюшко О.И., Боровкова Н.В., Хватов В.Б. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную активность фибробластов человека. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2013; (2): 111–5. [Makarov M.S., Storozheva M.V., Konyushko O.I., Borovkova N.V., Khvatov V.B. Influence of platelet growth factor concentration on proliferative activity of human fibroblasts. *Cell technologies in biology and medicine.* 2013; (2): 111–5 (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-013-2199-9
14. Боровкова Н.В., Макаров М.С., Андреев Ю.В., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. Оценка цитокинового состава сыворотки крови и препаратов на основе тромбоцитов человека. *Молекулярная медицина.* 2021; 19 (3): 51–7. [Borovkova N.V., Makarov M.S., Andreev Yu.V., Storozheva M.V., Ponomarev I.N. Evaluation of the cytokine composition of blood serum and preparations based on human platelets. *Molecular medicine.* 2021; 19 (3): 51–7 (In Russ.)]. doi: 10.29296/24999490-2021-03-08
15. Боровкова Н.В., Макаров М.С., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. Способ приготовления лизата тромбоцитов с высоким содержанием факторов роста. Патент РФ на изобретение № 2739515C1 от 25.12.2020. [Borovkova N.V., Makarov M.S., Storozheva M.V., Ponomarev I.N. Method of preparation of platelet lysate with a high content of growth factors. Patent RU №2739515C1, 25.12.2020 (In Russ.)].
16. Ченцова Е.В., Боровкова Н.В., Боженко Д.А. и др. Способ хирургического лечения дефектов роговицы различного генеза. Патент РФ на изобретение № 2782129, 2022. [Chentsova E.V., Borovkova N.V., Bozhenko D.A., et al. Method of surgical treatment of corneal defects of various genesis. Patent RU No. 2782129, 2022 (In Russ.)].

Вклад авторов в работу: Е.В. Ченцова, Н.В. Боровкова — разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, редактирование статьи; Д.А. Боженко — сбор данных и их интерпретация, написание статьи; И.Н. Пономарев — сбор и анализ данных, финальная подготовка статьи к публикации.

Authors' contribution: E.V. Chentsova, N.V. Borovkova — development of the concept and design of the study, interpretation of data, editing of the article; D.A. Bozhenko — data collection and interpretation, writing of the article; I.N. Ponomarev — collection and data analysis, final preparation of the article for publication.

Поступила: 22.07.2023. Переработана: 03.08.2023. Принята к печати: 04.08.2023

Originally received: 22.07.2023. Final revision: 03.08.2023. Accepted: 04.08.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногызская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

Екатерина Валериановна Ченцова — д-р мед. наук, профессор, старший научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии

Дмитрий Андреевич Боженко — аспирант, врач-офтальмолог, ORCID 0009-0009-8147-186X

Павел Васильевич Макаров — д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник

ГБУЗ «НМИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения города Москвы, Большая Сухаревская площадь, д. 3, Москва, 129090, Россия

Наталья Валерьевна Боровкова — д-р мед. наук, заведующая отделением биотехнологий и трансфузиологии, ORCID 0000-0002-8897-7523

Иван Николаевич Пономарев — канд. мед. наук, старший научный сотрудник

Для контактов: Дмитрий Андреевич Боженко, panacelium@gmail.com

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryzskaya St., Moscow, 105062, Russia

Ekaterina V. Chentsova — Dr. of Med. Sci., professor, senior researcher of the department of traumatology and reconstructive surgery

Dmitry A. Bozhenko — PhD student, ophthalmologist, ORCID 0009-0009-8147-186X

Pavel V. Makarov — Dr. of Med. Sci., professor, leading researcher of the department of traumatology and reconstructive surgery

N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Bolshaya Sukharevskaya Square, 3, Moscow, 129090, Russia

Natalia V. Borovkova — Dr. of Med. Sci., head of the department of biotechnology and transfusiology, ORCID 0000-0002-8897-7523

Ivan N. Ponomarev — Cand. of Med. Sci., senior researcher of the department of biotechnology and transfusiology

For contacts: Dmitry A. Bozhenko, panacelium@gmail.com