

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2020-1-14-17>  
УДК 617.713

## Результаты экспериментального исследования устройства для ультрафиолетового кросслинкинга роговицы «УФалинк Квант»

А.Р. Халимов, Н.Е. Шевчук, В.К. Суркова, Г.М. Казакбаева, Э.Л. Усубов

ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», Уфа

### РЕФЕРАТ

В статье представлены сведения об экспериментальных исследованиях устройства для ультрафиолетового кросслинкинга роговицы «УФалинк Квант», которые базируются на НИР Уфимского НИИ глазных болезней, выполненной при поддержке гранта Академии наук Республики Башкортостан.

Изучено влияние УФ-кросслинкинга с использованием аппарата «УФалинк Квант» на биомеханические показатели (модуль Юнга, пре-

дел прочности) свиной роговицы *ex vivo* и особенности морфологических проявлений в роговице кроликов. Выявлено достоверное повышение модуля Юнга на 165% и предела прочности материала на 185% по сравнению с нормой. Морфологические изменения характеризовались транзитным набуханием всех слоев стромы, более выраженным в ранний срок после операции. При этом отмечали снижение плотности кератоцитов преимущественно в передних и средних слоях стромы, не затрагивающей задние слои роговицы и эндотелий.

**Ключевые слова:** кератоконус, ультрафиолетовый кросслинлинг роговицы, устройство для УФО роговицы. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2020;1:14-17.

### ABSTRACT

#### The results from experimental studies of UFalink Kvant corneal cross-linking device

A.R. Khalimov, N.E. Shevchuk, V.K. Surkova, G.M. Kazakbaeva, E.L. Usubov

Ufa Eye Research Institute, Ufa

The paper presents data on experimental studies of UFalink Kvant device for corneal UV cross-linking. These data are based on academic research work of the Ufa Eye Research Institute supported by the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan Grant. The effect of UV crosslinking using UFalink Kvant on the Young's module and *ex vivo* porcine corneal tensile strength and the features of morphological changes in the rabbit's cornea were studied. The growth of the Young's module by 165% and the tensile strength by 185% in comparison with the norm was

revealed. Morphological changes were characterized by transient stromal edema in the early post-op period. There was a decrease in the number of keratocytes in the anterior and middle layers of the stroma. The number of keratocytes in the posterior stroma layer and the number of corneal endothelial cells remained unchanged.

**Key words:** keratoconus, UV corneal crosslinking, device for UV irradiation of the cornea. ■

Point of View. East – West. 2020;1:14-17.

**П**рофилактика и лечение кератэктазий остаются актуальной проблемой современной офтальмологии. Особую значимость исследованиям, направленным на реабилитацию пациентов с дегенеративными заболеваниями органа зрения, придают статистические данные, указывающие на неуклонный рост данной патологии, в т.ч. за счет ятрогенных кератэктазий, вызванных значительным повышением офтальмохирургической активности [1, 2].

Более десятилетия назад в арсенале офтальмологов появился новый метод лечения кератэктазий – ультрафиолетовый (УФ) кросслинлинг роговицы, способствующий повышению биомеханических свойств оптической оболочки глаза и патогенетически-ориентированной компенсации последствий развивающегося заболевания. В результате УФ-воздействия (370 нм) с рибофлавином происходит фотополимеризация фибрилл коллагена и компонентов основного вещества стромы

[3-5]. Кросслинлинг роговицы позволяет повысить опорные свойства роговой оболочки, приостановить прогрессирующую дегградацию коллагеновой структуры стромы и стабилизировать рефракцию [2].

Однако нежелательной особенностью стандартного хирургического вмешательства является его излишняя продолжительность (более 1 часа), что не может не сказываться на самочувствии пациента и занятости врача. Светодиодные источники ультрафиолета откры-

того типа при проведении кросслинкинга могут приводить к неравномерному распределению светового потока на поверхности роговицы. При этом в ряде случаев существует необходимость ограничения участка УФ-облучения с целью защиты зоны лимба. Именно поэтому сохраняет актуальность внедрение в практическую медицину акселерированных клинических протоколов кросслинкинга на основе использования новых доступных модернизированных устройств для УФ-облучения роговицы с повышенными опико-техническими возможностями, включающими системы диафрагмирования и гомогенизации светового пучка, генерации широкого спектра высоких доз УФ-излучения и т.п. [6-9].

## ЦЕЛЬ

Изучить в эксперименте биомеханические и морфологические изменения в роговице после ультрафиолетового кросслинкинга с использованием нового устройства с системами акселерации, диафрагмирования и гомогенизации светового потока.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования прочностно-механических свойств проведены на 30 свиных роговицах *ex vivo* в 3 группах (по 10 роговиц в каждой): 1-я группа – интактные (контроль), 2-я (группа сравнения) – стандартный протокол (3 мВт/см<sup>2</sup>, 30 минут) с устройством «УФалинк» (Россия, рег. удостоверение № ФСР 2009/05489) [10], 3-я (опытная группа) – акселерированный протокол (9 мВт/см<sup>2</sup>, 10 минут) с устройством «УФалинк Квант» (Россия, рег. удостоверение № РЗН 2019/8172). Последнее офтальмологическое устройство было разработано и запатентовано нами по ТУ 9444-007-01966940-2014 для проведения УФ-кросслинкинга роговицы [11] в рамках выполнения научно-исследовательской работы при поддержке гранта Академии наук Республики Башкортостан из Перечня приоритетных направлений научных исследований 2019 г. «Создание конкурентоспособных импортозамещающих диагностических и ле-

чебных технологий и изделий нового поколения для повышения качества жизни населения республики».

Устройство «УФалинк Квант» снабжено системами: визуализации и фото-, видеофиксации операционного поля, гомогенизации и диафрагмирования светового пятна, акселерированного (ускоренного) режима облучения до 18 мВт/см<sup>2</sup>, автоматической настойки флюенса излучения. Гомогенизированный световой поток устройства «УФалинк Квант» позволяет корректировать искривления и отражения на сферической поверхности роговой оболочки, создавая однородное световое поле, исключая вероятность образования локальных зон повышенного воздействия ультрафиолета.

Рибофлавин-УФ-обработанную роговицу делили в горизонтальном меридиане на две полоски шириной по 4 мм, измеряли их длину и поочередно укрепляли на зажимах разрывной установки, производили их растяжение до полного разрыва. Полученные результаты обрабатывали математически с вычислением модуля Юнга.

Расчет модуля Юнга производили формуле:

$$E = \frac{P \cdot l_0}{S \cdot \Delta l_0} = \frac{m \cdot g \cdot l_0}{S \cdot \Delta l_0}$$

$m$  – масса образца (кг),

$g$  – ускорение свободного падения (м/с<sup>2</sup>),

$l_0$  – длина образца до растяжения (мм),

$S$  – площадь поперечного сечения образца (мм<sup>2</sup>),

$\Delta l_0$  – приращение длины образца (мм).

Сравнение морфологической структуры роговицы кролика после УФ кросслинкинга с использованием устройств «УФалинк» и «УФалинк Квант» проводили методами световой микроскопии (4 кролика, 8 глаз).

УФ кросслинкинг роговицы глаза кроликов выполняли в операционной виварии института. Для анестезиологического пособия применяли «Золетил» 15 мг/кг («Valdepharm», Франция), «Ксилазин» 20 мг/кг («Ветфарм», Беларусь) внутримышечно, местные инстилляцией 0,4% раствора оксибупрокаина («Инокаин», Индия). Деэпителизацию рого-

вицы производили микрохирургическим шпателем на участке 8 мм с помощью операционного микроскопа (Carl Zeiss, Германия). Для насыщения (30 мин.) стромы использовали раствор 0,1%-го рибофлавина с 20%-м декстраном (Декстралинк, Россия). УФ-облучение роговицы проводили непрерывно с использованием устройств «УФалинк» (3 мВт/см<sup>2</sup> в течение 30 мин.) и «УФалинк Квант» (9 мВт/см<sup>2</sup> – 10 мин.). В процессе УФ воздействия выполняли инстилляцией каплей Декстралинк. Срок наблюдения – 7-е и 30-е сутки после процедуры.

Гистологические исследования выполняли по общепринятым методикам. Энуклеированные глаза животных фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Гистологические срезы (1-4 мкм) готовили с использованием микротомы «RM 2145» (Leica Microsystems, Германия), окрашивали по методу Ван Гизона или гематоксилином и эозином. Световую микроскопию проводили с помощью микроскопа «LEICA DM 2500» (Leica Microsystems, Германия) с цифровой фотокамерой «LEICA DFC 450» (Leica Microsystems, Германия).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «STATISTICA» 6.1. Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднюю арифметическую величину ( $M$ ) и ошибку средней ( $m$ ). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования прочностно-механических свойств свиных роговиц после УФ кросслинкинга в стандартном («УФалинк») и акселерированном («УФалинк Квант») режимах.

УФ облучение роговицы в присутствии фотосенсибилизатора (рибофлавин) инициирует фотохимические процессы, которые наиболее интенсивно протекают в передней строме. В результате такого воздействия происходит повышение биомеханической прочности роговицы, обусловленное эффектами фотополимеризации молекул коллагена, в том числе с участием белков межфибриллярной и межклеточной адгезии [5]. Соответственно, одним из

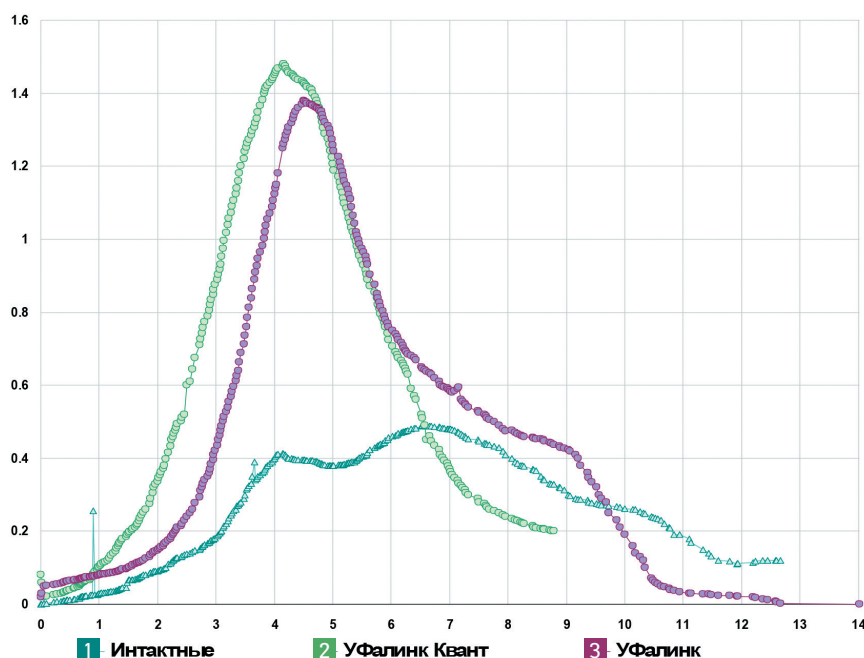


Рис. 1. Диаграмма растяжения лоскутов из свиных роговичных дисков *ex vivo* после УФ кросслинкинга с устройствами «УФалинк Квант» и «УФалинк».

По оси абсцисс – относительное удлинение материала  $\Delta l$  (мм), по оси ординат – сила приложенной нагрузки  $P$  (Н)

Примечание: \*  $p < 0,01$  – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

основных критериев эффективности процедуры УФ кросслинкинга роговицы является степень ответного увеличения ее биомеханической прочности [12]. Механическую прочность роговиц, сшитых по акселерированному протоколу, оценивали по величинам показателей разрывной нагрузки образцов (диаграмма «приложенная сила – относительное удлинение», рис. 1), величинам относительного удлинения и по результатам расчета модуля Юнга.

Для контрольной группы 1-й (интактные роговицы) рассчитанное значение модуля Юнга было равным  $0,089 \pm 0,017$  МПа (табл.). При этом максимум на кривой продольного растяжения, характеризующий предел прочности материала (Р) из роговичных дисков, составил –  $4,8 \pm 0,9$  Н. На рис. 1 видно, что пологая и растянутая часть кривой после ее максимума, свидетельствующая о высоких эластичных свойствах интактной роговицы, завершалась точкой разрыва материала.

Обработка роговиц по стандартному протоколу с помощью устройства «УФалинк» (группа 2) способ-

ствовала повышению биомеханической устойчивости корнеальной ткани к растяжению, что сопровождалось достоверным почти 3-кратным увеличением модуля Юнга ( $0,257 \pm 0,023$  МПа,  $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. В этой группе показатель Р также в 3 раза статистически значимо превышал прочностные данные интактных роговиц ( $p < 0,01$ ).

Модуль Юнга для роговицы, сшитой в акселерированном режиме с использованием устройства «УФалинк Квант» достоверно превосходил значение нормы в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ), при этом усилие, потребовавшееся для достижения предельной прочности роговицы, превышало показатели контроля примерно в 3 раза ( $p < 0,01$ ). Статистически значимых различий между группами 2 и 3, где производился УФ кросслиндинг, не установлено.

Морфологические исследования роговицы кроликов после УФ кросслинкинга с использованием устройств «УФалинк» и «УФалинк Квант»

В исследуемых группах животных на 1-3-и сутки после УФ кросслинкинга наблюдали полное восстанов-

ление удаленного эпителия. На 7-е сутки в строме отмечали признаки транзиторного отека в виде характерного разволокнения коллагена. Расслоение коллагеновых волокон стромы визуализировалось практически во всех ее слоях. Отмечалось снижение плотности кератоцитов преимущественно в передних и средних слоях стромы. Других патоморфологических изменений не регистрировали.

Через 30 суток после УФ кросслинкинга в исследуемых группах эпителиальный покров роговицы имел обычное строение, отмечали некоторое разнообразие формы и плотности расположения клеток базального слоя. Отечность стромы роговицы приобретала очаговый характер, между пучками коллагеновых волокон располагались кератобласты и зрелые кератоциты. Эндотелий роговицы располагался в виде непрерывного слоя (рис. 2-3).

Морфологические изменения в роговице кроликов после УФ кросслинкинга при стандартном («УФалинк») и акселерированном («УФалинк Квант») режимах в целом были однотипными. На некоторых гистопрепаратах после акселерированного протокола отмечали более выраженные кросслинкиндиндуцированные признаки (отек стромы, снижение количества кератоцитов), которые не носили выраженного патологического характера.

## ВЫВОДЫ

УФ кросслиндинг свиных роговиц *ex vivo*, выполненный стандартным методом с помощью «УФалинк» и акселерированным (9 мВт/см<sup>2</sup> – 10 мин) – с использованием аппарата «УФалинк Квант», способствовал повышению прочностно-механических свойств корнеальных образцов. При этом регистрировали увеличение модуля Юнга на 188% и 165% соответственно и предела прочности материала на 208% и 185% соответственно по сравнению с нормой. Исследованные показатели биомеханики свиных роговиц после использования стандартной и акселерированной техник УФ кросслинкинга статистически значимых различий не имели.

Таблица

**Влияние стандартного и акселерированного УФ кросслинkinга свиной роговицы ex vivo на показатели биомеханики (M±σ)**

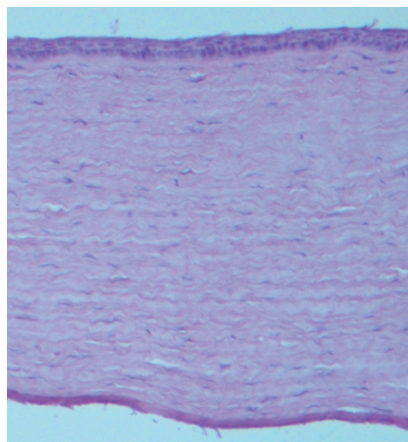
№	Группа	Модуль Юнга (мПа)	Предел прочности P, (Н)
1	Интakтные (контроль), n=10	0,089±0,017	4,8±0,9
2	Стандартный УФ кросслинkinг, n=10	0,257±0,023*	14,8±1,3*
3	Акселерированный УФ кросслинkinг, n=10	0,236±0,027*	13,7±1,8*

Примечание: \* p<0,01 – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

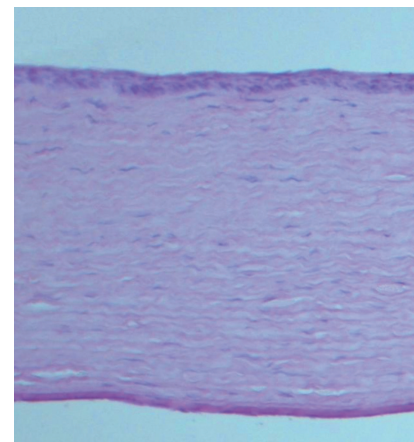
Изучение морфологической картины роговой оболочки кроликов показало, что УФ воздействие (370 нм) на роговицу аппаратами «УФалинк» и «УФалинк Квант» в присутствии рибофлавина после применения, соответственно, стандартного и акселерированного режимов в целом было идентичным и характеризовалось транзиторным набуханием всех слоев стромы, более выраженным в ранний срок после операции. При этом отмечали снижение плотности кератоцитов преимущественно в передних и средних слоях стромы (3-30 сут.), не затрагивающей задние слои роговицы и эндотелия.

В результате проведенной НИР, выполненной при поддержке гранта Академии наук Республики Башкортостан, на базе ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ» разработано, запатентовано и зарегистрировано «Устройство офтальмологическое для ультрафиолетового облучения роговицы глаза «УФалинк Квант» по ТУ 9444-007-01966940-2014», предназначенное для проведения УФ кросслинkinга. Устройство снабжено системами: визуализации, фото- и видеофиксации операционного поля, гомогенизации светового потока, диафрагмирования светового пятна, акселерированного (ускоренного) режима облучения до 18 мВт/см<sup>2</sup>, автоматической настойки флюенса излучения.

По результатам экспериментальных исследований в рамках НИР, а также на основании проведенных технических и клинических испытаний в аккредитованных учреждениях устройство «УФалинк Квант» соответствует требованиям нормативно-технической документации, критериям безопасности и эффективности, может быть рекомендовано для



**Рис. 2.** Морфологическая картина роговицы кролика после УФ кросслинkinга устройством «УФалинк Квант» (9 мВт/см<sup>2</sup> – 10 мин.). Ув. × 100, окраска гематоксилином и эозином, 30 сут.



**Рис. 3.** Морфологическая картина роговицы кролика после УФ кросслинkinга устройством «УФалинк» (3 мВт/см<sup>2</sup> – 30 мин.). Ув. × 100, окраска гематоксилином и эозином, 30 сут.

серийного выпуска и применения в практическом здравоохранении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение). М.: Изд-во «Офтальмология», 2011: 164.
2. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслинkinг роговицы. Вестник РАМН. 2016; 71(3): 224-232.
3. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. Результаты клинического применения устройства для перекрестного связывания коллагена роговицы «УФалинк». Рефракционная хирургия и офтальмология. 2009; 9(2): 14-17.
4. Бикбов М.М., Суркова В.К. Метод перекрестного связывания коллагена роговицы при кератоконусе. Обзор литературы. Офтальмология. 2014; 11(3): 13-18.
5. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. Am. J. Ophthalmol. 2003; 135(5): 620-627.
6. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Суркова В.К., Зайнуллина Н.Б. Клинические результаты лечения кератоконуса методом

трансэпителиального кросслинkinга роговичного коллагена. Офтальмология. 2016; 13(1): 4-9.

7. Cinar Y, Cingü AK, Türkcu FM, Yüksel H, Sahin A, Yıldırım A, Caca I, Cinar T. Accelerated corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus. Cutan. Ocul. Toxicol. 2014; 33(2): 168-171.

8. Hashemi H, Fotouhi A, Mirafteb M et al. Short-term comparison of accelerated and standard methods of corneal collagen crosslinking. J. Cataract. Refract. Surg. 2015; 41: 533-540.

9. Choi M, Kim J, Kim EK et al. Comparison of the conventional Dresden protocol and accelerated protocol with higher ultraviolet intensity in corneal collagen cross-linking for keratoconus. Cornea. 2017; 36(5): 523-529.

10. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Халимов А.Р., Баймухаметов Н.Э. Устройство для перекрестного сшивания коллагена роговицы глаза. Патент RU № 81581 от 16.04.2012.

11. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. и др. Устройство-4 для ультрафиолетового сшивания роговицы глаза. Патент RU № 172763 от 21.07.2017.

12. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. Exp Eye Res. 1998; 66(1): 97-103.