

Локальный антиоксидантный статус после ультрафиолетового кросслинкинга роговицы у пациентов с кератоконусом



А.Р. Халимов



Л.И. Халимова



Э.Л. Усубов

ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»
ул. Пушкина, 90, Уфа, 450008, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2019;16(1S):74–78

В статье представлены результаты исследования состояния локального антиоксидантного статуса у пациентов с прогрессирующим кератоконусом (КК) и его динамики на фоне ультрафиолетового кросслинкинга роговицы. **Цель:** изучить оксидативную активность слезы пациентов с кератоконусом и ее динамику после ультрафиолетового кросслинкинга роговицы. **Пациенты и методы.** Для оценки локального уровня оксидативной активности при кератоконусе были исследованы уровни общего антиоксидантного статуса (ОАС) и супероксиддисмутазы (СОД) в слезной жидкости пациентов с КК, а также динамика этих показателей на фоне лечения методом кросслинкинга. В исследование были включены 38 пациентов (38 глаз) с кератоконусом I–II стадии (по классификация Амслер), в том числе мужчин — 24 (63,1 %), женщин — 14 (36,9 %). Группу с проведением стандартного УФ кросслинкинга (S-CXL) составили 20 глаз, импульсного акселерированного (I-CXL) — 18 глаз. Средний возраст пациентов составил $32,4 \pm 6,8$ года. Для группы контроля были отобраны 12 практически здоровых лиц. Сроки наблюдений — до операции, 3, 7, 14 и 30-е сутки после процедуры. **Результаты.** На основании проведенных исследований выявлено, что в слезе у пациентов с кератоконусом отмечается статистически значимое снижение исходного показателя ОАС на 40 %, которое составило $1,68 \pm 0,21$ ммоль/л, у здоровых людей — $2,82 \pm 0,15$ ммоль/л. Уровень СОД в слезе у пациентов с кератоконусом также был ниже на 19 % — до $96,7 \pm 11,3$ нг/мл, в контроле — $119,1 \pm 16,5$ нг/мл. Применение S-CXL роговицы вызвало снижение ОАС в течение первых 3 дней с последующим восстановлением его уровня. Применение I-CXL роговицы также показало снижение этого показателя, однако к концу 1-го месяца уровень ОАС оказался выше предоперационного и лучше, чем при применении стандартного протокола. Снижение уровня СОД после лечения отмечалось в течение первых 3 дней, однако использование S-CXL вызвало более резкий коллапс этого показателя по сравнению с показателем, полученным после проведения импульсного акселерированного протокола кросслинкинга роговицы. **Вывод.** Выявлено, что у пациентов с кератоконусом отмечается снижение локального антиоксидантного статуса на основании данных ОАС и уровня СОД. Применение ультрафиолетового кросслинкинга роговицы вызывает максимальное снижение показателей СОД и ОАС на 3-й день после процедуры, а с 14-х суток наблюдается их постепенное восстановление до исходного уровня. Применение стандартного протокола у пациентов с кератоконусом способствовало более выраженному развитию местного кросслинкинг-индуцированного ущерба в виде снижения антиоксидантного статуса слезы по сравнению с тем, что наблюдалось в результате использования импульсного акселерированного метода.

Ключевые слова: кератоконус, антиоксидантная активность, роговица, кросслинкинг, УФ-облучение

Для цитирования: Халимов А.Р., Халимова Л.И., Усубов Э.Л. Локальный антиоксидантный статус пациентов с кератоконусом после ультрафиолетового кросслинкинга роговицы. *Офтальмология*. 2019;16(1S):74–78. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2019-1S-74-78>

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

Конфликт интересов отсутствует



Local Antioxidant Status in Patients with Keratoconus after Ultraviolet Corneal Crosslinking

A.R. Khalimov, L.I. Khalimova, E.L. Usubov

Ufa Eye Research Institute

Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2019;16(1S):74–78

The article presents the study results of the local antioxidant status in patients with progressive keratoconus and its dynamics after the ultraviolet corneal crosslinking. **Purpose:** to study the oxidative activity in the tear of the patients with keratoconus and its dynamics after ultraviolet cornea crosslinking. **Patients and methods.** To assess the local level of oxidative activity in keratoconic patients according to the levels of total antioxidant status (TAS) and superoxide dismutase (SOD) in the tear fluid, as well as their dynamics after UV crosslinking were investigated. The study included 38 patients (38 eyes) with keratoconus stage I–II (classification according to Amsler), men — 24 (63.1 %), women — 14 (36.9 %). The standard UV crosslinking group (S-CXL) was 20 eyes, and the pulsed accelerated protocol (I-CXL) — 18 eyes. The average age of patients was 32.4 ± 6.8 years. As a control group, 12 practically healthy individuals were selected. The time of observation is before the operation, on the 3rd, 7th, 14th and 30th days after the procedure.

Results: On the basis of the conducted studies, it was revealed that keratoconus patients showed a statistically significant decrease in the initial indicator of TAS by 40 % and amounted to 1.68 ± 0.21 mmol/l, compared to healthy people — 2.82 ± 0.15 mmol/l. The SOD level in tears in patients with keratoconus was also lower by 19 % — to 96.7 ± 11.3 ng/ml, compared to the control — 119.1 ± 16.5 ng/ml. The use of S-CXL of the cornea caused a decrease in TAS during the first 3 days with the subsequent restoration of its level. The use of pulse A-CXL also showed a decrease in this indicator, but by the end of 1st month the level of TAS was higher than preoperative and better than when using the standard protocol. A decrease in SOD level after treatment was noted during the first 3 days, however, the use of S-CXL caused a more significant collapse of this indicator compared to the pulsed accelerated corneal crosslinking protocol. **Conclusion.** TAS data and SOD level had shown a decrease in local antioxidative status in patients with keratoconus. Ultraviolet corneal crosslinking causes the maximum decrease in SOD and TAS on the 3rd day after the procedure, and from the 14th day their gradual recovery to the initial level is observed. The standard protocol contributed to a more pronounced development of local cross-linking damage in patients with keratoconus. It manifests itself in the antioxidant status reduction of the tear compared to the pulsed accelerated method.

Keywords: keratoconus, antioxidant activity, cornea, crosslinking, UV irradiation

For citation: Khalimov A.R., Khalimova L.I., Usubov E.L. Local Antioxidant Status in Patients with Keratoconus after Ultraviolet Corneal Crosslinking. *Ophthalmology in Russia*. 2019;16(1S):74–78. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2019-1S-74-78>

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

There is no conflict of interests

Известно, что у пациентов с различными дистрофическими заболеваниями роговицы возможно повышение активности отдельных оксидативных ферментов, что лежит в основе патогенеза заболевания.

Роговица при кератоконусе (КК) подвержена хроническому окислительному стрессу и деградации тканей с выработкой, в частности, перекиси водорода. В итоге может отмечаться повышение уровня каталазы митохондриальной РНК, утилизирующей H_2O_2 [1]. Роли окислительного стресса в развитии КК уделяется все больше внимания [2]. У пациентов с КК уровень свободных радикалов и других реактивных веществ в роговице, как правило, выше, чем у здоровых лиц [3, 4]. При КК наблюдалось повышенное количество эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в месте разрыва слоя боуменовой оболочки, что указывает на увеличение продукции оксида азота (NO) в этих областях роговицы [4]. NO и пероксинитрит могут быть вовлечены во множественные цитотоксические эффекты, включая повреждение ДНК и активацию апоптотических путей [5]. Чрезмерное образование реактивных форм азота может способствовать модификации молекул стромаль-

ного коллагена, повышению апоптотической активности и истончению роговицы при КК [6].

В обеспечении баланса окислительных процессов играет роль семейство супероксиддисмутаз (СОД), которые катализируют реакцию дисмутации, трансформируя токсичный супероксидный радикал O_2^- в кислород и в менее токсичную перекись водорода. Известно, что экстраокулярные ткани обладают большей протекцией в отношении супероксида, чем интраокулярные. Слезная и внутриглазная жидкость имеет низкую СОД активность, при которой утилизация супероксидных радикалов осуществляется за счет аскорбиновой кислоты [7].

Ультрафиолетовое (УФ) облучение с рибофлавином образует активные формы кислорода — триплетный и синглетный кислород [8]. Синглетный кислород — высокоактивный, естественный клеточный метаболит аэробных организмов, и он может оказывать как положительное, так и негативное воздействие. Наряду с клинической стабилизацией процесса у пациентов с кератоконусом после проведения УФ кроссликинга роговицы может наблюдаться сдвиг локального оксидативного

A.R. Khalimov, L.I. Khalimova, E.L. Usubov

Contact information: Usubov Emin emines.us@inbox.ru

статуса, который служит критерием оценки безопасности и эффективности процедуры [9].

Цель: изучить оксидативную активность слезы пациентов с кератоконусом и ее динамику после проведения ультрафиолетового кросслинкинга роговицы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для оценки локальной оксидативной активности при кератоконусе были исследованы уровни общего антиоксидантного статуса (ОАС) и супероксиддисмутазы (СОД) в слезной жидкости пациентов с КК, а также их динамика на фоне лечения методом кросслинкинга. В исследование были включены 38 пациентов (38 глаз) с кератоконусом I–II стадии (по классификации Амслер), находившихся на стационарном лечении в Уфимском НИИ глазных болезней, в том числе мужчин — 24 (63,1 %), женщин — 14 (36,9 %). В качестве лечебного мероприятия были применены 2 различных протокола ультрафиолетового кросслинкинга. Группу стандартного УФ кросслинкинга (S-CXL) составили 20 пациентов (20 глаз), импульсного акселерированного (I-CXL) — 18 пациентов (18 глаз).

Определение ОАС проводили с использованием тест-системы Total antioxidant status (TAS) (Randox Laboratory Limited, Великобритания) в ммоль/л на основании изменения окрашивания радикала катиона ABTS с детекцией при 600 нм на фотометре SF-Ultra (Россия). Уровень СОД определялся в нг/мл с использованием тест-системы eBioscience (Австрия) по количеству белка в пероксидазной реакции с детекцией при 450 нм на фотометре StatFax (США).

Средний возраст пациентов составил $32,4 \pm 6,8$ года. В качестве группы контроля были отобраны 12 практи-

чески здоровых лиц. Сроки наблюдений — до операции, 3, 7, 14 и 30-е сутки после процедуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании проведенных исследований выявлено, что у пациентов с кератоконусом отмечено значительное статистически значимое снижение исходного ОАС на 40 %, которое составило $1,68 \pm 0,21$ ммоль/л, у здоровых людей показатель составил $2,82 \pm 0,15$ ммоль/л. Исследование содержания СОД в слезе у пациентов с кератоконусом также выявило незначительное снижение ее уровня на 19 %, а именно до $96,7 \pm 11,3$ нг/мл, в контрольной группе — $119,1 \pm 16,5$ нг/мл.

Выполнение оперативного вмешательства, несомненно, вызвало отрицательную динамику показателя ОАС вне зависимости от выбранного протокола кросслинкинга (рис. 1).

В частности, применение стандартной процедуры кросслинкинга роговицы спровоцировало резкое снижение ОАС в 1-й день после процедуры до $1,12 \pm 0,15$ ммоль/л. Интересно, что отрицательная динамика наблюдалась в раннем послеоперационном периоде с минимальным значением на 3-й день — $0,81 \pm 0,12$ ммоль/л. Через неделю после процедуры уровень ОАС начал восстанавливаться и на 7-й день составил $0,98 \pm 0,11$ ммоль/л. В течение последующих 3 недель показатель ОАС неуклонно рос и составил $1,19 \pm 0,15$ ммоль/л на 14-й и $1,31 \pm 0,19$ ммоль/л на 30-й день.

Использование акселерированного импульсного кросслинкинга роговицы показало схожие результаты. Отмечалось статистически значимое снижение этого показателя почти во все сроки и составило в 1-й день $1,39 \pm 0,20$ ммоль/л, в 3-й — $1,03 \pm 0,14$ ммоль/л, в 7-й —

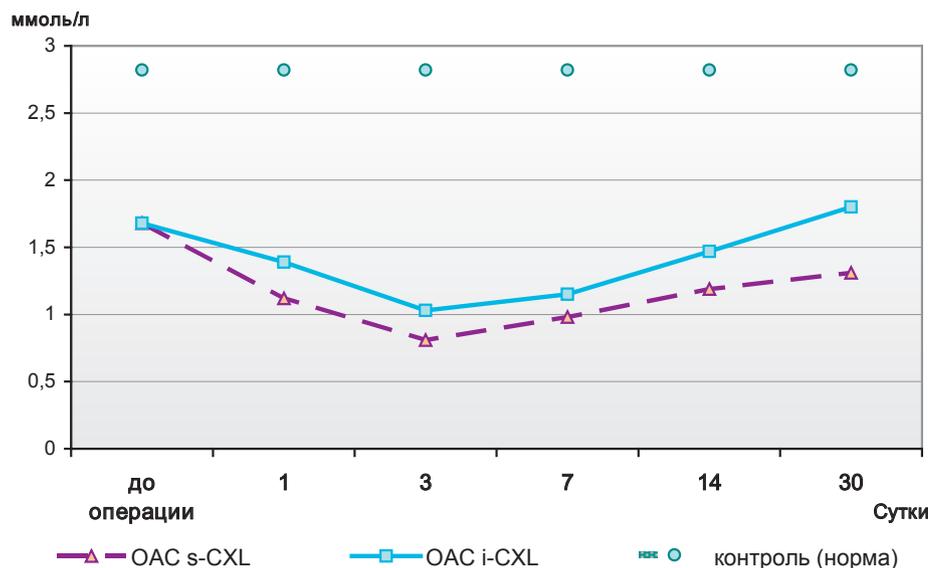


Рис. 1. Общий антиоксидантный статус (ОАС) слезной жидкости у пациентов с кератоконусом после стандартного (s-CXL) и импульсного (i-CXL) УФ кросслинкинга роговицы (ммоль/л)

Fig. 1. Total antioxidant status (TAS) of the patients tear fluid with keratoconus after standard (s-CXL) and pulsed (i-CXL) corneal UV cross-linking (mmol/l)

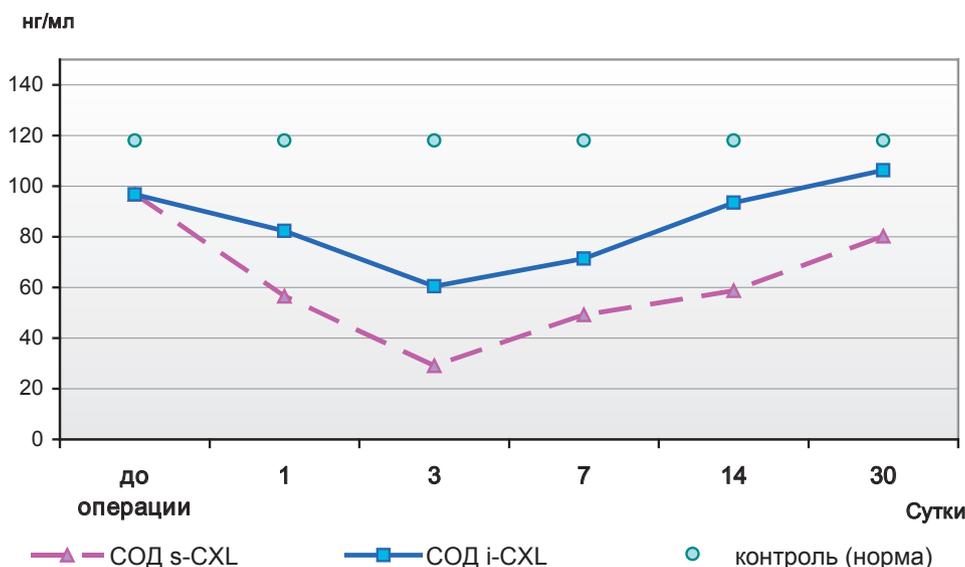


Рис. 2. Содержание супероксиддисмутазы (СОД) в слезной жидкости пациентов с кератоконусом после стандартного (s-CXL) и импульсного (i-CXL) УФ кросслиннинга роговицы (нг/мл)

Fig. 2. The content of superoxide dismutase (SOD) in the patients tear fluid with keratoconus after the standard (s-CXL) and pulsed accelerated (i-CXL) corneal UV crosslinking (ng/ml).

1,15 ± 0,15 ммоль/л, в 14-й — 1,47 ± 0,21 ммоль/л и в 30-й — 1,80 ± 0,24 ммоль/л. Несмотря на то что динамика активности ОАС была схожая, с резким снижением в первые трое суток с постепенным восстановлением к концу месяца, амплитуда скачков была не столь существенная. Так, на 3-е сутки показатель ОАС после S-CXL снизился на 71 %, тогда как на фоне I-CXL — на 63 %. Более того, на 30-е сутки показатель ОАС восстановился и оказался выше исходного дооперационного уровня после I-CXL, тогда как после S-CXL оставался низким.

После выполнения кросслиннинга роговицы также отмечалось значительное, статистически значимое снижение уровня СОД в слезе в различные сроки при применении обоих протоколов (рис. 2).

Применение стандартного протокола S-CXL вызвало снижение уровня СОД до 56,5 ± 12,2 нг/мл в 1-й день. Отрицательная динамика наблюдалась в течение 2 недель и составила 29,1 ± 8,5 нг/мл на 3-й и 49,2 ± 9,6 нг/мл на 7-й день. Через 2 недели после процедуры отмечалась положительная динамика на 14-й день — 58,7 ± 16,7 нг/мл с восстановлением уровня СОД практически до предоперационных показателей на 30-й день — 80,2 ± 14,1 нг/мл.

Выбор импульсного акселерированного протокола кросслиннинга роговицы также вызвал снижение

уровня СОД в слезе на всех сроках, что составило в 1-й день 82,3 ± 18,7 нг/мл, в 3-й — 60,5 ± 11,2 нг/мл, в 7-й — 71,4 ± 10,1 нг/мл, в 14-й — 93,5 ± 13,2 нг/мл и в 30-й — 106,3 ± 20,4 нг/мл. Однако статистически значимое снижение отмечалось только на 3-й день по сравнению с данными, полученными при применении стандартного протокола.

ВЫВОДЫ

Выявлено, что у пациентов с кератоконусом отмечается снижение локального антиоксидативного статуса по данным ОАС и уровня СОД. Применение ультрафиолетового кросслиннинга роговицы вызывает максимальное снижение показателей СОД и ОАС на 3-й день после процедуры, а с 14-х суток наблюдается их постепенное восстановление до исходного уровня. Применение стандартного протокола у пациентов с кератоконусом способствовало более выраженному развитию местного кросслиннинг-индуцированного ущерба в виде снижения антиоксидантного статуса слезы по сравнению с импульсным акселерированным методом.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Халимов А.Р. — выполнение исследований и техническое редактирование;
Халимова Л.И. — подготовка иллюстраций, оформление библиографии;
Усубов Э.Л. — написание статьи и редактирование.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Tran A., Carballo M., Saghizadeh M., Vasiliou V., Adachi W., Brown D.J. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: Evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46:823–832. DOI: 10.1167/iovs.04-0549
2. Chwa M., Atilano S.R., Hertzog D., Zheng H., Langberg J., Kim D.W., Kenney M.C. Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:4361–4369. DOI: 10.1167/iovs.08-1969
3. Chwa M., Atilano S.R., Reddy V., Jordan N., Kim D.W., Kenney M.C. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47:1902–1910. DOI: 10.1167/iovs.05-0828
4. Buddi R., Lin B., Atilano S.R., Zorapapel N.C., Kenney M.C., Brown D.J. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50:341–351. DOI: 10.1177/002215540205000306

5. Squadrito G.L., Pryor W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;25:392–403. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00095-1
6. Arnal E., Peris-Martinez C., Menezes J.L., Johnsen-Soriano S., Romero F.J. Oxidative stress in keratoconus? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52:8592–8597. DOI: 10.1167/iovs.11-7732
7. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслинкинг роговичного коллагена. *Вестник Российской академии наук.* 2016;71:3:224–232. [Bikbov M.M., Khalimov A.R., Usubov E.L. Ultraviolet Corneal Crosslinking. *Annals of Russian academy of sciences = Vestnik Rossiyskoy akademii nauk.* 2016;71:3:224–232 (In Russ.)]. DOI: 10.15690/vramn562
8. Бикбов М.М., Суркова В.К. Метод перекрестного связывания коллагена роговицы при кератоконусе. Обзор литературы. *Офтальмология.* 2014;11(3):13–18. [Bikbov M.M., Surkova V.K. Corneal collagen crosslinking for keratoconus. A review. *Ophthalmology in Russia = Oftal'mologiya.* 2014;11(3):13–18 (In Russ.)]. DOI: 10.18008/1816-5095-2014-3-13-19
9. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. *Эктазии роговицы.* М.: Офтальмология; 2011. [Bikbov M.M., Bikbova G.M. Corneal ectasia. Moscow: Ophthalmology; 2011 (In Russ.)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»
Халимов Азат Рашитович
кандидат биологических наук, заведующий научно-производственным отделом
ул. Пушкина, 90, Уфа, 450008, Российская Федерация

ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»
Халимова Лилия Илюсовна
младший научный сотрудник отделения хирургии роговицы и хрусталика
ул. Пушкина, 90, Уфа, 450008, Российская Федерация

ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»
Усубов Эмин Логман оглы
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией трансплантационной хирургии переднего отрезка глаза отделения хирургии роговицы и хрусталика
ул. Пушкина, 90, Уфа, 450008, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

Ufa Eye Research Institute
Khalimov Azat R.
PhD, Head of Research and Production Department
Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation

Ufa Eye Research Institute
Khalimova Liliya I.
Junior Researcher of Corneal and Refractive Surgery Department
Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation

Ufa Eye Research Institute
Usubov Emin L.
MD, consultant in charge of transplantation surgery laboratory of the anterior segment of the eye of Corneal and Refractive Surgery Department
Pushkin str., 90, Ufa, 450008, Russian Federation