

Кросслинкинг склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA). Обзор литературы



М. М. Бикбов



В. Н. Суркова



Э. Л. Усубов

М. Н. Астрелин

Государственное бюджетное учреждение «Уфимский НИИ глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан», ул. Пушкина, 90, г. Уфа, 450008, Республика Башкортостан

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2015; 12 (4): 4–8

Кросслинкинг – это образование химических связей между крупными молекулами, которое, как правило, делает материал прочнее. Кросслинкинг роговичного коллагена с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA) успешно применяется для лечения кератэктазий с 2003 года. Имеется ряд предпосылок успешного использования кросслинкинга склеры в лечении прогрессирующей близорукости, при которой в склере наблюдается истончение и снижение биомеханической прочности ткани, так же как и в роговице при кератэктазиях. Экспериментальные исследования показали увеличение прочности склеры после кросслинкинга с рибофлавином и UVA *in vitro*. При этом не наблюдали изменения толщины склеры. Длительность достигнутого эффекта определена до 8 месяцев после процедуры на кроликах *in vivo*. Изменения структуры склеры после кросслинкинга изучены с помощью световой, электронной и атомно-силовой микроскопии. Выявлено более плотное расположение коллагеновых волокон, увеличение их диаметра, разнонаправленность и перекрещенность коллагеновых фибрилл. Среди побочных эффектов процедуры на кроликах *in vivo*, по данным некоторых авторов, выявлено повреждение сетчатки и роговицы на стороне облучения, связанное с высокой дозой излучения и истончением склеры в результате дегидратации. В эксперименте определены оптимальная продолжительность инстилляции рибофлавина (20 минут) и облучения ультрафиолетом А (40 минут) при стандартной мощности излучения 3 мВт/см². В эксперименте *in vivo* показано, что кросслинкинг склеры с рибофлавином и UVA препятствует росту глазного яблока кроликов при моделировании миопии с помощью окклюдии. Имеются единичные данные об успешном применении кросслинкинга склеры в клинике. Однако под наблюдением находилось лишь 6 пациентов (12 глаз), срок наблюдения составил 6 месяцев, не до конца ясна методика, по которой была проведена процедура. Таким образом, в настоящее время остается еще множество нерешенных вопросов, касающихся эффективности и безопасности применения кросслинкинга склеры с рибофлавином и UVA в клинике. Однако имеющиеся экспериментальные данные дают надежду на возможность создания нового метода лечения прогрессирующей близорукости.

Ключевые слова: кросслинкинг, кросс-линкинг, склера, прогрессирующая миопия, близорукость, биомеханическая прочность, ультрафиолет А, рибофлавин, коллаген, моделирование миопии, модуль Юнга, световая микроскопия, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, повреждение сетчатки, повреждение роговицы, кератоконус, диаметр коллагеновых волокон

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

ENGLISH

Scleral crosslinking with riboflavin and ultraviolet A (UVA). A review

M. M. Bikbov, V. H. Surkova, E. L. Usubov, M. N. Astrelin
Ufa Eye Research Institute, Pushkina str., 90, Ufa, 450008, Republic of Bashkortostan, Russia

SUMMARY

Crosslinking is a formation of chemical bonds between large molecules. It makes material stronger. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A (UVA) has been successfully used in keratectasia treatment since 2003. There are some presuppositions of the scleral crosslinking successful using in the progressive myopia, characterized by thinning

and mechanical strength decrease of the sclera, as well as in corneal ectasia. Experimental investigations showed an increase in the mechanical strength of the sclera after crosslinking with riboflavin and UVA in vitro. At the same time there were no changes in the thickness of the sclera. Achieved biomechanical effect was constant over a time with interval during up to 8 months in rabbits in vivo. Scleral structure changes after crosslinking were studied with light, electron and atomic force microscopy. Dense collagen bundle at the same time with fibers diameter increase was observed. The spatial pattern of fibrils within crosslinked scleral tissue was tangled and running in different directions. Some authors found such side effects of the procedure as damage of the retina and cornea on the irradiation side because of the high irradiance and thinning of the sclera as a result of dehydration. The optimal duration of riboflavin instillation (20 minutes) and irradiation with 3 mW/cm² (40 minutes) were determined in the experiments. It was shown in vivo, that crosslinking of the sclera with riboflavin and UVA prevented the growth of the rabbit eyes in occlusion-induced myopia. There are several data about successful clinical using of the scleral crosslinking. However, only 6 patients (12 eyes) were observed, procedure parameters are not clear, follow-up period was only 6 months. Thus, now there are many unsolved questions about efficacy and safety of the scleral crosslinking with riboflavin and UVA. Experimental results encourage for a new method of the progressive myopia treatment will be created.

Keywords: crosslinking, cross-linking, sclera, progressive myopia, biomechanical strength, ultraviolet A, riboflavin, collagen, occlusion-induced myopia, rabbit model, Young's modulus, light, electron, atomic force, microscopy, retina damage, cornea damage, keratoconus, collagen fiber diameter

Financial disclosure: Authors has no financial or property interests related to this article. There is no conflict of interests.

Ophthalmology in Russia. 2015; 12 (4): 4–8

Кросслиндинг — это образование химических связей между крупными молекулами, которое, как правило, делает материал прочнее [1]. Имеется ряд предпосылок успешного использования кросслиндинга склеры в лечении прогрессирующей близорукости. Так, в патогенезе осевой миопии одна из ведущих ролей принадлежит слабости склеральной ткани [2]. Растяжимость склеры в глазах с миопией высокой степени выше, чем в эметропических глазах [3]. Растяжение и истончение склеры, хориоидеи и сетчатки при близорукости происходит из-за изменения структуры склеры, таких как снижение диаметра коллагеновых волокон [4, 5] и нарушение фибриллогенеза [6]. Важным фактором, обуславливающим биомеханическую слабость склеры при миопии, является снижение уровня поперечной связанности склеральной ткани [7]. Близорукость высокой степени, синдром голубых склер и кератоконус были описаны при синдроме Элерса-Данлоса, который характеризуется недостатком межмолекулярных перекрестных связей в коллагене [8]. В противоположность этому у пациентов с сахарным диабетом, при котором образуются дополнительные глюкозинуцированные перекрестные связи в коллагене, осевая миопия встречается редко [9]. С 2003 года кросслиндинг роговичного коллагена с рибофлавином и ультрафиолетом А успешно применяется для лечения кератоконуса, при котором в роговице наблюдается истончение и снижение биомеханической прочности ткани, так же как и в склере при близорукости [10]. Исследования, проведенные на животных, выявили, что блокирование естественного кросслиндинга коллагена способствует развитию экспериментальной миопии [11].

Впервые изменение биомеханических свойств склеры в результате ультрафиолетового облучения

А в присутствии фотосенсибилизатора рибофлавина изучили G. Wollensak и E. Spoerl в 2004 году [12]. Они проводили исследование на трупных человеческих и свиных глазах. В качестве фотосенсибилизатора использовали 0,1% раствор рибофлавина (10 мг рибофлавин-5-фосфата в 10 мл 20% декстрана-Т-500) в течение 10 минут. Облучение проводили ультрафиолетом А (370 нм) мощностью 3 мВт/см² в течение 30 минут. Прочность склеры определяли путем вычисления показателей напряжения-деформации и модуля Юнга. Исследователи выявили значительное увеличение жесткости склеры после кросслиндинга. Аналогичные результаты получили Т.-Х. Liu и Z. Wang (2013) в эксперименте на трупных свиных глазах. Они использовали такой же фотосенсибилизатор и те же параметры ультрафиолетового излучения, как в исследовании G. Wollensak и E. Spoerl [13].

Y. Zhang с соавт. (2014) получили данные, не согласующиеся с результатами предыдущих двух исследований [14]. Они использовали по 8 трупных глаз кроликов, свиней и человека. В качестве фотосенсибилизатора применяли 0,1% водный раствор рибофлавина в течение 15 минут до облучения и каждые 3 минуты в ходе процедуры. Облучение проводили ультрафиолетом А (365 нм) мощностью 3 мВт/см² в течение 40 минут. Прочность склеры определяли путем вычисления показателей напряжения-деформации и модуля Юнга при 4%, 6% и 8%-ном растяжении. Выявили, что на склере кроликов произошло статистически достоверное увеличение как напряжения, так и модуля Юнга после кросслиндинга. На свиной склере наблюдали увеличение только предельного напряжения. На человеческих глазах в результате кросслиндинга склеры не выявили выраженных изменений ее биомеханиче-

ских параметров. Авторы предположили, что в эксперименте G. Wollensak и E. Spoerl [12] в связи с увеличением мощности UVA за счет перекрытия полей излучения двойных диодов наблюдалось увеличение жесткости свиной и человеческой склеры после процедуры.

Длительность биомеханического эффекта после кросслинкинга склеры с рибофлавином и UVA изучали G. Wollensak и E. Iomdina (2009). Исследование проводили на 9 животных *in vivo* [15]. В качестве фотосенсибилизатора использовали 0,1% раствор рибофлавин-5-фосфата в физиологическом растворе в течение 5 минут до облучения и каждые 5 минут в ходе процедуры. Облучение проводили ультрафиолетом А (370 нм) мощностью 3 мВт/см² в течение 30 минут (5,4 Дж/см²). Жесткость склеры определяли через 3 дня, 4 и 8 месяцев. Было выявлено, что биомеханический эффект кросслинкинга склеры у кроликов *in vivo* сохранялся в течение всего периода наблюдения после процедуры.

При прогрессирующей близорукости происходит истончение склеры [4, 5], поэтому важное значение имеет изучение влияния кросслинкинга на ее толщину. В ряде исследований, проведенных на кадаверной склере кроликов, свиней, человека, а также на глазах кроликов *in vivo*, было выявлено, что после кросслинкинга с рибофлавином и UVA толщина склеры статистически достоверно не меняется [13, 14, 15, 16].

Изменение структуры склеры после ультрафиолетового облучения с рибофлавином изучали G.-B. Jung с соавт. (2011). Они проводили исследование на 1 трупном человеческом глазу [17]. В качестве фотосенсибилизатора использовали 0,1% раствор рибофлавина (3 мг рибофлавин-5-фосфата в 3 мл 20% декстрана 500) в течение 10 минут. Облучение проводили ультрафиолетом А (370 нм) мощностью 3 мВт/см² в течение 30 минут. Проводили сравнение структуры облученной и интактной склеры методами световой и атомно-силовой микроскопии. Атомно-силовая микроскопия — это метод с разрешающей способностью примерно 0,1-1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали, применяется для исследования локальных свойств поверхности за счет анализа силы взаимодействия иглы зонда с поверхностью исследуемого образца [18, 19]. На снимках атомно-силовой микроскопии выявили разнонаправленный ход коллагеновых фибрилл, их перекрещивание, в отличие от интактной склеры, где наблюдалось параллельное расположение фибрилл. С помощью световой микроскопии выявили более плотное расположение коллагеновых волокон после кросслинкинга по сравнению с интактной склерой. Эти изменения архитектоники склеральной ткани, по мнению авторов, могут свидетельствовать об образовании дополнительных перекрестных интерфибриллярных связей. S. Choi с соавт. (2013) с помощью электронной микроскопии на трупном человеческом глазу выявили увеличение диаметра коллагеновых волокон склеры (127%) после кросслинкинга [20].

В связи с тем, что четко не определены оптимальные параметры ультрафиолетового облучения и длительность инстилляций фотосенсибилизатора для проведения кросслинкинга склеры, ряд авторов посвятили свои исследования этим вопросам. Так Y. Zhang с соавт. (2013) считают, что продолжительность облучения склеры ультрафиолетом А должна составлять 40 минут при мощности 3 мВт/см² (длина волны — 365 нм) [21]. Они проводили исследование *in vivo* на 36 кроликах. Склеральные образцы, облученные в течение 10 и 20 минут, по своим биомеханическим свойствам практически не отличались от контрольных интактных. При облучении в течение 40 минут и более наблюдалось значительное увеличение предельного напряжения и модуля Юнга. Однако в глазах, облученных в течение 50 и 60 минут с помощью световой микроскопии выявили повреждение сетчатки.

Оптимальную продолжительность инстилляций фотосенсибилизатора до облучения ультрафиолетом А определяли M. Wang с соавт. (2012). Исследование проводили на 15 трупных человеческих глазах, которые были разделены на группы в зависимости от продолжительности пропитывания склеры 0,1% раствором рибофлавина (5, 10, 20 или 30 минут) [22]. После проведения процедуры кросслинкинга измеряли показатели напряжения-деформации склеральных образцов. Выявили, что напряжение и модуль Юнга увеличивались с увеличением продолжительности инстилляций фотосенсибилизатора. В случаях с 20-и и 30-минутным пропитыванием склеры не обнаружили статистически достоверной разницы. Таким образом, исследователи сделали вывод, что продолжительность инстилляций рибофлавина до проведения облучения UVA должна составлять 20 минут.

Представляет интерес экспериментальное исследование по изучению влияния кросслинкинга склеры на прогрессирование миопии, моделированной на животных [23]. Dotan A. с соавт. (2014) провели исследование на 22 кроликах в возрасте 13 дней. Длину глаз измеряли ультразвуковым методом (А-сканирование). На правых глазах кроликов выполнили круговой разрез конъюнктивы. В опытной группе (11 кроликов) провели кросслиндинг склеры, в контрольной (также 11 кроликов) — его не проводили. В обеих группах выполнили тарзорафию, которая позволила вызвать рост передне-задней оси глаз в результате окклюзии. На каждый квадрант правых глаз опытной группы приходилась зона облучения площадью 0,4-1,2 см². В качестве фотосенсибилизатора использовали 0,1% раствор рибофлавин-5-фосфата без декстрана в течение 20 секунд до облучения и каждые 20 секунд в течение облучения, которое проводили ультрафиолетом А (370 нм) мощностью 57 мВт/см² в течение 200 секунд. Веки открывали на 55 день и измеряли длину глаз. В контрольной группе средняя длина правых глаз вы-

росла с $10,50 \pm 0,67$ мм до $15,69 \pm 0,39$ мм (разница составила $5,19 \pm 0,85$ мм). В опытной группе соответствующие показатели составили $10,68 \pm 0,74$ мм и $14,29 \pm 0,3$ мм (разница — $3,61 \pm 0,76$ мм). Различия между группами были статистически достоверными. Таким образом, исследователи продемонстрировали, что кросслинкинг склеры с рибофлавином и UVA препятствует удлинению глаз кроликов при моделировании миопии с помощью окклюзии.

Описано и отрицательное воздействие кросслинкинга склеры на структуры глаза [16]. G. Wollensak с соавт. (2005) на 6 кроликах (6 глаз) *in vivo* выявили серьезные побочные эффекты процедуры кросслинкинга склеры в виде потери фоторецепторов, наружного ядерного слоя и пигментного эпителия сетчатки на большом протяжении. Кроме того, отмечалось поражение роговицы у двух кроликов (2 глаза) в виде стромального отека, потери кератоцитов и эпителиальных клеток на стороне, где проводилось облучение. Повреждение роговицы связали с попаданием на нее ультрафиолетового излучения. Позднее, поражение сетчатки объяснили высокой мощностью UVA (до 6 мВт/см^2 в местах перекрытия зон облучения от двух двойных диодов) и истончением склеры в результате ее дегидратации декстраном, входившим в состав фотосенсибилизатора [15].

Имеются единичные сообщения о применении кросслинкинга склеры в клинике. Поляк А.С. с соавт. (2009) наблюдали 6 пациентов (12 глаз) с прогрессирующей близорукостью средней степени (степень прогрессирования составляла более 1-1,5 D в год) [24]. На правых глазах проводили процедуру кросслинкинга склеры, левые глаза использовали в качестве конт-

роля. Методика операции была следующей: с помощью специально разработанной системы доставки ультрафиолетового излучения (370 нм) облучали полосу склеры в одном сегменте с 10 до 15 мм от экватора в течение 30 минут. Облучавшуюся зону склеры предварительно насыщали раствором рибофлавина на декстране в течение 10 минут. Динамическое наблюдение пациентов проводили до 6 месяцев после процедуры. Во всех случаях применения кросслинкинга склеры наблюдалась стабилизация близорукости. На контрольных глазах в 4 случаях отмечено незначительное прогрессирование миопии ($-4,5 \pm 0,5$ D по сравнению с первоначальной рефракцией $-4,0 \pm 0,5$ D). На 2 контрольных глазах наблюдалась стабилизация процесса. Однако из тезиса Поляка А.С. с соавт. неясно, каким образом авторы проводили кросслинкинг склеры. Также нет данных о течении близорукости у наблюдавшихся больных в более поздние послеоперационные сроки и о проведении аналогичной процедуры у других пациентов.

Таким образом, ряд ученых считают, что кросслинкинг склерального коллагена может стать эффективным методом лечения прогрессирующей близорукости [12, 20, 22], в основе патогенеза которой лежит нарушение биомеханических свойств склеры [3, 25, 26]. В настоящее время остается еще множество нерешенных вопросов, касающихся эффективности и безопасности применения кросслинкинга склеры с рибофлавином и UVA в клинике. Однако имеющиеся экспериментальные данные вселяют надежду на возможность создания нового метода лечения прогрессирующей близорукости.

Мнение авторов может не совпадать с позицией редакции

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bikbov M.M., Bikbova G.M. [Keratectasia (pathogenesis, pathomorphology, clinic, diagnosis, treatment)] Ektazii rogovicy (patogenez, patomorfologiya, klinika, dyagnostika, lecheniye) – GU «Ufimskiy nauchno-issledovatel'skiy institute glaznykh bolezney» AN RB. – M.: Izd-vo «Oftalmologiya», 2011. – 164 s., il. [in Russ.]
2. Avetisov E.S., Savitskaya N.F., Vinetskaya M.I., Iomdina E.N. A study of biochemical and biomechanical qualities of normal and myopic eye sclera in humans of different age groups. *Metab. Pediatr. Syst. Ophthalmol.* 1983; 7: 183-188.
3. Avetisov E.S. [Myopia] Blizorukost'. – 2 izd., pererab. i dop. – M.: Medizina, 2002. – 288 s.: il. [in Russ.]
4. Curtin B.J., Iwamoto T., Renaldo D.P. Normal and staphylomatous sclera of high myopia. An electron microscopic study. *Arch. Ophthalmol.* 1979; 97: 912-915.
5. Liu K.R., Chen M.S., Ko L.S. Electron microscopic studies of the scleral collagen fiber in excessively high myopia. *J. Formosan. Med. Assoc.* 1986; 85: 1032-1038.
6. Funata M., Tokoro T.: Scleral change in experimentally myopic monkeys. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1990; 228: 174-179.
7. Iomdina E.N., Daragan V.A., Ilyina E.E.: Certain biomechanical properties and crosslinking of the scleral shell of the eye in progressive myopia. *Proceedings of XIVth Congress on Biomechanics.* 1993. Paris: International Society of Biomechanics, p. 616-617.
8. Mechanic G. Crosslinking of collagen in a heritable disorder of connective tissue: Ehlers-Danlos syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 47: 267-272.
9. Logstrup N., Sjolie A.K., Kyvik K.O., Green A. Long term influence of insulin dependent diabetes mellitus on refraction and its components: a population based twin study. *Br.J. Ophthalmol.* 1997; 81: 343-349.
10. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am.J. Ophthalmol.* 2003; 135: 620-627.
11. McBrien N.A., Norton T.T. Prevention of collagen crosslinking increases form-deprivation myopia in tree shrew. *Exp. Eye Res.* 1994; 59: 475-486.
12. Wollensak G., Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *J. Cataract Refract. Surg.* 2004; 30: 689-695.
13. Liu T.-X., Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin. *Acta Ophthalmol.* 2013; 91: 253-257.
14. Zhang Y., Li Z., Liu L., Han X., Zhao X., Mu G. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera. *BioMed Research International.* Volume 2014 (2014), Article ID 194204, 5 pages.
15. Wollensak G., Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Ophthalmol.* 2009; 87: 193-198.
16. Wollensak G., Iomdina E., Dittert D.-D., Salamatina O., Stoltenburg G. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2005; 83: 477-482.
17. Jung G.-B., Lee H.-J., Kim J.-H., Lim J.I., Choi S., Jin K.-H., Park H.-K. Effect of crosslinking with riboflavin and ultraviolet A on the chemical bonds and ultrastructure of human sclera. *Journal of Biomedical Optics* 16 (12), 125004 (December 2011).
18. Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986; 56: 930-933.
19. Gusev A.I. [Nanomaterials, nanostructures, nanotechnologies] Nanomaterialy, nanostructure, nanotechnologii. – M.: Fizmatlit, 2007. – 416 s. [in Russ.]

-
20. Choi S., Lee S.-C., Lee H.-J., Cheong Y., Jung G.-B., Jin K.-H., Park H.-K. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light. *Lasers Med. Sci* 2013; 28: 1289-1296.
 21. Zhang Y., Zou C., Liu L., Cao L., Xia X., Li Z., Hu M., Yu H., Mu G. Effect of irradiation time on riboflavin-ultraviolet-A collagen crosslinking in rabbit sclera. *J. Cataract Refract. Surg.* 2013; 39: 1184-1189.
 22. 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: 723-728.
 23. Dotan A., Kremer I., Livnat T., Zigler A., Weinberger D., Bourla D. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of progressive myopia in a rabbit model. *Exp. Eye Res.* 2014; 127: 190-195.
 24. Polyak A.S., Turgunbayev N.A., Medvedev M.A. [Initial results of the sclera photomodification in progressive myopia] Nachalnyie rezultaty fotomodifikatsii sclery u bolnykh s progressivnyuyushey blizorukostyu. Sbornik tezisov obscheroossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchyonykh: «Aktual'nye problemy oftalmologii». Moskva, 2009, s. 64. [in Russ.]
 25. McBrien N., Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003; 22: 307-338.
 26. Rada J.A. S., Shelton S., Norton T.T. The sclera and myopia. *Exp. Eye Res.* 2006; 82: 185-200.