

Характеристика морфологической и ультраструктурной трансформации роговицы после УФ кросслинкинга (обзор литературы)

М.М. Бикбов, А.Р. Халимов ✉, Н.Е. Шевчук, Г.М. Казакбаева, Л.И. Гилемзянова, И.Д. Валишин

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Аннотация. В статье представлены краткие сведения по экспериментальному и клиническому изучению морфологической и ультраструктурной трансформации роговицы, наблюдаемой после ультрафиолетового (УФ) кросслинкинга (сшивания) роговичного коллагена. В обзор включены результаты, полученные на основе современных методов исследования. Показано, что УФ кросслиндинг индуцирует в роговице в раннем послеоперационном периоде (1 мес.) характерный отклик, связанный с очаговым разволокнением коллагена стромы, изменением межфибриллярного расстояния, увеличением диаметра фибрилл, утратой поверхностных нервных волокон, активацией апоптоза кератоцитов со снижением их количества. Выявленные особенности носят транзиторный характер (до 6 мес.) и затрагивают преимущественно переднюю и среднюю строму, не влияя на эндотелий роговицы. В срок 6–12 мес. отмечается восстановление корнеальных нервных волокон, репопуляция кератоцитов, упорядочивание нарушенной межфибриллярной последовательности, уплотнение коллагеновой структуры с сохранением жесткости роговицы, в том числе за счет увеличения диаметра фибрилл коллагена. Положительный кросслиндинг-индуцированный эффект более выражен на фоне патологически измененной роговицы, в частности, при кератоконусе, по сравнению с экспериментальными моделями УФ кросслинкинга, воспроизведенными на интактных лабораторных животных.

Ключевые слова: ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы, морфология роговицы, кератоконус

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00132.

REVIEW ARTICLES

Review article

Characteristics of morphological and ultrastructural transformation of the cornea after UV crosslinking (literature review)

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov ✉, N.E. Shevchuk, G.M. Kazakbayeva, L.I. Gilemzyanova, I.D. Valishin

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Abstract. The article provides brief information on the experimental and clinical study of the morphological and ultrastructural transformation of the cornea observed after ultraviolet (UV) crosslinking of corneal collagen. The review includes the results obtained on the basis of modern research methods. UV crosslinking has been shown to induce a characteristic response in the cornea in the early postoperative period (1 month) associated with focal fibrillation of stroma collagen, changes in the interfibrillary distance, an increase in the diameter of fibrils, loss of superficial nerve fibers, activation of keratocyte apoptosis with a decrease in their number. The identified features are transient (up to 6 months) and mainly affect the anterior and middle stroma, without affecting the corneal endothelium. In the period of 6-12 months there is a restoration of corneal nerve fibers, keratocyte repopulation, sequencing of the disrupted interfibrillary sequence, and consolidation of the collagen structure while maintaining corneal rigidity, including by increasing the diameter of collagen fibrils. The positive crosslinking-induced effect is more pronounced against the background of a pathologically altered cornea, in particular, with keratoconus, compared with experimental models of UV crosslinking reproduced on intact laboratory animals.

Keywords: ultraviolet corneal crosslinking, corneal morphology, keratoconus

Financing: The research was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant No. 24-25-00132.

Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы (CXL), применяемый в клинической практике два последних десятилетия, произвел революцию в лечении кератоконуса. Было продемонстрировано, что воздействие ультрафиолетового (УФ) излучения диапазона А в комбинации с рибофлавином способствует повышению биомеханики биологических тканей, в частности роговицы [1]. В настоящее время CXL является признанным и достаточно безопасным методом лечения прогрессирующего керато-

конуса и ряда других дегенеративных и воспалительных заболеваний роговой оболочки [2].

Процесс CXL представляет собой фотохимические взаимодействия, опосредованные участием УФ излучения длиной волны (370 ± 5) нм и рибофлавина (витамин В₂). Последний выполняет функцию фотосенсибилизатора, который под воздействием ультрафиолета продуцирует активные формы кислорода (АФК), инициирующие образование ковалентных связей между молекулами

коллагена, белками межламеллярной адгезии. Формирование дополнительных химических связей может происходить между аминоконцами боковых цепей коллагена и протеогликанами внеклеточного матрикса с генерацией синглетного кислорода [3, 4, 5]. Таким образом, процесс УФ «сшивки» коллагена роговицы с участием фотоактивированного рибофлавина и АФК приводит к укреплению структуры роговицы и приостанавливает прогрессирование кератэктазии.

Проведенные многочисленные исследования доказали безопасность CXL. Серьезные осложнения, развивающиеся при использовании данной методики, достаточно редки и включают помутнение роговицы, значительно реже рубцевание или послеоперационные инфекции, а в единичных случаях повреждение эндотелия. Кроме этого, были отмечены реактивация герпетических инфекций и стерильные инфильтраты стромы роговицы [6].

Кросслинкинг роговицы активно применяется при лечении пациентов с кератэктазиями, которые являются хроническими, невоспалительными, дегенеративными заболеваниями роговицы и характеризуются структурной дезорганизацией роговичного коллагена, значительным ослаблением внутри- и межфибриллярных связей, что приводит к прогрессирующему снижению зрительных функций. Известно, что среди первичных кератэктазий в подавляющем большинстве случаев (более 98 %) встречается кератоконус (КК) [7].

Известны традиционные ранние клинические проявления CXL – это роговичный синдром, вызванный дезэпителизацией роговой оболочки (до 4 сут.), отек стромы (до 7 сут.) и псевдохейз (помутнение) роговицы (до 1–3 мес.). Несмотря на достаточно большое число работ, посвященных результатам применения CXL в лечении пациентов с КК, исследователей по-прежнему интересует, какие именно морфологические и ультраструктурные изменения происходят в роговице после ее УФ облучения в присутствии рибофлавина [8, 9, 10].

Исследования микроструктуры роговицы после CXL указывают на изменения в размере и последовательности коллагеновых фибрилл, при этом наиболее значимая трансформация происходит в передней трети стромы, что, по мнению ряда авторов, обуславливает эффект придания жесткости роговой оболочке. Экспериментальная оценка взаимосвязи механических свойств и изменение ультраструктуры роговиц свиней после CXL, проведенная Chang S. с соавторами [11], выявила увеличение на 28 % тангенциального модуля упругости материала, определяемого с помощью испытаний на одноосное растяжение. Отмечали преобразование структуры коллагена в пределах первых 300 мкм глубины роговицы: уменьшилось количество фибрилл на единицу площади на 8–12 %, увеличилась их толщина примерно на 5 % при улучшении микроциркуляции в межфибриллярном пространстве.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия с преобразованием Фурье (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) – методика, используемая для получения инфракрасного спектра поглощения или излучения, в частности, твердого тела, подтвердила образование межфибриллярных связей в результате воздействия CXL. Полученные данные показали, что жесткость тканей после применения рибофлавин-ультрафиолетового воздействия обусловлена такими параметрами, как диаметр коллагеновых фибрилл и их структурная плотность [11].

Применение ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения с Фурье-преобразованием (FTIR-ATR) позволило провести углубленное изучение механизмов формирования коллагеновых связей в роговице, в частности после CXL. Анализ спектров ATR-FTIR выявил влияние УФ излучения на коллагеновый матрикс свиных роговиц. Значительные изменения наблюдались в полосах, связанных с коллагеновыми сшивками. Кроме того, в результате вызванных воздействием УФ излучения биохимических изменений на молекулярном уровне выявлена существенная разница в оптическом рассеянии, происходящем в строме роговицы. Было показано, что повышенная дегидратация ткани роговицы практически не влияет на нативную структуру тройной спирали коллагена [12].

Анализ, проведенный с помощью поверхностной спектроскопии комбинационного рассеяния света (Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS), показал, что общая вторичная структура коллагена не изменяется, в то время как модификации боковых цепей аминокислот являются наиболее характерным результатом сшивания. Было обнаружено образование вторичных и ароматических аминных групп, а также метиленовых и карбонильных групп [5]. В совокупности эти результаты свидетельствуют о значимых изменениях в ультраструктуре роговицы после CXL, включая создание новых сшивок в макромолекулах коллагена [12]. При этом CXL стабилизирует преимущественно меж- и внутрифибриллярное, но не межламеллярное сцепление [13].

По мере появления новых клинических протоколов CXL, основанных на снижении длительности процедуры с пропорциональным увеличением мощности ультрафиолета, потребовались сравнительные исследования эффективности различных режимов воздействия на роговицу. Было показано, что сокращение продолжительности УФ облучения, особенно менее 5 минут, не оказывает такого же биомеханического эффекта [14].

В экспериментальных исследованиях на роговицах крыс выявлено разрыхление пучков волокон коллагена, обусловленных развитием отека стромы в ранний (3–7 сут.) период наблюдений, сохраняющегося до 30 сут. эксперимента после стандартного УФ кросслинкинга («Дрезденский» протокол) с раствором рибофлавина. Аналогичные, но менее выраженные изменения наблюдали при проведении CXL с раствором рибофлавина, содержащим декстран

с молекулярной массой 500 kDa («Декстралинк»), что связано с обезвоживающим и противоотечным эффектом полимера. При этом в обеих группах происходило снижение плотности кератоцитов в передних и средних слоях стромы роговицы [15].

Экспериментальные исследования *in vivo* на роговицах разных животных (куры и кролики) показали, что эффект CXL зависит от исходного состояния роговичного коллагена. УФ воздействие в присутствии рибофлавина практически не влияет на общую структуру роговицы, представляющей собой хорошо организованный коллагеновый комплекс, как, например, у кур или других птиц. Напротив, в роговицах кроликов первоначальное распределение коллагеновых волокон может быть частично организовано или не организовано. В этом случае CXL вызывает существенные позитивные изменения в строении коллагена. Типичным примером роговицы с неорганизованным расположением коллагена является роговица пациентов с кератоконусом, что свидетельствует о необходимости дальнейших разносторонних исследований влияния CXL на структуру слоев интактной и патологически измененной роговицы [16].

Изучение морфологических изменений в коллагеновых фибриллах парных роговиц свиней и кроликов, одна из которых была контрольной, а другая подверглась CXL, методами световой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии, показало следующее. Установлено существенное снижение толщины центральной зоны роговицы животных, при этом коллагеновые фибриллы были более компактно и упорядоченно расположены в передней строме и менее плотно – в задней. Их диаметр увеличился в передней и средней строме, что превосходило показатели измерений фибрилл более глубоких слоев. Отмечали статистически достоверное уменьшение межфибрилярного расстояния в различных областях роговицы кролика, тогда как изменений в задней части стромы роговицы свиней не наблюдалось [17].

Аналогичные изменения были отмечены и в экспериментальных исследованиях на крысах. Проведенные электронномикроскопические исследования средних слоев стромы роговицы крыс показали, что CXL способствовал увеличению фибриллярного диаметра и снижению плотности интрамеллярной упаковки фибрилл, наиболее выражено наблюдаемой в раннем послеоперационном периоде (3 суток). Уменьшение плотности фибриллярной упаковки может быть следствием отека стромы, который на ультраструктурном уровне может сохраняться в течение нескольких месяцев. Выявленное увеличение диаметра фибрилл после CXL, очевидно, является одним из факторов повышения прочностных свойств роговой оболочки [18].

S. Akhtar с коллегами изучали ультраструктурные изменения центральной зоны и периферии роговицы крыс через 7 дней после применения стандартного протокола CXL с дезэпителизацией (3 мВт/см² в течение

30 мин) [19]. Как показало исследование, после проведенного CXL в пределах одной и той же роговицы диаметр коллагеновых фибрилл и межфибрилярное расстояние в центре были значительно меньше по сравнению с таковыми на периферии [20]. В свою очередь, расстояние между фибриллами на периферии роговицы после CXL было существенно больше, чем в интактном контроле. Кроме того, площадь и плотность протеогликанов на периферии роговицы после CXL были значительно выше, чем в центральной части, что позволило авторам сделать предположение о большей эффективности CXL на периферии роговицы. Это может быть связано с более высоким содержанием люмикана, богатого лейцином, и более высокой диффузией кислорода и рибофлавина по периферии роговицы [21].

Изучение срезов роговицы кроликов с помощью SHG-визуализации (Second Harmonic Generation) показало, что коллагеновые волокна передней стромы после CXL (1–3 месяца) становятся значительно более выпрямленными по сравнению с ее задними слоями. В то время как волокна коллагена при меньшем влиянии CXL или без воздействия CXL выглядели гораздо более волнистыми [22, 23, 24]. Такой CXL-индуцированный эффект был назван авторами как «обжатие» коллагена. Возможно, это одна из причин уплотнения стромы в послеоперационном периоде (6 месяцев и более).

Другое исследование было посвящено гистологической оценке изменений в роговице кроликов после применения метода ускоренного сшивания коллагена – акселерированного CXL. Выявлено значительно большее (в 3 и более раз) количество апоптотных клеток в эндотелии и среди кератоцитов после CXL по сравнению с контрольной группой [25]. В ряде других экспериментальных исследований также отмечается апоптоз кератоцитов в передней и средней строме с незначительным повреждением эндотелиальных клеток [26]. Были представлены экспериментальные данные о том, что структура роговицы, измененная после CXL, ограничивает межламеллярную миграцию клеток и может приводить к нарушению нормального паттерна кератоцитов [27]. Таким образом, хотя CXL является надежным методом предотвращения прогрессирования КК, все еще существует риск повреждения эндотелиоцитов и связанных с ним осложнений, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения данного вопроса.

Общепризнанная морфологическая картина стромы роговицы у пациентов с КК в ранний срок (1–30 суток) после CXL характеризуется, как правило, очаговым разволокнением коллагеновых пучков, вызванным развитием интра- и послеоперационного отека [8]. Кроме того, одним из неизменных последствий УФ воздействия на роговицу является гибель кератоцитов передней стромы. Имеются сведения, что в зоне лимба после CXL может наблюдаться снижение способности эпителиальных клеток к делению [28].

Проведенный *in vitro* иммуноанализ роговиц человека с КК показал, что CXL снижает жизнеспособность клеток, запускает апоптоз и ингибирует пролиферацию, не влияя на миофибробластическую трансформацию кератоцитов [29]. Как показывают результаты клинических исследований, после первоначального истощения кератоцитов в передней строме роговицы после CXL плотность клеток возвращается к среднему уровню через 6–12 месяцев после операции, что подтверждается исследованием с помощью конфокальной микроскопии [14]. Однако в ряде случаев может отмечаться стойкая потеря кератоцитов, что клинически может проявляться в виде визуально заметного роговичного рубца [30]. Одним из функциональных предназначений кератоцитов (особых фибробластов) является синтез основных типов коллагена и компонентов межклеточного матрикса. Соответственно, послеоперационное восстановление плотности кератоцитов является важным критерием долгосрочности CXL-индуцированного эффекта повышения биомеханической резистентности роговицы [31].

По данным Mazzotta С. с соавт., восстановление популяции кератоцитов у пациентов с КК начинается примерно через 1 мес. после CXL, усиливается на 3-м месяце и завершается примерно через полгода [32].

Клинические исследования показали, что CXL приводит к эпителиопатии в виде полиморфизма и полимегагизма эпителиальных клеток, снижению плотности и апоптозу кератоцитов, выраженному нарушению хода и структуры нервных волокон. Авторами было установлено, что процесс восстановления популяции кератоцитов происходит в сроки от трех до шести месяцев, нервных волокон – до года [33, 34]. Согласно данным других авторов, снижение чувствительности роговицы, связанное с утратой нервных волокон, отмечается на 15-е сутки после CXL, процесс начала их регенерации – через месяц и восстановление – через 6 месяцев [35]. Jordan С. с коллегами выявили тотальную потерю суббазального нервного сплетения и гибель кератоцитов передней стромы у пациентов с КК в раннем послеоперационном периоде с последующим (12 мес.) полным восстановлением поврежденных морфологических структур [36].

Следует отметить, что CXL помимо непосредственного лечебного эффекта несет и сопутствующее патогенетическое воздействие. Выраженность CXL-индуцированных осложнений в тканях глаза зависит от выбранного клинического протокола CXL, с соответствующим режимом УФ облучения и способом доставки фотосенсибилизатора в строму, исходного патологического состояния роговицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ультрафиолетовый кросслинкинг роговичного коллагена с рибофлавином индуцирует в роговице в раннем (до 1 месяца) послеоперационном периоде характерные морфологические и ультраструктурные изменения, связанные с очаговым разволокнением коллагена стромы,

изменением межфибриллярного расстояния, увеличением диаметра фибрилл, утратой поверхностных нервных волокон, активацией апоптоза кератоцитов со снижением их количества, при сохранности клеток эндотелия.

Морфологические кросслинкинг-ассоциированные изменения носят транзиторный характер (до 6 месяцев) и преимущественно затрагивают переднюю и среднюю строму роговицы. В последующем (от 6 до 12 месяцев) отмечается восстановление корнеальных нервных волокон, репопуляция кератоцитов, упорядочивание нарушенной межфибриллярной последовательности, уплотнение коллагеновой структуры с сохранением жесткости роговицы, в том числе за счет увеличения диаметра фибрилл коллагена.

Эффективность ультрафиолетового кросслинкинга зависит от исходного состояния роговичного коллагена. Положительные кросслинкинг-индуцированные эффекты более выражены на фоне патологически измененной роговицы, в частности, при кератоконусе, по сравнению с экспериментальными моделями УФ кросслинкинга, воспроизведенными на интактных лабораторных животных.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sporl E., Huhle M., Kasper M., Seiler T. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Ophthalmologie*. 1997;94(12):902–906. doi: 10.1007/s003470050219.
2. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*. 2003;135(5):620–627. doi: 10.1016/s0002-9394(02)02220-1.
3. Gassel C.J., Rock D., Konrad E.M., Blumenstock G., Bartz-Schmidt K.U., Rock T. Impact of keratoconus stage on outcome after corneal crosslinking. *BMC Ophthalmology*. 2022;22(1):207. doi: 10.1186/s12886-022-02425-8
4. Link J., Herber R., Raiskup F., Pillunat L.E., Sporl E. Principles of corneal cross-linking: Presentation based on the development of the various treatment protocols. *Ophthalmology*. 2022;119(4):332–341. (In German) doi: 10.1007/s00347-021-01538-7.
5. Melcher S., Zimmerer C., Galli R., Golden J., Herber R., Raiskup F. et al. Analysis of riboflavin/ultraviolet a corneal cross-linking by molecular spectroscopy. *Heliyon*. 2023;9(2):e13206. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13206
6. Lang S.J., Reinhard T. Crosslinking in keratoconus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2016;233(6):713–716. (In German) doi: 10.1055/s-0042-103494
7. Халимов А.Р., Суркова В.К., Казакбаева Г.М., Усубов Э.Л., Халимова Л.И., Зайнуллина Н.Б. Особенности морфологической и ультраструктурной организации роговицы (обзор литературы). *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(6):194–202. doi: 10.29413/ABS.2022-7.6.19.
8. Зотов В.В., Сальников В.В., Поздеева Н.А. Изменения ультраструктуры стромы роговицы после проведения кросслинкинга. *Практическая медицина. Офтальмология*. 2012;1:95–96.

9. Kling S., Hammer A., Conti A., Hafezi F. Corneal cross-linking with riboflavin and UV-A in the mouse cornea in vivo: morphological, biochemical, and physiological analysis. *Translational Vision Science & Technology*. 2017;6(1):7. doi: 10.1167/tvst.6.1.7
10. Müller P.L., Löffler K.U., Kohlhaas M., Holz F.G., Herwig-Carl M.C. Morphologic Corneal Changes after Crosslinking for Keratoconus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2018;235(7):809–819. (In German) doi: 10.1055/s-0043-102577.
11. Chang S.H., Mohammadvali A., Chen K.J., Ji Y.R., Young T.H., Wang T.J. et al. The Relationship Between mechanical properties, ultrastructural changes, and intrafibrillar bond formation in corneal UVA/riboflavin cross-linking treatment for keratoconus. *Journal of Refractive Surgery*. 2018;34(4):264–272. doi: 10.3928/1081597X-20180220-01
12. Danielewska M.E., Kostyszak M.A., Sareło P., Gąsior-Głogowska M., Niemczyk M., Prządka P. et al. Indirectly assessing changes in corneal properties with OCT speckle after crosslinking in porcine eyes. *Experimental Eye Research*. 2022;219:109051. doi: 10.1016/j.exer.2022.109051
13. Wollensak G., Sport E., Mazzotta C., Kalinski T., Sel S. Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. *British Journal of Ophthalmology*. 2011;95(6):876–880. doi: 10.1136/bjo.2010.190843
14. Santhiago M.R., Randleman J.B. The biology of corneal cross-linking derived from ultraviolet light and riboflavin. *Experimental Eye Research*. 2021;202:108355. doi: 10.1016/j.exer.2020.108355.
15. Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Морфологическая оценка изменений в роговице экспериментальных животных после ультрафиолетового кроссликинга. *Точка зрения. Восток–Запад*. 2021;1:66–69. doi: 10.25276/2410-1257-2021-1-66-69.
16. Bueno J.M., Avila F.J., Martinez-Garcia M.C. Quantitative analysis of the corneal collagen distribution after in vivo cross-linking with second harmonic microscopy. *BioMed Research International*. 2019;2019:3860498. doi: 10.1155/2019/3860498
17. Subasinghe S.K., Ogbuehi K.C., Mitchell L., Dias G.J. Morphological alterations of the cornea following crosslinking treatment (CXL). *Clinical Anatomy*. 2021;34(6):859–866. doi: 10.1002/ca.23728.
18. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Шевчук Н.Е., Суркова В.К., Усубов Э.Л., Казакбаева Г.М. Особенности ультраструктурных изменений роговичного коллагена экспериментальных животных после УФ кроссликинга роговицы. *Современные технологии в офтальмологии*. 2022;5(45):171–177. doi: 10.25276/2312-4911-2022-5-171-177.
19. Akhtar S., Bron A.J., Salvi S.M., Hawksworth N.R., Tuft S.J., Meek K.M. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. *Acta Ophthalmologica*. 2008;86(7):764–772. doi: 10.1111/j.1755-3768.2007.01142.x.
20. Almubrad T., Mencucci R., Smedowski A., Samivel R., Almutleb E., Alkanaa A. et al. Ultrastructural study of collagen fibrils, proteoglycans and lamellae of the cornea treated with iontophoresis – UVA cross-linking and hypotonic riboflavin solution. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(12):7160–7174. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.019
21. Akhtar S., Smedowski A., Masmali A., Alkanaa A., Khan A.A., Almutleb E. et al. Effect of Ultraviolet-A and Riboflavin treatment on the architecture of the center and periphery of normal rat cornea: 7 days post treatment. *Experimental Eye Research*. 2022;219:109064. doi: 10.1016/j.exer.2022.109064.
22. Bradford S.M., Mikula E.R., Juhasz T., Brown D.J., Jester J.V. Collagen fiber crimping following in vivo UVA-induced corneal crosslinking. *Experimental Eye Research*. 2018;177:173–180. doi: 10.1016/j.exer.2018.08.009.
23. Tan H.Y., Chang Y.L., Lo W., Hsueh C.M., Chen W.L., Ghazaryan A.A. et al. Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked-treated corneas by Fourier transform-second harmonic generation imaging. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013;39(5):779–788. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.11.036
24. Bradford S., Luo S., Brown D., Juhasz T., Jester J. A review of the epithelial and stromal effects of corneal collagen crosslinking. *Ocular Surface*. 2023;30:150–159. doi: 10.1016/j.jtos.2023.09.003.
25. Xing H., Oyang H. Evaluation of corneal tissue changes after collagen cross-linking with ultraviolet and riboflavin A. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2022;68(5):72–76. doi: 10.14715/cmb/2022.68.5.9.
26. Song W., Wang Y., Qiao J., Li H., Rond B., Yang S. et al. The comparative safety of genipin versus UVA-riboflavin crosslinking of rabbit corneas. *Molecular Vision*. 2017;23:504–513.
27. Petroll W.M., Miron-Mendoza M., Sunkara Y., Ikebe H.R., Sripathi N.R., Hassaniardekani H. The impact of UV cross-linking on corneal stromal cell migration, differentiation and patterning. *Experimental Eye Research*. 2023;233:109523. doi: 10.1016/j.exer.2023.109523.
28. Vimalin J., Gupta N., Jambulingam M., Padmanabhan P., Madhavan H. The effect of riboflavin-UV-A treatment on corneal limbal epithelial cells-A study on human cadaver eyes. *Cornea*. 2012;31(9):1052–1059. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182498902.
29. Song X., Strachan T., Wang J., Langenbacher A., Seitz B., Szentmáry N. Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *BioMed Research International*. 2015;2015:254237. doi: 10.1155/2015/254237.
30. Bulirsch L.M., Weber C., Saßmannshausen M., Kohlhaas M., Holz F.G., Loeffler K.U. et al. Histological changes in keratoconus and wound healing after corneal cross-linking. *Ophthalmologie*. 2022;119(4):342–349. (In German) doi: 10.1007/s00347-021-01537-8.
31. Messmer E.M., Meyer P., Herwig M.C., Loeffler K.U., Schirra F., Seitz B. et al. Morphological and immunohistochemical changes after corneal cross-linking. *Cornea*. 2013;32(2):111–117. doi: 10.1097/ICO.0b013e31824d701b.
32. Mazzotta C., Traversi C., Caragiulo S., Rechichi M. Pulsed vs continuous light accelerated corneal collagen crosslinking: in vivo qualitative investigation by confocal microscopy and corneal OCT. *Eye (Lond)*. 2014;28(10):1179–1183. doi: 10.1038/eye.2014.163/

33. Саркисова К.Г. Комбинированный кросслинкинг роговичного коллагена при прогрессирующем кератоконусе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2023. 24 с.

34. Аветисов С.Э., Бубнова И.А., Сурнина З.В., Аверич В.В., Саркисова К.Г. Изменения структуры роговицы после применения кросслинкинга роговичного коллагена при кератоконусе. Медицинский совет. 2022;16(6):226–233. doi: 10.21518/2079-701X-2022-16-6-226-233.

35. Mazzotta C., Traversi C., Baiocchi S., Sergio P., Caporossi T., Caporossi A. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation. *European Journal of Ophthalmology*. 2006;16(4):530–535. doi: 10.1177/112067210601600405.

36. Jordan C., Patel D.V., Abeysakera N., McGhee C.N.J. In vivo confocal microscopy analyses of corneal microstructural changes in a prospective study of collagen cross-linking in keratoconus. *Ophthalmology*. 2014;121(2):469–474. doi: 10.1016/j.optha.2013.09.014.

REFERENCES

1. Sporn E., Huhle M., Kasper M., Seiler T. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Ophthalmologie*. 1997;94(12):902–906. doi: 10.1007/s003470050219.

2. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*. 2003;135(5):620–627. doi: 10.1016/s0002-9394(02)02220-1.

3. Gassel C.J., Rock D., Konrad E.M., Blumenstock G., Bartz-Schmidt K.U., Rock T. Impact of keratoconus stage on outcome after corneal crosslinking. *BMC Ophthalmology*. 2022;22(1):207. doi: 10.1186/s12886-022-02425-8

4. Link J., Herber R., Raiskup F., Pillunat L.E., Sporn E. Principles of corneal cross-linking: Presentation based on the development of the various treatment protocols. *Ophthalmology*. 2022;119(4):332–341. (In German) doi: 10.1007/s00347-021-01538-7.

5. Melcher S., Zimmerer C., Galli R., Golden J., Herber R., Raiskup F. et al. Analysis of riboflavin/ultraviolet a corneal cross-linking by molecular spectroscopy. *Heliyon*. 2023;9(2):e13206. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13206

6. Lang S.J., Reinhard T. Crosslinking in keratoconus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2016;233(6):713–716. (In German) doi: 10.1055/s-0042-103494

7. Khalimov A.R., Surkova V.K., Kazakbaeva G.M., Usubov E.L., Khalimova L.I., Zaynullina N.B. Features of morphological and ultrastructural organization of the cornea (literature review). *Acta biomedica scientifica*. 2022;7(6):194–202. (In Russ.) doi: 10.29413/ABS.2022-7.6.19.

8. Zotov V.V., Salnikov V.V., Pozdeeva N.A. Changes in the ultrastructure of the corneal stroma after crosslinking. *Prakticheskaya meditsina. Oftal'mologiya = Practical medicine. Ophthalmology*. 2012;1:95–96. (In Russ.).

9. Kling S., Hammer A., Conti A., Hafezi F. Corneal cross-linking with riboflavin and UV-A in the mouse cornea in vivo: morphological, biochemical, and physiological analysis.

Translational Vision Science & Technology. 2017;6(1):7. doi: 10.1167/tvst.6.1.7

10. Müller P.L., Löffler K.U., Kohlhaas M., Holz F.G., Herwig-Carl M.C. Morphologic Corneal Changes after Crosslinking for Keratoconus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2018;235(7):809–819. (In German) doi: 10.1055/s-0043-102577.

11. Chang S.H., Mohammadvali A., Chen K.J., Ji Y.R., Young T.H., Wang T.J. et al. The Relationship Between mechanical properties, ultrastructural changes, and intrafibrillar bond formation in corneal UVA/riboflavin cross-linking treatment for keratoconus. *Journal of Refractive Surgery*. 2018;34(4):264–272. doi: 10.3928/1081597X-20180220-01

12. Danielewska M.E., Kostyszak M.A., Sarefo P., Gąsior-Głogowska M., Niemczyk M., Prządka P. et al. Indirectly assessing changes in corneal properties with OCT speckle after crosslinking in porcine eyes. *Experimental Eye Research*. 2022;219:109051. doi: 10.1016/j.exer.2022.109051

13. Wollensak G., Sport E., Mazzotta C., Kalinski T., Sel S. Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. *British Journal of Ophthalmology*. 2011;95(6):876–880. doi: 10.1136/bjo.2010.190843

14. Santhiago M.R., Randleman J.B. The biology of corneal cross-linking derived from ultraviolet light and riboflavin. *Experimental Eye Research*. 2021;202:108355. doi: 10.1016/j.exer.2020.108355.

15. Khalimov A.R., Usubov E.L. Morphological assessment of changes in the cornea of experimental animals after ultraviolet corneal crosslinking. *Tochka zreniya. VostoK-Zapad = Point of View. East-West*. 2021;1:66–69. (In Russ.) doi: 10.25276/2410-1257-2021-1-66-69.

16. Bueno J.M., Avila F.J., Martinez-Garcia M.C. Quantitative analysis of the corneal collagen distribution after in vivo cross-linking with second harmonic microscopy. *BioMed Research International*. 2019;2019:3860498. doi: 10.1155/2019/3860498.

17. Subasinghe S.K., Ogbuehi K.C., Mitchell L., Dias G.J. Morphological alterations of the cornea following crosslinking treatment (CXL). *Clinical Anatomy*. 2021;34(6):859–866. doi: 10.1002/ca.23728.

18. Bikbov M.M., Khalimov A.R., Shevchuk N.E., Surkova V.K., Usubov E.L., Kazakbayeva G.M. Features of ultrastructural changes in corneal collagen in experimental animals after UV corneal crosslinking. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii = Modern technologies in ophthalmology*. 2022;5(45):171–177. (In Russ.) doi: 10.25276/2312-4911-2022-5-171-177.

19. Akhtar S., Bron A.J., Salvi S.M., Hawksworth N.R., Tuft S.J., Meek K.M. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. *Acta Ophthalmologica*. 2008;86(7):764–772. doi: 10.1111/j.1755-3768.2007.01142.x.

20. Almubrad T., Mencucci R., Smedowski A., Samivel R., Almutleb E., Alkanaa A. et al. Ultrastructural study of collagen fibrils, proteoglycans and lamellae of the cornea treated with iontophoresis – UVA cross-linking and hypotonic riboflavin solution.

Saudi Journal of Biological Sciences. 2021;28(12):7160–7174. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.019

21. Akhtar S., Smedowski A., Masmali A., Alkanaa A., Khan A.A., Almutleb E. et al. Effect of Ultraviolet-A and Riboflavin treatment on the architecture of the center and periphery of normal rat cornea: 7 days post treatment. *Experimental Eye Research*. 2022;219:109064. doi: 10.1016/j.exer.2022.109064.

22. Bradford S.M., Mikula E.R., Juhasz T., Brown D.J., Jester J.V. Collagen fiber crimping following *in vivo* UVA-induced corneal crosslinking. *Experimental Eye Research*. 2018;177:173–180. doi: 10.1016/j.exer.2018.08.009.

23. Tan H.Y., Chang Y.L., Lo W., Hsueh C.M., Chen W.L., Ghazaryan A.A. et al. Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked-treated corneas by Fourier transform-second harmonic generation imaging. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013;39(5):779–788. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.11.036

24. Bradford S., Luo S., Brown D., Juhasz T., Jester J. A review of the epithelial and stromal effects of corneal collagen crosslinking. *Ocular Surface*. 2023;30:150–159. doi: 10.1016/j.jtos.2023.09.003.

25. Xing H., Oyang H. Evaluation of corneal tissue changes after collagen cross-linking with ultraviolet and riboflavin A. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2022;68(5):72–76. doi: 10.14715/cmb/2022.68.5.9.

26. Song W., Wang Y., Qiao J., Li H., Rond B., Yang S. et al. The comparative safety of genipin versus UVA-riboflavin crosslinking of rabbit corneas. *Molecular Vision*. 2017;23:504–513.

27. Petroll W.M., Miron-Mendoza M., Sunkara Y., Ikebe H.R., Sripathi N.R., Hassaniardekani H. The impact of UV cross-linking on corneal stromal cell migration, differentiation and patterning. *Experimental Eye Research*. 2023;233:109523. doi: 10.1016/j.exer.2023.109523.

28. Vimalin J., Gupta N., Jambulingam M., Padmanabhan P., Madhavan H. The effect of riboflavin-UV-A treatment on corneal limbal epithelial cells-A study on human cadaver eyes. *Cornea*. 2012;31(9):1052–1059. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182498902.

29. Song X., Strachan T., Wang J., Langenbucher A., Seitz B., Szentmáry N. Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *BioMed Research International*. 2015;2015:254237. doi: 10.1155/2015/254237.

30. Bulirsch L.M., Weber C., Saßmannshausen M., Kohlhaas M., Holz F.G., Loeffler K.U. et al. Histological changes in keratoconus and wound healing after corneal cross-linking. *Ophthalmologie*. 2022;119(4):342–349. (In German) doi: 10.1007/s00347-021-01537-8.

31. Messmer E.M., Meyer P., Herwig M.C., Loeffler K.U., Schirra F., Seitz B. et al. Morphological and immunohistochemical changes after corneal cross-linking. *Cornea*. 2013;32(2):111–117. doi: 10.1097/ICO.0b013e31824d701b.

32. Mazzotta C., Traversi C., Caragiulo S., Rechichi M. Pulsed vs continuous light accelerated corneal collagen crosslinking: *in vivo* qualitative investigation by confocal microscopy and corneal OCT. *Eye (Lond)*. 2014;28(10):1179–1183. doi: 10.1038/eye.2014.163/

33. Sarkisova K.G. Combined crosslinking of corneal collagen in progressive keratoconus. Dissertation abstract of the Candidate of Medical Sciences. Moscow, 2023. 24 p. (In Russ.).

34. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Surnina Z.V., Averich V.V., Sarkisova K.G. Changes in corneal structure after corneal collagen crosslinking in keratoconus. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2022;16(6):226–233. (In Russ.) doi: 10.21518/2079-701X-2022-16-6-226-233.

35. Mazzotta C., Traversi C., Baiocchi S., Sergio P., Caporossi T., Caporossi A. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation. *European Journal of Ophthalmology*. 2006;16(4):530–535. doi: 10.1177/112067210601600405.

36. Jordan C., Patel D.V., Abeysekera N., McGhee C.N.J. *In vivo* confocal microscopy analyses of corneal microstructural changes in a prospective study of collagen cross-linking in keratoconus. *Ophthalmology*. 2014;121(2):469–474. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.09.014.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Мухаррам Мухтарамович Бикбов – доктор медицинских наук, профессор, директор, Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; eye@anrb.ru

Ахзат Рашидович Халимов – доктор биологических наук, заведующий научно-инновационным отделом, Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; azrakhal@yandex.ru

Наталья Евгеньевна Шевчук – доктор биологических наук, заместитель директора по науке, Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; ufaeyenauka@mail.ru

Гюлли Мухаррамовна Казакбаева – кандидат медицинских наук, заведующая отделом офтальмологической и медицинской эпидемиологии, Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; gyullibikbova@gmail.com

Лейсан Ильшатовна Гилемзянова – заведующая лабораторией экспериментальных исследований, Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; gileisan@gmail.com

Искандер Дамирович Валишин – врач-офтальмолог 1-го микрохирургического отделения, Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; iskander0796@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 24.11.2024; одобрена после рецензирования 20.12.2024; принята к публикации 06.05.2025.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Mukharram M. Bikbov – MD, Professor, Director, Ufa Scientific Research Institute of Eye Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; eye@anrb.ru

Akhzat R. Khalimov – Doctor of Biological Sciences, Head of the Scientific and Innovation Department, Ufa Scientific Research Institute of Eye Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; azrakhal@yandex.ru

Natalia E. Shevchuk – Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for Science, Ufa Scientific Research Institute of Eye Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; ufaeyenauka@mail.ru

Gulli M. Kazakbayeva – Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Ophthalmology and Medical Epidemiology, Ufa Scientific Research Institute of Eye Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; gyullibikbova@gmail.com

Leisan I. Gilemzyanova – Head of the Laboratory of Experimental Research, Ufa Scientific Research Institute of Eye Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; gileisan@gmail.com

Iskander D. Valishin – Ophthalmologist of the 1st Microsurgical Department, Ufa Scientific Research Institute of Eye Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; iskander0796@yandex.ru

The article was submitted 24.11.2024; approved after reviewing 20.12.2024; accepted for publication 06.05.2025.