

DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2017-4-45-49>
УДК 617.715

Безопасность кросслинkinга склеры с рибофлавином/ультрафиолетом А (UVA) для структур глаза в эксперименте

М.М. Бикбов¹, В.К. Суркова¹, Э.Л. Усубов¹, Д.С. Вишняков², М.Н. Астрелин¹

¹ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан», Уфа;

²ГБУЗ Республики Башкортостан «Городская клиническая больница № 13 города Уфы», Уфа

РЕФЕРАТ

Цель. Оценить безопасность кросслинkinга склеры с рибофлавином/ультрафиолетом А для структур глаза в эксперименте *in vivo*.

Материал и методы. Исследование проводили на 9 кроликах породы шиншилла (18 глаз). На правом глазу выполняли процедуру кросслинkinга, левый глаз служил контролем. Кросслинkinг склеры проводили по оригинальной методике через небольшой (около 1 см) паралимбальный разрез конъюнктивы и теноновой оболочки. Верхне-внутренний сектор склеры насыщали 0,1% водным раствором рибофлавина мононуклеотида в течение 20 минут. Облучение ультрафиолетом А мощностью 3 мВт/см² выполняли в течение 30 минут. Лабораторных животных выводили из эксперимента через 1 сутки, 1 неделю и 1 мес. после операции (по 3 кролика на каждый срок). С помощью световой микроскопии (окраска гематоксилином и эозином) оценивали состояние облученного участка склеры с прилежащими внутренними оболочками и частью косо́й экстраокулярной мышцы, а также зрительного нерва.

Офтальмохирургия. – 2017. – № 4. – С. 45–49.

Результаты. Через 1 сутки после проведения кросслинkinга в склере и экстраокулярной мышце пролеченных глаз наблюдалась воспалительная реакция. Она носила транзиторный характер и полностью исчезала в склере через 1 неделю, в мышце – через 1 мес. В сетчатке и зрительном нерве пролеченных глаз патологических изменений выявлено не было.

Выводы. Использование данных параметров процедуры кросслинkinга склеры является безопасным для структур глаза. В перспективе данный метод может применяться в клинике для повышения биомеханической прочности склеральной ткани при прогрессирующей близорукости.

Ключевые слова: кросслинkinг, склера, кролик, гистология, световая микроскопия, миопия, близорукость. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

ABSTRACT

Safety of the scleral crosslinking with riboflavin and ultraviolet A (UVA) for ocular structures in experiment

M.M. Bikbov¹, V.K. Surkova¹, E.L. Usubov¹, D.S. Vishnyakov², M.N. Astrelin¹

¹The Ufa Research Institute of Eye Diseases of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Ufa;

²The City Clinical Hospital No. 13, Ufa

Purpose. To evaluate a safety of the scleral crosslinking with riboflavin/ultraviolet A for the structures of the eye *in vivo*.

Material and methods. The study was conducted in 9 Chinchilla rabbits (18 eyes). Right eyes underwent the crosslinking procedure, left eyes were used as a control. Scleral crosslinking was performed according to an original technique through a small (about 1 cm) paralimbal incision of the conjunctiva and Tenon's capsule. Upper nasal sector of the sclera was saturated with 0.1% aqueous solution of riboflavin mononucleotide for 20 minutes. Irradiation with 3mW/cm² ultraviolet A was carried out within 30 minutes. Laboratory animals were killed 1 day, 1 week and 1 month after the surgery (3 rabbits for each period). The condition of irradiated portions of the sclera with adjacent inner layers and a part of the superior oblique muscle, as well as the optic nerve were evaluated using the light microscopy (hematoxylin-eosin staining).

Results. The inflammatory reaction was observed in the cross-linked sclera and extraocular muscle 1 day after the procedure. It was transient and disappeared completely in the sclera 1 week later and in the muscle – 1 month after the surgery. There were no signs of tissue damage in the retina and optic nerve of the treated eyes.

Conclusions. These parameters of the scleral crosslinking are safe for the structures of the eye. In the future this method could be applied in the clinic to enhance the biomechanical strength of the scleral tissue in progressive myopia.

Key words: crosslinking, sclera, rabbit, histology, light microscopy, myopia. ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

Fedorov Journal of Ophthalmic Surgery. – 2017. – No. 4. – P. 45–49.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Лечение прогрессирующей близорукости до сих пор остается нерешенной проблемой офтальмологии. Особую опасность представляют осложнения данного заболевания, приводящие к необратимой потере зрения [19]. Склеропластические операции, направленные на предотвращение прогрессирования миопии, заключаются в укреплении склеры биологическими или синтетическими трансплантатами [1, 7]. Однако склеропластика не всегда эффективна и возможны ее серьезные осложнения: ущемление зрительного нерва и сосудов глазного яблока, развитие иридоциклита и эндофтальмита [8]. Кроме того, при склеропластических операциях происходит предупреждение растяжения склеры за счет создания внешнего «каркаса» при отсутствии изменения структуры самой склеральной ткани. При прогрессирующей же близорукости одним из ключевых звеньев патогенеза является снижение прочности склеры из-за нарушений ее структуры, снижения количества внутри- и межмолекулярных связей [6, 13]. В связи с этим более патогенетически обоснованным методом лечения заболевания выглядит кросслинkinг склеры [10, 14, 17]. Кросслинkinг – это образование дополнительных химических связей между макромолекулами, приводящее к увеличению прочности ткани [2, 18]. Уже более 10 лет данный метод успешно применяется для лечения кератэктазий [3, 4, 9]. Высказываются предположения о перспективности использования кросслинkinга склеры с рибофлавином/UVA при прогрессирующей близорукости [5]. Так, в ряде экспериментальных работ было показано положительное влияние кросслинkinга на биомеханическую прочность склеральной ткани, замедление прогрессирования смоделированной близорукости [11, 12, 17]. Однако лишь единичные работы посвя-

щены гистологическим изменениям, происходящим в склере и других структурах глазного яблока под воздействием ультрафиолетового облучения в присутствии фотосенсибилизатора [15, 16, 20]. Поэтому актуальным является изучение морфологических изменений, происходящих в тканях глаза в результате фотохимического кросслинkinга склеральной оболочки.

ЦЕЛЬ

Оценить безопасность кросслинkinга склеры с рибофлавином/ультрафиолетом А для структур глаза в эксперименте *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 9 кроликах породы шиншилла (18 глаз). На правом глазу выполняли процедуру кросслинkinга, левый глаз служил контролем.

Кросслинkinг склеры проводили под внутримышечной анестезией препаратом «Ксилазин» 2% в дозе 0,2 мл/кг и местной анестезией 0,4% раствором Оксибупрокаина («Инокаин»). После установки блефаростата в верхне-внутреннем секторе выполняли паралимбальный разрез конъюнктивы и теноновой оболочки длиной около 1 см для подхода к склеральной ткани. Через полученный разрез тупым путем формировали карман между склерой и теноновой оболочкой, в который инстиллировали 0,1% водный раствор рибофлавина мононуклеотида шприцом с канюлей. Таким образом насыщали склеру фотосенсибилизатором в течение 20 минут (*рис. 1а*).

Облучение фиброзной оболочки ультрафиолетом А выполняли с помощью устройства «Уфалинк С» (длина волны – 370 нм, мощность излучения – 3 мВт/см²), разработанного в Уфимском НИИ глазных болезней специально для проведения кросслинkinга склеры (патент на полезную модель № 144673 от 28.07.2014 г.): излучатель аппарата вводили в сформированный карман и обеспечивали воздействие UVA на склеру в течение 30 минут (6 циклов по 5 минут) (*рис. 1б*).

В промежутках между циклами дополнительно инстиллировали фотосенсибилизатор в течение 20–30 секунд. После завершения облучения на конъюнктиву накладывали 1–2 узловых шва 8/0. В послеоперационном периоде проводили местную антибактериальную и противовоспалительную терапию в течение 1 недели (0,5% раствор левофлоксацина и 0,1% раствор дексаметазона 3 раза в день).

Лабораторных животных вывели из эксперимента через 1 сутки, 1 неделю и 1 мес. после операции (по 3 кролика на каждый срок). Глаза энуклеировали и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Выкраивали облученный участок склеры с прилежащими внутренними оболочками и частью косой экстраокулярной мышцы, попадавшей в зону облучения, а также зрительный нерв. Морфологические исследования данных структур проводили для выявления прямого или опосредованного повреждающего воздействия кросслинkinга. В контрольной группе выкраивали соответствующий участок. Полученные образцы проводили через спирты и заливали в парафин. Готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. Визуальный анализ препаратов проводили с помощью светового микроскопа Leica DME при различных увеличениях (x40, x100, x200, x400, x1000). Фотоснимки гистологических препаратов делали с помощью микроскопа Leica DME и цифровой фотокамеры Leica DC4.

Исследование проводили в соответствии с общепринятыми принципами гуманности и существующими международными правилами по работе с лабораторными животными, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (принята 18.03.1986 г. и подтверждена 15.06.2006 г. в г. Страсбург, Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сутки после процедуры кросслинkinга у кроликов наблюдались умеренный блефароспазм и инъекция конъюнктивы оперированного глаза. Нарушения про-

Для корреспонденции:

Астрелин Михаил Николаевич,
науч. сотрудник отделения хирургии
роговицы и хрусталика
E-mail: astrelin87@yandex.ru

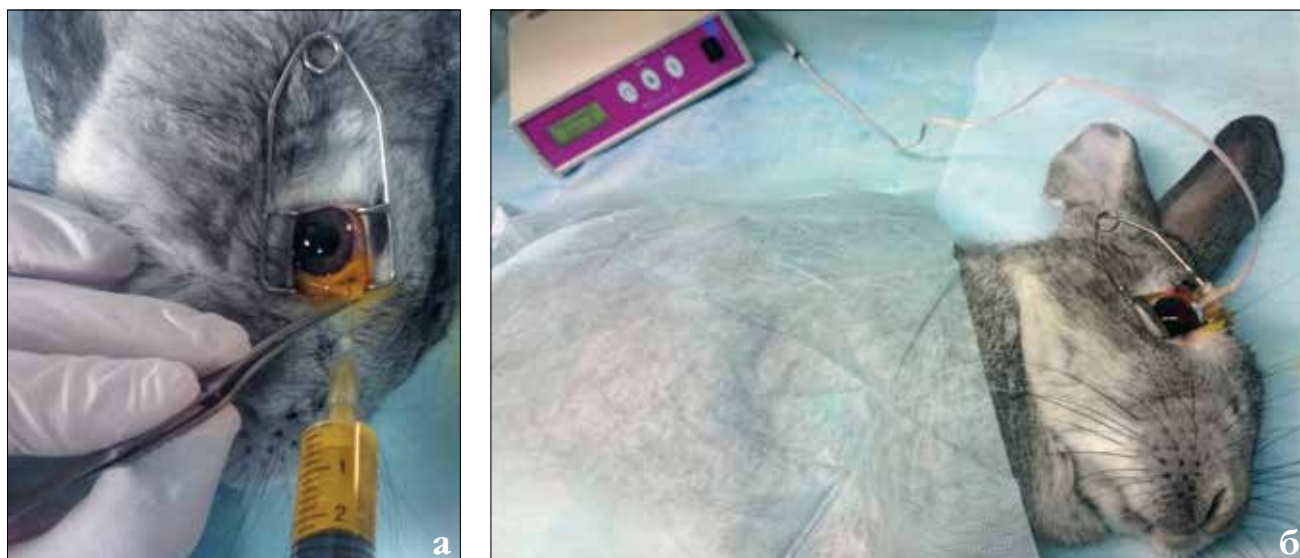
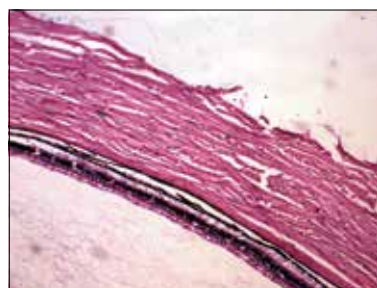
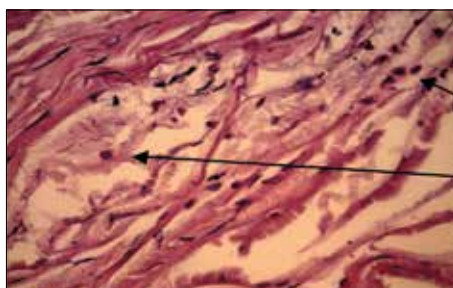


Рис. 1. Проведение процедуры кросслинкинга склеры с рибофлавином/UVA на кролике in vivo: а) насыщение склеры фотосенсибилизатором; б) облучение склеры ультрафиолетом А с помощью устройства «Уфалинк С»

Fig. 1. The procedure of scleral crosslinking with Riboflavin/UVA in the rabbit in vivo: a) saturation of the sclera with a photosensitizer; b) irradiation of the sclera with the ultraviolet A using the «Ufalink C» device



ув. × 100



ув. × 400

Рис. 2. Световая микроскопия склеры и прилежащих внутренних оболочек. Опытная группа. 1 сутки после процедуры кросслинкинга. Незначительный отек и скудная воспалительная инфильтрация склеры сегментоядерными нейтрофилами – показаны стрелками (клетки с розовой цитоплазмой и синим сегментированным ядром). Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 2. The light microscopy of the sclera and adjacent the inner membranes. The experimental group. One day after the crosslinking procedure. Slight edema and sparse inflammatory infiltration of the sclera by nuclear-segmented neutrophils – arrows (cells with pink cytoplasm and a blue segmented nucleus). Hematoxylin and eosin staining

зрачности оптических сред не выявлялось. Воспалительные явления постепенно стихали и полностью исчезали через 3-4 недели после операции.

При энуклеации оперированных глаз отмечалось свободное отделение конъюнктивы и теноновой оболочки от поверхности склеры, не было выявлено выраженного фиброзного процесса.

При световой микроскопии гистологических препаратов через 1 сутки после процедуры кросслин-

кинга в склере опытной группы наблюдался незначительный отек и скудная воспалительная инфильтрация в виде сегментоядерных нейтрофилов (до 3 клеток в поле зрения при увеличении x400) (рис. 2).

В зоне облучения верхней косой экстраокулярной мышцы опытной группы наблюдался достаточно выраженный отек и лейкоцитарная инфильтрация (рис. 3).

Воспалительная реакция в склере и мышце носила транзиторный характер. Уже через неделю после про-

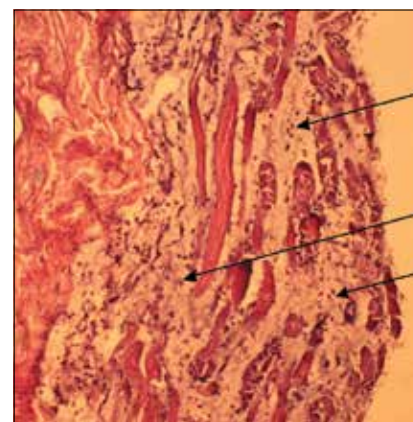


Рис. 3. Световая микроскопия экстраокулярной мышцы. Опытная группа. 1 сутки после процедуры кросслинкинга. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100. Выраженный отек и лейкоцитарная инфильтрация (показаны стрелками)

Fig. 3. The light microscopy of extraocular muscle. The experimental group. One day after the crosslinking procedure. Hematoxylin and eosin staining. Magnification: x100. Pronounced edema and leukocytic infiltration (arrows)

цедуры наблюдалось стихание воспалительного процесса в мышце и его полное исчезновение в склере (рис. 4). Через 1 мес. после проведенного кросслинкинга признаки воспаления отсутствовали и в мышечной ткани (рис. 5).

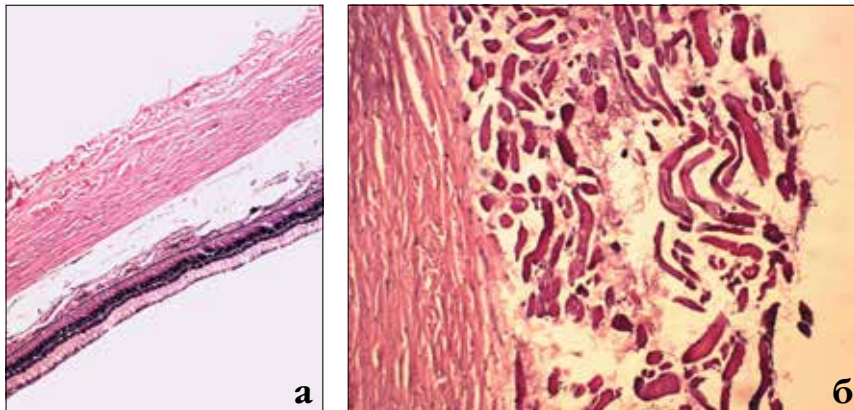


Рис. 4. Световая микроскопия оболочек глазного яблока (а) и экстраокулярной мышцы (б). Опытная группа. 1 неделя после процедуры кросслинкинга. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

Fig. 4. The light microscopy of membranes of the eyeball (a) and extraocular muscle (b). The experimental group. One week after the crosslinking procedure. Hematoxylin and eosin staining. Magnification: $\times 100$

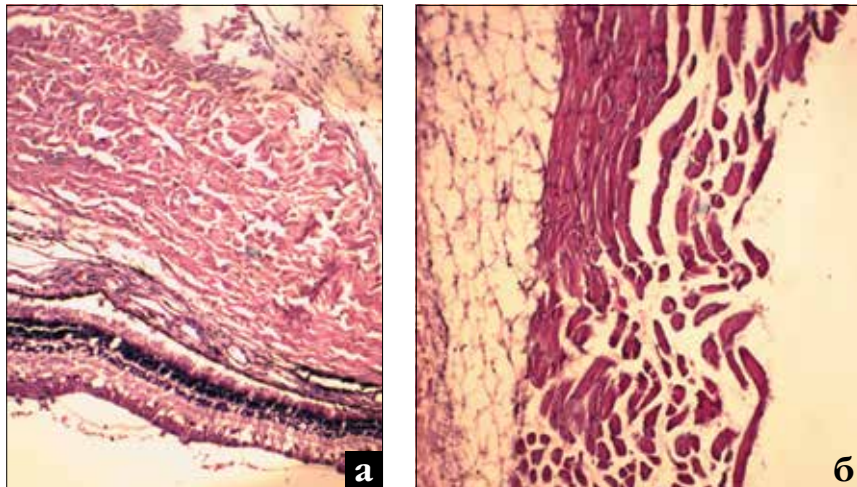


Рис. 5. Световая микроскопия оболочек глазного яблока, ув. $\times 200$ (а) и экстраокулярной мышцы, ув. $\times 100$ (б). Опытная группа. 1 мес. после процедуры кросслинкинга. Окраска гематоксилином и эозином. Отсутствие признаков воспалительного процесса

Fig. 5. The light microscopy of the membranes of the eyeball, magnification: $\times 200$ (a) and extraocular muscle, $\times 100$ (b). The experimental group. One month after the crosslinking procedure. Hematoxylin and eosin staining. The absence of signs of inflammatory process

В сетчатке и зрительном нерве пролеченных глаз не было выявлено патологических изменений ни в один из сроков наблюдения (рис. 2, 4а, 5а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте оценивалось влияние кросслинкинга склеры с рибофлавином/UVA на состояние структур глаз кроликов в различные сроки. Через 1 сутки после процедуры в об-

лученном участке склеры и прилегающей части экстраокулярной мышцы наблюдалась воспалительная реакция, которая носила транзиторный характер. В сетчатке и зрительном нерве не было выявлено патологических изменений в результате проведенного кросслинкинга склеры.

Полученные данные согласуются с результатами других авторов. Так Wollensak G. и Iomdina E. (2009 г.) выявили умеренную воспалительную инфильтрацию склеры в первые сутки после кросслинкинга, которая

имела тенденцию к стиханию и полностью исчезала через несколько дней. Признаков повреждения сетчатки в результате процедуры не наблюдалось [15].

Ранее Wollensak G. с соавт. (2005 г.) проводили схожее исследование и выявили поражение сетчатки в виде потери фоторецепторов, наружного ядерного слоя и пигментного эпителия в результате проведения кросслинкинга склеры. Данный побочный эффект процедуры авторы объяснили использованием UVA высокой мощности (до 6 мВт/см^2) и истончением склеры в результате ее дегидратации декстраном, входившим в состав фотосенсибилизатора [16].

Таким образом, для безопасного проведения кросслинкинга склеры с рибофлавином/UVA крайне важно учитывать дозу облучения ультрафиолетом А. Это подтверждается и работами других авторов. Так, Yali Zhang с соавт. наблюдали повреждение сетчатки кроликов в эксперименте при облучении склеры в течение 50 минут и более (мощность излучения 3 мВт/см^2). При сокращении времени воздействия UVA той же мощности (до 40 минут) патологических изменений выявлено не было [20].

В эксперименте мы использовали UVA мощностью 3 мВт/см^2 в течение 30 минут и не выявили серьезных побочных эффектов процедуры. Возникшая в склере и экстраокулярной мышце воспалительная реакция носила транзиторный характер. Впервые была проведена оценка влияния кросслинкинга с рибофлавином/UVA на экстраокулярные мышцы и зрительный нерв.

Для облучения ультрафиолетом А склеры мы использовали устройство «Уфалинк С», предназначенное именно для выполнения данной процедуры. Оригинальная конструкция излучателя устройства позволила провести кросслиндинг склеры в области экватора и заднего полюса через небольшой паралимбальный разрез конъюнктивы. Авторы других исследований применяли в своих экспериментах аппараты, сконструированные для выполнения кросслинкинга роговицы, а не склеры [15, 16, 20]. Использование же их в клинике для проведения кросслинкинга склеральной ткани технически не осуществимо или крайне затратно.

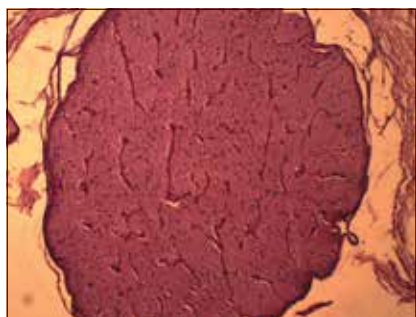


Рис. 6. Световая микроскопия зрительного нерва. Отсутствие признаков патологических изменений. Опытная группа. 1 сутки после процедуры кросслинкинга. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

Fig. 6. The light microscopy of the optic nerve. No signs of pathological changes. The experimental group. One day after the crosslinking procedure. Hematoxylin and eosin staining. Magnification: $\times 100$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Безусловно, требуются дополнительные экспериментальные исследования по поиску оптимальных параметров процедуры. Однако полученные нами данные позволяют рассматривать кросслиндинг склеры с рибофлавином/UVA как перспективный, достаточно безопасный и малоинвазивный метод воздействия на склеральную ткань.

Выполнение кросслинкинга склеры с рибофлавином/ультра-

фиолетом А (облучение мощностью 3 мВт/см² в течение 30 минут) сопровождается воспалительной реакцией в склере и прилегающей экстраокулярной мышце. Воспаление носит транзиторный характер. Сетчатка и зрительный нерв остаются интактными после процедуры. Таким образом, использование данных параметров является безопасным для структур глаза. Дальнейшие исследования и разработка оптимального протокола процедуры позволят адаптировать кросслиндинг склеры для применения в клинике для повышения прочности склеральной ткани при прогрессирующей близорукости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисов Э.С. Близорукость. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2002. – 288 с.
2. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазия роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение). – М.: Офтальмология, 2011. – 164 с.
3. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Суркова В.К., Зайнуллина Н.Б. Клинические результаты лечения кератоконуса методом трансэпителиального кросслинкинга роговичного коллагена // Офтальмология. – 2016. – Т. 13, № 1. – С. 4-9.
4. Бикбов М.М., Суркова В.К. Метод перекрестного связывания коллагена роговицы при кератоконусе. Обзор литературы // Офтальмология. – 2014. – Т. 11, № 3. – С. 13-18.
5. Бикбов М.М., Суркова В.К., Усубов Э.Л., Астрелин М.Н. Кросслиндинг склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA). Обзор литературы // Офтальмология. – 2015. – Т. 12, № 4. – С. 4-8.
6. Иомдина Е.Н., Бауэр С.М., Котляр К.Е. Биомеханика глаза: теоретические аспекты и клинические приложения / Под ред. В.В. Нероева. – М.: Реал Тайм, 2015. – 208 с.
7. Иомдина Е.Н., Тарутта Е.П., Маркосян Г.А. и др. Новые технологии склероукрепляющего лече-

ния прогрессирующей миопии // Педиатрическая офтальмология. – 2008. – № 1. – С. 28-30.

8. Лазаренко В.И., Осипова О.В., Большаков И.Н. Коллаген-хитозановый комплекс в лечении дегенеративной миопии. – Красноярск: Амальгама, 2014. – 108 с.

9. Bikbova G., Bikbov M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin // Acta Ophthalmologica. – 2014. – Vol. 92, № 1. – P. 30-34.

10. Choi S., Lee S-C, Lee H-J et al. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light // Lasers Med Sci. – 2013. – Vol. 28, № 5. – P. 1289-1296.

11. Dotan A., Kremer I., Livnat T. et al. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of progressive myopia in a rabbit model // Exp. Eye Res. – 2014. – Vol. 127. – P. 190-195.

12. Liu T.-X., Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin // Acta Ophthalmol. – 2013. – Vol. 91, № 4. – P. 253-257.

13. Rada J.A., Shelton S., Norton T.T. The sclera and myopia // Exp. Eye Res. – 2006. – Vol. 82, № 2. – P. 185-200.

14. Wang M., Zhang F., Qian X., Zhao X. Regional Biomechanical properties of human sclera after cross-linking by riboflavin/ultraviolet A // J. Refract. Surg. – 2012. – Vol. 28, № 10. – P. 723-728.

15. Wollensak G., Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA) // Acta Ophthalmol. – 2009. – Vol. 87, № 2. – P. 193-198.

16. Wollensak G., Iomdina E., Dittert D.D. et al. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA // Acta Ophthalmol. Scand. – 2005. – Vol. 83, № 4. – P. 477-482.

17. Wollensak G., Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera // J. Cataract Refract. Surg. – 2004. – Vol. 30, № 3. – P. 689-695.

18. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 2003. – Vol. 135, № 5. – P. 620-627.

19. Wong T.Y., Ferreira A., Hughes R. et al. Epidemiology and disease burden of pathologic myopia and myopic choroidal neovascularization: an evidence-based systematic review // Am. J. Ophthalmol. – 2014. – Vol. 157, № 1. – P. 9-25.

20. Zhang Y., Zou C., Liu L. et al. Effect of irradiation time on riboflavin-ultraviolet-A collagen crosslinking in rabbit sclera // J. Cataract Refract. Surg. – 2013. – Vol. 39, № 8. – P. 1184-1189.

Поступила 10.01.2017



[WWW.OOR.RU](http://www.oor.ru) ОБЩЕСТВО ОФТАЛЬМОЛОГОВ РОССИИ – В ИНТЕРНЕТЕ!