

РЕЗУЛЬТАТЫ *EX VIVO* ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ РИБОФЛАВИН-УФ-А ИНДУЦИРОВАННОГО СШИВАНИЯ КОЛЛАГЕНА ТОНКИХ РОГОВИЦ

А. Р. Халимов^{1, 2}, В. А. Катаев², Г. А. Дроздова³, Г. М. Казакбаева¹, Р. А. Халиков²

В экспериментах *ex vivo* на глазах свиней исследована эффективность корнеального насыщения рибофлавином ткани роговицы посредством инстилляций растворов для ультрафиолетового кросслинkingа коллагена. Изучено влияние растворов на толщину роговицы. Предложено офтальмологическое средство, содержащее рибофлавин и хитозана сукцинат, для рибофлавин-УФ-А индуцированного сшивания коллагена тонких роговиц.

Ключевые слова: рибофлавин; УФ-кросслинking; кератоконус; хитозан; роговица.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время УФ (ультрафиолетовый) кросслинking — рибофлавин-УФ-А индуцированная фототерапевтическая процедура сшивания коллагеновых фибрилл роговицы глаза — получила широкое распространение и стала одним из основных методов лечения кератэктазий на начальных стадиях заболевания. Стандартная техника кросслинkingа, согласно Дрезденскому протоколу (2003), предполагает, наряду с УФ-А корнеальным облучением мощностью 3 мВт/см² длиной волны 370 нм, использование раствора 0,1 % рибофлавина мононуклеотида (далее рибофлавина) [11]. Несколько позже был предложен 0,1 % рибофлавин с 20 % декстраном молекулярной массой 450 – 550 кДа. Основная роль, которая отводится рибофлавиному при перекрестном сшивании коллагена, определяется его способностью повышать чувствительность тканей роговицы к действию УФ-излучения и индуцировать фотохимические взаимодействия. При этом рибофлавин, поглощая энергию УФ-излучения, оказывает протективное действие на внутриглазные структуры [1, 4, 8]. Соответственно эффективность и безопасность кросслинkingа будет зависеть от степени насыщения роговицы рибофлавином перед началом облучения. Поэтому для облегчения диффузии рибофлавина в строму прибегают к удалению роговичного эпителия.

Многочисленными исследованиями показана целесообразность введения декстрана в состав глазного раствора для насыщения роговицы рибофлавином, который оказывает выраженное противоотечное действие на стромальные ткани, что в целом является положительным фактом в постоперационном периоде [1]. Однако в ряде случаев, в частности, при исходно тон-

кой роговице, обезвоживающее действие полимера является нежелательным и приводит к дополнительному истончению стромы. Снижение корнеальной толщины на фоне декстрана может достигать 15 – 20 % или 50 – 80 мкм [7, 9, 10].

Внедрение новых эффективных средств и способов насыщения стромы роговицы рибофлавином, с учетом особенностей ее состояния, представляет особую значимость для качественного выполнения ультрафиолетового кросслинkingа.

Цель исследования — изучить эффективность модифицированного раствора для рибофлавин-УФ-А индуцированного сшивания коллагена тонких роговиц в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели нами предложен раствор для УФ-кросслинkingа, содержащий 0,1 % рибофлавина мононуклеотид и 1,0 % хитозана сукцинат на буферной изотонической основе [3].

Эксперименты *ex vivo* проводили в 3 группах на 45 энуклеированных (не более 3 ч после изъятия) глазах свиней (по 15 глаз в каждой): в 1-й опытной группе насыщение выполняли предлагаемым раствором (Уфимский НИИ глазных болезней, Россия), во 2-й группе — 0,1 % рибофлавином (Уфимский НИИ глазных болезней, Россия) в растворе 0,9 % хлорида натрия (контроль), в 3-й — 0,1 % рибофлавином с 20 % декстраном (рег. удостоверение № ФСР 2010/09071, Уфимский НИИ глазных болезней, Россия) [2]. Для исследований проводили дезэпителизацию (7 – 9 мм) центральной части роговицы глазного яблока. Содержание рибофлавина мононуклеотида в роговицах устанавливали непосредственно после насыщения стромы в течение 1, 2, 5, 15, 30, 45 и 60 мин посредством инстилляций (закапываний) исследуемых растворов на поверхность роговицы с частотой 1 капля/мин.

Количественное определение рибофлавина мононуклеотида в роговице выполняли после замораживания образцов сразу после насыщения, избегая их пребывания на свету. Точную навеску 0,1 – 0,2 г корнеаль-

¹ ГБУ “Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ”, Россия, 450008, Уфа, ул. Пушкина, 90.

² ФГБОУ ВО “Башкирский государственный медицинский университет” МЗ РФ, Россия, 450000, Уфа, ул. Ленина, 3.

³ ФГАОУ ВО “Российский университет дружбы народов” Минобрнауки, Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

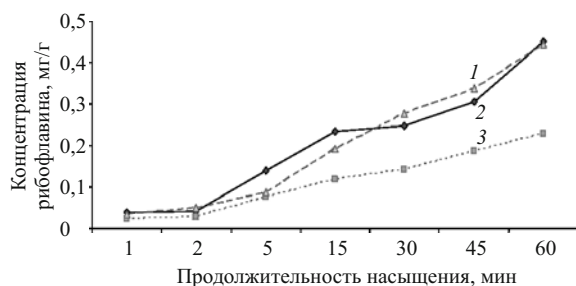


Рис. 1. Динамика концентрации рибофлавина в роговице свиней при применении растворов для корнеального насыщения.

По оси абсцисс — продолжительность инстилляций (мин), по оси ординат — концентрация рибофлавина в корнеальной ткани (мг/г): 1 — 1-я группа (раствор 0,1 % рибофлавина с 1 % хитозаном); 2 — 2-я группа (изоосмотический раствор 0,1 % рибофлавина); 3 — 3-я группа (раствор 0,1 % рибофлавина с 20 % декстраном).

ной ткани аккуратно разрезали на мелкие кусочки с помощью ножниц, помещали в ступку, куда добавляли пипеткой 2,5 мл раствора уксусной кислоты (0,5 мл уксусной кислоты ледяной разводили водой в мерной колбе до 250 мл) и растирали с измельченным стеклом. Прибавляли пипеткой 2,25 мл 0,1 М раствора натрия ацетата, снова тщательно растирали. Отбирали шприцем жидкую фазу и фильтровали в кювету, используя шприцевую насадку PTFE с диаметром пор 0,45 мкм. Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-56 (“ОКБ Спектр”, Россия) при 445 нм (по методике ФСП 42-7969-06). Раствор сравнения — вода.

Содержание рибофлавина мононуклеотида в мг/г рассчитывали по формуле:

$$X, \text{ мг/г} = \frac{D \cdot (4,75 + a) \cdot 1,2709 \cdot 1000}{a \cdot 323 \cdot 100} = \frac{D \cdot (4,75 + a)}{a \cdot 25,415},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора; 323 — удельный показатель поглощения $E_{\text{см}}^{1\%}$ рибофлавина при длине волны 445 нм; 1,2709 — коэффициент пересчета рибофлавина в рибофлавин-мононуклеотид; 4,75 — объем растворителя (2,5 + 2,25 мл); 100, 1000 — коэффициенты пересчета концентрации; мг/г; a — навеска ткани роговицы, г.

Измерение толщины роговицы выполняли с помощью контактного пахиметра ТОМЕУ (Япония).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Statistika 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика концентрации рибофлавина в роговице свиней во время всего периода наблюдений характеризовалась непрерывным ростом содержания фотосенсибилизатора в исследуемых группах (рис. 1). Через 5 мин диффузии растворов уровень рибофлавина в корнеальной ткани в группе 1 составил $(0,0084 \pm 0,0005)$ мг/г, в контроле: с рибофлавином — $(0,0140 \pm$

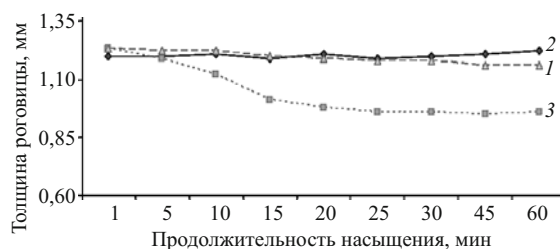


Рис. 2. Динамика изменений толщины роговицы свиней при использовании растворов для корнеального насыщения.

По оси абсцисс — продолжительность насыщения стромы (мин), по оси ординат — толщина роговицы (мм): 1 — 1-я группа (раствор 0,1 % рибофлавина с 1 % хитозаном); 2 — 2-я группа (изоосмотический раствор 0,1 % рибофлавина); 3 — 3-я группа (раствор 0,1 % рибофлавина с 20 % декстраном).

0,002) мг/г (2 группа), с рибофлавином/декстраном — $(0,0076 \pm 0,0003)$ мг/г (3 группа).

Продолжительность процедуры стандартного УФ кросслинкинга составляет 45 – 60 мин, из которых 15 – 30 мин требуется для диффузии фотосенсибилизатора и последующие 30 мин для УФ облучения при мощности 3 мВт/см² с продолжающимися инстилляциями раствора рибофлавина [11]. Диапазон концентраций интрастромального рибофлавина в интервале от 15 до 45 мин составил для раствора рибофлавина — от $(0,0234 \pm 0,0015)$ до $(0,0304 \pm 0,0004)$ мг/г, для рибофлавина/декстрана — от $(0,0117 \pm 0,0016)$ до $(0,0188 \pm 0,0003)$ мг/г, в то время как для рибофлавина/хитозана — от $(0,0191 \pm 0,0006)$ до $(0,0328 \pm 0,0033)$ мг/г.

Из рис. 1 видно, что изотонический водный раствор рибофлавина гораздо эффективнее проникает в интракорнеальные ткани и обнаруживается в роговице в значительно больших количествах, чем при использовании раствора рибофлавин/декстран. Однако следует отметить, что водный раствор рибофлавина требует гораздо большего количества инстилляций, в отличие от растворов с полимерами, образующими устойчивое окулярное “покрытие”. По данным [12] для качественного выполнения процедуры большое значение имеет стабильность прекорнеальной рибофлавиновой пленки, которая для водного раствора рибофлавина составляет 1,5 мин, а для раствора рибофлавин/декстран — 22 мин. При этом защитное действие оказывает не только фотосенсибилизатор, который диффундировал в строму, но и рибофлавин на поверхности роговицы, способный поглощать до 1/4 энергии УФ-излучения, являющийся неотъемлемой частью системы безопасности кросслинкинга [12].

Рибофлавин/хитозан по своей проникающей способности и интракорнеальной концентрации рибофлавина аналогичен изоосмотическому водному раствору фотосенсибилизатора и значительно превосходит систему рибофлавин/декстран, что, вероятно, обусловлено физико-химическими свойствами полимеров, входящих в состав указанных средств.

При использовании рибофлавина/хитозана и изотонического раствора рибофлавина корнеальная толщина практически не изменилась, что является положительным свойством для патологически истонченной, дезэпителизированной роговицы, тогда как в группе рибофлавин/декстран наблюдали уменьшение толщины роговицы с $(1,22 \pm 0,06)$ мм до $(0,94 \pm 0,08)$ мм, вследствие обезвоживающего действия полимера (рис. 2). Эта особенность рибофлавина/декстрана, приводящая к уменьшению толщины (на 15 – 20 %) и уплотнению роговицы, вероятно, является одной из причин более низкого содержания рибофлавина в роговице животных 3 группы, вызванного как затруднением стромального транспорта гидрофильного рибофлавина мононуклеотида, так и снижением корнеальной емкости.

По данным [5] стромальное истончение, связанное с обезвоживающим действием декстрана, приводит к увеличению светопропускающей способности роговицы, которое следует учитывать при проведении УФ-кросслинкинга тонких роговиц [5]. Представленные результаты исследований согласуются с ранее полученными данными по изучению содержания рибофлавина во влаге передней камеры кроликов, где продемонстрированы сходная динамика и продолжительное действие раствора рибофлавина с хитозаном [6].

С высокой долей достоверности можно провести экстраполяцию полученных результатов на роговицу человека. Тем более, что при насыщении рибофлавином величина коэффициента абсорбции роговицы человека выше, чем роговицы свиней, несмотря на значительно большую толщину последней [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что раствор 0,1 % рибофлавина с 1 % хитоза-

ном в эксперименте *ex vivo* эффективно насыщает строму дезэпителизированной роговицы, не снижая её толщины, и после проведения соответствующих испытаний может быть предложен в качестве безопасного и эффективного средства для УФ-сшивания роговичного коллагена при эктатических заболеваниях у пациентов с тонкими (около 400 мкм) роговицами.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. М. Бикбов, Г. М. Бикбова, *Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение)*, Наука, Москва (2011).
2. М. М. Бикбов, А. Р. Халимов, Г. М. Бикбова, Патент RU 2412707 (2011).
3. М. М. Бикбов, А. Р. Халимов, Г. М. Бикбова, Патент RU 2475248 (2013).
4. М. М. Бикбов, А. Р. Халимов, Э. Л. Усубов, *Вестник Рос. акад. мед. наук*, **71**(3), 224 – 232 (2016).
5. М. М. Бикбов, А. Р. Халимов, Н. Е. Шевчук и др., *Научно-практич. ж. "Точка зрения. Восток-Запад"*, № 1, 38 – 39 (2015).
6. А. Р. Халимов, М. М. Бикбов, Н. Е. Шевчук и др., *"Вестн. волгоградского гос. мед. университета"*, № 4, 195 – 198 (2013).
7. J. M. Bueno, E. J. Gualda, A. Giakoumaki, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**(8), 5325 – 5331 (2011).
8. I. M. Cheung, C. N. McGhee, T. Sherwin, *Clin. Exp. Optom.*, **97**(4), 349 – 355 (2014).
9. S. Kling, L. Remon, A. Pérez-Escudero, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**(8), 3961 – 3968 (2010).
10. C. Mazzotta, S. Caragiuli, *Am. J. Ophthalmol.*, **157**(6), 1156 – 1162 (2014).
11. G. Wollensak, E. Spoerl, T. Seiler, *Am. J. Ophthalmol.*, **135**(5), 620 – 627 (2003).
12. G. Wollensak, H. Aurich, C. Wirbelauer, et al., *J. Cataract. Refract. Surg.*, **36**(1), 114 – 120 (2010).

Поступила 20.01.17

RESULTS OF EX VIVO INVESTIGATION OF NEW OPHTHALMIC SOLUTION FOR RIBOFLAVIN-UV-ABSORBANCE INDUCED CROSS-LINKING OF THIN CORNEAS

A. R. Khalimov¹, V. A. Kataev², G. A. Drozdova³, G. M. Kazakbaeva¹, and R. A. Khalikov²

¹ Ufa Eye Research Institute, Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Ufa, ul. Pushkina 90, Ufa, Bashkortostan, 450008 Russia

² Bashkir State Medical University, ul. Lenina 3, Ufa, Bashkortostan, 450000 Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

The effectiveness of corneal riboflavin saturation through instillation of solutions for UV cross-linking was studied in *ex vivo* experiments on porcine eyes. In addition, the effect of solutions on the cornea thickness was studied and a new ophthalmological agent containing riboflavin and chitosan succinate for UV absorbance-induced collagen cross-linking of thin corneas was proposed.

Keywords: riboflavin; UV-absorbance-induced cross-linking; keratoconus; chitosan; cornea.