

СУБКОНЪЮНКТИВАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АУТОПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ (PRP) ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВ ГЛАЗ.

МАРКЕС-ДЕ-АРАСЕНАР¹, МОНТЕРО-ДЕ-ЭСПИНОСАИ¹, МУНЬОСМ², ПЕРЕЙРАДЖ.³

WWW.PRPLAB.RU

СУБКОНЪЮНКТИВАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АУТОПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ (PRP) ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВ ГЛАЗ.

МАРКЕС-ДЕ-АРАСЕНА Р¹, МОНТЕРО-ДЕ-ЭСПИНОСА И¹, МУНЬОС М², ПЕРЕЙРА ДЖ.³

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Цель: Оценка эффективности субконъюнктивального применения аутогенного тромбоцитарного концентрата при лечении ожогов глаз.

Методика: Оценка проводилась посредством анализа результатов лечения глаз 10 пациентов, страдающих от ожогов глаз, полученных на работе. Оценивались два вида лечения: первая группа получала только обычное консервативное местное лечение; а второй группе, в дополнении к этому, проводили субконъюнктивальные инъекции тромбоцитарной массы. Изучались клиническое состояние пациентов и период, в течение которого пациент не мог вернуться к работе; наблюдение продолжалось вплоть до полного заживления ожогов.

Результаты: Были зафиксированы статистически значимые различия между группой, получающей субконъюнктивально аутогенный тромбоцитарный концентрат, и группой, получающей местно традиционные лекарственные препараты, по времени заживления роговицы и конъюнктивы, времени нахождения на больничном и времени, требуемом для полного выздоровления.

Выводы: Субконъюнктивальное введение аутогенного тромбоцитарного концентрата следует считать простой, экономически выгодной и эффективной формой лечения травм (ожогов) поверхностных тканей глаза.

Ключевые слова: Поверхностные ткани глаза, ожоги глаз, тромбоциты, факторы роста, роговица.

Одобрено: 12/6/07.

Больница FREMAP, Севилья. Клиника Centro Cid Clinic, Севилья. Хирургическое отделение (Офтальмология). Медицинский факультет Севильского университета.

¹ Кандидат медицинских наук. Севильский университет. Испания.

² Кандидат медицинских наук. Больница Virgen del Rocío. Севилья. Испания.

³ Дипломированный врач. Больница Virgen del Rocío. Севилья. Испания. Исследование проводилось при финансовой поддержке Casa Real de los Godos Institution.

Корреспонденцию направлять по адресу:

Rafael Márquez de Aracena del Cid Servicio de Oftalmología

Hospital FREMAP de Sevilla Avda. de Jerez, s/n

Sevilla Spain

E-mail: rafael_marquez@fremap.es

числе в глазу (25).

Применение факторов роста в составе тромбоцитарной массы на эпителий роговицы может усилить трофику тканей роговицы (26). Наблюдения показали, что применение определенных частиц сыворотки и плазмы в клеточной культуре усиливает рост, перемещение и дифференциацию клеток (27). Кроме того, появилась новая возможность для применения тромбоцитарной массы в таких областях как трансплантология роговицы (28).

Эффективность местного применения аутологической сыворотки и аутогемотерапии при определенных изменениях поверхности роговицы может привести к выводам, что лечебные возможности данного метода заключаются в содержимом тромбоцитов. На данный момент нет доказательств того, что факторы роста являются единственными производными крови, которые усиливают процессы эпителизации роговицы.

На данном этапе необходимо определить, эффективен ли тромбоцитарный концентрат при регенерации изменений поверхности глаза. Для этого был проведен клинический анализ регенерации обожженных тканей поверхности глаза после субконъюнктивального применения тромбоцитарного концентрата, с оценкой полезности и эффективности данного метода. Ниже приводятся предварительные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Мы подробно исследовали десять глаз десяти пациентов, посетивших отделение неотложной помощи нашей больницы по причине производственной травмы: ожог глаза 3 степени по классификации Dua (29), т.е. Наличие дефекта роговицы, произошедшее от трех до шести часов назад с повреждением конъюнктивы на 30-50%. После получения пациентом назначенного лечения в соответствии с методами и протоколом, мы осуществляли клинический контроль вплоть до полного заживления.

Пациенты отбирались последовательно среди тех, кто первым поступил в отделение неотложной помощи с указанной патологией и разрешил соответствующее лечение. У пациентов с ожогами обоих глаз для исследования выбирался глаз, получивший

более серьезные повреждения.

Распределение по группам

Пациентов разделили на две группы в зависимости от получаемого лечения:

— Группа А (5 пациентов) получала обычное местное лечение.

— Группа В (5 пациентов) получала местное лечение + тромбоцитарную массу субконъюнктивально (СПС).

Все пациенты, участвующие в исследовании, получали следующее традиционное лечение:

После промывания глаза физ. раствором было назначено следующее лечение: глазные капли Циклопентолат, по 1 капле каждые 12 часов; глазные капли Дексаметазон, 1 мг и Тобрамицин 3 мг по 1 капле каждые 6 часов: крем ретинола пальмитат, 10.000 U.I. + гентамицина сульфат 3 мг + DL-Метионин 5 мг каждые 6 часов + повязка на глаз.

Для Группы В проводилось следующее:

1. Подробное разъяснение лечения пациенту, который затем подписывал информированное согласие.

2. Взятие 20 куб.см периферической крови в 4,5 мл стерильные пробирки с 0,5 мл цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Кроме того, кровь брали и для клинического анализа для получения полной лейкоцитарной формулы и биохимии, анализа на гепатит и ВИЧ.

Пробирки с пробами крови центрифугировали 7 минут на 2 100 об/мин, для разделения плазмы на составляющие. Для нашего исследования мы использовали фракции плазмы с большим количеством тромбоцитов, т.е. 200-400 μ l (0,2-0,4 куб.см.) сразу после клеток эритроцитарного ряда. 1-2 мл были получены после центрифугирования, когда гематокрит находится в рамках обычных клинических параметров.

Субконъюнктивальная инъекция

В стерильной среде (операционной) и после 3 закапываний в глаз по 1 капле каждые 3 минуты 1 мг хлоргидрата тетракаина + 4 мг хлоргидрата оксибупрокоин (Colircusi double anesthetic®, Alcon-Cusi), проводилась субконъюнктивальная инъекция тромбоцитарной массы под конъюнктиву глазного яблока (Рис. 1) 0,5-1 мл в 12 часов и еще раз в 6 часов. На 24 часа накладывалась повязка с кремом с антибиотиком + противовоспалительные капли

Метод клинической оценки

Оценка субъективных симптомов пациента и клиническая оценка раны проводились при помощи биомикроскопии щелевой лампой с местной окраской флуоресцеином или без нее. Для измерения, а также оценки травмы, глаз подразделяли на 12-часовые сектора [29] и изучали область, окрашенную флуоресцеином, и степень гиперемии.

Статистическое исследование проводилось следующим образом: средние показатели со стандартным отклонением; процент в форме критериев Тьюки и значимость в форме критерия Крускала-Уоллиса, а также корреляции Пирсона.

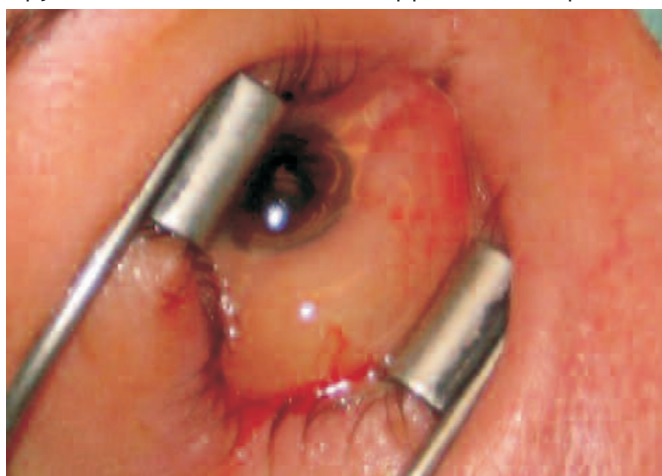


Рис. 1: Отек конъюнктивы после субконъюнктивальной инъекции тромбоцитарной массы в глаз с ожогом щелочью.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Десять пациентов мужского пола с ожогами глаз III степени по классификации Dua (35) по причине производственной травмы. Средний возраст пациентов – 32,25 лет (стандартное отклонение = 15,52). У четырех пациентов был травмирован правый глаз (40%), у пятерых – левый глаз (50%) и у одного – оба глаза (10%). Что касается трудовой деятельности пациентов, 50% (пять пациентов) работали в строительной отрасли, 30% (три пациента) – в сфере обслуживания и 20% (два пациента) – в промышленном производстве. Причинные факторы – ожоги щелочью у шести пациентов (60%), у троих (30%) – ожоги растворителями, часто используемыми при строительстве и в обслуживании, а у одного пациента – ожог кислотой (10%).

Что касается периода заживления роговицы, то он составлял 6 дней в группе А (традиционное лечение) и 3 дня в группе В (аутотерапия тромбоцитами), со статистически значимой разницей (0,001) между группами.

Что касается кератита, сокращение было очевидно в группе В (6 дней) по сравнению с группой А (9 дней).

Что касается времени на больничном, разница не была статистически значимой между группой А (7 дней) и группой В (6 дней).

В отличие от этого, окончательное время заживления было разным в группе А (10 дней) и группе В (6 дней), но, как и с другими параметрами, разница не была статистически значимой (0.017).

Аналитическая оценка пациентов, получавших аутологичный плазменный концентрат, не показала никакой взаимосвязи с параметрами исследования (параметрическая и непараметрическая корреляция Пирсона).

Побочное действие лечения

В группе А не было никаких нежелательных эффектов. В группе В, 100% пациентов, получавших тромбоцитарную массу субконъюнктивально, не показали никаких признаков отека конъюнктивы спустя 24 часа (Рис. 2). Три пациента (60%) говорили о раздражении слизистой оболочки глаза через одну минуту после инъекции, которое проходило спустя 3-5 минут. Три пациента (60%) продемонстрировали четко локализованные и слегка выпуклые небольшие субконъюнктивальные отложения оранжевого цвета в местах введения, которые исчезли (в среднем) через 8 дней. Ни в одном из глаз, получавших лечение, не было обнаружено никаких стойких последствий.

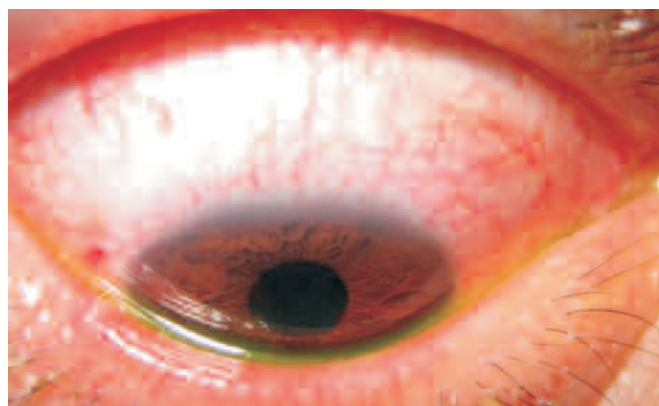


Рис. 2: Конъюнктива глазного яблока через 24 часа после субконъюнктивального введения тромбоцитарной массы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Лечение для исправления дефектов эпителиализации роговицы включает в себя наружное применение аутологической плазмы обогащенной тромбоцитами

- при нейрогенном, нейротрофическом кератите (30),
- хронических заболеваниях поверхности глаза (31),
- сухом кератоконъюнктивите (32,33)
- стойких дефектах эпителия роговицы (34,35).

Создается впечатление, что плазма обогащенная тромбоцитами способствует эпителиализации, заживлению и восстановлению поверхности роговицы (19-22), так как она предоставляет факторы роста и улучшает восприимчивость роговицы в ходе применения (30). Кроме того, местное использование других факторов роста, например фактора роста эпидермиса (EGF) и фактора роста нервов (NGF) благоприятствует заживлению нарушений роговицы (36-38), улучшая зрение и восприимчивость роговицы (39). Факторы роста эндотелия сосудов могли играть важную роль в физиологии клеток эпителия конъюнктивы (25). Было также доказано, что наружное применение факторов (KGF-2) у подопытных животных (кроликов) могло стимулировать перемещение стволовых клеток к центру роговицы, тем самым благоприятствуя заживлению обожженной

роговицы (40). Кажется, что такая стимуляция связана с концентрацией факторов роста (41). Факторы роста в амниотической оболочке усиливают рост выращенных стволовых клеток (42).

Данное исследование показывает, что субконъюнктивальное введение аутологичной тромбоцитарной массы приводит к статистически значимому уменьшению периода заживления ожогов роговицы III степени (0.001).

Что касается заживления конъюнктивы, определенная степень активности эндогенных факторов роста была описана в регенерации таковых (25). Наше исследование свидетельствует об уменьшении времени заживления конъюнктивы при ожогах III степени при использовании тромбоцитов по сравнению с традиционным лечением (группа А). Полученные результаты следует проверить в более масштабных исследованиях.

Что касается кератита, более короткий период заживления наблюдался у пациентов в группе В (6 дней) по сравнению с группой А (9 дней).

Более короткий период заживления роговицы и конъюнктивы, время на больничном и окончательное время выздоровления пациентов, получавших плазму, обогащенную тромбоцитами (группа В) по сравнению с группой, получавших традиционное лечение, (группа А) могут означать, что субконъюнктивальное применение плазмы, обогащенной тромбоцитами играет активную и эффективную роль во внешних процессах

Таблица I. Краткие результаты

Дни на больничном, ожог III степени	Группа А Группа В	М 5	P50 6	[P25-P75] [6-9] [4-6]	P 0,05
Время заживления, ожог III степени	Группа А Группа В	5 5	10 6	[8-15] [6-7]	0,017
Заживление роговицы, ожог III степени	Группа А Группа В	5 5	6 3	[4-7] [2-3]	0,001
Заживление конъюнктивы, ожог III степени	Группа А Группа В	5 5	6 4	[6-7] [4-6]	0,017

восстановления глаз после травм (ожогов). Следовательно, можно вести разговор о ее местном применении.

Эффективность данного вида лечения подтверждается более коротким периодом заживления и рубцевания конъюнктивы и временем заживления ожогов глаз III степени (35), что имеет статистическую значимость при заживлении роговицы.

Создается впечатление, что наличие небольших ограниченных конъюнктивальных выпуклостей указывает на местоположение отложений тромбоцитарной массы, которые могут впоследствии высвободиться, продлевая эффект от вышеназванной терапии.

Представляется, что субконъюнктивальная инъекция плазмы, богатой плазматическими тромбоцитами, уменьшает проявление клинических симптомов офтальмологических патологий, таких как язв роговицы или конъюнктивы. Соответственно, следует рассмотреть возможность локального использования.

Как показал наш опыт, клиническая эффективность субконъюнктивного применения тромбоцитов позволяет нам сделать вывод, что нет необходимости активировать

тромбоцитарную массу, чтобы она начала действовать, а возможности новых применений для лечения ожогов глаз могут представлять интерес. Кроме того, действие крови в отношении восстановления тканей может быть обнаружено, в основном, в частицах тромбоцитов.

Метод, используемый в нашем исследовании, позволяет получать исключительно тромбоциты, исключая воспалительные лимфокины лейкоцитарного происхождения. Риски распространения заболевания исключаются, так как плазма аутологична и, кроме того, она приготавливается непосредственно в амбулаторных условиях, а также имеет ничтожный антигенный эффект и очень низкую стоимость. Тот факт, что тромбоцитарная масса подтверждает восстановительную деятельность на поверхности глаза, открывает новые возможности для ее применения при лечении патологий поверхности роговицы.

Субконъюнктивальное применение аутологичных тромбоцитов плазмы при повреждениях - ожогах глаз - это простое и экономически выгодное лечение без каких-либо нежелательных побочных эффектов. Однако эффективность должна быть подтверждена более широкомасштабными исследованиями.

ССЫЛКИ

1. Reim M, Redbrake C, Schrage N. Heridas oculares químicas y térmicas. Tratamiento quirúrgico y médico basado en hallazgos clínicos y patofisiológicos. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2001; 76: 79-124.
2. Morgan SJ. Chemical burns of the eye: causes and management. *Br J Ophthalmol* 1987; 71: 854-857.
3. Rapuano CJ, Luchs J, Kim T. Requisitos en Oftalmología. Segmento Anterior. Madrid: Harcourt 2001; 288-293.
4. Cameron JD. Corneal reaction to injury. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals of cornea and external diseases*. St. Louis: Mosby; 1997.
5. Kruse FE, Tseng SC. Epithelial growth is promoted by a mitogen from fibroblast conditioned medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO Suppl)* 1991; 34: 1011.
6. Harris TM, Berry ER, Pakurar AS, Sheppard LB. Biochemical transformation of bulbar conjunctiva into corneal epithelium: an electrophoretic analysis. *Exp Eye Res* 1985; 41: 597-605.
7. Buck RC. Ultrastructure of conjunctival epithelium replacing corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1986; 5: 149-159.
8. Huang AJ, Watson BD, Hernandez E, Tseng SC. Induction of conjunctival transdifferentiation by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization. *Ophthalmology* 1988; 95: 228-235.
9. Pfister RR, Haddox JL, Dodson RW, Harkins LE. Alkali-burned collagen produces a locomotory and metabolic stimulant neutrophils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 295-304.
10. Ralph RA. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea* 2000; 19: 274-282.
11. Pfister RR, Paterson CA, Spiers JW, Hayes SA. The efficacy of ascorbate treatment after severe experimental alkali burns depends upon the route of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19: 1526-1529.
12. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106: 1504-1510.
13. Morgan S, Murray A. Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. *Eye* 1996; 10: 349-354.
14. Trusov MS, Rozenkrants KB. Surgical treatment of chemical burns of the eye in combination with irrigation with defibrinated blood and subconjunctival administration of autoblood with antibiotics. *Vestn Oftalmol* 1966; 79: 61-65.
15. Sallai S, Fehür J, Podhorányi G. Experience with autologous blood therapy in burns. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1967; 150: 879-886.
16. Dolezalova V, Kutszkova L. Subconjunctival injection of autogenous blood in the eye after thermal and chemical burns. *Cesk Oftalmol* 1973; 29: 207-212.
17. Lenkiewicz E, Ferencowa A, Szewczyk E. Subconjunctival autohemotherapy of eye burns in our cases. *Klin Oczna* 1992; 94: 113-114.
18. Kuprianowicz W, Czesnel H. Results of treatment of calcium eye burns with subconjunctival injections of blood. *Klin Oczna* 1969; 39: 51-54.
19. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 459-461.
20. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999; 106: 1984-1989.
21. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 390-395.
22. Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001; 20: 807-810.
23. Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165: 728-737.
24. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12: 261-273.
25. Gebhardt M, Mentlein R, Schaudig U, Pufe T, Recker K, Nulle B, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. *Ophthalmology* 2005; 112: 1023-1030.
26. Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion* 2004; 44: 1724-1731.
27. Hartwig D, Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L, et al. Topical treatment of ocular surface defects: comparison of epitheliotropic capacity of fresh frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model. *Transfus Med* 2005; 15: 107-113.
28. Marquez de Aracena del Cid R, Montero de Espinosa Escoriaza I, Muñoz Söez M, Pereira Gutiérrez G, Martín Leal F. Tratamiento con concentrado plaquetario plasmático subconjuntival y típico en el trasplante de limbo. *Mapfre Medicina* 2006; 17: 280-285.
29. Dua HS, King AJ, Joseph A. A new classification of ocular surface burns. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1379-1383.
30. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004; 111: 1115-1120.
31. Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, Yamada M, Mashima Y, Watanabe R, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 579-583.
32. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 459-461.
33. Tananuvant N, Daniell M, Sullivan LJ, Yi Q, Mckelvie P, McCarty DJ, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea* 2001; 20: 802-806.
34. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999; 106: 1984-1989.
35. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 390-395.
36. Lambiasi A, Manni L, Rama P, Bonini S. Clinical application of nerve growth factor on human corneal ulcer. *Arch Ital Biol* 2003; 141: 141-148.
37. Baum J. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *Surv Ophthalmol* 1999; 43: 372-373.
38. Lambiasi A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1998; 338: 1174-1180.
39. Bonini S, Lambiasi A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 2000; 107: 1347-1351.
40. Liu L, Li YP, Huang SQ, Lin JX, Zhang WX. Mechanism of keratinocyte growth factor-2 accelerating corneal epithelial wound healing on rabbit alkali burned cornea. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2005; 41: 364-368.
41. Mathers WD, Sherman M, Fryczkowski A, Jester JV. Dose-dependent effects of epidermal growth factor on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 2403-2406.
42. Yam HF, Pang CP, Fan DS, Fan BJ, Yu EY, Lam DS. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea* 2002; 21: 101-105.
43. Daniele S, Gilbard JP, Schepens CL. Treatment of persistent epithelial defects in neurotrophic keratitis with epidermal growth factor: a preliminary open study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992; 30: 314-317.