ISSN 1816-5095 (print); ISSN 2500-0845 (online) https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-4-802-808 поступила 13.08.24 was received 13.08.24

Сравнительная характеристика результатов конфокальной микроскопии роговицы после УФ-А-кросслинкинга с использованием различных растворов рибофлавина в эксперименте



М.М. Бикбов





А.Р. Халимов



Э.Л. Усубов





И.Д. Валишин

Л.И. Гилемзянова

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация

# **РЕЗЮМЕ**

## Офтальмология. 2024;21(4):802-808

УФ-кросслинкинг роговицы (CXL) стал наиболее распространенным методом лечения кератэктазий. К настоящему времени Дрезденский протокол (G. Wollensak и соавт., 2003) получил много модификаций в части изменения средств или способов выполнения процедуры. В данной статье представлены результаты прижизненного изучения морфологических изменений роговицы кроликов после CXL с использованием растворов рибофлавина различного состава. Цель: сравнить методом конфокальной микроскопии влияние CXL на морфологическую структуру роговицы экспериментальных животных при использовании рибофлавина на основе физраствора, декстрана и гидроксипропилметилцеллюлозы. Материал и методы. Исследование выполнено на 20 глазах 15 кроликов, которым проводили стандартный СХL с 0,1% рибофлавином в трех группах: в первой в качестве основы раствора использовали 0,9 % раствор хлорида натрия, во второй — 20 % декстран, в третьей — 1,0 % гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ). Режим облучения роговицы: З мВт/см², ЗО минут, длина волны З7О нм. Оценку состояния роговицы осуществляли на 3, 7, 14, 30 и 90-е сутки после СХL. Всем животным выполняли биомикроскопию и конфокальную микроскопию (Heidelberg Retinal Tomographer HRT-III («Heidelberg Engineering», Германия)). Производили подсчет плотности кератоцитов на глубине 120–160 мкм в центральной зоне роговицы на площади 1 мм<sup>2</sup>. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.1 и Excel 2010. Результаты. Результаты биомикроскопии и конфокальной микроскопии роговицы кроликов *in vivo* показали наличие послеоперационных изменений эпителия и стромы после проведенного СХL. Во всех группах на 7-е сутки после процедуры отмечали снижение плотности кератоцитов вследствие их апоптоза, преимущественно в передних слоях стромы. Количество кератоцитов после СХL в 1-й группе составило 192,5 ± 29,8, во 2-й — 227,4 ± 38,2, в 3-й — 204,4 ± 32,6 клеток/мм<sup>2</sup> против интактного контроля 352,8 ± 35,2 клеток/мм<sup>2</sup>. При этом статистически достоверной разницы между группами не было выявлено. Заключение. Результаты прижизненной конфокальной микроскопии роговицы кроликов продемонстрировали в целом однотипные морфологические изменения, наблюдаемые в раннем послеоперационном периоде, которые сопровождались утратой субэпителиальных нервных волокон, развитием лакунарного отека, апоптозом кератоцитов со снижением их плотности преимущественно в передних и средних слоях стромы. Начало репопуляции кератоцитов и регенерации нервных волокон отмечали на 30-е сутки. Признаков повреждения эндотелия не обнаружено. Сравнительная оценка наибольшей эффективности представленных методик СХL с 0,1 % рибофлавином в составе с физраствором, декстраном или ГПМЦ может быть дана на основании более масштабных экспериментально-клинических наблюдений.

**Ключевые слова:** ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы, рибофлавин, декстран, метилцеллюлоза, конфокальная микроскопия

**Для цитирования:** Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л., Зайнутдинова Г.Х., Валишин И.Д., Гилемзянова Л.И. Сравнительная характеристика результатов конфокальной микроскопии роговицы после УФ-А-кросслинкинга с использованием различных растворов рибофлавина в эксперименте. *Офтальмология*. 2024;21(4):802–808. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-4-802-808

Прозрачность финансовой деятельности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00132 (https://rscf.ru/project/24-25-00132/).

Конфликт интересов отсутствует.

802



М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов, Г.Х. Зайнутдинова, И.Д. Валишин, Л.И. Гилемзянова Контактная информация: Халимов Азат Рашидович azrakhal@yandex.ru

# Comparative Characteristics of Corneal Confocal Microscopy after UV-A Cross-linking with Different Riboflavin Solutions in Experiment

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov, E.L. Usubov, G.Kh. Zainutdinova, I.D. Valishin, L.I. Gilemzyanova

Ufa Eye Research Institute Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation

# ABSTRACT

# Ophthalmology in Russia. 2024;21(4):802-808

Corneal cross-linking (CXL) has become the most common way of managing keratectasia. To date, the Dresden protocol (G. Wollensak et al., 2003) has acquired many modifications, in which the composition of the applied agents or modes of CXL procedure have been changed. This article presents the results of studying morphological changes of rabbit cornea in vivo after CXL using riboflavin solutions of different composition. Purpose: compare the effect of CXL on the corneal morphological structure in experimental animals by confocal microscopy using riboflavin with saline, dextran and hydroxypropylmethylcellulose. Material and methods. The study was performed on 20 eyes of 15 rabbits, which underwent standard (Epi-Off) CXL with 0.1 % riboflavin in 3 groups: in the first group saline was used as a base, in the second group - 20 % dextran, in the third - 1.0 % hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Corneal irradiation mode: 3 mW/cm<sup>2</sup>, 30 minutes, wavelength 370 nm. The corneal condition was evaluated at 3, 7, 14, 30 and 90 days after CXL. Biomicroscopy and confocal microscopy were performed in all animals using Heidelberg Retinal Tomographer HRT-III (Heidelberg Engineering, Germany). Heratocyte density was counted at the depth of 120-160 µm in the central zone on the area of 1 mm<sup>2</sup>. Statistical processing of the results was performed using Statistica 6.1 and Excel 2010 programmes. Results. In vivo biomicroscopy and confocal microscopy of the rabbit corneas showed postoperative changes in the epithelium and stroma after CXL. In all groups, 7 days after CXL, there was a decrease in keratocyte density, due to apoptosis, observed predominantly in the anterior layers of the stroma. The number of keratocytes after CXL in group 1 was 192.5 ± 29.8 cells/mm<sup>2</sup>, in group 2 — 227.4 ± 38.2 cells/mm<sup>2</sup>, in group 3 — 204.4 ± 32.6 cells/mm<sup>2</sup> against intact control 352.8 ± 35.2 cells/mm<sup>2</sup>. There was not statistically significant difference between the groups. Conclusion. The results of lifetime confocal microscopy of the rabbit cornea demonstrated similar morphological changes in the early postoperative period, which were accompanied by the loss of subepithelial nerve fibres, development of lacunar edema, apoptosis of keratocytes with a decrease in their density mainly in the anterior and middle layers of the stroma. The beginning of keratocyte repopulation and nerve fibre regeneration was observed on the 30th day after CXL. No signs of endothelium damage were detected. A comparative assessment of the greatest effectiveness of CXL techniques with 0.1% riboflavin in saline, dextran or HPMC can be given on the basis of larger-scale experimental and clinical studies.

Keywords: ultraviolet corneal crosslinking, riboflavin, dextran, methylcellulose, confocal microscopy

For citation: Bikbov M.M., Khalimov A.R., Usubov E.L., Zainutdinova G.Kh., Valishin I.D., Gilemzyanova L.I. Comparative Characteristics of Corneal Confocal Microscopy after UV-A Cross-linking with Different Riboflavin Solutions in Experiment. *Ophthalmology in Russia*. 2024;21(4):802–808. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-4-802-808

**Financial disclosure:** the study was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant No. 24-25-00132 (https://rscf.ru/project/24-25-00132/).

There is no conflict of interests.

## АКТУАЛЬНОСТЬ

В последние годы существенно увеличилось разнообразие методов выполнения ультрафиолетового кросслинкинга роговицы (CXL), используемого для лечения прогрессирующих форм как первичных, так и вторичных кератэктазий. Это связано с высокой эффективностью техники CXL, а также необходимостью индивидуального подхода к проведению процедуры с учетом особенностей патологических проявлений этой группы заболеваний роговой оболочки. Впервые методика СХL, которая заключается в ультрафиолетовом (УФ-А) облучении роговицы с фотосенсибилизатором (0,1 % раствор рибофлавина), была предложена G. Wollensak и соавт. в 2003 году для усиления прочностных свойств роговой оболочки у пациентов с кератоконусом (КК) [1]. На сегодняшний день это практически единственная технология, позволяющая остановить или замедлить прогрессирование КК, при этом закономерно ожидается снижение потребности в проведении радикальных хирургических вмешательств (послойная или сквозная кератопластика). Механизм СХL основан на фотохимических взаимодействиях в тканях роговицы, индуцированных ультрафиолет-активированным рибофлавином. Результатом этого процесса является образование дополнительных ковалентных связей внутри и между фибриллами роговичного коллагена, в том числе опосредованных участием ряда адгезивных белков межклеточного матрикса стромы, что приводит к значительному повышению биомеханической прочности роговицы [2]. В настоящее время в медицинскую практику офтальмолога внедрены различные клинические протоколы CXL, такие как стандартный, ускоренный, трансэпителиальный, импульсный и др. [3-6].

Результат процедуры, в частности глубина сшивки коллагена стромы, зависит от вариаций комбинированного

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov, E.L. Usubov, G.Kh. Zainutdinova, I.D. Valishin, L.I. Gilemzyanova Contact information: Khalimov Azat R. azrakhal@yandex.ru 803

Comparative Characteristics of Corneal Confocal Microscopy after UV-A Cross-linking with Different Riboflavin...

воздействия на роговицу основных составляющих СХL: раствора рибофлавина, кислорода воздуха и ультрафиолетового света длиной волны 370 нм [2]. В настоящее время продолжается поиск как наиболее эффективных режимов УФ-А-облучения роговицы (мощность и длительность облучения), так и факторов, обеспечивающих безопасность СХL за счет различных сочетаний действующего вещества (рибофлавин) и вспомогательных компонентов в растворе фотосенсибилизатора (ФС) [7–12].

На современном этапе развития научно-клинических исследований существует возможность прижизненного изучения структуры роговицы на различной глубине с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, которая позволяет получать важные сведения об особенностях морфологии тканей роговой оболочки, обеспечивая высокоразрешающую визуализацию клеток и экстрацеллюлярного матрикса [13]. Так, например, с помощью морфологических данных конфокальной микроскопии роговицы in vivo была дана оценка состояния роговичных структур у пациентов с КК после ускоренного и импульсного CXL с выявлением апоптозного эффекта и определением сроков репопуляции кератоцитов [14]. В научной литературе представлены сообщения, посвященные изучению влияния процедуры CXL и его клинических протоколов на микроморфологическую структуру роговицы [15-20]. Однако исследования, направленные на оценку влияния различных растворов для CXL на транспорт рибофлавина в строму и морфологические особенности структуры роговицы в различные сроки после проведения процедуры, немногочисленны [21].

В данной статье представлены результаты прижизненного изучения морфологических изменений роговицы у экспериментальных животных после проведения CXL с использованием растворов рибофлавина с различными молекулами доставки.

Цель: сравнить влияние УФ-кросслинкинга на морфологическую структуру роговицы у экспериментальных животных методом конфокальной микроскопии при использовании 0,1 % раствора рибофлавина на основе физраствора, декстрана или гидроксипропилметилцеллюлозы.

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

804

Проведено сравнительное морфологическое исследование 20 глаз 15 кроликов породы «Шиншилла» *in vivo*, которым на правом глазу производили стандартный (Ері-Off) УФ-кросслинкинг роговицы с 0,1 % раствором рибофлавина мононуклеотида (далее по тексту «рибофлавина»), при этом левый глаз оставался интактным и служил контролем (5 глаз). Экспериментальные животные были разделены на 3 группы (по 5 кроликов в каждой), в которых при проведении СХL применяли изотонические растворы рибофлавина с различным составом вспомогательных компонентов. В первой группе в качестве основы раствора ФС использовали водный 0,9 % хлорид натрия, во второй — 20 % декстран с молекулярной массой 450–550 кДа («Декстралинк», Россия), в третьей — 1,0 % гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) (вязкость 2 % раствора в воде 4000 мПа·с при 20 °C).

СХL роговицы и конфокальную микроскопию выполняли в операционной вивария под общим обезболиванием («Ксилазин» 20 мг/кг и «Золетил» 15 мг/ кг внутримышечно) и местной анестезией (окулярные инстилляции глазных капель «Инокаин»). После деэпителизации роговицы диаметром около 8-9 мм под операционным микроскопом (Carl Zeiss, Германия) проводили закапывание исследуемых растворов рибофлавина с частотой 1 капля в минуту в течение 30 мин. Облучение роговицы во всех группах выполняли с помощью устройства «УФалинк» (Россия) в режиме 3 мВт/см<sup>2</sup>, продолжительностью 30 минут и при длине волны 370 нм. В процессе УФ-облучения проводили инстилляции исследуемых растворов с частотой 1 капля в 2 минуты. В послеоперационном периоде в течение 5 дней закапывали антибактериальные препараты 2 раза в день (глазные капли «Левофлоксацин»). Оценку состояния роговицы глаз животных в группах осуществляли на 3, 7, 14, 30 и 90-е сутки после CXL.

Всем животным проводили биомикроскопию. Динамику морфологических изменений роговицы изучали с помощью лазерного сканирующего томографа Heidelberg Retinal Tomographer HRT-III («Heidelberg Engineering», Германия) с использованием модуля «Rostock» (Rostock Cornea Module — RCM), что позволяет исследовать весь передний отдел глаза [22]. Подсчет плотности кератоцитов выполняли на глубине 120– 160 мкм в центральной зоне роговицы на площади 1 мм<sup>2</sup>.

Показатели обрабатывали методом вариационной статистики, представляли в виде средней арифметической величины — *M* (Mean) и стандартного отклонения —  $\sigma$  (Standard Deviation). Для оценки достоверности непараметрических количественных данных использовали критерий Манна — Уитни, для определения достоверности нормально распределенных данных — критерий Стьюдента.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.1 и Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех опытных глазах исследуемых групп кроликов на 2–3-и сутки после стандартного СХL наблюдали завершенную реэпителизацию роговицы, незначительные клинические признаки воспаления в виде умеренной конъюнктивальной инъекции. Кроме того, на основании биомикроскопии было выявлено, что применение фотосенсибилизатора с декстраном (группа 2) вызывает меньшее набухание ткани роговицы и менее значимый отек в раннем послеоперационном периоде. Выраженность обезвоживающего действия полимера на роговицу отмечали непосредственно в процессе

М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов, Г.Х. Зайнутдинова, И.Д. Валишин, Л.И. Гилемзянова Контактная информация: Халимов Азат Рашидович azrakhal@yandex.ru

инстилляций при выполнении CXL и в течение первых часов после процедуры.

В поверхностных слоях интактной роговицы на уровне базального слоя и боуменовой мембраны (глубина 33 мкм) отмечали субэпителиальные нервные сплетения (рис. 1). После проведенного СХL (на 7-е сутки) ни в одной из групп в оптической зоне нервные волокна визуализировать не удалось.

Результаты конфокальной микроскопии на 7-е сутки после CXL во всех группах животных показали повышенную отражательную способность передних слоев стромы с развитием характерного лакунарного или «губчатого» отека, известного также как «пчелиные соты» (рис. 2). Принято считать, что лакунарный отек обусловлен массовым апоптозом кератоцитов передних слоев стромы, наблюдаемым в послеоперационном периоде. Клиническим проявлением лакунарного отека после проведенной процедуры CXL является помутнение (псевдохейз) роговицы с частичной утратой ее светопроводящей способности. Гиперрефлективность стромы определяли во всех группах в сроки до 1 месяца.

В интактной роговице на различной глубине визуализировали последовательную однонаправленную контрастную исчерченность стромы, свойственную упорядоченной коллагеновой структуре роговицы (рис. 3А).



Рис. 1. Конфокальная микроскопия роговицы кролика. Волокна субэпителиального нервного сплетения: А — интактный глаз. Глубина 55 мкм; Б — после СХL с рибофлавином и декстраном (30 сутки). Глубина 33 мкм

**Fig. 1.** Confocal microscopy of the rabbit cornea. Fibers of the subepithelial nerve plexus: A — intact eye. The depth — 55  $\mu$ m; B — after CXL with riboflavin and dextran (30 days). The depth 33  $\mu$ m



Рис. 2. Конфокальная микроскопия роговицы кролика. Лакунарный отек роговицы после СХL с рибофлавином и декстраном (7-е сутки). Глубина 70 мкм

Fig. 2. Confocal microscopy of the rabbit cornea. Lacunar corneal edema after CXL with riboflavin and dextran (7 days). The depth 70  $\mu m$ 

В опытных группах наблюдали схожую картину наряду с признаками снижения плотности кератоцитов (7-е сутки), вызванного патогенетическим влиянием проведенного СХL с деэпителизацией (рис. 3Б).

Конфокальная микроскопия во всех исследуемых группах на 7-е сутки после СХL показала снижение плотности кератоцитов (рис. 4Б) вследствие их апоптоза, наблюдаемое преимущественно в передних слоях стромы (рис. 5А). Отмечали уменьшение количества кератоцитов в 1-й группе до 192,5  $\pm$  29,8 клеток/мм<sup>2</sup>, во 2-й — до 227,4  $\pm$  38,2, в 3-й — до 204,4  $\pm$  32,6, в отличие от значений, полученных у интактных животных (352,8  $\pm$  35,2 клеток/мм<sup>2</sup>). При этом статистически достоверной разницы между экспериментальными группами не было выявлено. Признаки репопуляции с появлением активированных кератоцитов в виде ярких контрастных клеток наблюдали на 30 сутки (рис. 5Б).

G. Wollensak и соавт. в экспериментальных исследованиях на кроликах *in vivo* установили дозозависимое



Рис. 3. Конфокальная микроскопия роговицы кролика. Однонаправленная исчерченность стромы: А — интактный глаз. Глубина 231 мкм; Б — после СХL с рибофлавином и ГПМЦ (7 сутки). Глубина 200 мкм

Fig. 3. Confocal microscopy of the rabbit cornea. Unidirectional striation of the stroma: A — intact eye. The depth — 231  $\mu$ m; B — after CXL with riboflavin and HPMC (7 days). The depth 200  $\mu$ m



Рис. 4. Конфокальная микроскопия роговицы кролика: А — кератоциты интактной роговицы. Глубина 98 мкм; Б — снижение плотности кератоцитов после СХL с рибофлавином на изоосмотической основе (7 сутки). Глубина 113 мкм

Fig. 4. Confocal microscopy of the rabbit cornea: A — keratocytes of the intact cornea. The depth — 98  $\mu m;$  5 — decrease in keratocyte density after CXL with riboflavin on an isoosmotic basis (7 days). The depth 113  $\mu m$ 

805

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov, E.L. Usubov, G.Kh. Zainutdinova, I.D. Valishin, L.I. Gilemzyanova Contact information: Khalimov Azat R. azrakhal@yandex.ru

Comparative Characteristics of Corneal Confocal Microscopy after UV-A Cross-linking with Different Riboflavin...



Рис. 5. Конфокальная микроскопия роговицы кролика: А — апоптотированные кератоциты после СХL с рибофлавином и декстраном (7 сут). Глубина 129 мкм; Б — активированные кератоциты после СХL с рибофлавином и ГПМЦ (30 сут). Глубина 106 мкм

Fig. 5. Confocal microscopy of the rabbit cornea: A — apoptosed keratocytes after CXL with riboflavin and dextran (7 days). The depth — 129  $\mu m;$  5 — activated keratocytes after CXL with riboflavin and HPMC (30 days). The depth 106  $\mu m$ 



Рис. 6. Конфокальная микроскопия роговицы кролика. Эндотелий роговицы: А — интактный глаз; Б — после СХL с рибофлавином и декстраном (7 сутки)

Fig. 6. Confocal microscopy of the rabbit cornea. Corneal endothelium: A — intact eye. B — after CXL with riboflavin and dextran (7 days)

повреждение кератоцитов после проведения CXL с рибофлавином, которое можно наблюдать в роговице на глубине до 300 микрон при использовании флюенса УФ-излучения 5,4 Дж/см<sup>2</sup> [23]. Результаты, полученные в проведенном нами экспериментальном исследовании, согласуются с данными литературы, указывающими на значительное уменьшение плотности кератоцитов после CXL [24].

У кроликов опытных групп четко визуализировали характерную гексагональную форму эндотелиоцитов, их упорядоченное равномерное расположение, идентичное интактной роговице (рис. 6). Повреждения эндотелия после СХL не отмечалось ни в одной из групп в течение всего срока наблюдения. Плотность эндотелиальных клеток (ПЭК) интактных кроликов была на уровне 3180 ± 118 клеток/мм<sup>2</sup>. На 7-е сутки эксперимента данный показатель составил: в 1-й группе 3026 ± 96, во 2-й — 2988 ± 102, в 3-й — 3162 ± 110 клеток/мм<sup>2</sup>. Статистический анализ не выявил достоверных отличий между группами.

Результаты конфокальной микроскопии показали, что морфологические изменения роговицы, связанные с проведением УФ-кросслинкинга с использованием исследованных нами растворов фотосенсибилизатора (рибофлавин изоосмотический, рибофлавин с декстраном и рибофлавин с гидроксипропилметилцеллюлозой) не имеют существенной разницы. Однако на основании данных биомикроскопии следует отметить, что противоотечный эффект декстрансодержащего раствора может иметь значение при оценке интраоперационных биометрических показателей роговицы и клинико-функциональных результатов УФ-кросслинкинга в послеоперационном периоде.

Основным действующим веществом исследованных нами растворов является 0,1 % раствор рибофлавина, который в процессе CXL роговицы играет роль фотосенсибилизатора и фотопротектора. Изменение состава вспомогательных компонентов растворов позволяет расширить возможности их применения, в том числе с учетом исходного патологического состояния роговой оболочки, и, соответственно, повлиять на эффективность и безопасность процедуры. Так, в частности, раствор с декстраном обладает противоотечным эффектом за счет дегидратирующего действия полимера, но при этом вызывает обратимое интраоперационное снижение толщины роговицы. Раствор рибофлавина с ГПМЦ или с физраствором сохраняет биометрические показатели роговицы стабильными и может использоваться, когда применение средств с декстраном недопустимо.

Ряд исследователей указывают на более высокую эффективность применения раствора рибофлавина с декстраном, чем раствора рибофлавина с ГПМЦ у пациентов с КК. В частности, было показано, что CXL с рибофлавин/декстраном может приводить к значительно лучшим визуальным результатам по сравнению с раствором рибофлавина с ГПМЦ [25]. Кроме того, растворы с декстраном могут обладать другими потенциальными преимуществами, обусловленными его биохимическими свойствами, способствующими более эффективному сшиванию коллагена [26]. Вместе с тем имеются сведения, указывающие на более глубокие структурные изменения в роговице и высокую эффективность CXL с рибофлавином и метилцеллюлозой у пациентов с КК по сравнению с раствором рибофлавина и декстрана [27]. Однако при этом авторы показали сопоставимые результаты, касающиеся глубины демаркационной линии и зоны состоявшегося CXL в наблюдаемых группах.

В ряде исследований была дана оценка эффективности CXL в отношении интрастромальной концентрации рибофлавина у кроликов *in vivo*. В одной из публикаций сообщалось о более низкой концентрации рибофлавина в роговице при использовании рибофлавина-декстрана по сравнению с рибофлавином-метилцеллюлозой, что может указывать на бо́льшую эффективность

М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов, Г.Х. Зайнутдинова, И.Д. Валишин, Л.И. Гилемзянова Контактная информация: Халимов Азат Рашидович azrakhal@yandex.ru

последнего сочетания [28]. М.М. Бикбов и соавт. (2016) получили аналогичные результаты, исследуя концентрацию рибофлавина во влаге передней камеры кроликов. По мнению авторов, это может быть связано с обезвоживающим эффектом декстрана, который в процессе инстилляций способствует снижению толщины роговицы и уплотнению стромы, затрудняя транспорт рибофлавина в межклеточном матриксе [29].

G. Wollensak и соавт. продемонстрировали способность рибофлавина с метилцеллюлозой образовывать прекорнеальную пленку большой толщины, обладающей устойчивостью к распаду, что способствует более значимому поглощению энергии УФ-А-излучения по сравнению с прекорнеальной пленкой из рибофлавина с декстраном [30]. Это обстоятельство должно обеспечивать проникновение УФ-А-излучения и индукцию коллагеновых сшивок в более глубоких слоях стромы при использовании раствора с декстраном.

Несмотря на разницу в эффектах, оказываемых на структуру роговицы при применении исследованных растворов 0,1 % рибофлавина (на основе водного 0,9 % хлорида натрия, 20 % декстрана или 1,0 % гидроксипропилметилцеллюлозы), значимые прижизненные морфологические изменения нами не были выявлены. Несомненно, интерпретация результатов применения растворов рибофлавина для CXL требует дальнейшего анализа на основании более масштабных экспериментально-клинических наблюдений. Предстоит выяснить механизмы морфологической и ультраструктурной трансформации роговицы, оце-

- 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.
- Lenk J, Herber R, Raiskup F, Pillunat LE, Spörl E. Principles of corneal cross-linking: Presentation based on the development of the various treatment protocols. Ophthalmologe. 2022;119(4):332–341. doi: 10.1007/s00347-021-01538-7.
- Ozgurhan E, Akcay B, Kurt T, Yildirin Y, Demirok A. Accelerated corneal collagen crosslinking in thin keratoconic corneas. J Refract Surg. 2015;31:386–390. doi: 10.3928/1081597X-20150521-11.
- Desmurkh R, Hafezi F, Kymionis G, Kling S, Shah R, Padmanabhan P, Sachdev MS. Curent concepts in crosslinking thin corneas. Indian J Ophthalmol. 2019;67(1):8– 15. doi: 10.4103/ijo.IJO\_1403\_18.
- Caporossi A, Mazzotta C, Paradiso AL, Baiocchi S, Marigliani D, Caporossi T. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus: 24-month clinical results. J Cataract Refract Surg. 2013;39(8):1157–1163. doi: 10.1016/j. jcrs.2013.03.026.
- Mazzotta C, Raiskup F, Hafezi F, Torres-Netto EA, Balamoun AA, Giannaccare G, Bagaglia SA. Long term results of accelerated 9 mW corneal crosslinking for early progressive keratoconus: the Siena Eye-Cross Study 2. Eye Vis (Lond). 2021;8:16. doi: 10.1186/s40662-021-00240-8.
- O'Brart NAL, O'Brart DPS, Aldahlawi NH, Hayes S, Meek KM. An Investigation of the Effects of Riboflavin Concentration on the Efficacy of Corneal Cross-Linking Using an Enzymatic Resistance Model in Porcine. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59(2):1058–1065. doi: 10.1167/iovs.17-22994.
- Wernli J, Schumacher S, Spoerl E, Mrochen M. The efficacy of corneal crosslinking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(2):1176–1180. doi: 10.1167/ iovs.12-11409.
- Kobashi H, Yunoki S, Kato N, Shimazaki J, Ide T, Tsubota K. Evaluation of the Physiological Corneal Intrastromal Riboflavin Concentration and the Corneal Elastic Modulus After Violet Light Irradiation. Transl Vis Sci Technol. 2021;10(5):12. doi: 10.1167/tvst.10.5.12.
- 10. Ashena Z, Doherty S, Gokul A, McGhee C, Ziaei M, Nanavaty M. Flattening of central, paracentral, and peripheral cones after nonaccelerated and accelerated epithe-

нить результат модификации роговичного коллагена после CXL-индуцированных фотохимических взаимодействий с целью выявления наилучшей стратегии лечения кератоконуса, основанной на оптимальном сочетании имбибиции фотосенсибилизатора и режима УФ-облучения роговицы, что может способствовать наибольшей клинической эффективности и максимальной безопасности процедуры.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты прижизненной конфокальной микроскопии роговицы кроликов после стандартного УФ-кросслинкинга с использованием растворов рибофлавина с декстраном, рибофлавина с гидроксипропилметилцеллюлозой или рибофлавина с 0,9 % хлоридом натрия показали в целом однотипные морфологические изменения, наблюдаемые в раннем послеоперационном периоде, и характеризующиеся утратой субэпителиальных нервных волокон, апоптозом кератоцитов со снижением их плотности преимущественно в передних и средних слоях стромы, развитием лакунарного отека, при отсутствии повреждения эндотелия. В последующем, на 30-е сутки после процедуры, начинался период репопуляции кератоцитов и регенерации нервных волокон.

#### УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Бикбов М.М. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Халимов А.Р. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование, статистическая обработка данных, сбор и обработка материала; Усубов Э.Л. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование:

Зайнутдинова Г.Х. — написание текста, редактирование; Валишин И.Д. — сбор и обработка материала;

Гилемзянова Л.И. — сбор и обработка материала.

#### **ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES**

lium-off CXL in keratoconus: a multicenter study. J Refract surg. 2022;38(5):310-316. doi: 10.3928/1081597X-20220404-02.

- Said D, Ross A, Messina M, Mohammed I, Dua H. Localised corneal haze and scarring following pulsed accelerated collagen cross-linking for keratoconus. Eye. 2019;33(1):167–168. doi: 10.1038/s41433-018-0211-3.
- Бикбов ММ, Халимов АР, Усубов ЭЛ. Ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016;71(3):224–232.
   Bikbov MM, Khalimov AR, Usubov EL. Ultraviolet Corneal Crosslinking. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(3):224–232 (In Russ.). doi: 10.15690/vramn562.
- Chiang JCB, Roy M, Kim J, Markoulli M, Krishnan AV. In-vivo corneal confocal microscopy: Imaging analysis, biological insights and future directions. Common Biological. 2023;6(1):652. doi: 10.1038/s42003-023-05005-8.
- Mazzotta C, Traversi C, Caragiuli 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.
- Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial, and accelerated corneal collagen cross-linking procedures for keratoconus. J Refract Surg. 2012;28(11):769–776. doi: 10.3928/1081597X-20121016-01.
- Jordan C, Patel DV, Abeysekera N, McGhee CNJ. 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.
- Mazzotta C, Hafezi F, Kymionis G, Caragiuli S, Jacob S, Traversi C, Barabino S, Randleman JB. In Vivo Confocal Microscopy after Corneal Collagen Crosslinking. Ocul Surf. 2015;13(4):298–314. doi: 10.1016/j.jtos.2015.04.007.
- Shajari M, Kolb CM, Agha B, Steinwender G, Müller M, Herrmann E, Schmack I, Mayer WJ, Kohnen T. Comparison of standard and accelerated corneal crosslinking for the treatment of keratoconus: a meta-analysis. Acta Ophthalmol. 2019;97(1):e22–e35. doi: 10.1111/aos.13814.
- Teo AWJ, Mansoor H, Sim N, Lin MT-Y, Liu Y-Ci. In Vivo Confocal Microscopy Evaluation in Patients with Keratoconus. J Clin Med. 2022;11(2):393. doi: 10.3390/ jcm11020393.

807

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov, E.L. Usubov, G.Kh. Zainutdinova, I.D. Valishin, L.I. Gilemzyanova Contact information: Khalimov Azat R. azrakhal@yandex.ru

Comparative Characteristics of Corneal Confocal Microscopy after UV-A Cross-linking with Different Riboflavin...

- Hacıagaoglu S, Turhan SA, Toker E. A comparison of conventional and accelerated corneal crosslinking: corneal epithelial remodeling and in vivo confocal microscopy analysis. Int Ophthalmol. 2024;44(1):87. doi: 10.1007/s10792-024-03020-0.
- Hypothesis M, Innov D, Osaba M, Tempesti T, Reviglio VE. Photophysical and photodynamic analysis of different Rb formulations Photophysical and photodynamic analysis of different formulations of riboflavin. Medical Hypothesis Discovery & Innovation in Optometry. 2023;4(4):181–187. doi: 10.51329/mehdioptometry189.
- 22. Ткаченко НВ, Астахов СЮ. Диагностические возможности конфокальной микроскопии при исследовании поверхностных структур глазного яблока. Офтальмологические ведомости. 2009;2(1):82–89. Tkachenko NV, Astakhov SYu. Confocal microscopy diagnostic abilities in investigation
- of superficial eyeball structures. Ophthalmological reports. 2009;2(1):82–89 (In Russ.).
  23. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Keratocyte apoptosis afer collagen cross-linking using ribofavin / UVA treatment. Cornea. 2004;23(1):43–49. doi: 10.1097/00003226-200401000-00008.
- Guthoff RF, Baudouin C, Stave J. Atlas of Confocal Laser Scanning In vivo Microscopy in Ophthalmology. Berlin: Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 2006. 200 p.
- Rapuano PB, Mathews PM, Florakis GJ, Trokel SL, Such LH. Corneal collagen crosslinking in patients treated with dextran versus isotonic hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) riboflavin solution: a retrospective analysis. Eye and Vision. 2018;5:23. doi: 10.1186/s40662-018-0116-z.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ» Бикбов Мухаррам Мухтарамович доктор медицинских наук, профессор; директор ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация https://orcid.org/0000-0002-9476-8883

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Халимов Азат Рашидович

доктор биологических наук, заведующий научно-инновационным отделением ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация https://orcid.org/0000-0001-7470-7330

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Усубов Эмин Логман оглы кандидат медицинских наук, заведующий отделением хирургии роговицы и хрусталика ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация

https://orcid.org/0000-0002-1008-1516

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Зайнутдинова Гузель Халитовна доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отделения по организации научных исследований и разработок ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация https://orcid.org/0000-0001-9578-8635

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Валишин Искандер Дамирович врач-офтальмолог 1-го микрохирургического отделения ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация https://orcid.org/0000-0002-1811-9320

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Гилемзянова Лейсан Ильшатовна заведующая лабораторией экспериментальных исследований ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Российская Федерация https://orcid.org/0000-0002-0583-013X

- 26. Халимов АР. Роль декстрана в офтальмологическом растворе рибофлавина для УФ кросслинкинга роговицы. Точка зрения. Восток-Запад. 2018;1:136–138. Khalimov AR. The role of dextran in ophthalmic riboflavin solution for UV corneal crosslinking. Point of view. East-West. 2018;1:136–138 (In Russ.). doi: 10.25276/2410-1257-2018-1-136-138.
- Thorsrud A, Hagem AM, Sandvik GF, Drolsum L. Acta Superior outcome of corneal collagen cross-linking using riboflavin with methylcellulose than riboflavin with dextran as the main supplement. Ophthalmol. 2019;97(4):415–421. doi: 10.1111/aos.13928.
- Hammer A, Rudaz S, Guinchard S, Kling S, Richoz O, Hafezi F. Analysis of riboflavin compounds in the rabbit cornea in vivo. Curr Eye Res. 2016;41(9):1166–1172. doi: 10.3109/02713683.2015.1101141.
- Бикбов ММ, Шевчук НЕ, Халимов АР, Бикбова ГМ. Динамика уровня рибофлавина во влаге передней камеры глаза экспериментальных животных при стандартном насыщении стромы растворами для УФ кросслинкинга роговицы. Вестник офтальмологии. 2016;132(6):29–35.

Bikbov MM, Shevchuk NE, Khalimov AR, Bikbova GM. Dynamics of riboflavin level in aqueous humour of anterior chamber of experimental animals under standard stroma saturation by ultraviolet corneal cross-linking solutions. Russian Annals of Ophthalmology. 2016;132(6):29–35 (In Russ.). doi: 10.17116/oftalma2016132629-35.

 Wollensak G, Auric H, Wirbelauer C, Sel S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. J Cataract Refract Surg. 2010;36:114–120. doi: 10.1016/j.jcrs.2009.07.044.

#### **ABOUT THE AUTHORS**

Ufa Eye Research Institute Bikbov Mukharram M. MD, Professor; director of Ufa Research Institute of Eye Diseases Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation https://orcid.org/0000-0002-9476-8883

Ufa Eye Research Institute Khalimov Azat R. MD (Biol.), head of the scientific and innovative department Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation https://orcid.org/0000-0001-7470-7330

Ufa Eye Research Institute Usubov Emin L. PhD, head of the department of corneal and lens surgery Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation https://orcid.org/0000-0002-1008-1516

Ufa Eye Research Institute Zainutdinova Guzel Kh. MD, senior researcher at the department for the organization of scientific research and development Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation https://orcid.org/0000-0001-9578-8635

Ufa Eye Research Institute Valishin Iskander D. ophthalmologist of the 1st microsurgical department Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation https://orcid.org/0000-0002-1811-9320

Ufa Eye Research Institute Gilemzyanova Leysan I. head of the laboratory of experimental research Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation https://orcid.org/0000-0002-0583-013X

М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов, Г.Х. Зайнутдинова, И.Д. Валишин, Л.И. Гилемзянова

Контактная информация: Халимов Азат Рашидович azrakhal@yandex.ru