

Экспериментальное обоснование эффективности различных методов доставки рибофлавина в строму роговицы как начального этапа выполнения УФ-кросслинкинга

Б.Э. Малюгин, С.Б. Измайлова, А.В. Шацких, Д.Е. Мерзлов, С.А. Пронкина
ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Изучить в эксперименте глубину проникновения 0,1%-ного раствора рибофлавина в физрастворе в строму роговицы при моделировании различных методик УФ-кросслинкинга и оценить степень альтерации передней поверхности роговицы при применении нового инструмента для дозированной скарификации эпителия.

Материал и методы. Для обнаружения рибофлавина в строме роговицы применяли инфракрасную Фурье-спектроскопию с регистрацией ИК-спектров отражения. Исследование проводили на 9 донорских глазах человека (3 группы по 3 глаза), не пригодных для целей трансплантации. В первой группе моделировали классический метод УФ-кросслинкинга с полным удалением эпителия, во второй – трансэпителиальный метод, в третьей – метод дозированного механического нарушения целостности эпителия при помощи скарификатора оригинальной модели. 0,1%-ный раствор рибофлавина инстиллировали на протяжении 30 минут (по 1 капле каждую минуту) после установки глаза в фиксаторе. Во второй группе для разрыхления контактов между клетками эпителия роговицы одновременно с 0,1%-ным раствором рибофлавина инстиллировали 0,5%-ный раствор проксиметакаина, содержащий бензаклония хлорид. Степень повреждения передних

слоев роговицы при применении скарификатора изучали на 3-х кадаверных глазах при помощи световой микроскопии.

Результаты. При регистрации спектров излучения в инфракрасном диапазоне со стороны эндотелия в первой и третьей группах отмечали достоверное увеличение интенсивности полосы 1542 см^{-1} , характерной для рибофлавина, что свидетельствовало о полном пропитывании им стромы роговицы. Увеличение данного показателя в 1 и 2 группах составило $7,3\pm 0,5\%$ и $7,8\pm 0,6\%$ соответственно ($p>0,05$). Относительная интенсивность спектров роговиц третьей группы достоверно не отличалась от таковых при контрольных измерениях (до инстилляции раствора рибофлавина). Изучение морфологии роговицы после применения скарификатора показало альтерацию всех слоев эпителия вплоть до Боуеновой мембраны без нарушения целостности последней.

Выводы. Нами доказано полноценное пропитывание стромы роговицы 0,1%-ным раствором рибофлавина при использовании метода дозированной скарификации эпителия, сравнимое с таковым при полной дезэпителизации роговицы, а также обоснована эффективность и безопасность нового инструмента-скарификатора.

Ключевые слова: кератоконус, спектроскопия, УФ-кросслиндинг, роговичный эпителий, рибофлавин. ■

Офтальмохирургия. – 2014. – № 1. – С. 24-29.

Для корреспонденции:

Малюгин Борис Эдуардович, докт. мед. наук, профессор, зам. ген. директора по научной работе;

Измайлова Светлана Борисовна, канд. мед. наук, офтальмохирург;

Шацких Анна Викторовна, канд. мед. наук, зав. лабораторией патологической анатомии и гистологии глаза Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем;

Мерзлов Денис Евгеньевич, врач-офтальмолог, аспирант;

Пронкина Светлана Алексеевна, врач-офтальмолог, аспирант

ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России

Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а

Тел.: (499) 488-8543

E-mail: info@mntk.ru

ABSTRACT

Experimental rationales of the efficacy of different methods of riboflavin delivery into the corneal stroma as the initial step of corneal UV cross-linking

B.E. Malyugin, S.B. Izmaylova, A.V. Shatskikh, D.E. Merzlov, S.A. Pronkina

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

Purpose. To study experimentally the penetration of a 0.1% riboflavin solution in the balanced salt solution (BSS) into the corneal stroma during the simulation of various UV cross-linking techniques and to assess an alteration of anterior corneal surface using a new device for dosed corneal epithelium scarification.

Material and methods. We used the infra-red Fourier-spectroscopy with the registration of reflectance spectra to assess the Riboflavin penetration into the corneal stroma. The study was performed in 9 human donor eyes (3 groups of 3 eyes in each) which were not acceptable for transplantation. A classic UV cross-linking technique with the complete removal of the epithelium was simulated in the first group, a transepithelial technique – in the second group, a technique of a dosed corneal epithelium disruption using a new model of scarifier device – in the third group. Donor eyes were fixed in a holder, the 0.1% riboflavin solution was instilled during 30 minutes in a rate of 1 drop per minute. In the second group the 0.1% riboflavin solution and the 0.5% proximetacaine solution (containing benzalkonium chloride) were instilled simultaneously to break the tight junctions between the epithelial cells. The alteration of

anterior corneal surface was assessed in 3 cadaver eyes using the light microscopy after application of a new scarifier.

Results. The analysis of infra-red spectra, registered from the endothelial side of the corneas in the first and the second groups showed a significant increase in intensity of the band at 1542 cm^{-1} , which is typical for riboflavin. This fact demonstrates its full penetration to the corneal stroma and its complete impregnation. The increase of this index in the 1st and the 2nd groups was $7.3 \pm 0.5\%$ and $7.8 \pm 0.6\%$, respectively ($p > 0.05$). In the third group a relative intensity of the spectra did not differ significantly from those of control measurements (before instillation of riboflavin solution). The morphologic study of the corneas after use of a new scarifier showed the alteration of all epithelial layers up to the Bowman's membrane without damaging of its integrity.

Conclusions. We have proved a full impregnation of the corneal stroma with the 0.1% riboflavin solution using the method of dosed corneal epithelium scarification, comparable to that after a full corneal deepithelialization. The efficacy and safety of the new scarifier device were also substantiated.

Key words: keratoconus, spectroscopy, UV cross-linking, corneal epithelium, riboflavin. ■

Ophthalmosurgery.– 2014.– No. 1.– P. 24-29.

Химическое поперечное связывание коллагена роговицы с использованием ультрафиолетового излучения и фотосенсибилизатора (0,1%-ный раствор рибофлавина), получившее в литературе сокращенное название УФ-кросслинкинг, наряду с имплантацией роговичных сегментов является одним из перспективных направлений лечения кератэктазий различного генеза. Данная процедура направлена на стабилизацию патологического процесса путем повышения биомеханической прочности, способствующей сохранению формы эктазированной роговицы и препятствующей дальнейшему выпячиванию. В основе УФ-кросслинкинга лежит образование дополнительных ковалентных связей между волокнами коллагена роговицы, инициированных высвобождением свободных радикалов кислорода под воздействием УФ-излучения в присутствии рибофлавина [1-3, 9-11].

К настоящему моменту в клинической практике используются несколько методик доставки рибофлавина в стро-

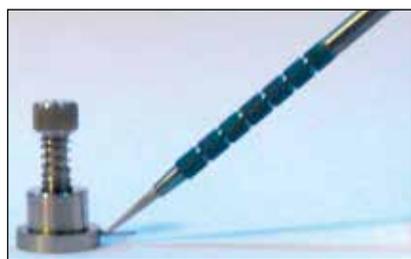
му роговицы как первого этапа процедуры УФ-кросслинкинга. Это – многократные инстилляциии рибофлавина после полной механической дезэпителизации роговицы, а также использование различных препаратов-разрыхлителей, нарушающих связи клеток эпителия роговицы. С целью химического нарушения целостности эпителия, как правило, используют растворы местных анестетиков, содержащие раствор бензалкония хлорида.

Эффективность классической методики доказана рядом клинических исследований, однако полная дезэпителизация приводит к значительному дискомфорту пациента в послеоперационном периоде, светобоязни, слезотечению, а также к увеличению риска послеоперационных инфекционных осложнений [10]. Трансэпителиальный УФ-кросслинкинг лишен выше перечисленных недостатков. Однако его эффективность многим исследователям представляется сомнительной ввиду того, что нарушение связей между клетками базального слоя эпи-

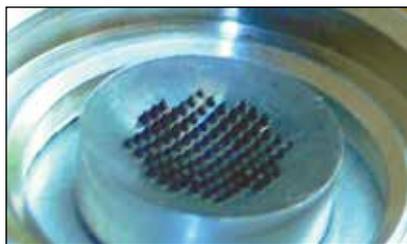
телиа, как правило, не является достаточным для полноценного прохождения рибофлавина и пропитывания им стромы роговицы [4, 7, 8]. УФ-кросслинкинг с частичным механическим нарушением целостности эпителия с этой точки зрения представляется перспективным. Однако сообщения о его клиническом применении являются единичными, и экспериментальных доказательств пропитывания стромы роговицы раствором рибофлавина при его применении нами не обнаружено [6].

ЦЕЛЬ

Изучение в эксперименте глубины проникновения 0,1%-ного раствора рибофлавина в строму роговицы при моделировании различных методик УФ-кросслинкинга и оценка степени альтерации передней поверхности роговицы при применении нового инструмента для дозированной скарификации эпителия.



а



б

Рис. 1. Общий вид (а) и рабочая часть (б) инструмента для дозированной скарификации эпителия роговицы

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование провели на 12 глазах человека, полученных от 10 доноров (трупов) без признаков патологии роговицы, которые не соответствовали критериям отбора донорского материала для целей кератопластики. Возраст доноров варьировал от 30 до 39 лет. Интервал от момента смерти до энуклеации не превышал 8 часов, от момента смерти до проведения эксперимента – не более 11 часов.

Были выделены 4 экспериментальных группы по 3 глаза. Для обнаружения рибофлавина в строме роговицы применяли инфракрасную Фурье-спектроскопию с регистрацией ИК-спектров отражения. В 1, 2 и 3 группах изучали степень пропитывания стромы роговицы раствором рибофлавина. Для этого цельный кадаверный глаз помещали в специальный фиксатор, затягивая его крепление таким образом, чтобы тонус глаза соответствовал нормальному. В 1-й группе, перед инстилляцией на роговицу 0,1%-ного раствора рибофлавина в физрастворе, эпителий полностью механически удаляли скребцом, что соответствовало начальному этапу выполнения кросслинкинга по классической методике. Во 2-й группе эпителий роговицы донорского глаза оставляли интактным, однако для увеличения проницаемости на его поверхность на протяжении 30 минут капельно наносили раствор анестетика (0,5%-ный пропаракаин), содержащий бензалкония хлорид. Данная методика ранее уже была описана в литературе и нашла свое применение в клинической практике [7, 8]. В 3-й группе выполняли дозированное механическое нарушение целостности эпителия с помощью специального инструмента-скарификатора.

Скарификатор оригинальной конструкции был разработан нами с целью

оптимизации технологии УФ-кросслинкинга¹. Его отличительная особенность – в конструкции рабочей части, представляющей собой часть полусферы, снабженную шипами, расположенными на внутренней (рабочей) поверхности и имеющими длину, равную 60 мкм, общее количество которых равно 95 (рис. 1). После наложения скарификатора на роговицу при нажатии на подпружиненный плунжер устройства шипы выдвигаются и входят в соприкосновение с передней поверхностью роговицы.

0,1%-ный раствор рибофлавина наносили на переднюю поверхность роговицы в течение 30 мин со скоростью 1 капли в минуту. После чего излишки рибофлавина смывали физиологическим раствором до получения прозрачных смывных вод и удаляли эпителий в случаях, когда он был сохранен. Роговицу высекали трепаном диаметром 8,0 мм и переносили на предметный столик ИК-микроскопа.

Для определения полноценного пропитывания стромы роговицы рибофлавином регистрацию спектров проводили со стороны эндотелия. Регистрировали несколько ИК-спектров отражения с разных участков роговицы со стороны эндотелия для выявления возможных флуктуаций. Спектры регистрировали в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на ИК-микроскопе Nuperion 2000 с кристаллом Германия (Ge), совмещенным с вакуумным ИК-Фурье-спектрометром модели IFS 66v/s (Bruker). Спектры усредняли по 50 сканам.

В режиме «НПВО» ИК-микроскопа регистрировали спектры рибофлавина в виде порошка. При сравнении ИК-спектра отражения рибофлавина в порошковой форме с ИК-спек-

тром отражения роговицы выявляли полосы спектра, не совпадающие по положению и интенсивности. Именно эти полосы служили индикатором присутствия рибофлавина в роговице. О полном проникновении рибофлавина через всю толщу роговицы свидетельствовало увеличение относительной интенсивности полос ее ИК-спектра, характерных для рибофлавина. В качестве контроля для оценки фонового спектра интактной роговицы служили усредненные ИК-спектры дезэпителизированных роговиц 1-й группы перед началом инстилляцией рибофлавина.

Глаза 4-й группы использовали для изучения морфологии роговицы методом световой микроскопии. Определяли глубину и характер нарушений целостности эпителия, а также наличие повреждений Боуменовой мембраны и передних слоев стромы роговицы после применения инструмента-скарификатора.

В ходе данной группы экспериментов донорский глаз закрепляли в специальном фиксаторе, регулируя его таким образом, чтобы тонус глаза соответствовал нормальному. Далее на глаз устанавливали скарификатор, нажимали на кнопку инструмента, при этом слегка её ротируя в нажатом положении (в пределах 5°-10°). Далее роговицу выделяли и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезжиривали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозин. Препараты изучали под микроскопом фирмы Leica DM LB2 (Германия) при увеличении x50, x100, x200, x400 крат с последующей фоторегистацией.

Все вышеперечисленные исследования выполняли на базе Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН и в Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании порошковой формы рибофлавина на ИК-микроскопе было выявлено, что самая интенсив-

¹ Заявка на патент РФ № 2013130332 от 04.07.2013 г.

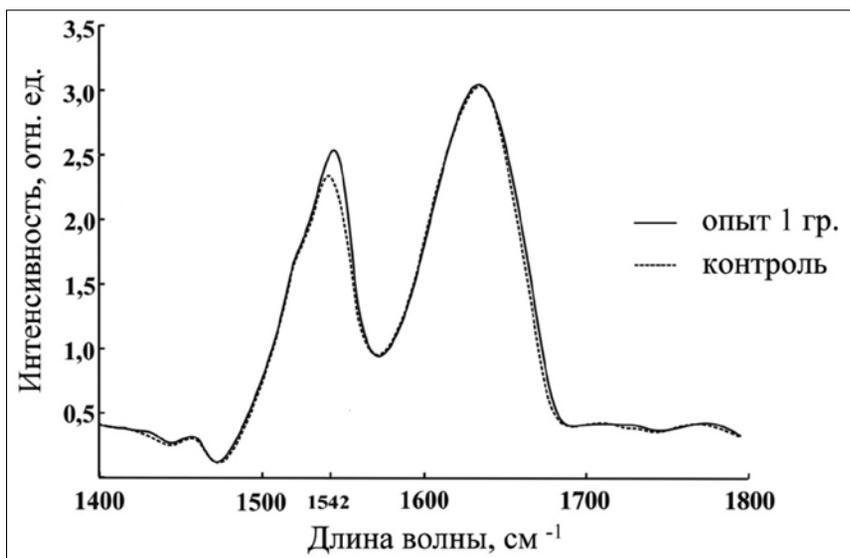


Рис. 2. Усредненные ИК-спектры отражения роговиц первой группы и контроля

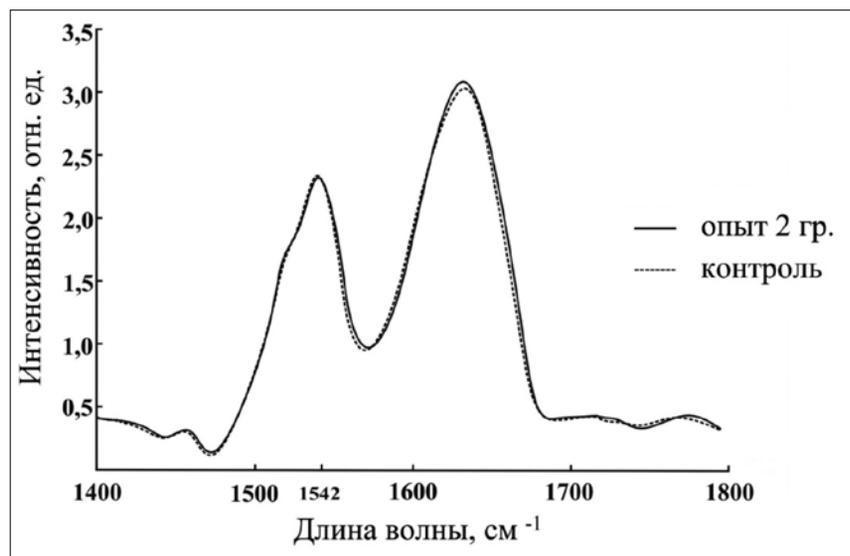


Рис. 3. Усредненные ИК-спектры отражения роговиц второй группы и контроля

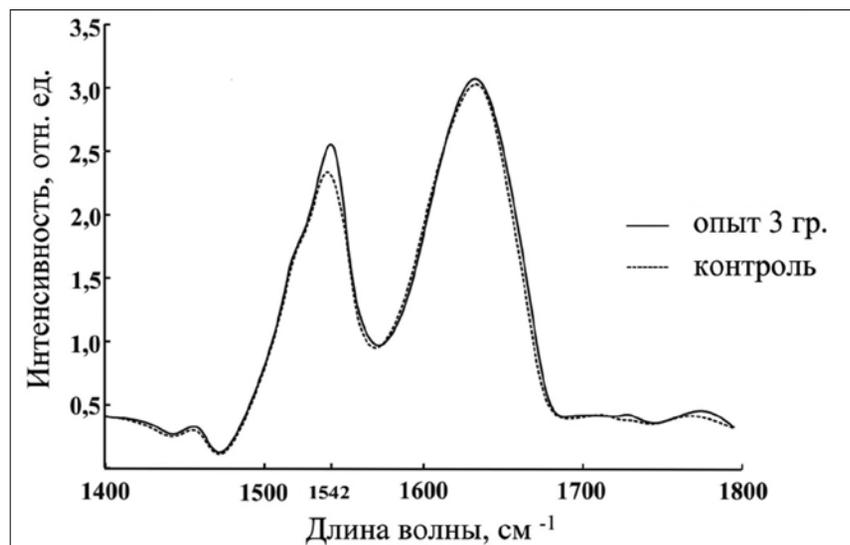


Рис. 4. Усредненные ИК-спектры отражения роговиц третьей группы и контроля

ная полоса находится в спектре 1542 см^{-1} . Данная полоса относится к сопряженным связям «C=C» и «C=N» в конденсированных ароматических кольцах рибофлавина и менее всего подвержена влиянию взаимодействия с растворителем, что приводит к сохранению интенсивности этой полосы в спектре раствора. Количественной характеристикой изменения ИК-спектров служило изменение относительной интенсивности полос 1542 см^{-1} и 1640 см^{-1} , выраженное в процентах. Полоса 1640 см^{-1} была выбрана в качестве контроля в виду того, что она относится к той же пептидной связи, что и полоса 1542 см^{-1} , и отражает в ней исключительно различный тип колебаний, следовательно, в одинаковых условиях их относительная интенсивность остается постоянной.

При анализе усредненного инфракрасного спектра отражения роговиц первой группы выявили достоверное увеличение относительной интенсивности полосы 1542 см^{-1} по сравнению с контролем на $7,3 \pm 0,5\%$, что свидетельствовало о проникновении рибофлавина в строму роговицы (рис. 2).

Относительная интенсивность полосы 1542 см^{-1} усредненного ИК-спектра роговиц в условиях интактного эпителия (2 группа) не имела статистически значимой разницы по сравнению с контролем (рис. 3).

Анализ усредненного спектра роговиц третьей группы показал сходные результаты. Относительная интенсивность его полосы, равная 1542 см^{-1} , была выше на $7,8 \pm 0,6\%$ по сравнению с контролем (рис. 4).

Результаты ИК-спектроскопии в исследуемых группах суммированы в табл.

В результате изучения морфологии 3-х донорских роговиц человека по-

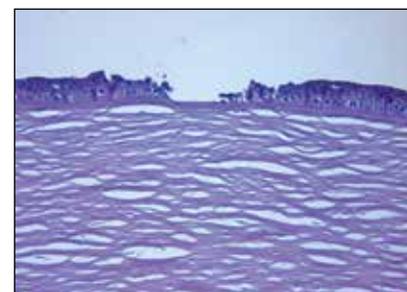


Рис. 5. Гистопрепарат донорской роговицы человека после применения инструмента-скарификатора. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x200

Сравнение относительных интенсивностей полос ИК-спектра в исследуемых группах

Таблица

Исследуемая группа	Относительная интенсивность полос 1542 см ⁻¹ /1640 см ⁻¹ (отн. ед.)	Изменение относительной интенсивности свечения (%)
Контроль	0,667±0,003	-
Группа I	0,716±0,003	+7,3±0,5
Группа II	0,668±0,003	+0,2±0,5
Группа III	0,719±0,004	+7,8±0,6

сле применения скарификатора (4-я исследуемая группа) было определено, что в зоне воздействия шипов инструмента имел место сквозной дефект всех слоев переднего эпителия роговицы, включая базальный. При этом ни в одном случае альтерация эпителия не сопровождалась повреждением Боуменовской мембраны и передних слоев стромы роговицы (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работах, посвященных изучению проникновения рибофлавина в строму роговицы человека при использовании классической методики УФ-кросслинкинга, ранее был применен метод спектрофотометрии, основанный на регистрации спектра, прошедшего через центр роговицы и поглощенного ею УФ-излучения (спектр поглощения). Спектр регистрировали в интервале 400-700 нм, после чего результаты сравнивали со спектром поглощения чистого рибофлавина [4, 5].

Однако вышеописанный способ имеет существенный недостаток, заключающийся в том, что он не позволяет достоверно распознать присутствие рибофлавина в строме роговицы вследствие того, что спектр поглощения излучения рибофлавина, как и других веществ, не является специфическим, что может привести к ошибочной интерпретации результатов исследования.

Именно поэтому нами для обнаружения рибофлавина в строме роговицы применена инфракрасная Фурье-спектроскопия, являющаяся од-

ним из наиболее распространенных физико-химических методов исследования структуры химических веществ. Он доказал свою высокую эффективность при обнаружении химических веществ в биологических жидкостях и тканях [13].

Известно, что ИК-спектры отражения являются специфичными для каждого вещества благодаря тому, что отражают наличие каждой функциональной химической группы в их составе и характер химических связей в молекуле. Мы исходили из предпосылки, что полученный с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии ИК-спектр отражения рибофлавина является уникальным и позволит четко идентифицировать его присутствие в ткани роговицы. Полное пропитывание стромы роговицы рибофлавином является обязательным условием успешного выполнения УФ-кросслинкинга [12].

В ходе эксперимента нами смоделированы возможные варианты доставки рибофлавина в строму роговицы: классический, предполагающий полное удаление эпителия, трансэпителиальный с химическим разрыхлением межклеточных контактов и с использованием метода дозированной скарификации эпителия.

В результате было выявлено полное пропитывание роговицы рибофлавином после её полной дезэпителизации и отсутствие такового при использовании трансэпителиального метода. Последнее обосновывает нецелесообразность её использования в клинической практике. Напротив, дозированная скарификация эпителия при помощи предложенного нами ориги-

нального инструмента обеспечила дозированное механическое нарушение целостности всей толщи эпителия и позволила раствору рибофлавина пропитать всю толщу роговицы.

В отличие от аналогов, предложенный нами инструмент имеет внутреннюю рабочую часть с кривизной, повторяющей форму передней поверхности роговицы, и расположенными на ней шипами длиной 60 мкм, что исключает неравномерное воздействие на поверхность роговицы и сводит к минимуму риск повреждения Боуменовской мембраны и передних слоев стромы роговицы [6]. Результаты морфологического исследования показали, что при применении предложенного нами скарификатора происходит механическое нарушение целостности всей толщи эпителия. При этом важным является тот факт, что целостность базального слоя эпителия также оказалась нарушенной. Известно, что именно он является наиболее труднопроходимым барьером для раствора рибофлавина [4]. Кроме того, отсутствие повреждений Боуменовской мембраны и передних слоев стромы роговицы подтвердило безопасность данного метода и инструмента для его осуществления и обосновало возможность дальнейшего применения в клинической практике.

ВЫВОДЫ

На основе инфракрасной Фурье-спектроскопии донорских роговиц человека с регистрацией ИК-спектров отражения доказано полноценное пропитывание стромы роговицы 0,1%-ным раствором рибофлавина при использовании метода дозированной скарификации эпителия, сравнимое с таковым при полной дезэпителизации роговицы, что является фактором, создающим предпосылки для достижения высокого эффекта при применении последующих этапов УФ-кросслинкинга.

Дозированная альтерация эпителия на фоне отсутствия повреждения Боуменовской мембраны и передних слоев стромы, обеспечивающая доступ рибофлавина к ткани роговицы, обосновывает целесообразность использования предложенного инструмента-скарификатора в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Хабибуллин А.Ф. Кросслинкинг роговичного коллагена в лечении кератоконуса // Вестник офтальмологии. – 2011. – № 5. – С. 21-25.

2. Мороз З.И., Измайлова С.Б., Легких С.Л., Мерзлов Д.Е. Интрастромальная кератопластика с имплантацией сегментов в сочетании с кросслинкингом роговичного коллагена // Офтальмохирургия. – 2013. – № 3. – С. 17-22.

3. Мороз З.И., Ковиун Е.В., Горохова М.В., Власова В.А. Кератопластика с использованием кросслинкинг-модифицированного донорского материала при фистуле роговицы (клинический случай) // Офтальмохирургия. – 2012. – № 4. – С. 88-92.

4. Hayes S., O'Brart D.P., Lamdin L.S. et al. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy // J. Cataract Refract. Surg. – 2008. – Vol. 34. – P. 657-661.

5. Kostyuk O., Nalovina O., Mubard T.M. et al. Transparency of the bovine corneal stroma at physiological hydration and its dependence on concentration of the ambient anion // J. Physiol. – 2002. – № 543. – P. 633-642.

6. O'Eineachain R. Epithelium-conserving collagen cross-linking technique better for patients' recovery // Eurotimes. – 2012. – № 17. – P. 39.

7. Pinelli R., El-Shawaf H. Transepithelial tensioactive mediated CXL // J. Cataract Refract. Surg. Today Europe. – 2009. – № 37. – P. 67-70.

8. Pinelli R., Mometto C. Corneal epithelium: should it stay or should it go? // Ophthalmology Times Europe. – 2007. – Vol. 3, Is. 3.

9. Spörl E., Schreiber J., Hellmund K. et al. Studies on the stabilization of the cornea in rabbits // Ophthalmologie. – 2000. – № 3. – P. 203-206.

10. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope // Curr. Opin. Ophthalmol. – 2006. – № 17. – P. 356-360.

11. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Riboflavin/ultraviolet-A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 2003. – № 5. – P. 620-627.

12. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M., Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit // J. Cataract Refract. Surg. – 2003. – № 9. – P. 1786-1790.

13. Yoshida M., Yamamoto M., Takeda J. Optical screening of diabetes mellitus using non-invasive Fourier-transform infrared spectroscopy technique for human lip // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2013. – Vol. 76. – P. 169-176.

Поступила 30.01.2014

МИДРИМАКС®

Фенилэфрин 5% + тропикамид 0,8%

УВЕРЕННОСТЬ ВРАЧА В УСПЕХЕ

Эффективный и длительный мидриаз

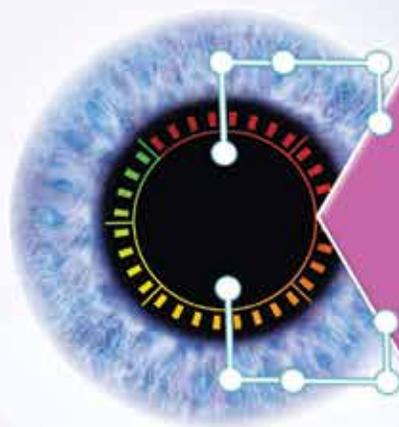
Свободные руки медицинского персонала

Быстрое достижение максимального эффекта

Возможность контроля непредвиденных ситуаций во время операции

Экономия времени и медикаментов на предоперационную подготовку пациента

Уникальная комбинация для диагностики и предоперационной подготовки в офтальмохирургии



Материал предназначен для медицинских и фармацевтических работников



Перед применением препарата следует проконсультироваться с врачом