

doi: 10.18008/1816-5095-2016-2-111-114

## Изменение биомеханических свойств роговицы после модифицированного трансэпителиального кросслинкинга

И. Б. Медведев<sup>1</sup>В. Ю. Евграфов<sup>1</sup>С. Н. Багров<sup>2</sup>Р. С. Кемов<sup>2</sup>Дергачева Н. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФДПО ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, ул. Островитянова 1, Москва, 117997, Российская Федерация

<sup>2</sup> ООО «Центр глазной хирургии», ул. Пречистенка, 40/2, стр.1, Москва, 119034, Российская Федерация

### РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2016; 13 (2): 111-114

**Цель работы:** оценка изменения биомеханических свойств роговицы после проведения трансэпителиального кросслинкинга с предварительным применением 40%-ного раствора глюкозы. **Материалы и методы.** Изучены биомеханические свойства роговицы шести кроликов породы Шиншила (12 глаз). 4 кролика вошли в опытную группу, в которой на один глаз наносили раствор глюкозы непосредственно на роговицу и выдерживали в течение 10 минут, после чего проводили закапывание 0,1% раствора рибофлавина в течение 30 минут. На парный глаз кролика наносили раствор рибофлавина без предварительной инстилляцией глюкозы. Затем осуществляли процедуру облучения по стандартной технологии с воздействием УФ с длиной волны 370 нм и энергией излучения 3.0 мВт/см<sup>2</sup>. Два кролика (4 глаза) составили контрольную группу, в которой кросслиндинг не проводили. Через 1 месяц проводили эвтаназию животных с последующей энуклеацией для исследования роговицы на разрывной машине. В контрольной и опытной группе сравнивали кривые релаксации и анализировали следующие показатели: начальное напряжение (мПа), равновесное напряжение (мПа), модуль упругости. **Результаты и обсуждение.** После проведения кросслинкинга отмечался рост начального напряжения (в контрольной группе 0,7±0,1 мПа, в опытной – 1,5±0,2 и 1,3±0,3 мПа, соответственно). Релаксация напряжения проходила быстро (равновесное значение напряжения достигалось уже через 250 сек.), а после инстилляцией глюкозы – примерно в течение 75 сек., что говорит о большей ригидности этой группы образцов. В опытной группе достоверно изменился и модуль упругости: его значения возросли приблизительно в 2 раза по сравнению с контрольными образцами. Равновесные значения напряжения в опытных группах стали отличными от нулевого значения, что также свидетельствовало об изменении химической структуры образцов. **Выводы.** Проведение трансэпителиального кросслинкинга с предварительной инстилляцией 40% раствора глюкозы обеспечивает проникновение рибофлавина в строму роговицы и повышает её биомеханическую прочность. Полученные нами данные указывают на перспективность применения в клинике разработанной модификации трансэпителиального кросслинкинга.

**Ключевые слова:** трансэпителиальный кросслиндинг, роговица, биомеханические свойства

**Формат цитирования:** И. Б. Медведев, В. Ю. Евграфов, С. Н. Багров, Р. С. Кемов, Дергачева Н. Н. Изменение биомеханических свойств роговицы после модифицированного трансэпителиального кросслинкинга. Офтальмология. 2016;13 (2): 111-114 doi: 10.18008/1816-5095-2016-2-111-114

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

**Конфликт интересов отсутствует**

### ENGLISH

## Changes in biomechanical properties of the cornea after modified transepithelial crosslinking

I. B. Medvedev<sup>1</sup>, V. Ju. Evgrafov<sup>1</sup>, S. N. Bagrov<sup>2</sup>, R. S. Kemov<sup>2</sup>, N. N. Dergacheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia; <sup>2</sup> LLC «Eye surgery center», Prechistenka str.1, Moscow, 119034, Russia;

### SUMMARY

**The aim** of the study was to evaluate changes in biomechanical properties of the cornea after conducting transepithelial crosslinking with the prior application of a 40% glucose solution. **Materials and methods.** Just studied the biomechanical prop-

erties of the corneas of six rabbits breed Chinchilla (12 eyes). 4 rabbit entered in the experimental group, in which in one eye glucose solution was applied on the cornea and allowed to stay for 10 minutes, followed by the instillation of 0.1% Riboflavin solution for 30 minutes. On a couple of the rabbit eye was applied a solution of Riboflavin without prior instillation of glucose. Then carried out the procedure of irradiation according to the conventional technology with UV with a wavelength of 370  $\mu\text{m}$  and a beam energy of 3.0 mW/cm<sup>2</sup>. Two rabbits (4 eyes) were included in the control group, in which crosslinking was not performed. After 1 month the euthanasia of the animals was performed with subsequent enucleation for corneal research on a tensile testing machine. In the control and experimental group compared, the relaxation curves and the following parameters were analyzed: initial stress (MPa), equilibrium stress (MPa) modulus of elasticity. **Results and their discussion.** After the crosslinking the rise of the initial stress (in the control group and 0.7+0.1 MPa, in the experimental and 1.5+0.21.3+0.3 MPa, respectively). The stress relaxation is fast (equilibrium stress value is reached after 250 sec.) and after the administration of glucose for approximately 75 seconds, which means a greater rigidity of experimental group of samples. In the experimental groups significantly changed and the modulus of elasticity: its value has increased approximately in 2 times in comparison with control samples. The equilibrium stress values in the experimental groups were different from the zero value that also indicates a change in the chemical structure of the samples. **Conclusions.** Holding transepithelial of crosslinking with prior instillation of a 40% solution of glucose facilitates the penetration of Riboflavin into the corneal stroma and improves its biomechanical strength. Our data indicate promising application in the clinic of this modification of transepithelial crosslinking.

**Keywords:** transepithelial crosslinking, cornea, biomechanical properties

**For citation:** I.B. Medvedev, V.Ju. Evgrafov, S.N. Bagrov, R. S Kemov, N.N. Dergacheva Changes in biomechanical properties of the cornea after modified transepithelial crosslinking Ophthalmology in Russia. 2016;13 (2): 111-114 doi: 10.18008/1816-5095-2016-2-111-114

**Financial Disclosure:** No author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

**There is no conflict of interests.**

**Ophthalmology in Russia. 2016; 13 (2): 111-114**

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы для стабилизации патологического процесса при кератоконусе и ряде других заболеваний роговицы был предложен кросслинкинг — способ лечения, в основе которого лежит «уплотнение» или увеличение прочности роговицы, наступающее под воздействием низкоинтенсивного ультрафиолетового облучения стромы роговицы в присутствии сенсibilизатора (рибофлавина). Уплотнение ткани обусловлено повышением продукции синглетного кислорода, который, освобождаясь, вызывает образование связей — мостиков между разрозненными до того коллагеновыми фибриллами стромы, объединяя их в единую прочную сеть, усиливая прочность роговицы в 3-6 раз. Метод, разработанный T. Seller, G. Wollensak в 2003 г. [1], включает удаление эпителия в центральной 7-миллиметровой зоне, инстилляцию 0,1% раствора рибофлавина в течение 30 минут с последующим воздействием ультрафиолетовым излучением с длиной волны 370 нм и энергией излучения 3,0 мВт/см<sup>2</sup>. Серьезным недостатком стандартного протокола кросслинкинга является удаление эпителия роговицы, так как оно приводит к значительному послеоперационному диском-

форту, затуманенности зрения, риску развития инфекционных кератитов. В связи с этим была предложена технология трансэпителиального кросслинкинга, однако эффективность вмешательства при данном способе снижена [2,3].

Нами была разработана собственная модификация трансэпителиального кросслинкинга [4]. Способ включает пропитывание роговицы глаза 0,1%-ным раствором рибофлавина и последующее ее облучение ультрафиолетовым светом с длиной волны 365-375 нм в течение 30 мин. При этом перед пропитыванием роговицы рибофлавином на нее наносят 40%-ный раствор глюкозы на 9-11 мин., затем остатки раствора удаляют, а на обработанную глюкозой поверхность роговицы наносят 0,1%-ный раствор рибофлавина на 30 мин. В настоящее время мы проводим цикл исследований с целью обоснования применения данного метода в клинической практике.

Целью данной работы явилась оценка изменения биомеханических свойств роговицы после проведения трансэпителиального кросслинкинга с предварительным применением 40%-ного раствора глюкозы.

**Таблица 1.** Биомеханические показатели образцов роговицы после проведения кросслинкинга

**Table 1.** Biomechanical parameters of the cornea samples after crosslinking

Группа образцов Sample group	Начальное напряжение, МПа Initial stretch, mPa	Equilibrium stretch, mPa	Модуль упругости, МПа elastic modulus, mPa
Контрольная Control	0,7+0.1	0+0.0	3,4+0.3
трансэпителиальный кросслинкинг Transepithelial crosslinking	1,5+0.2	0,2+0.08	7,5+0.6
Инстиляция 40%-ной глюкозы + трансэпителиальный кросслинкинг 40% glucose instillations + Transepithelial crosslinking	1,3+0.3	0,2+0.06	6,5+0.5

И. Б. Медведев и др.

Контактная информация: Дергачева Надежда Николаевна deb20052005@yandex.ru

Изменение биомеханических свойств роговицы после модифицированного...

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего изучены биомеханические свойства роговицы шести кроликов породы Шиншилла (12 глаз). 4 кролика вошли в опытную группу, в которой на один глаз наносили раствор глюкозы непосредственно на роговицу и выдерживали в течение 10 минут, после чего проводили закапывание 0,1% раствора рибофлавина в течение 30 минут. На парный глаз кролика наносили раствор рибофлавина без предварительной инстилляцией глюкозы. Затем осуществляли процедуру облучения по стандартной технологии с воздействием УФ излучения с длиной волны 370 нм и энергией излучения 3.0 мВт/см<sup>2</sup>. Два кролика (4 глаза) составили контрольную группу, в которой кросслинкинг не проводился. Через 1 месяц выполняли эвтаназию животных с последующей энуклеацией для исследования роговицы на разрывной машине. Применяли универсальную разрывную машину Р-5. Режим исследований — температура 25°C, скорость движения нижнего зажима 50 мм/мин., деформация 30%. Образцы исследования выкраивали из центральной части роговицы кроликов (длина 8 мм, ширина 4 мм). В контрольной и опытной группе сравнивали кривые релаксации и анализировали следующие показатели: начальное напряжение (мПа), равновесное напряжение (мПа), модуль упругости.

Модуль упругости — физическая величина, характеризующая способность твёрдого тела упруго (то есть не постоянно) деформироваться при приложении к нему силы. В области упругой деформации модуль упругости тела в общем случае зависит от напряжения и определяется производной (градиентом) зависимости напряжения от деформации, то есть тангенсом угла наклона диаграммы напряжений-деформаций:

$$E^{\text{def}} \equiv \frac{d\sigma}{d\varepsilon},$$

где  $E$  — модуль упругости;  $\sigma$  — напряжение, вызываемое в образ-

це действующей силой (равно силе, делённой на площадь приложения силы);  $\varepsilon$  — упругая деформация образца, вызванная напряжением (равна отношению изменения размера образца после деформации к его первоначальному размеру).

В наиболее распространённом случае зависимость напряжения и деформации является линейной (закон Гука):

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}.$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Примеры типичных релаксационных кривых в опытных и контрольной группе представлены на Рис.1-3.

Характер релаксационных кривых во всех 3-х группах по форме весьма близок и напоминает логарифмическую кривую.

После проведения кросслинкинга отмечается рост начального напряжения (в контрольной группе 0,7±0,1 мПа, в опытных — 1,5±0,2 и 1,3±0,3 мПа, соответственно). Релаксация напряжения проходит быстро (равновесное значение напряжения достигается уже через 250 сек.), а после инстилляцией глюкозы — примерно в течение 75 сек., что говорит о большей ригидности этой группы образцов. В опытных группах достоверно изменился и модуль упругости: его значения возросли приблизительно в 2 раза по сравнению с контрольными образцами. Равновесные значения напряжения в опытных группах стали отличными от нулевого значения, что также свидетельствует об изменении химической структуры образцов. Как правило, увеличение значений равновесных напряжений в опытах по релаксации напряжения происходит за счёт образования поперечных сшивков.

Ранее сообщалось, что интенсивное пропитывание стромы роговицы рибофлавином необходимо для изменения её биомеханических свойств при проведении кросслин-

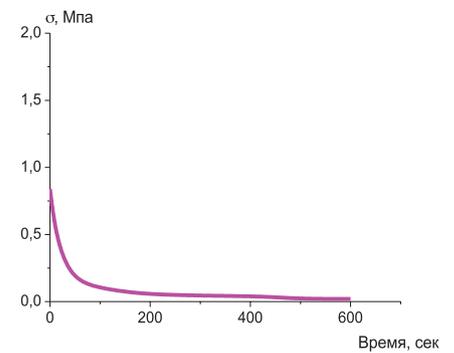


Рис. 1. Пример типичной релаксационной кривой в контрольной группе.

Fig.1 An example of a typical relaxation curve in the control group.

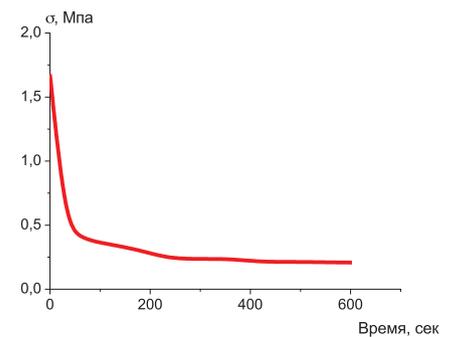


Рис.2. Пример типичной релаксационной кривой в группе, где проводили только кросслинкинг

Fig.2 An example of a typical relaxation curve in the group, where the crosslinking was performed only

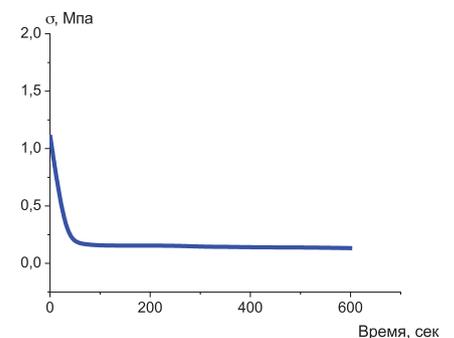


Рис.3 Пример типичной релаксационной кривой в группе, где перед кросслинкингом проводили инстилляцию 40%-ной глюкозы

Fig.3 An example of a typical relaxation curve in the group, where the crosslinking was performed after instillation of a 40% glucose

кинга [2]. Хорошо известно, что интактный эпителий является препятствием для диффузии рибофлавина [5]. В связи с этим, согласно традиционному протоколу проведения кросслинкинга, эпителий роговицы дол-

жен быть удален перед аппликацией раствора рибофлавина. В то же время желательно сохранение эпителия роговицы, поскольку это позволяет уменьшить интра- и послеоперационные болевые ощущения, избежать использования лечебных контактных линз, уменьшить риск послеоперационных инфекционных осложнений и снижения прозрачности роговицы [6,7]. Возможность выполнения кросслинkinга транэпителиально была установлена сравнительно недавно, но преимущества такой манипуляции недостаточно строго доказаны [8,9]. Проницаемость эпителиального слоя для рибофлавина можно повысить несколькими способами: увеличением длительности контакта с рибофлавином, повышением проницаемости межклеточного матрикса или изменением физико-химических свойств раствора рибофлавина [10]. Ранее нами было показано, что предварительная инстилля́ция 40%-ной глюкозы в течение 10 минут позволяет добиться достаточного пропитывания стромы роговицы без удаления эпителия, что помимо снижения операционного риска позволяет также уменьшить время проведения операции.

В данном исследовании оценивали влияние разработанной нами модификации кросслинkinга на биомеханические свойства роговицы.

После проведения кросслинkinга нами был выявлен отек стромы роговицы, который был несколько более выражен в случае инстилля́ции раствора 40%-ной глюкозы. Это может объяснить тот несколько неожиданный факт, касающийся более низкой ригидности роговицы во 2-й группе, что теоретически может объясняться

более интенсивным пропитыванием стромы рибофлавином [5]. Известно также, что кривизна и толщина роговицы влияют на её ригидность [11], однако отличия в группах по этим показателям в нашей работе были слишком незначительны, чтобы повлиять существенным образом на полученные данные. Следует отметить, что малый размер выборки, вариации в уровне ВГД, вариации характеристик роговицы экспериментальных животных могут влиять на достоверность полученных результатов [12]. Для того чтобы обосновать использование предварительных инстилля́ций с применением 40%-ной глюкозы перед транэпителиальным кросслинkinгом, следует также провести оптическую и электронную микроскопию образцов роговицы после данной процедуры.

## ВЫВОДЫ

1. Проведение транэпителиального кросслинkinга с предварительной инстилля́цией 40% раствора глюкозы обеспечивает проникновение рибофлавина в строму роговицы и повышает её биомеханическую прочность.

2. Полученные данные указывают на перспективность применения в клинике разработанной модификации транэпителиального кросслинkinга. Для обоснования её использования требуется выполнение оптической и электронной микроскопии роговицы, а также проведение предварительных клинических исследований.

*Мнение авторов может не совпадать с позицией редакции*

*поступила 14.03.16 / received 14.03.16*

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress – strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin Ultraviolet-A-induced collagen cross-linking. J Cataract Refract Surg. 2003;29:1780-1785.
- Wollensak G Spoerl E Wilsch M Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin- ultraviolet-A treatment in the rabbit. J Cataract Refract Surg. 2003;29:1786-1790.
- Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. J Cataract Refract Surg. 2009 Mar;35 (3):540-6.
- Evgrafov VY, IB Medvedev, Medvedev NI, Bagrov SN, RS Kemov [A method of treating keratoconus cornea]. Patent for invention RU 2542799, 28.01.2015. (in Russ.).
- Baiocchi S Mazzotta C Cerretani D Caporossi T Caporossi A. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. J Cataract Refract Surg. 2009;35:893-899.
- Abdelghaffar W Hantera M Elsabagh H. Corneal collagen crosslinking: promises and problems. Br J Ophthalmol. 2010;94:1559-1560.
- Ashwin PT McDonnell PJ. Collagen crosslinkage: a comprehensive review and directions for future research. Br J Ophthalmol. 2010;94:965-970.
- Filippello M Stagni E O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. J Cataract Refract Surg. 2012;38:283-291.
- Salman AG. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus in a pediatric age group. J Cataract Refract Surg. 2013;39:1164-1170.
- Raiskup F Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A.I. Principles. Ocul Surf. 2013;11:65-74.
- Beshtawi IM O'Donnell C Radhakrishnan H. Biomechanical properties of corneal tissue after ultraviolet-A-riboflavin crosslinking. J Cataract Refract Surg. 2013;39:451-462.
- Boxer Wachler BS, Pinelli R, Ertan A, Chan C. Safety and efficacy of transepithelial crosslinking J Cataract Refract Surg. 2010 Jan;36 (1):186-8.

## Сведения об авторах

**Медведев Игорь Борисович**, д.м.н., профессор, кафедра офтальмологии ФДПО ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ул. Островитянова д. 1, г. Москва, 117997, Российская Федерация, glazmed@list.ru

**Евграфов Владимир Юрьевич**, д.м.н., профессор, кафедра офтальмологии ФДПО ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ул. Островитянова д. 1, г. Москва, 117997, Российская Федерация, evgrafov@lidt.ru

**Багров Сергей Николаевич**, к.б.н. ООО «Центр глазной хирургии», ул. Пречистенка 40/2, стр.1, Москва, 119034, Российская Федерация

**Кемов Руслан Султанович**, врач-офтальмолог, «Центр глазной хирургии», ул. Пречистенка 40/2, стр.1, Москва, 119034, Российская Федерация, rukemov@inbox.ru

**Дергачева Надежда Николаевна**, аспирант, кафедра офтальмологии ФДПО ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ул. Островитянова д. 1, г. Москва, 117997, Российская Федерация, deb20052005@yandex.ru

## Affiliation

**Medvedev Igor Borisovich**, MD, ophthalmology department of Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia, glazmed@list.ru

**Evgrafov Vladimir Urjevich**, M.D. Ph.D., ophthalmology department of Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia, evgrafov@lidt.ru

**Bagrov Sergej Nikolajevich**, PhD, LLC «Eye surgery center», Prechistenka str.1, Moscow, 119034, Russia, mail@lasik.ru

**Kemov Ruslan Sultanovich**, ophthalmologist, LLC «Eye surgery center», Prechistenka str.1, Moscow, 119034, Russia, rukemov@inbox.ru

**Dergacheva Nadejda Nikolaevna**, postgraduate, ophthalmology department of Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia, deb20052005@yandex.ru