

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-4-48-54>

## Молекулярно-клеточные механизмы ультрафиолетового кросслинкинга роговицы

М.М. Бикбов, А.Р. Халимов

ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», Уфа

## Molecular and cellular mechanisms of ultraviolet corneal crosslinking

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov

Ufa Eye Research Institute of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Ufa

### РЕФЕРАТ

В представленной, главным образом, экспериментальной работе установлены закономерности и механизмы ультраструктурной трансформации и изменения метаболизма роговицы при ультрафиолетовом воздействии. Для выполнения безопасного и эффективного ультрафиолетового кросслинкинга роговицы необходимо качественное насыщение стромы рибофлавином, которое может быть достигнуто преимущественно за счет достаточной площади деэпителизации (не менее 8-9 мм). Установлено, что ультрафиолетовый кросслинлинг роговицы с применением в качестве фотосенсибилизаторов разработанных растворов рибофлавина (Декстралинк, Риболинк и Хитолинк) способствует повышению ее прочностных свойств, связанных с изменением структурного состояния коллагеновых фибрилл.

Доказано, что рибофлавин-УФ воздействие на оптическую оболочку глаза обусловлено кратковременным локальным усилением свободнорадикальных процессов, снижением общего антиоксидантного статуса, отсутствием некротических и значимых воспалительных реакций. Показано, что недостаток рибофлавина в строме формирует каскад патоморфологических событий необратимого характера, приводящих к потере нативной структуры роговицы. На основании проведенных исследований обоснована необходимость дифференцированного подхода к применению рибофлавинсодержащих растворов при проведении ультрафиолетового кросслинкинга роговицы.

**Ключевые слова:** ультрафиолетовый кросслинлинг роговицы, молекулярно-клеточные механизмы, фотосенсибилизаторы, рибофлавин.

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;4:48-54.

### ABSTRACT

In the presented mainly experimental work, the regularities and mechanisms of ultrastructural transformation and changes in corneal metabolism under ultraviolet exposure are established. High-quality saturation of the stroma with riboflavin is necessary to perform safe and effective UV crosslinking of the cornea, which can be achieved mainly due to a sufficient area of de-epithelization (at least 8-9 mm). It was found that UV crosslinking of the cornea with the use of developed riboflavin solutions (Dextralink, Ribolink and Khitolink) as photosensitizers increases its strength properties associated with changes in the structural state of collagen fibrils.

It is proved that the riboflavin-UV effect on the optical shell of the eyeball is caused by a short-term local increase in free radical processes, a decrease in the overall antioxidant status, and the absence of necrotic and significant inflammatory reactions. It is shown that the lack of riboflavin in the stroma forms a cascade of pathomorphological events of an irreversible nature, leading to the loss of the native structure of the cornea. On the basis of the conducted studies, the necessity of a differentiated approach to the use of riboflavin-containing solutions during ultraviolet crosslinking of the cornea is justified.

**Key words:** ultraviolet corneal crosslinking, molecular-cellular mechanisms, photosensitizers, riboflavin.

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;4:48-54.

Как известно, заболевания периферического отрезка глаза, в частности, кератэктазии, сопровождаются деструкцией коллагена роговицы, что вызывает снижение ее прочностных свойств с вовлечением в этот процесс всех тканевых, клеточных и молекулярных структур роговой оболочки [1]. Среди первичных кератэктазий наиболее распространенной офтальмопатологией является кератоконус (КК), частота которого составляет 1,3-22,3 на

100 тыс. человек, а распространенность – 0,4-0,86 случаев на 100 тыс. населения. Повышение частоты КК в последние годы связывают с растущей популярностью эксимерлазерных рефракционных операций на роговице, вызывающих снижение ее биомеханической резистентности, влиянием техногенных факторов, совершенствованием методов диагностики заболевания и рядом других причин [2].

В настоящее время одним из эф-

фективных методов лечения КК признан ультрафиолетовый (УФ) кросслинлинг роговицы (КР) с применением фотосенсибилизатора (ФС) рибофлавина (РФ) [3]. Данная технология способствует повышению прочностных свойств роговицы и приостановке прогрессирования заболевания. В результате УФ кросслинкинга происходит фотополимеризация коллагена роговицы и компонентов основного вещества стромы [4]. Вместе с тем остаются мало

изучены механизмы патофизиологических процессов, опосредованных дисбалансом продукции и утилизации активных форм кислорода (АФК), которые протекают в тканях глаза при КР и воздействии УФ излучения на орган зрения. Постоянное совершенствование технологии УФ кросслинкинга требует проведения всестороннего и углубленного исследований в соответствии с критериями безопасности и эффективности процедуры [3, 5]. При этом качество предлагаемых методик КР определяется адекватным дозированием УФ облучения (УФО) и выбором приемлемых растворов для фотосенсибилизации и фотопротекции роговицы с учетом ее индивидуальных особенностей [6-9].

Однако к настоящему времени недостаточно изучены способы оценки активности свободно-радикальных процессов в роговице, происходящих после УФ кросслинкинга, особенности изменения локального и системного цитокинового и антиоксидантного статуса человека. Требуют исследования и обобщения патофизиологические аспекты УФ воздействия на орган зрения и организм в целом. Вышеизложенное послужило основанием для изучения этих вопросов в настоящей работе.

## ЦЕЛЬ

Установить закономерности и механизмы ультраструктурной трансформации и изменения метаболизма роговицы при УФ воздействии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 96 крысах-самцах линии Вистар и 164 кроликах породы Шиншилла, 360 свиных глазах. Объекты исследования разделены на 6 групп: 1-я – интактные, 2-я – производили УФ облучение роговицы без РФ, 3-я – УФ кросслинкинг с раствором изоосмотического РФ (контроль), в 4–6-я – УФ кросслинкинг с разработанными растворами РФ (Декстралинк, Риболинк и Хитолинк).

Модель стандартного УФ кросслинкинга роговицы глаза крыс и кроликов *in vivo* воспроизводили при анестезиологическом пособии препаратами Золетил 15 мг/

кг («Valdepharm», Франция) и Ксилазин (20 мг/кг) («Ветфарм», Беларусь), местной анестезии 0,4%-м оксибупрокаином. Корнеальную дезэпителизацию проводили диаметром 3 мм у крыс и 3, 6, 9 мм – у кроликов. УФО роговицы выполняли с помощью устройства «УФалинк» (Россия) с длиной волны 370 нм при мощности 3 мВт/см<sup>2</sup> продолжительностью 10-30 мин. УФ облучение свиных роговиц с РФ и без него производили *ex vivo* в режиме 3 мВт/см<sup>2</sup> продолжительностью от 1 мин. до 30 мин.

Насыщение свиных роговиц *ex vivo*, роговиц крыс и кроликов *in vivo* выполняли посредством инстилляций разработанных растворов с РФ мононуклеотидом: «Декстралинк» (0,1%-м РФ с 20%-м декстраном); «Риболинк» (0,1%-м РФ с 1,0%-й гидроксипропилметилцеллюлозой); «Хитолинк» (0,1%-м РФ с 1,0%-м хитозаном сукцинатом).

Забор влаги передней камеры (ВПК) кроликов производили в объеме около 0,2 мл через парацентез иглой 30 G после завершения инстилляций ФС и промывания конъюнктивной полости стерильным физраствором.

Толщину свиных роговиц *ex vivo* определяли в центральной зоне с помощью микрометра Digital linear gauge EG-100 (Япония). Исследование биомеханических показателей роговицы выполняли после УФ воздействия и УФ кросслинкинга с рибофлавином роговичных полос и дисков с последующим их тестированием на универсальной разрывной испытательной машине. Механическую прочность роговиц оценивали по величинам показателей разрывной нагрузки образцов на диаграмме «приложенная сила – относительное удлинение», величинам относительного удлинения и по результатам расчета модуля Юнга.

Величину сравнительной УФ абсорбции свиной роговицей в присутствии растворов рибофлавина *ex vivo* оценивали по поглощению света от излучателя «УФалинк», проходящего через изолированную роговицу, размещенную на фотоприемном элементе УФ-радиометра («НТП ТКА», Россия). Регистрацию показаний с него после завершения насыщения роговицы и удаления излишков раствора РФ с ее поверхности,

осуществляли в течение 30 минут.

Количественное определение РФ проводили в прецизионных навесках свиных и кроличьих роговиц после извлечения из них действующего вещества и измерения его оптической плотности в растворе с использованием спектрофотометра СФ-56 (Россия). Содержание РФ во ВПК кроликов производили с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия) при длине волны 610 нм и тест-систем ID-Vit (Immundiagnostik, Германия).

Для изучения состояния процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), который исследовали с применением набора реактивов «ТБК-АГАТ» (Россия). Оптическую плотность образовавшихся комплексов определяли при длинах волн 535 и 570 нм с помощью спектрофотометра СФ-56 (Россия).

Гистологические исследования выполняли по общепринятым методикам. Для электронномикроскопического исследования фрагменты роговицы животных фиксировали в растворе 2%-го глутарового альдегида. Обезвоживание и заливку в эпон-812 проводили по общепринятой методике. Ультратонкие срезы производили с помощью ультрамикротомы «LEICA EM UC7» (Германия), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе «JEM-1011» (Япония). Определение изменений плотности фибриллярной упаковки коллагеновых волокон роговицы выполняли по методу Pinelli (2009) на микрофотографиях при увеличении  $\times 15000$ .

Прижизненное морфологическое исследование и определение плотности кератоцитов роговицы кроликов проведены под общим наркозом методом конфокальной микроскопии с помощью лазерного сканирующего томографа HRT-III (Германия) с насадкой «Rostok».

Срок наблюдений при проведении гистологического, электронномикроскопического и прижизненного морфологического исследования составил 3, 7, 14, 30 и 90 суток.

В клинические наблюдения включены 92 пациента с КК I, II стадии по

классификации Amsler (1961), которым проводился стандартный и трансэпителиальный УФ кросслинк-инг роговицы. Группа контроля – 42 практически здоровых добровольца.

Протокол стандартной техники КР: под местной анестезией после дезэпителизации роговицы (Epi-Off) диаметром около 8-9 мм производятся инстилляциии раствора «Декстралинк» (Россия) из расчета 1 капля / 2 мин в течение получаса. Насыщение роговицы РФ оценивалось по люминесценции влаги передней камеры при биомикроскопии с кобальтовым (синим) светофильтром. Для облучения роговицы использовалось устройство офтальмологическое «УФалинк» (Россия) в режиме 3 мВт/см<sup>2</sup>, 30 мин при длине волны 370 нм с одновременными инстилляциями средства «Декстралинк».

Трансэпителиальная техника КР выполнялась без удаления эпителия (Epi-On) роговицы с этапом предварительного насыщения посредством электрофореза с раствором 0,1% -го РФ в течение 15 мин, силой тока 1,0 мА с использованием гальванизатора «Поток-1» (Россия). Этап УФ облучения роговицы был аналогичен стандартной методике.

Забор слезной жидкости (СЖ) выполняли у больных до операции, на 3, 7 и 14 сутки после УФ кросслин-кинга стандартным и трансэпителиальными способами. Для получения сыворотки крови (СК) после ретракции сгустка пробы центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин.

Определение уровней TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IFN- $\alpha$  в СЖ и СК проводили с применением стандартных диагностических наборов «Вектор-Бест» (Россия) и «eBioscience» (Австрия) с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Оценку общего антиоксидантного статуса СЖ и СК пациентов осуществляли с помощью тест-системы «Total antioxidant status» (Randox Laboratories Ltd., Великобритания) на фотометре SF-Ultra (Россия). Определение содержания супероксиддисмутазы в СЖ и СК выполняли с использованием тест-набора «eBioscience» (Австрия) на фотометре StatFax (США) и TECAN INFINITE F-50 (Австрия).

Все числовые данные обрабатывали методом вариационной статистики, представляли в виде средней арифметической величины – М (Mean) и стандартного отклонения –  $\sigma$  (Standard Deviation). Для оценки достоверности непараметрических количественных данных использовали критерий Манна-Уитни, для определения достоверности нормально распределенных данных – критерий Стьюдента. Статобработку проводили с помощью пакета программ Statistica 6.1 и Excel 2010 методами параметрической и непараметрической статистики.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для КР были разработаны и предложены растворы РФ (Декстралинк, Риболинк и Хитолинк) с фотосенсибилизирующими свойствами, предназначенные для насыщения стромы, отличающиеся составом основы.

Инстилляциии разработанных растворов при проведении экспериментальных исследований *ex vivo* и *in vivo* способствовали насыщению роговицы РФ аналогично контрольному раствору (изоосмотический РФ). Толщина роговицы при этом значимо не изменялась по сравнению с контролем. Исключением явился декстралинк, способствовавший снижению толщины роговицы на 24% ( $p < 0,05$ ) за счет ее дегидратации, наблюдаемой уже с 5-й мин. инстилляций.

Сохранение стабильной толщины роговицы при использовании средств риболинк и хитолинк в процессе инстилляций, наряду с выявленной особенностью декстралинка снижать толщину оптической оболочки, позволило рекомендовать указанные растворы для дифференцированного использования при проведении КР у пациентов с КК: при показателе более 450 мкм – рекомендуется декстралинк, 400-450 мкм – риболинк [10].

УФ обработка роговиц в присутствии РФ способствовала значимому росту предела прочности свиных роговичных полос и дисков на 202-246% – максимум кривой на графике (рис. 1). Отмечалось также увеличение модуля Юнга у свиных роговичных полос, обработанных УФ с рибофлавинодержащими раство-

рами, на 203-232% по сравнению с результатами контрольной группы. Все средства способствовали повышению жесткости оптической оболочки без значимых отличий между опытными группами [11]. В исследование дополнительно включили группу, в которой проводилось УФ воздействие на роговицу без РФ с тем, чтобы оценить возможное влияние излучения на ее биомеханику. Кроме этого, в отдельной группе изучали прочность роговиц, обработанных декстраном, без УФ облучения.

Установлено заметное увеличение прочностных свойств роговичных дисков и полос, облученных ультрафиолетом без РФ, при котором модуль Юнга возрос в среднем на 54-130%, а предел прочности – на 86-133%; в группе с декстраном, соответственно, на 13-73% и 24-77%, т.е. УФ воздействие или дегидратация стромы способствуют дополнительному увеличению жесткости роговицы.

Таким образом, УФО свиных роговиц в присутствии исследуемых растворов РФ (декстралинк, риболинк, хитолинк) оказывало статистически значимое повышение прочностно-механических свойств корнеальной ткани, связанное с фотополимеризацией коллагеновых волокон стромы. Заметное увеличение жесткости роговицы может происходить также за счет ее УФ облучения или обезвоживания.

Эффективный УФ кросслинк роговицы и повышение ее прочностных свойств может быть достигнуто за счет стабильной интрастромальной концентрации РФ, который обеспечивает необходимую защиту глублежащих слоев роговицы – чувствительного эндотелия и внутриглазных структур от негативного воздействия УФ облучения. Динамика уровня РФ в роговице при инстилляциях исследуемых растворов характеризовалась непрерывным ростом концентрации РФ в течение часа (рис. 2).

Однотипность изменений содержания РФ выявлена как для исследований *in vivo*, так и *ex vivo*. При исходно равной концентрации действующего вещества в растворе наибольшую способность к насыщению стромы демонстрировал рас-

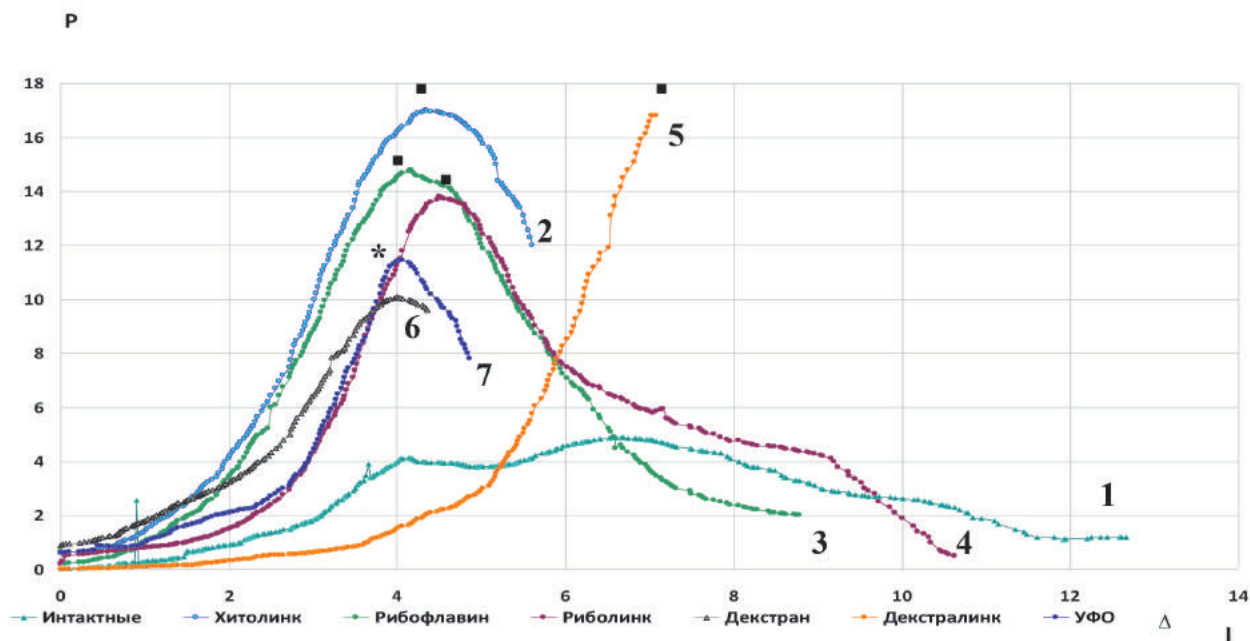


Рис. 1. Диаграмма растяжения свиных роговичных дисков *ex vivo* после УФ облучения с использованием растворов рибофлавина. По оси абсцисс – относительное удлинение материала  $\Delta l$  (мм), по оси ординат – сила приложенной нагрузки  $P$  (Н)

1 – интактные, 2 – УФ-хитолинк, 3 – УФ-рибофлавин, 4 – УФ-риболинк, 5 – УФ-декстралинк, 6 – декстран, 7 – УФО.

\*  $p < 0,05$ ; ■  $p < 0,01$  – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

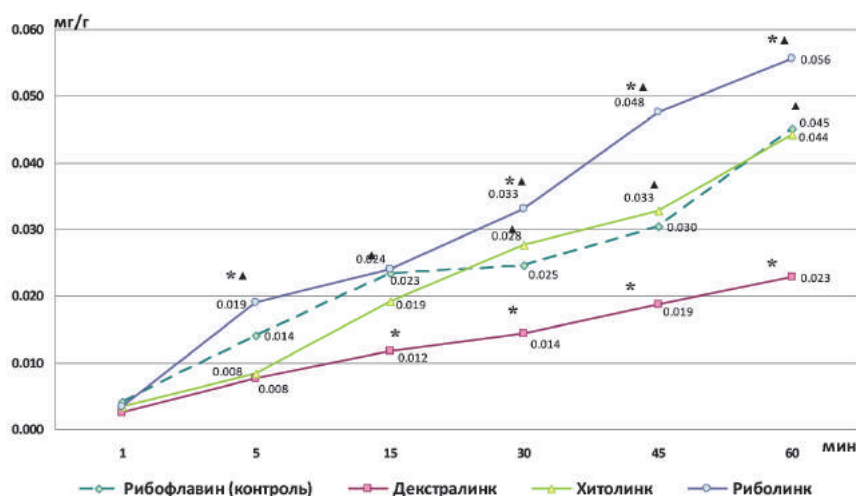


Рис. 2. Динамика уровня рибофлавина (мг/г) в свиной роговице *ex vivo* после насыщения офтальмологическими растворами для УФ кросслинкинга

\*  $p < 0,05$  – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

▲  $p < 0,05$  – достоверность различий при сравнении с группой декстралинка.

твор риболинка (РФ с гидроксипропилметилцеллюлозой). Также количественное содержание РФ в ткани роговицы при инстилляциях имело прямую зависимость от площади удаленного эпителия, что было определено по уровню ФС во влаге

передней камеры кроликов в условиях дезэпителизации оптической оболочки диаметром 3, 6 или 9 мм. Наиболее эффективное насыщение и достаточное пропитывание оптимальной площади стромы РФ может быть обеспечено за счет тотальной

деэпителизации роговицы кролика – около 9 мм. Концентрация РФ в роговице после насыщения препаратом декстралинк, начиная с 15 мин. наблюдений, была меньше, чем при использовании других растворов, возможно, из-за декстранопосредованного снижения толщины роговицы.

Таким образом, диффузия рибофлавина в роговицу обусловлена составом основы используемых растворов, а эффективность насыщения стромы ФС может быть достигнута за счет максимального устранения эпителиального барьера.

Насыщенная РФ строма образует систему «роговица – РФ» (Р-РФ), которая, обладая возросшей степенью УФ поглощения, по сравнению с интактной оптической оболочкой, обеспечивает защиту глублежащих интраокулярных структур. Установлено, что интактная свиная роговица пропускала около 20% ультрафиолета от исходной мощности, в то время как после 5-30 мин инстилляций раствора 0,1% изотонического РФ интенсивность проникновения УФ излучения достоверно снижалась, соответственно, в 5,7-315 раз от значений необработан-



ной роговицы. УФ абсорбирующая способность роговиц, насыщенных РФ с помощью декстралинка, была ниже, чем при использовании изосмотического раствора, риболинк или хитолинк. Однако через 30 мин светопропускающая способность системы Р-РФ во всех группах находилась в пределах 0,002 - 0,06 мВт/см<sup>2</sup>, что существенно ниже порога повреждающего действия УФО (0,35 мВт/см<sup>2</sup>) для эндотелия роговицы.

Нами была исследована УФ абсорбция системы «роговица – РФ – пре-корнеальная пленка» (Р-РФ-П). Установлено фотопротекторное действие по отношению к ультрафиолету средств декстралинк, риболинк и хитолинк, при использовании которых более устойчивый вязкий рибофлавиновый слой поглощал до 50% энергии излучения, а при инстилляциях изосмотического раствора рибофлавина – только 25%. Риболинк и хитолинк, кроме повышенной, по сравнению с изосмотическим раствором, проникающей способности РФ в роговицу, обеспечивали стабильность образуемой пленки ФС. Декстралинк, истончая роговицу и в меньшей степени насыщая ее РФ, свой фотозащитный эффект от УФО реализовывал преимущественно за счет прекорнеальной рибофлавиновой пленки.

Для изучения состояния процессов перекисного окисления липидов в тканях глаза определяли уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-рп), в супернатантах гомогенатов роговиц. Так через час после УФО отмечали достоверный рост концентрации ТБК-рп на 26% (p<0,05), а при

кроссликинге с РФ – лишь на 15%. На 4-14 сутки величина показателя в группах приближалась к контрольным значениям. Уровень ТБК-рп в супернатантах гомогенатов глазного яблока крыс после воздействия УФ излучения (1 ч) на роговицу достоверно увеличивался на 44% (p<0,05) с последующей (на 7-17 сутки) его нормализацией. Дезэпителизация роговицы на данный параметр значимо не влияла.

Таким образом, одним из ключевых патогенетических факторов УФ воздействия на роговицу является индукция свободно-радикальных процессов с активацией ПОЛ, которые в определенной степени компенсируются при УФО в присутствии фотосенсибилизатора и фотопротектора РФ. Незначительное повреждающее воздействие дезэпителизации роговицы выраженного влияния на интенсивность процессов ПОЛ не оказывало.

Состояние ультраструктуры роговицы после КР в присутствии разработанных растворов РФ оценивали по изменению плотности фибриллярной упаковки и диаметра коллагеновых фибрилл стромы крыс. Во всех группах отмечали снижение плотности фибриллярной последовательности на 3 сутки после УФ воздействия, в т.ч. в присутствии РФ, по сравнению с интактной роговицей (табл. 1). К завершению срока наблюдений (90 суток) значения показателя приближались к норме. При этом существенных отличий между группами, при использовании исследуемых растворов РФ, не обнаружено.

КР в присутствии рибофлавинсодержащих растворов способство-

вал увеличению диаметра фибриллярного коллагена в среднем на 6 - 9%. При УФ облучении без ФС также определяли незначительный (на 3,5%) прирост диаметра фибрилл.

Полученные результаты исследований основывались на статистических данных нормального распределения диаметра коллагеновых фибрилл роговицы. Установлено, что наибольшее количество фибрилл после УФ воздействия без РФ имели диаметр 34-36 нм, после КР с разработанными растворами РФ – 36-40 нм (в норме – 34-38 нм).

По данным конфокальной микроскопии, КР с применением изосмотического (контроль) и исследуемых растворов РФ (декстралинк, риболинк и хитолинк) вызывал однотипные морфологические изменения в роговице кролика *in vivo*.

Анализ гистоморфологической картины роговицы экспериментальных животных показал, что воздействие УФ излучения в присутствии рибофлавинсодержащих растворов характеризуется временным набуханием стромы и десцеметовой мембраны (3-7 сутки), гибелью кератоцитов преимущественно в передних и средних слоях стромы (3-30 сутки), не затрагивая задние слои и эндотелий. Отсутствие РФ в роговице при ее УФ облучении, кроме отека и гибели кератоцитов во всех слоях стромы, вызывало патологические последствия необратимого характера: интракорнеальную васкуляризацию, нарушение целостности десцеметовой мембраны, повреждение эндотелия.

Для оценки влияния КР на динамику локального и системного уровня

Таблица 1

**Влияние ультрафиолетового облучения роговицы крыс на плотность фибриллярной упаковки волокон и диаметр фибрилл коллагена (M±σ)**

Группа	Диаметр фибрилл (нм)		Плотность волокон (фибрилл / 0,25 мкм <sup>2</sup> )	
	3 сут	90 сут	3 сут	90 сут
1 Интактные (контроль)	35,59±2,33		130,5±11,98	
2 УФО без рибофлавина	36,92±2,88	36,67±2,42	106,90±8,97	124,90±5,00
3 УФО / изо-рибофлавин	39,62±3,21	39,46±3,08	102,05±7,05	118,05±7,38
4 УФО / декстралинк	39,04±2,70	39,31±3,30	93,31±6,71*	122,31±7,92
5 УФО / риболинк	38,90±2,92	38,63±2,11	96,55±8,12*	116,55±9,34
6 УФО / хитолинк	37,78±3,16	37,22±3,25	104,55±10,02	113,55±9,34

\*p<0,05 – достоверность различий показателя при сравнении с интактным контролем.

цитокинов и антиоксидантного статуса были проведены клинические наблюдения пациентов с КК [12-15]. Особенности локального цитокинового статуса больных КК до процедуры УФ кросслинкинга были связаны с 10 и 25-кратным повышением содержания соответственно TGF- $\beta$ 1 и - $\beta$ 2, в сравнении с нормой (табл. 2).

Соответственно, в динамике стандартного КР выявлен 2,5-кратный рост содержания факторов роста на 7 и 3 сутки наблюдений, относительно дооперационных значений. Содержание TNF-а в СЖ больных с КК превышало показатели контроля более чем в 2 раза. Через 3-7 дней после s-CXL и t-CXL кросслинкинга роговицы местный уровень TNF-а практически не изменялся, при некотором снижении на 14-е сутки. Дооперационная концентрация IL-1b была в пределах контрольных значений. На 3-и сутки после s-CXL уровень данного цитокина превышал в 2 раза, а после t-CXL – в 1,5 раза дооперационные данные с последующей нормализацией показателей до исходных величин.

Величина IFN-а в слезе больных КК достоверно отличалась от контроля в 2,7 раза. Ее максимальную концентрацию обнаруживали на 3-и сутки после процедуры в обеих наблюдаемых группах при более выраженном росте у пациентов со s-CXL. На 7-14 сутки наблюдений содержание IFN-а в СЖ после s-CXL и t-CXL достоверно уменьшалось, приближа-

ясь к дооперационным значениям.

Следует отметить, что у пациентов с КК после t-CXL каких-либо значимых изменений в уровнях исследованных цитокинов не установлено, что, очевидно, обусловлено с отсутствием травмирующего воздействия стандартной методики, связанного с деэпителизацией роговицы.

Динамика содержания TNF-а, IL-1b и IFN-а в СК пациентов с КК после s-CXL и t-CXL не имела статистически значимых отличий от параметров нормы и дооперационных показателей в течение всего периода наблюдений.

Выявлено достоверное снижение общего антиоксидантного статуса (ОАС) слезной жидкости пациентов с КК до лечения на 40% ( $p < 0,05$ ). При этом содержание супероксиддисмутазы (СОД) на фоне заболевания было меньше нормы в среднем на 18,8%. Стандартный КР усугублял патологическое состояние антиоксидантной системы роговицы в раннем послеоперационном периоде (3-7-е сутки), что выражалось в уменьшении уровня СОД слезы на 70% ( $p < 0,05$ ) и ОАС на 52% ( $p < 0,05$ ), по сравнению с дооперационными данными. Трансэпителиальная техника КР вызывала менее значимые отличия от исходных значений, соответственно, на 58% и 41% ( $p < 0,05$ ).

Минимальные значения СОД и ОАС слезы регистрировали на 3-и сутки после процедуры УФ кросс-

линкинга с последующей тенденцией к восстановлению дооперационных показателей, что в целом по срокам соответствовало росту активности процессов свободно-радикального окисления. Не наблюдали значимых системных отличий ОАС и уровня СОД у пациентов с КК в сроки до 14 суток после УФ кросслинкинга, по сравнению с нормой [16].

Установленные механизмы межмолекулярных и межклеточных взаимодействий в тканях после КР с рибофлавином можно охарактеризовать следующим образом. Одним из первоочередных внешних воздействий на роговицу является удаление эпителия, которое инициирует выброс провоспалительных цитокинов, в частности IL-1b, на 3-7-е сутки после выполнения процедуры. При этом отмечается активная продукция трансформирующих факторов (TGF  $\beta$ 1, - $\beta$ 2). В дальнейшем деэпителизация роговицы с ее УФО способствует усилению процессов клеточной пролиферации и миграции с образованием активированных кератоцитов (фибробластов).

Использование рибофлавина для насыщения стромы с последующим УФ облучением роговицы длиной волны 370 нм приводит к усиленному образованию в ней АФК, в частности супероксид анион-радикала, гидроксильного радикала, синглетного кислорода, которые инициируют фотохимические взаимодействия в тканях оптической оболоч-

Таблица 2

**Уровень цитокинов в слезной жидкости пациентов с кератоконусом после стандартного (s-CXL) и трансэпителиального (t-CXL) УФ кросслинкинга роговицы в динамике исследования (M $\pm$  $\sigma$ , пг/мл)**

Показатель	Группы пациентов		Метод кросс-линкинга роговицы	Срок наблюдения		
	Контроль	Кератоконус		3 сут	7 сут	14 сут
TGF $\beta$ 1	40,6 $\pm$ 7,2	437,4 $\pm$ 81,9■	s-CXL	641,5 $\pm$ 100,2■	1150,8 $\pm$ 91,5■▲	235,1 $\pm$ 56,2■
			t-CXL	682,4 $\pm$ 58,2■	733,6 $\pm$ 69,8■	309,1 $\pm$ 61,1■
TGF $\beta$ 2	36,8 $\pm$ 5,5	1017,2 $\pm$ 137,2■	s-CXL	2514,4 $\pm$ 149,3■▲	1635,1 $\pm$ 103,8■	1343,5 $\pm$ 121,8■
			t-CXL	1736,5 $\pm$ 125,2■	1274,1 $\pm$ 104,8■	1163,2 $\pm$ 109,5■
TNF-а	8,9 $\pm$ 1,3	20,9 $\pm$ 2,1*	s-CXL	21,8 $\pm$ 2,5*	19,0 $\pm$ 2,8*	14,5 $\pm$ 1,9*
			t-CXL	22,7 $\pm$ 3,1*	18,1 $\pm$ 2,5*	12,6 $\pm$ 2,0
IL-1b	8,8 $\pm$ 1,6	7,5 $\pm$ 0,8	s-CXL	14,9 $\pm$ 3,0	12,5 $\pm$ 3,1	8,2 $\pm$ 1,7
			t-CXL	11,7 $\pm$ 2,4	11,2 $\pm$ 2,3	9,1 $\pm$ 2,0
IFN-а	4,2 $\pm$ 0,7	11,1 $\pm$ 2,7*	s-CXL	28,8 $\pm$ 4,1*▲	22,4 $\pm$ 4,6■	16,5 $\pm$ 3,3*
			t-CXL	22,2 $\pm$ 3,7*	20,4 $\pm$ 4,3*	13,5 $\pm$ 3,8*

\*  $p < 0,05$  \*  $p < 0,01-0,001$  – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

▲  $p < 0,05$  – достоверность различий при сравнении с показателями пациентов с кератоконусом.

ки, изменяя ее ультраструктуру и повышая биомеханические свойства. Вместе с тем продукция АФК вызывает интенсификацию свободно-радикального окисления в роговице с усилением процессов ПОЛ и образованием их метаболитов [9]. Отмечается местное снижение антиоксидантного статуса, наряду с уменьшением уровня СОД. При этом наблюдается гибель кератоцитов, которая охватывает преимущественно переднюю и среднюю строму, не затрагивая глублежащие слои, включая эндотелий роговицы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выполнения безопасного и эффективного УФ кросслинкинга роговицы необходимо качественное насыщение стромы РФ, которое может быть достигнуто преимущественно за счет достаточной площади дезителлизации (не менее 8-9 мм). УФ кросслиндинг роговицы с применением разработанных растворов РФ в качестве фотосенсибилизаторов способствует повышению ее прочностных свойств, связанных с изменением структурного состояния коллагеновых фибрилл.

Доказано, что рибофлавин-УФ воздействие на переднюю фиброзную оболочку глаза обусловлено кратковременным локальным усилением свободно-радикальных процессов, снижением общего антиоксидантного статуса, отсутствием некротических и значимых воспалительных реакций. Показано, что недостаток РФ в строме формирует последовательность патоморфологических событий необратимого характера, приводящих к потере нативной структуры роговицы. На основании проведенных исследований обоснована необходимость

дифференцированного подхода к применению рибофлавинсодержащих растворов при проведении УФ кросслинкинга роговицы. При выполнении УФ кросслинкинга с ФС, содержащим декстран, рекомендуется предварительное насыщение роговицы продолжительностью не менее 30 минут. Минимальная толщина роговицы, при которой может использоваться средство декстранлинк, должна быть не менее 440-450 мкм. Применение риболинка с гидроксипропилметилцеллюлозой, обладающего хорошей способностью к пенетрации в строму, допустимо на роговицах, толщиной не менее 400 мкм, а длительность этапа насыщения может быть сокращена до 20-25 минут.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение). М., – 2011. – 168 с.
2. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Патеюк Л.С. Кератоконус: этиологические факторы и сопутствующие проявления // Вестник офтальмологии. – 2014. – № 4. – С. 110-116.
3. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016; 71(3):224-232.
4. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 2003. – Vol. 135. – N 5. – P. 620-627.
5. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л., Казакбаева Г.М. Эктазии роговицы (избранные лекции). М.: Апрель, 2018. – 123 с.
6. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. Динамика уровня рибофлавина во влаге передней камеры глаза экспериментальных животных при стандартном насыщении стромы растворами для УФ кросслинкинга роговицы. Вестник офтальмологии. 2016; 132(6): 29-35.
7. Бикбов М.М., Суркова В.К., Халимов А.Р. и др. Топографическая локализация

демаркационной линии после УФ-кросслинкинга роговицы при прогрессирующем кератоконусе. Офтальмология. 2018; 15(1): 32-37.

8. Бикбов М.М., Суркова В.К., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Результаты лечения пеллоидной маргинальной дегенерации роговицы методом роговичного кросслинкинга. Вестник офтальмологии. 2017; 133(3): 58-64.

9. Bikbova G., Khalimov A., Kazakbaeva G., Bikbov M. Molecular mechanisms of corneal collagen crosslinking. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2018; 59(9): 522.

10. Халимов А.Р., Катаев В.А., Дроздова Г.А. и др. Результаты ex vivo исследования нового офтальмологического средства для рибофлавин-УФ-А индуцированного сшивания коллагена тонких роговиц. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018; 81(2): 30-32.

11. Бикбов М.М., Халимов А.Р. Влияние ультрафиолетового кросслинкинга на биомеханику роговицы. Российский журнал биомеханики. 2018; 2: 148-153.

12. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Халимов А.Р. Динамика локальных уровней трансформирующего фактора роста b у пациентов с дегенеративными заболеваниями роговицы при ультрафиолетовом кросслинкинге коллагена. Российский иммунологический журнал. 2013; 7(16): 372-376

13. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Халимов А.Р. Влияние ультрафиолетового кросслинкинга на уровень цитокинов в слезной жидкости у пациентов с кератэктазиями. Цитокины и воспаление. 2015;14(2): 54-57.

14. Халимов А.Р., Бикбов М.М., Дроздова Г.А. и др. Влияние стандартного и трансэпителиального УФ сшивания роговицы на динамику системного и локального уровня цитокинов у пациентов с кератоконусом. Российский иммунологический журнал. 2016; 1(19): 65-72.

15. Халимов А.Р., Шевчук Н.Е., Усубов Э.Л. Локальный уровень TGF-b у пациентов с кератоконусом в динамике ультрафиолетового кросслинкинга роговицы. Oftalmologiya. 2018; 1(26):147-150.

16. Халимов А.Р., Халимова Л.И., Усубов Э.Л. Локальный антиоксидантный статус после ультрафиолетового кросслинкинга роговицы у пациентов с кератоконусом. Офтальмология. 2019; 16(1S): 74-78.