



ВЛИЯНИЕ КРОССЛИНКИНГА С РИБОФЛАВИНОМ И УЛЬТРАФИОЛЕТОМ А (UVA) НА СТРУКТУРУ СКЛЕРАЛЬНОЙ ТКАНИ

© М.М. Бикбов, В.К. Суркова, Э.Л. Усубов, Н.А. Никитин, М.Н. Астрелин

ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней» Академии наук Республики Башкортостан, Уфа

Для цитирования: Офтальмологические ведомости. — 2017. — Т. 10. — № 2. — С. 6–12

Дата поступления: 28.12.2016

Статья принята к печати: 28.03.2017

✧ **Цель.** Оценить влияние кросслинкинга склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA) на структуру склеральной ткани в эксперименте *in vitro*. **Материал и методы.** Исследование проводили на 7 свиных глазах. Из каждого глазного яблока вырезали по два параллельных склеральных лоскута, один из которых подвергался процедуре кросслинкинга (инстилляцией 0,1 % водного раствора рибофлавина мононуклеотида в течение 20 минут, облучение ультрафиолетом А мощностью 3 мВт/см² в течение 30 минут), второй использовался в качестве контроля. Структуру склеры оценивали с помощью световой (окраска по Ван Гизону) и электронной микроскопии. Проводили морфометрический анализ фотоснимков гистологических препаратов с использованием специального программного обеспечения. **Результаты.** В результате кросслинкинга склеры с рибофлавином/UVA наблюдалось увеличение плотности упаковки коллагеновых волокон в среднем на 8,2 %, уменьшение площади межучного пространства — на 5,2 %, увеличение диаметра коллагеновых фибрилл — на 12 %. Патологических изменений структур склеры выявлено не было. **Вывод.** Полученные результаты подтверждают эффективность кросслинкинга склеры с рибофлавином/UVA в образовании дополнительных перекрёстных связей и безопасность процедуры для склеральной ткани.

✧ **Ключевые слова:** кросслинкинг склеры; световая микроскопия; электронная микроскопия; морфометрический анализ.

EFFECT OF CROSSLINKING WITH RIBOFLAVIN AND ULTRAVIOLET A (UVA) ON THE SCLERAL TISSUE STRUCTURE

© М.М. Bikbov, V.K. Surkova, E.L. Usubov, N.A. Nikitin, M.N. Astrelin

SBI “Ufa Eye Research Institute of Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan”, Ufa, Russia

For citation: Ophthalmology Journal, 2017;10(2):6-12

Received: 28.12.2016

Accepted: 28.03.2017

✧ **Purpose.** To evaluate the effect of the scleral crosslinking with riboflavin and ultraviolet A (UVA) on the scleral tissue structure *in vitro* experiments. **Material and methods.** The study was conducted on 7 porcine cadaver eyes. Two parallel scleral strips were excised from each eyeball, one of which was subjected to crosslinking procedure (instillation of 0.1% aqueous solution of riboflavin mononucleotide for 20 minutes, ultraviolet irradiation of 3 mW/cm² for 30 minutes), second was used as control. Scleral structure was evaluated by light (Van Gieson's stain) and electron microscopy. Morphometric analysis of the microphotographs was performed using special software. **Results.** As a result of crosslinking, the average packing density of collagen fibers increased by 8.2%, the area of the intermediate space decreased by 5.2%, the average diameter of collagen fibrils increased by 12%. There were no pathological changes in scleral structures. **Conclusion.** Obtained results confirm the

efficacy of scleral crosslinking with riboflavin/UVA in the formation of additional crosslinks, and the procedure safety for the scleral tissue.

✧ **Keywords:** scleral crosslinking; light microscopy; electron microscopy; morphometric analysis.

Миопия является одной из основных причин снижения зрения во всём мире — данным заболеванием страдают около 1 миллиарда человек [10, 11]. Прогрессирование миопии наблюдается примерно в 50 % случаев и до сих пор остаётся нерешённой проблемой офтальмологии [6]. Ряд учёных считают, что кросслинкинг склеры может стать новым эффективным методом лечения прогрессирующей близорукости, в основе патогенеза которой лежит снижение биомеханической прочности склеральной ткани [7, 13, 16]. Кросслинкинг — это образование химических связей между макромолекулами, которое, как правило, делает материал прочнее [1, 17]. Более 10 лет кросслинкинг роговицы с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA) успешно применяется для лечения кератэктазий, повышая прочность ослабленной роговичной ткани и тем самым препятствуя прогрессированию заболевания [2, 5]. В настоящее время имеются исследования, описывающие улучшение биомеханических параметров склеры в результате фотохимического кросслинкинга [3, 9, 14, 18]. Однако лишь единичные работы посвящены гистологическим изменениям, происходящим в непрозрачной части фиброзной оболочки глаза после данной процедуры [7, 8, 15]. Поэтому актуальным является изучение морфологических изменений склеры под влиянием фотохимического кросслинкинга.

Цель — оценить влияние кросслинкинга склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А на структуру склеральной ткани в эксперименте *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов склеральной ткани. Для экспериментов были использованы 7 свиных глаз (не более 3 часов после забоя). Материал для исследования доставляли в лабораторию в течение 30–40 минут после взятия в термосумке для транспортировки биологических материалов (4 °С) и помещали в холодильник. Общее время хранения не превышало 6 часов.

Глазные яблоки полностью освобождали от прилежащих мягких тканей. С помощью скальпеля и хирургических ножниц на каждом глазу в сагитальном направлении, начиная в 2 мм от лимба, выкраивали по два параллельных склеральных лоскута прямоугольной формы размером 4 × 10 мм.

Один из образцов склеры каждого глазного яблока подвергался процедуре кросслинкинга (опытная группа), второй парный образец оставался интактным (контрольная группа).

Процедура кросслинкинга. Склеральные образцы из опытной группы укладывали на предметное стекло наружной поверхностью кверху, насыщали 0,1 % водным раствором рибофлавина-мононуклеотида путём инстилляции в течение 20 минут. Облучение склеры ультрафиолетом А (длина волны 370 нм, мощность 3 мВт/см²) осуществляли с применением офтальмологического аппарата для УФ-кросслинкинга «УФалинк» (Россия) в течение 30 минут, дополнительно инстиллируя раствор фотосенсибилизатора каждые 5 минут на облучаемую поверхность.

С помощью световой микроскопии изучали склеральные образцы из 4 глазных яблок (8 образцов), с помощью электронной — из 3 глазных яблок (6 образцов).

Световая микроскопия. Склеральные лоскуты фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 48 часов. После проводки через спирты образцы заливали в парафин. Затем готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали их пикрофуксином по Ван Гизону. Визуальный анализ препаратов выполняли на световом микроскопе AxioStar Plus (Carl Zeiss) при различных увеличениях. Морфометрические измерения производили с помощью медицинской компьютерной видеосистемы, состоящей из микроскопа AxioStar Plus (Carl Zeiss), цифровой фотокамеры Jenoptik ProgRes C10 и персонального компьютера Pentium-IV с программным обеспечением «ВидеоТест Морфология». В программе осуществлялся автоматический подсчёт размеров (в пикселях) структур склеры, окрашенных в разные цвета — коллагеновых волокон, ядер склероцитов, межуточного пространства. Практическое значение имели выводимые программой данные об относительной площади структур склеры (в процентах от общей площади снимка) (рис. 1).

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования образцы склеры фиксировали в 2 % растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере Миллона (рН 7,2–7,4) с дофиксацией в 1 % раство-

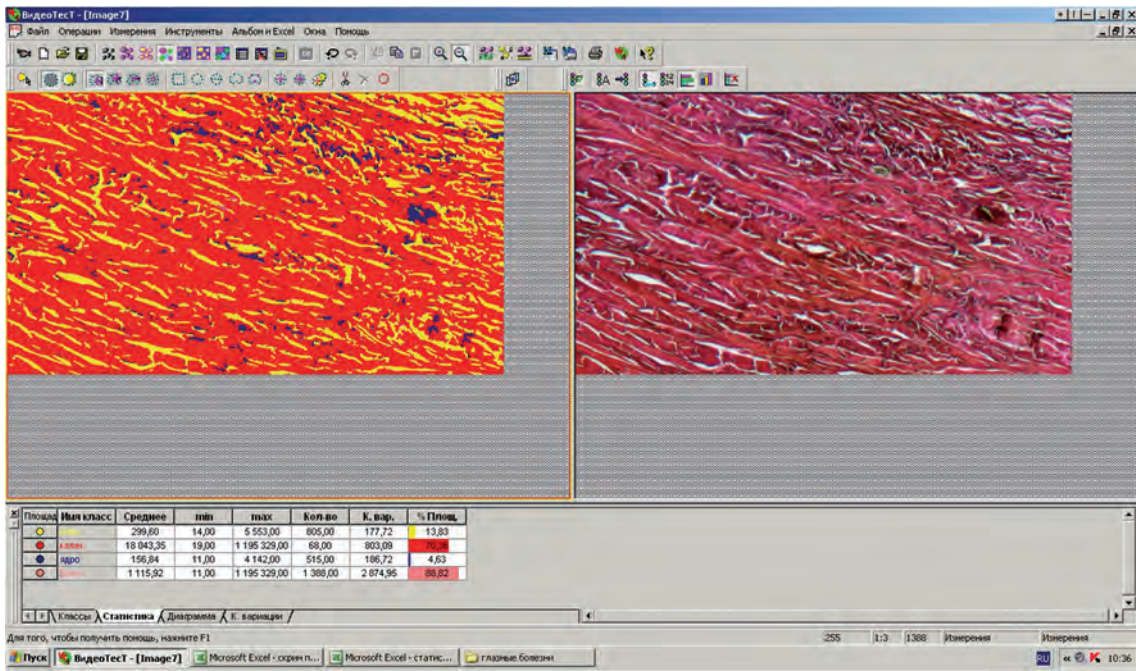


Рис. 1. Морфометрические измерения фотоснимков гистологических срезов склеры в программе «ВидеоТест Морфология»
 Fig. 1. Morphometric measurements of scleral histological sections photographs with the “VideoTesT Morphology” software

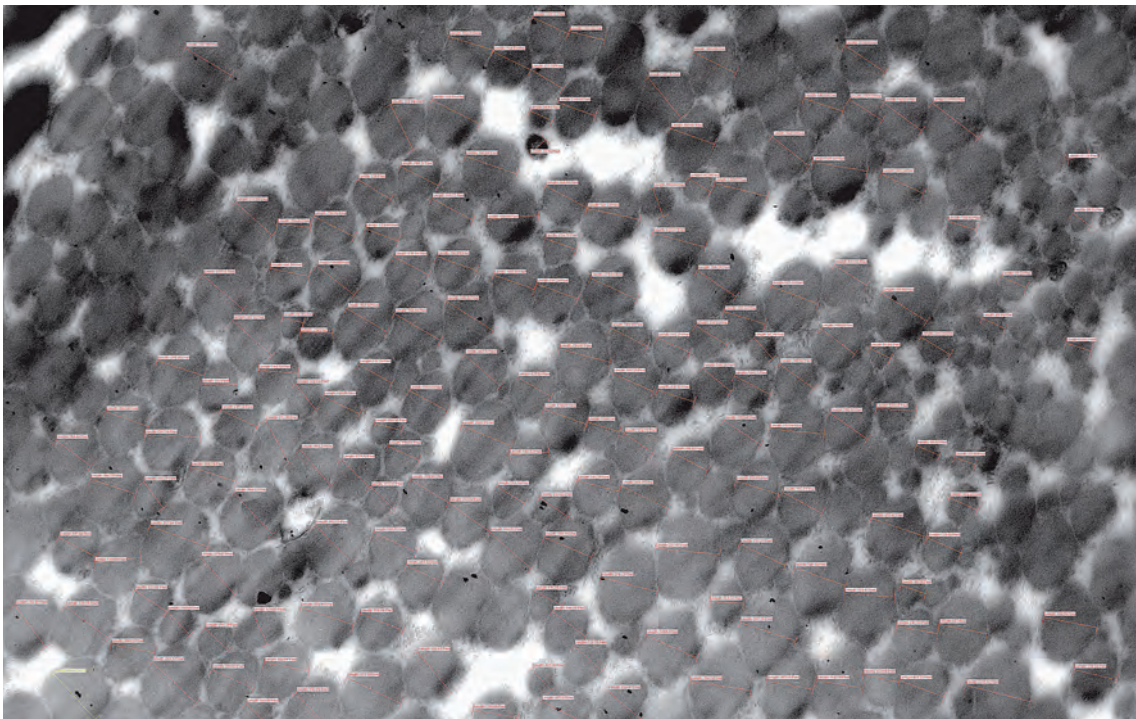


Рис. 2. Измерение диаметра коллагеновых фибрилл в программе Olympus iTEM
 Fig. 2. Collagen fibrils diameter measurement with the Olympus iTEM software

ре оксида осмия на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике [4]. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме ЛКВ-III 8800 (Швеция), контрастировали 2 % водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу, изучали и фотографировали на электронном транс-

миссионном микроскопе Jem-1011 (JEOL Ltd., Япония) при увеличениях от 5000 до 20000. Сравнительный анализ диаметра коллагеновых фибрилл осуществляли с использованием фотографических изображений (увеличение $\times 10\,000$) при помощи программного обеспечения Olympus iTEM для анализа электронограмм (рис. 2).

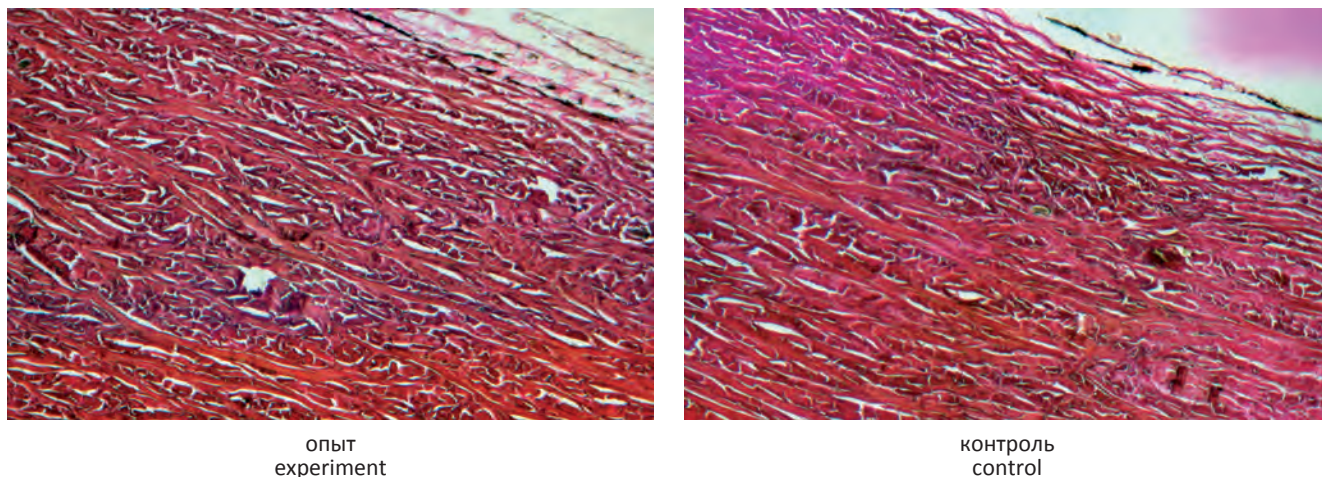


Рис. 3. Гистологический срез склеральных образцов опытной и контрольной групп. Окраска по Ван Гизону, увеличение $\times 100$
Fig. 3. Histological section of scleral samples from experimental and control groups. Van Gieson staining, magnification $\times 100$

РЕЗУЛЬТАТЫ

При световой микроскопии на фотоснимках гистологических препаратов склеры опытной и контрольной групп визуализировались коллагеновые волокна ярко-красного цвета и ядра склероцитов чёрного цвета. Признаков патологических изменений структур склеры в результате кросслинкинга не наблюдалось (рис. 3).

Морфометрический анализ фотоснимков гистологических препаратов отражает сравнение

относительных площадей коллагеновых волокон и межучного пространства в основной и контрольной группах и таким образом позволяет судить о влиянии кросслинкинга на плотность упаковки склеральной ткани (табл. 1, 2).

Таким образом, после кросслинкинга склеры с рибофлавином/UVA наблюдали увеличение плотности упаковки коллагеновых волокон в среднем на 8,2 % и уменьшение площади межучного пространства в среднем на 5,2 %.

Таблица 1

Сравнение относительной площади (% от общей площади) коллагеновых волокон в опытной и контрольной группах

Table 1

Comparison of the collagen fibers relative area (% of the total area) in the experimental and control groups

Глаз	Опыт, %	Контроль, %	Увеличение относительной площади коллагеновых волокон в опытных образцах по сравнению с контрольными, %
1	66,63	59,01	7,62
2	70,36	57,97	12,39
3	66,57	64,73	1,84
4	71,76	60,95	10,81
Среднее значение	68,83	60,67	8,17

Таблица 2

Сравнение относительной площади (% от общей площади) межучного пространства в опытной и контрольной группах

Table 2

Comparison of the interstitial space relative area (% of the total area) in the experimental and control groups

Глаз	Опыт, %	Контроль, %	Уменьшение относительной площади межучного пространства в опытных образцах по сравнению с контрольными, %
1	10,96	16,02	5,06
2	13,83	17,89	4,06
3	10,97	17,32	6,35
4	8,96	14,24	5,28
Среднее значение	11,18	16,37	5,19

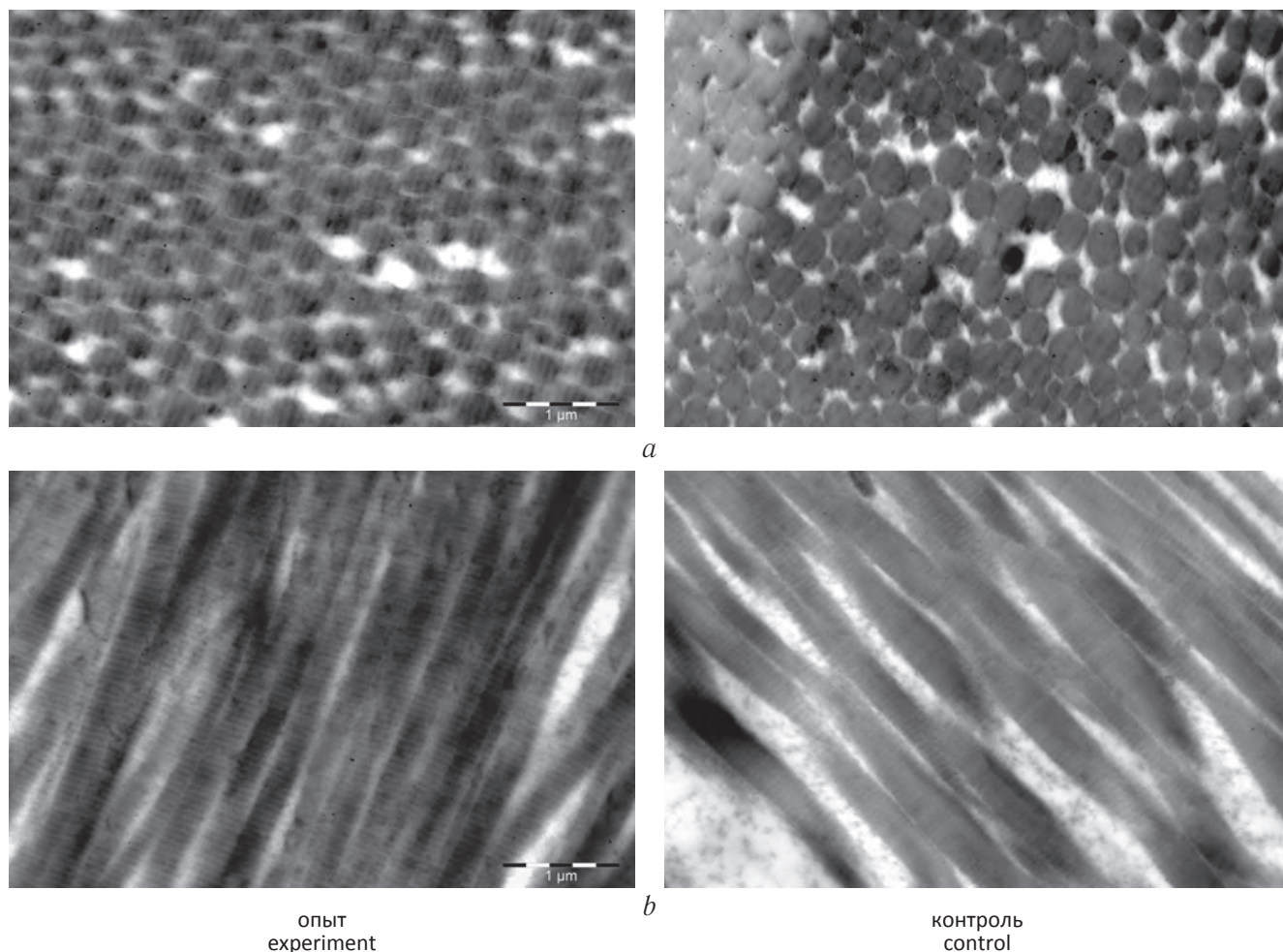


Рис. 4. Пучки коллагеновых фибрилл опытной и контрольной групп при поперечном (а) и продольном (б) срезах (ув. ×10000)

Fig. 4. Collagen fibrils bunches' transversal (a) and longitudinal (b) sections from experimental and control groups (magnification ×10,000)

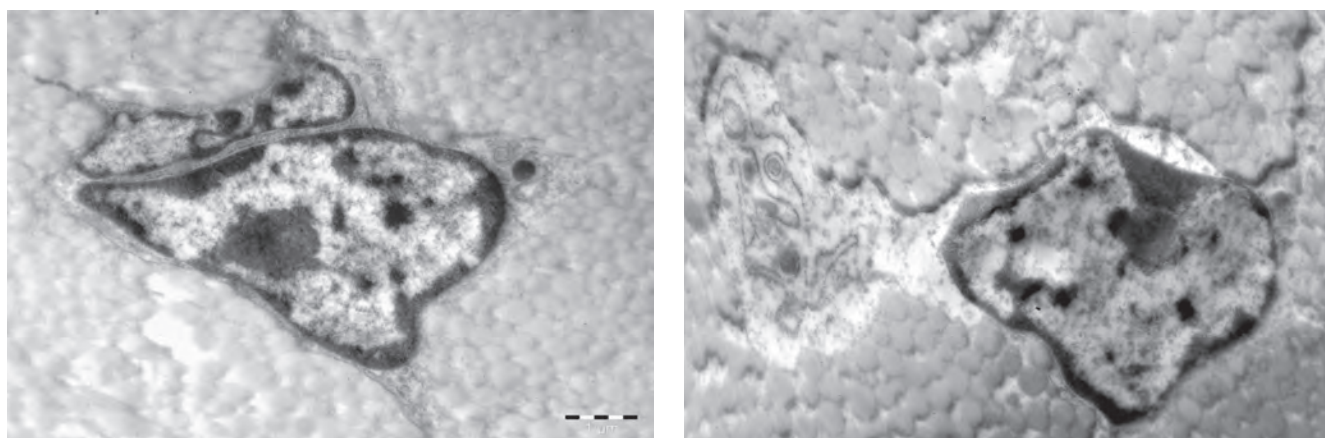


Рис. 5. Склероциты опытной и контрольной групп (ув. ×10000)

Fig. 5. Sclerocytes from experimental and control groups (magnification ×10,000)

Электронно-микроскопические исследования в обеих группах показали наличие регулярно чередующихся фибрилл (рис. 4), формирующих коллагеновые волокна. В самих фибриллах прослеживалась характерная поперечная исчерченность с чёткой периодичностью. Патологических

изменений волокнистых структур склеры в обеих группах выявлено не было.

Проводилась оценка состояния клеток склеры — склероцитов. Было показано, что они сохраняют свою структурную целостность без повреждения стенки (рис. 5). Выделялись склероциты с отростками не-

Таблица 3

Сравнение среднего диаметра коллагеновых фибрилл опытных и парных контрольных образцов склеры

Table 3

Comparison of the collagen fibrils mean diameter in the scleral samples from experimental eye and contralateral control eye

Глаз	Опытный образец (pixel)	Контрольный образец (pixel)
1	177,09	152,95
2	186,00	168,33
3	192,86	175,05
Среднее значение	185,32 (112 %)	165,44 (100 %)

правильной вытянутой формы, в которых визуализировались сохраненные ядра, органоиды, цитоплазма.

Количественный анализ электронограмм показал, что в результате кросслинкинга с рибофлавином/UVA происходит увеличение диаметра коллагеновых фибрилл в среднем на 12 % (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы изучили влияние кросслинкинга с рибофлавином/UVA на структуру склеры с помощью световой и электронной микроскопии. Каких-либо патологических изменений склеральной ткани по сравнению с контролем выявлено не было. Вместе с тем наблюдались компактизация коллагеновых волокон и увеличение диаметра фибрилл склеры. Полученные данные согласуются с результатами других авторов. Так, G. Wollensak et al. (2005) с помощью электронной микроскопии наблюдали признаки повреждения в результате кросслинкинга лишь единичных склероцитов, без патологических изменений в волокнах склеры. В связи с этим учёные сделали вывод о высокой устойчивости склеральной ткани к повреждающему воздействию ультрафиолетового излучения [15]. S. Choi et al. на электронограммах зафиксировали увеличение диаметра коллагеновых фибрилл склеры на 27 % под воздействием кросслинкинга [7]. G.-V. Jung et al. (2011) наблюдали более плотное расположение коллагеновых волокон после процедуры по данным световой микроскопии. Однако их исследование выполнено лишь на 1 трупном глазу и оценка плотности волокон проведена субъективно, без морфометрического анализа [8].

Данные литературы и результаты нашего исследования свидетельствуют об относительно высокой устойчивости склеральной ткани к повреждающему воздействию ультрафиолетового излучения. Увеличение диаметра коллагеновых фибрилл и более плотное расположение волокон склеры в результате кросслинкинга связаны с образованием дополнительных перекрёстных

связей, которые отталкивают макромолекулы коллагена друг от друга [8, 12].

ВЫВОД

В результате кросслинкинга склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А наблюдается увеличение плотности упаковки коллагеновых волокон в среднем на 8,2 %, уменьшение площади межучточного пространства — на 5,2 %, увеличение диаметра коллагеновых фибрилл — на 12 %. Полученные данные подтверждают образование дополнительных перекрёстных связей между макромолекулами склеры. Патологических изменений клеток и волокон фиброзной оболочки глаза в результате ультрафиолетового облучения в присутствии фотосенсибилизатора не наблюдалось, что свидетельствует о безопасности процедуры для склеральной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение). — М.: Офтальмология, 2011. — 164 с., ил. [Bikbov MM, Bikbova GM. Jektazii rogovicy (patogenez, patomorfologija, klinika, diagnostika, lechenie). Moscow: Oftal'mologija; 2011. 164 p. (In Russ.)]
2. 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. [Bikbov MM, Bikbova GM, Surkova VK, Zajnullina NB. Klinicheskie rezultaty lechenija keratokonusa metodom transjepitelial'nogo krosslinkinga rogovichnogo kollagena. *Oftal'mologija*. 2016;13(1):4-9. (In Russ.)]
3. 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. [Bikbov MM, Surkova VK, Usubov EL, Astrelin MN. Krosslinking sklery s riboflavinom i ul'trafiol'etom A (UVA). *Obzor literatury. Oftal'mologija*. 2015;12(4):4-8. (In Russ.)]
4. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. Пер. с англ. — М: Мир, 1975. — 324 с. [Uikli B. *Jelektronnaja mikroskopija dlja nachinajushhih*. Moscow: Mir; 1975. 324 p. (In Russ.)]

5. Bikbova G, Bikbov M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta Ophthalmologica*. 2014;92(1):30-34. doi: 10.1111/aos.12235.
6. Bullimore MA, Jones LA, Moeschberger ML, et al. A retrospective study of myopia progression in adult contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(7):2110-2113.
7. Choi S, Lee S-C, Lee H-J, Cheong Y, 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;28(5):1289-1296. doi: 10.1007/s10103-012-1237-6.
8. Jung G-B, Lee H-J, Kim J-H, et al. Effect of cross-linking with riboflavin and ultraviolet A on the chemical bonds and ultrastructure of human sclera. *J Biomed Opt*. 2011;16(12):125004. doi: 10.1117/1.3662458.
9. Liu T-X, Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin. *Acta Ophthalmol*. 2013;91(4):253-257. doi: 10.1111/aos.12172.
10. Pan CW, Ramamurthy D, Saw SM. Worldwide prevalence and risk factors for myopia. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2012;32(1):3-16. doi: 10.1111/j.1475-1313.2011.00884.x.
11. Rada JAS, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia. *Exp Eye Res*. 2006;82(2):185-200. doi: 10.1016/j.exer.2005.08.009.
12. Tanaka S, Eikenberry EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol*. 1988;203(2):495-505. doi: 10.1016/0022-2836(88)90015-0.
13. 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;28(10):723-728. doi: 10.3928/1081597X-20120921-08.
14. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Ophthalmol*. 2009;87(2):193-198. doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01229.x.
15. Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, et al. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005;83(4):477-482. doi: 10.1111/j.1600-0420.2005.00447.x.
16. Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *J Cataract Refract Surg*. 2004;30(3):689-695. doi: 10.1016/j.jcrs.2003.11.032.
17. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):620-627. doi: 10.1016/S0002-9394(02)02220-1.
18. 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;39(8):1184-1189. doi: 10.1016/j.jcrs.2013.02.055.

Сведения об авторах:

Мухаррам Мухтарамович Бикбов — д-р мед. наук, профессор, директор. ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН Республики Башкортостан, Уфа. E-mail: eye@anrb.ru.

Валентина Константиновна Суркова — д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения хирургии роговицы и хрусталика. ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН Республики Башкортостан, Уфа. E-mail: ufaeyenauka@mail.ru.

Эмин Логманович Усубов — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения хирургии роговицы и хрусталика. ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН Республики Башкортостан, Уфа. E-mail: emines.us@inbox.ru.

Николай Александрович Никитин — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения хирургии роговицы и хрусталика. ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН Республики Башкортостан, Уфа. E-mail: nic@ufanet.ru.

Михаил Николаевич Астрелин — научный сотрудник отделения хирургии роговицы и хрусталика. ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН Республики Башкортостан, Уфа. E-mail: astrelin87@yandex.ru.

Information about the authors:

Mukharram M. Bikbov — DMedSc, professor, director. Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia. E-mail: eye@anrb.ru.

Valentina K. Surkova — DMedSc, professor, leading scientific researcher of the Department of the cornea and lens surgery. Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia. E-mail: ufaeyenauka@mail.ru.

Emin L. Usubov — PhD, leading scientific researcher of the Department of the cornea and lens surgery. Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia. E-mail: emines.us@inbox.ru.

Nikolaj A. Nikitin — PhD, leading scientific researcher of the Department of the cornea and lens surgery. Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia. E-mail: nic@ufanet.ru.

Mikhail Nikolaevich Astrelin — scientific researcher of the Department of the cornea and lens surgery. Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia. E-mail: astrelin87@yandex.ru.