

НАСЫЩЕНИЕ РОГОВИЦЫ РИБОФЛАВИНОМ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КРОССЛИНКИНГА РОГОВИЧНОГО КОЛЛАГЕНА

В. П. Фокин¹, Е. Г. Солодкова¹, С. В. Балалин¹, В. Л. Загребин²

¹ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Волгоградский филиал,

²Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии

Проведен сравнительный анализ насыщения роговицы раствором рибофлавина при стандартной и модифицированной методиках кросслинкинга роговичного коллагена на 20 свиных кадаверных глазах с помощью колориметрии и гистологического метода исследования. Результаты исследования подтвердили одинаковое проникновение и равноценную насыщаемость рибофлавином стромы роговицы при проведении данных методик.

Ключевые слова: рибофлавин, кросслинкинг роговичного коллагена.

CORNEAL SATURATION WITH RIBOFLAVIN DURING CORNEAL CROSS-LINKING OF COLLAGEN

V. P. Fokin¹, E. G. Solodkova¹, S. V. Balalin¹, V. L. Zagrebin²

¹ Volgograd Affiliate of the Federal State Autonomous Institution «The S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex»

of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Volgograd,

²Volgograd State Medical University, Department of Histology, Embryology, Cytology

A comparative analysis of corneal saturation with a riboflavin solution using the standard and modified CXL protocols was performed in ex vivo 20 porcine corneas. The study has proved that riboflavin similarly absorbs into and saturates the corneal stroma when standard and modified protocols for CXL are used.

Key words: riboflavin, corneal collagen cross-linking.

Кератоконус является прогрессирующим, невоспалительным, двусторонним (но обычно асимметричным) заболеванием роговицы, которое характеризуется истончением, ослаблением и эктазией ее парааксиальных зон, что приводит к искажению роговичной поверхности [6, 9].

Наиболее востребованным способом лечения на начальных стадиях заболевания является кросслинкинг роговичного коллагена (КРК), предложенный в конце 90-х годов XX в. группой авторов из Дрезденского Университета [10—14]. «Минусами» классической методики КРК, выполняемой по так называемому «Дрезденскому протоколу», являются: 1) длительный болевой синдром в раннем послеоперационном периоде; 2) риск развития инфекционных кератитов за счет нарушения эпителиального барьера роговицы; 3) различные нарушения процесса реэпителизации (замедление реэпителизации, гипертрофия эпителия, длительная эпителиопатия и т. д.), что приводит к длительному снижению работоспособности, увеличению числа случаев непереносимости контактной коррекции у данной категории пациентов в дальнейшем; 4) отсутствие возможности проведения КРК у пациентов с толщиной роговицы менее 400 мкм, вследствие возможного проявления цитотоксического эффекта УФ-излучения на эндотелий роговицы.

По настоящее время исследователями ведется поиск возможных путей усовершенствования классичес-

кой методики КРК, чтобы улучшить переносимость ее пациентами, повысить ее эффективность [1—3, 7, 8].

С 2014 г. в Клинике Волгоградского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова», помимо классической, проводится методика кросслинкинга роговичного коллагена с дозированной эксимерлазерной деэпителизацией, выполняемой на глубину эпителиального слоя по данным оптической когерентной томографии (ОКТ) роговицы под контролем интраоперационной on-line пахиметрии [4, 5]. Также оптимизирован этап насыщения роговицы раствором «Декстралинк» путем использования для насыщения пластиковой воронки, устанавливаемой на поверхность глазного яблока. Одним из условий, обеспечивающих безопасность проведения операции КРК, является достижение достаточного уровня насыщения роговицы раствором рибофлавина.

В данном исследовании использовались фотометрический метод определения концентрации растворов, колориметрический метод оценки насыщения роговицы раствором «Декстралинк», а также гистологический метод [14, 15]. Фотометрический метод основан на сравнении поглощения при пропускании света через себя стандартным и исследуемым растворами (в данном случае раствором рибофлавина), колориметрический анализ основан на оценке цветовых компонентов — красного, зеленого и синего — фотоизображений роговиц,

подвергнутых как стандартной, так и модифицированной методике кросслинкинга роговичного коллагена. Гистологический метод исследования позволяет оценить состояние эпителиального слоя роговицы при окраске гематоксилин-эозином и состояние стромальных коллагеновых волокон при окраске по Ван Гизон.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить достаточность насыщения роговицы раствором «Декстралинк» с помощью колориметрического анализа, а также с помощью гистологического метода при выполнении модифицированной методики кросслинкинга роговичного коллагена в сравнении со стандартной методикой.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 20 свиных кадаверных глазах (давность забора — 2 часа).

Кадаверные глаза были распределены в 2 группы:

1-я группа (10 глаз) — глаза, подвергшиеся стандартной методике КРК;

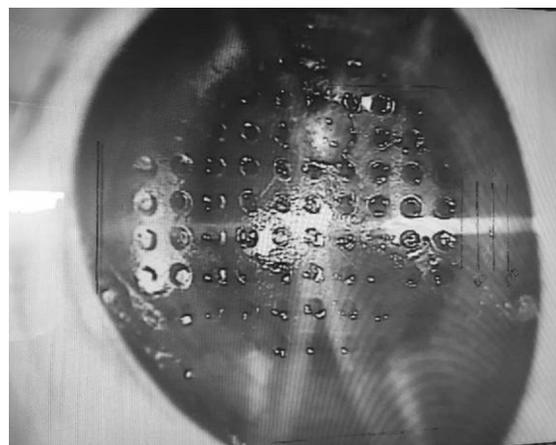
2-я группа (10 глаз) — глаза, подвергшиеся модифицированной методике КРК.

В ходе эксперимента каждый глаз помещали в держатель, для создания необходимого уровня тургора глазного яблока (рис. 1), после чего в 1-й группе эпителий удаляли механически в центральной оптической зоне диаметром 8 мм, во 2-й группе проводили точечную эксимерлазерную абляцию с использованием описанного инструмента на глубину эпителиального слоя (50 мкм), под контролем интраоперационной on-line пахиметрии (опция эксимерного лазера «Schwind – Amaris 500») (рис. 2А, 2Б).

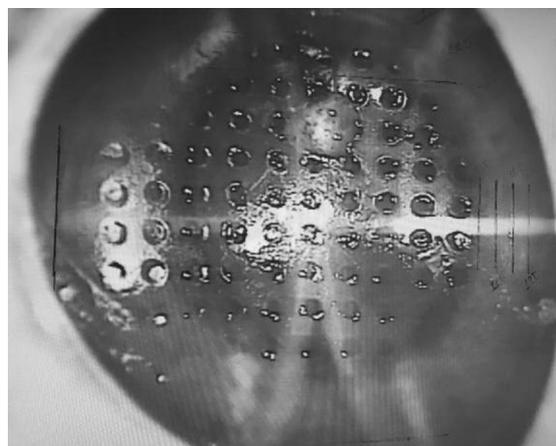


Рис. 1. Фото кадаверного свиного глаза, закрепленного в держателе

Далее, в обеих группах на поверхность глазного яблока устанавливалась пластиковая воронка, которую заполняли 1,0 мл раствора «Декстралинк» (рис. 3). Продолжительность этапа насыщения составила 15 мин во всех случаях.



А



Б

Рис. 2 (А, Б). Фото роговиц кадаверных глаз после проведения точечной эксимерлазерной деэпителизации



Рис. 3. Фото кадаверного глаза с установленной пластиковой воронкой на поверхности

Для проведения колориметрического анализа роговицы кадаверных глаз, принимавших участие в эксперименте, были изолированы. Колориметрический анализ насыщения роговицы раствором рибофлавина

проводили по системе RGB (red, green, blue) с помощью программы Колориметр Digital Color версии 5.10 операционной системы OS X Capitan (10.11.2). Для исключения фотоизображений с различным уровнем яркости и освещенности проводили фоторегистрацию одновременно сразу двух исследуемых изолированных роговиц, расположенных рядом относительно друг друга, после их насыщения раствором рибофлавина при выполнении операции КРК по стандартной и по модифицированной методикам, а также исследовалась интактная роговица, не окрашенная раствором рибофлавина (контрольная группа). В каждой группе было по 10 кадаверных свиных глаз.

Колориметрический анализ каждого глаза проводился трижды в оптической зоне роговицы с определением средних значений показателей RGB.

По окончании колориметрического анализа изолированные роговицы погружали в раствор формалина для приготовления препаратов и проведения дальнейшего гистологического исследования. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином для оценки толщины и состояния клеток переднего эпителия роговицы, а также по Ван Гизон для визуализации плотности и ориентации коллагеновых волокон в строме роговицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты фотоколориметрического анализа представлены в табл.

Средние значения показателей RGB после насыщения роговицы раствором рибофлавина при стандартной и модифицированной методиках (10 глаз)

Методика кроссликинга роговичного коллагена

Методика кроссликинга роговичного коллагена	Показатели RGB					
	R		G		B	
	<i>M</i>	$\pm m$	<i>M</i>	$\pm m$	<i>M</i>	$\pm m$
Стандартная	157,3	1,4	123,5	2,5	46,3	1,3
Модифицированная	157,5	1,9	127,4	2,4	48,1	1,8
<i>t</i>	0,08		1,1		0,8	
<i>p</i>	>0,05		>0,05		>0,05	

Из таблицы видно, что различие между средними значениями колориметрических показателей R, G, B статистически недостоверны ($t < 2,0$; $p > 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о равноценной насыщенности роговицы раствором рибофлавина, как по стандартной, так и по модифицированной методике.

На рис. 4 в качестве примера представлены результаты одного измерения насыщения роговицы раствором рибофлавина по системе RGB.

При оценке результатов гистологического исследования было установлено, что в первой опытной группе после полной механической дезэпителизации местами в препарате, окрашенном гематоксилин-эозином наблюдалось разрушение боуменовой оболочки с обнажением стромы роговицы. В строме наблюдались

явления отека, инфильтрации ткани. Отмечено повсеместное разобщение пучков коллагеновых волокон, появление лакунарных пространств между ними и нарушение ориентации соединительнотканых пластинок. Пропитывание стромы роговицы рибофлавином привело к увеличению толщины оптического среза (рис. 5).



Рис. 4. Результаты одного измерения насыщения роговицы раствором рибофлавина по системе RGB

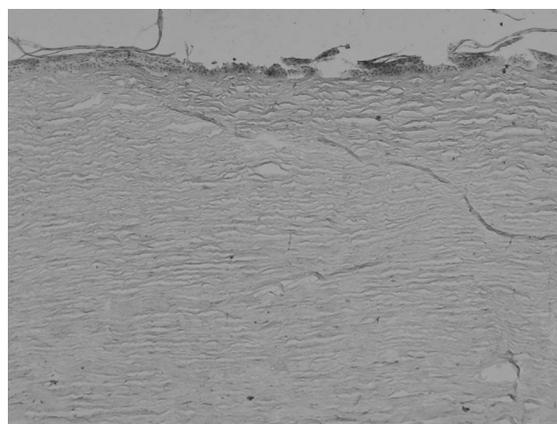


Рис. 5. Роговица свиной, первая опытная группа, окраска гематоксилин-эозин, об. x 10

В препаратах роговицы из 1-й группы, окрашенных по Ван Гизон, наблюдается сохранение боуменовой мембраны, в строме — повсеместное разобщение пучков коллагеновых волокон, появление лакунарных пространств между ними и нарушение ориентации соединительнотканых пластинок (рис. 6).

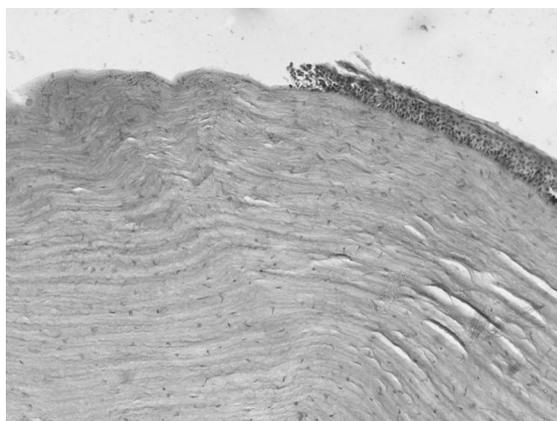


Рис. 6. Роговица свиной, первая опытная группа, окраска по Ван Гизон, об. x 10

Во второй опытной группе, где проводилась точечная эксимерлазерная дезэпителизация на глубину эпителиального слоя, при окраске гематоксилин-эозином отмечены участки десквамации переднего эпителия роговицы и частичного прерывания боуменовой мембраны. При этом соседние с участками слущивания кератоциты не пострадали и сохранили слоистость строения от рядов кубических до плоских клеток без элементов ороговения (рис. 7). При окраске по Ван Гизон видно, что такие участки дезэпителизации дали возможность пройти рибофлавину в строму роговицы на всю ее глубину, что отразилось в появлении лакунарных пространств на всей площади поперечного среза роговицы до десцеметовой мембраны. Коллагеновые волокна при этом сохранили однонаправленность ориентации параллельно поверхности роговицы (рис. 8).

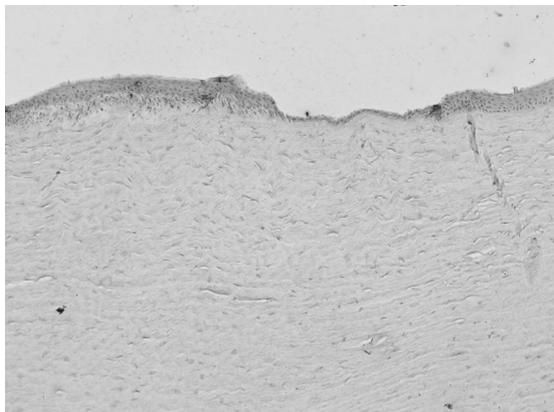


Рис. 7. Роговица свиньи, вторая опытная группа, окраска гематоксилин-эозин, об. x 10

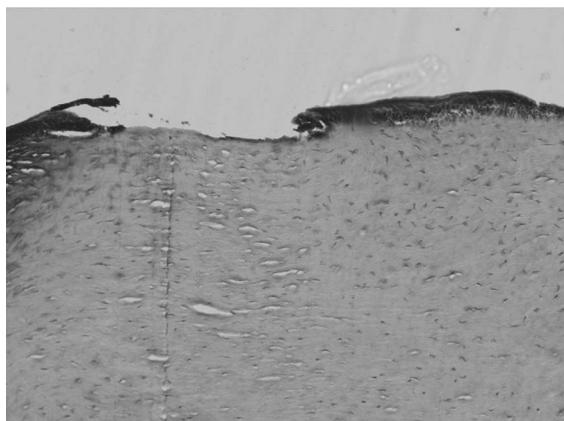


Рис. 8. Роговица свиньи, вторая опытная группа, окраска по Ван Гизон, об. x 10

Таким образом, результаты экспериментального этапа работы подтвердили одинаковое проникновение рибофлавина в строму роговицы как при проведении стандартной, так и модифицированной методики КРК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотоколориметрический анализ свидетельствует о равноценной насыщенности роговицы раствором ри-

бофлавина, как по стандартной, так и по модифицированной методике.

Гистологические исследования показали возникновение изменений в виде появления лакунарных пространств и упорядочивания расположения коллагеновых волокон в строме роговицы на равной глубине в обеих группах, что также подтверждает наличие достаточной сравнимой глубины эффекта кроссликинга роговичного коллагена при выполнении как стандартной, так и модифицированной методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малюгин Б. Э., Измайлова С. Б., Шацких А. В., Мерзлов Д. Е. и др. Экспериментальное обоснование эффективности различных методов доставки рибофлавина в строму роговицы как начального этапа выполнения УФ-кроссликинга // Офтальмохирургия. — 2014. — № 1. — С. 24—29.
2. Солодкова Е. Г., Борискина Л. Н., Ремесников И. А. Сравнительный анализ способов лечения кератоконуса // VI Всероссийская научная конференция молодых ученых в рамках научно-практической конференции «Федоровские чтения-2011». Сборник тезисов. — М., 2011. — С. 229—231.
3. Солодкова Е. Г., Ремесников И. А. Анализ отдаленных результатов кроссликинга роговичного коллагена при лечении прогрессирующего кератоконуса // Практическая медицина. — 2012. — Т. 1. — С. 118—120.
4. Патент № 2556791. Способ лечения кератоконуса / Борискина Л. Н., Блинкова Е. С., Солодкова Е. Г.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России»; Заявл. 09.06.2014; Опубл. 20.07.2015 // Бюл. — 2015. — № 20.
5. Патент № 2487691. Способ лечения кератоконуса / Борискина Л. Н., Ремесников И. А., Блинкова Е. С., Солодкова Е. Г.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздравсоцразвития России»; Заявл. 12.04.2012; Опубл. 20.07.2013 // Бюл. — 2013. — № 20.
6. Фейнбаум К. Современные аспекты этиопатогенеза и лечения кератоконуса // Офтальмохирургия. — 2011. — № 3. — С. 80—83.
7. Kaya V., Utin C. A., Yilmaz O. F. Efficacy of Corneal Collagen Cross-linking Using a Custom Epithelial Debridement Technique in Thin Corneas: A confocal Microscopy Study // J of Refract Surg. — 2011. — Vol. 27, № 6. — P. 444—450.
8. Pinelli R. C3-R treatment opens new frontiers for keratoconus and corneal ectasia // Eyeward. — 2007. — № 34. — P. 36—39.
9. Rabinowitz Y. S. Keratokonius // Survey of ophthalmology. — 1998. — Vol. 42. — P. 297—319.
10. Spoerl E., Schreiber J., Hellmund K., Seiler T., Knuschke P. Crosslinking Effects in the cornea of Rabbits // Ophthalmol. — 2000. — Vol. 97. — P. 203—206.
11. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D., Seiler T. Thermomechanical Behavior of Collagen-Crosslinked Porcine Cornea // Ophthalmologica — 2004. — Vol. 218 — P. 136—140.
12. Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. Increased Resistance of Crosslinkinked Cornea against Enzymatic

Digestion // *Current Eye Research* — 2004. — Vol. 29, № 1. — P. 35—40.

13. *Wollensak G., Spoerl E., Seiler T.* Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Collagen- Crosslinking for the Treatment of Keratokonus // *Am. J. Ophthalmol.* — 2003. — Vol. 135. — P. 620—627.

14. *Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T.* Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea after Collagen — Crosslinking by Riboflavin/UVA // *J. Cornea.* — 2004. — Vol. 23. — P. 503—507.

15. *Wollensak G., Spoerl E., Mazzotta C., Kalinski T., et al.* Intralamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light // *Br J Ophthalmol.* — 2011. — Vol. 10. — P. 1136—2010.

16. *Wollensak G., Spoerl E., Seiler T.* Keratocyte apoptosis after collagen cross-linking using riboflavin / UVA treatment // *Cornea.* — 2004. — Vol. 23, № 1. — P. 43—49.

Контактная информация

Солодкова Елена Геннадьевна — заведующая офтальмологическим отделением коррекции аномалий рефракции Волгоградского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: solo23@mail.ru