

ОЦЕНКА ПОСТУПЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В СТРОМУ РОГОВИЦЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ КРОССЛИНКИНГА РОГОВИЧНОГО КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО КЕРАТОКОНУСА

Е. Г. Солодкова, В. П. Фокин, А. К. Брель, Н. В. Блинцева

*ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова Минздрава России,
Волгоградский филиал,
Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра химии*

Проведен сравнительный анализ насыщения роговицы раствором рибофлавина при стандартной и модифицированной методиках кросслинкинга роговичного коллагена на 20 свиных кадаверных глазах. Результаты исследования подтвердили одинаковое проникновение рибофлавина в строму роговицы при проведении данных методик.

Ключевые слова: рибофлавин, кросслиндинг роговичного коллагена.

EVALUATION OF STROMAL RIBOFLAVIN ABSORPTION USING A MODIFIED CXL PROTOCOL FOR THE TREATMENT OF PROGRESSIVE KERATOCONUS

E. G. Solodkova, V. P. Fokin, A. K. Brel, N. V. Blintsova

*FGAU «IRTC» Eye Microsurgery» after Acad. S. N. Fedorov» Russian Ministry of Health, the Volgograd branch,
Volgograd State Medical University,
Department of Chemistry*

The compared corneal saturation with riboflavin solution while using the standard and modified CXL protocols in *ex vivo* 20 porcine corneas. The study showed that absorption of riboflavin into the corneal stroma under standard and modified protocols for CXL was similar.

Key words: riboflavin, corneal collagen crosslinking.

Кератоконус является прогрессирующим, невоспалительным, двусторонним (но обычно асимметричным) заболеванием роговицы, которое характеризуется истончением, ослаблением и эктазией ее парааксиальных зон, что приводит к искажению роговичной поверхности [8, 11].

Наиболее востребованным, на сегодняшний день, способом лечения, применяемым на начальных стадиях заболевания, и составляющим альтернативу кератопластике, является кросслиндинг роговичного коллагена (КРК), предложенный в конце 90-х годов XX в. группой авторов из Дрезденского Университета, заключающийся в перекрестном связывании коллагена роговицы, что достигается путем фотополимеризации ее стромальных волокон при комбинированном воздействии фотосенсибилизатора — 0,1%-го раствора рибофлавина и ультрафиолетового (УФ) излучения с длиной волны 365 нм, выполняемый с проведением полной механической дезэпителизации зоны роговицы диаметром 7—9 мм, что обеспечивает глубокое проникновение рибофлавина в строму роговицы [12—16].

«Минусами» классической методики КРК, выполняемой по так называемому «Дрезденскому протоколу», являются: 1) длительный болевой синдром в раннем послеоперационном периоде, 2) риск развития инфекционных кератитов за счет нарушения эпителиального

барьера роговицы, 3) различные нарушения процесса реэпителизации (замедление реэпителизации, гипертрофия эпителия, длительная эпителиопатия и т. д.), что приводит к длительному снижению работоспособности, увеличению числа случаев непереносимости контактной коррекции у данной категории пациентов в дальнейшем, 4) отсутствие возможности проведения КРК у пациентов с толщиной роговицы менее 400 мкм вследствие возможного проявления цитотоксического эффекта УФ-излучения на эндотелий роговицы. По настоящее время офтальмохирургами ведется поиск возможных путей усовершенствования классической методики КРК, чтобы улучшить переносимость ее пациентами, повысить ее эффективность [4, 5, 9, 10]. Важным шагом в направлении оптимизации стандартного способа кросслинкинга явилось предложение модифицированной методики КРК, с частичной дезэпителизацией роговицы, позволяющей уменьшить болевой синдром и ускорить реэпителизацию роговицы в раннем послеоперационном периоде, обеспечивающей полное пропитывание стромы роговицы раствором рибофлавина [3]. Наши исследования были продолжены в направлении индивидуализации этапа дезэпителизации роговицы при проведении операции КРК.

С 2014 г. в Клинике Волгоградского филиала ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова»

помимо классической, проводится методика кроссликинга роговичного коллагена с дозированной эксимерлазерной дезэпителизацией, выполняемой на глубину эпителиального слоя по данным оптической когерентной томографии (ОКТ) роговицы под контролем интраоперационной on-line пахиметрии [6, 7].

Также оптимизирован этап насыщения роговицы раствором «Декстралинк» путем использования для насыщения пластиковой воронки, устанавливаемой на поверхность глазного яблока. При этом сокращается продолжительность этапа насыщения, улучшается его качество, а также исключается контакт дезэпителизированной роговицы с воздухом, что снижает выраженность роговичного синдрома у пациента в процессе операции и облегчает субъективную переносимость процедуры.

Одним из условий, обеспечивающих безопасность проведения операции КРК, является достижение достаточного уровня насыщения роговицы раствором рибофлавина.

В данном исследовании использовался фотометрический метод определения концентрации растворов, который основан на сравнении поглощения при пропускании света через себя стандартным и исследуемым растворами (в данном случае раствором рибофлавина).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить достаточность насыщения роговицы раствором «Декстралинк» с помощью метода фотокolorиметрического анализа при выполнении модифицированной методики кроссликинга роговичного коллагена в сравнении со стандартной методикой.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 20 свиных кадаверных глазах (давность забора — 2 часа).

Кадаверные глаза были распределены в 2 группы:

1. 1-я группа (10 глаз) — глаза, подвергшиеся стандартной методике КРК.

2. 2-я группа (10 глаз) — глаза, подвергшиеся модифицированной методике КРК.

В ходе эксперимента каждый глаз помещали в держатель, для создания необходимого уровня тургора глазного яблока (рис. 1), после чего в 1-й группе эпителий удаляли механически в центральной оптической зоне диаметром 8 мм, во 2-й группе проводили точечную эксимерлазерную абляцию с использованием описанного инструмента на глубину эпителиального слоя (50 мкм), под контролем интраоперационной on-line пахиметрии согласно опции эксимерного лазера «Schwind –Amaris 500» (рис. 2).

Далее в обеих группах на поверхность глазного яблока устанавливалась пластиковая воронка, которую заполняли 1,0 мл раствора «Декстралинк» (рис. 3). Продолжительность этапа насыщения составила 15 мин во всех случаях.

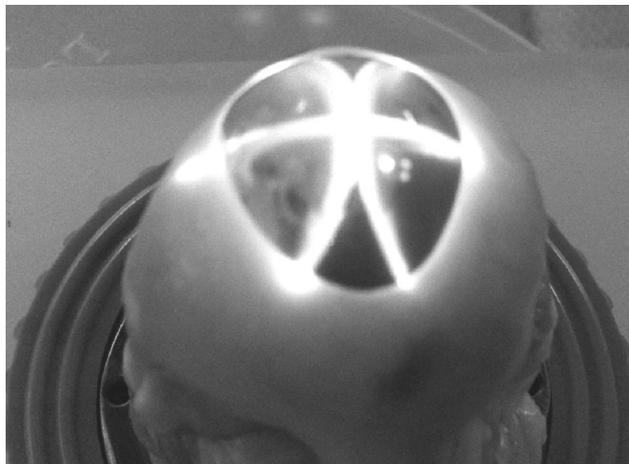


Рис. 1. Фото кадаверного свиного глаза, закрепленного в держателе

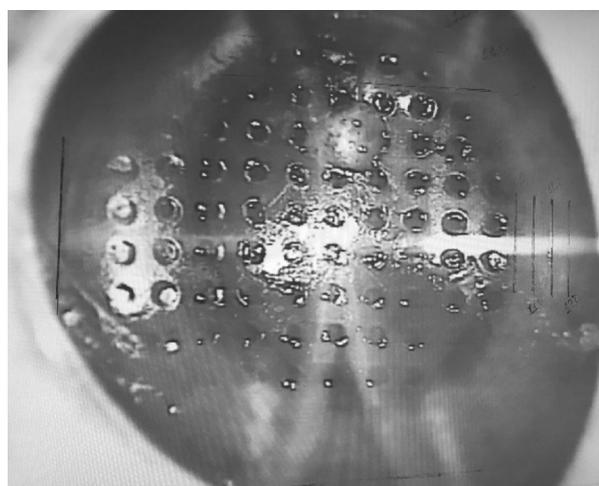
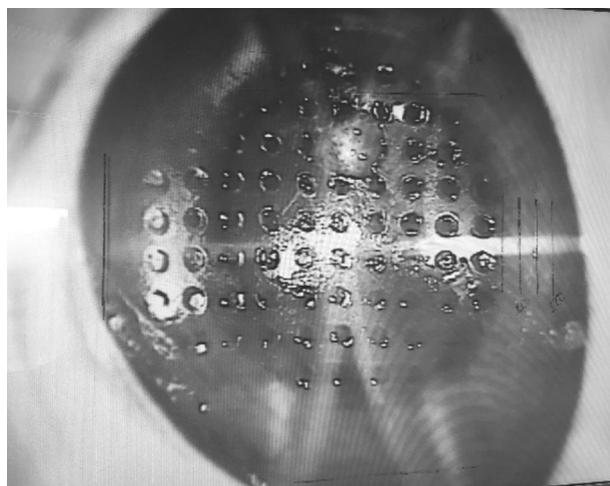


Рис. 2. Фото роговиц кадаверных глаз после проведения точечной эксимерлазерной дезэпителизации



Рис. 3. Фото кадаверного глаза с установленной пластиковой воронкой на поверхности

С помощью измерительной лабораторной пипетки (5 мл), градуированной до 0,1 мл, производился забор оставшегося раствора рибофлавина с точностью до 0,1 мл. Оставшийся раствор помещался в отдельные пробирки.

Степень поглощения света исследуемых растворов измеряют с помощью фотоколориметров. В нашем случае использовался фотоэлектроколориметр КФК-2МП. В качестве «нулевого» раствора использовалась дистиллированная вода. Оптическая плотность дистиллированной воды составила $D = 0,05$.

Все фотоколориметры снабжены светофильтрами — окрашенными средами (стеклами, пленками или растворами), пропускающими лучи только определенной области спектра. Подбор необходимого светофильтра проводился с использованием справочной таблицы [1, 2]. В нашем случае был подобран синий светофильтр ($\lambda_{max} = 445 \text{ нм}$). Определение концентрации рибофлавина в исследуемых растворах проводилось с помощью калибровочного графика. Принцип построения калибровочного графика состоит в следующем: готовятся несколько стандартных растворов — 5—7 с известным содержанием определяемого вещества. В каждом стандартном растворе измеряется его оптическая плотность с помощью фотоколориметра КФК-2МП. По результатам измерений строится график, где по оси ординат откладывается оптическая плотность раствора, измеренная фотоколориметром, а по оси абсцисс — соответствующая ей концентрация рибофлавина.

В нашем случае в ряд из 7 пробирок помещали по 1,0 мл стандартного образца раствора рибофлавина, содержащего 1,0 мг лекарственного вещества в 1,0 мл раствора. В первую пробирку добавили 1,0 мл дистиллированной воды, во вторую и последующие пробирки — дистиллированную воду в объеме на 0,5 мл превышающем предыдущий. Растворы перемешивались. Пос-

ле этого из каждой пробирки отбирали пробы объемом 2,0 мл, помещали в кювету с толщиной слоя 10,0 мм измеряли их оптическую плотность с помощью фотоколориметра в синем светофильтре ($\lambda_{max} = 445 \text{ нм}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по концентрации рибофлавина и оптической плотности представлены в табл. 1 и рис. 4.

Таблица 1

Данные для построения калибровочного графика

№ пробирки	Оптическая плотность, D	Концентрация рибофлавина, C, мг/мл
1	1,485	0,5
2	1,438	0,4
3	1,414	0,33
4	1,381	0,2857
5	1,358	0,25
6	1,333	0,22
7	1,3	0,2

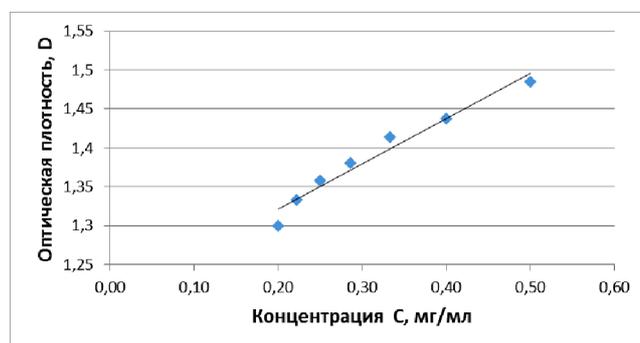


Рис. 4. Калибровочный график для определения концентрации рибофлавина в исследуемых растворах

Оптическая плотность исследуемых растворов находится в линейной зависимости от концентрации вещества в растворе. Об этом свидетельствует закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$D = k \cdot C,$$

где D — оптическая плотность раствора, k — коэффициент, характеризующий взаимодействие поглощающего растворенного вещества со светом с длиной волны λ , C — концентрация вещества.

Исходя из этого, калибровочный график аппроксимировался прямой. Для определения концентрации рибофлавина в исследуемых растворах использовалась следующая формула:

$$C = 1,65 \cdot D - 1,97,$$

где C — концентрация рибофлавина в исследуемом растворе, D — оптическая плотность исследуемого раствора.

Количество рибофлавина в растворе, оставшемся при выполнении как стандартной, так и модифицированной методики представлено в табл. 2.

Количество рибофлавина в растворе после насыщения роговицы при стандартной и модифицированной методике КРК

Методика кросслинкинга роговичного коллагена	D, оптическая плотность		C (мг/мл), концентрация рибофлавина		g (мг), рибофлавина	
	M	± m	M	± m	M	± m
Стандартная	1,288	0,006	0,142	0,007	0,21	0,015
Модифицированная	1,284	0,003	0,143	0,006	0,25	0,032
t	0,59		0,59		1,15	
p	>0,05		>0,05		>0,05	

Из таблицы видно, что различие между средними значениями полученных показателей в группах статистически недостоверны ($t < 2,0$; $p > 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о равноценной насыщенности роговицы раствором рибофлавина, как по стандартной, так и по модифицированной методике (рис. 5).

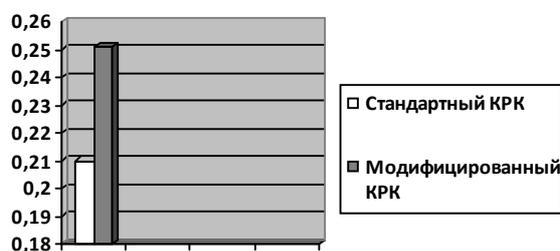


Рис. 5. Количество рибофлавина (мг) в растворе после насыщения роговицы при стандартной и модифицированной методике КРК

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментального этапа работы подтвердили одинаковое проникновение рибофлавина в строму роговицы как при проведении стандартной, так и модифицированной методики КРК. В результате эксперимента было установлено, что концентрация рибофлавина в растворе, оставшемся после насыщения роговицы в обеих группах, одинаковая, что, при исходных равных условиях эксперимента говорит об одинаковом проникновении рибофлавина в строму роговиц при проведении обеих методик.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коренман И. М. Фотометрический анализ. — М.: Химия, 1970 — 343 с.
2. Логинова Н. В., Полозов Г. И. Введение в фармацевтическую химию: Учебное пособие. — Мн.: БГУ, 2003. — 250 с.
3. Малюгин Б. Э., Измайлова С. Б., Шацких А. В., Мерзлов Д. Е. и др. Экспериментальное обоснование эффективности различных методов доставки рибофлавина в строму роговицы как начального этапа выполнения УФ-кросслинкинга // Офтальмохирургия. — 2014. — № 1. — С. 24—29.
4. Солодкова Е. Г., Борискина Л. Н., Ремесников И. А. «Сравнительный анализ способов лечения кератоконуса» // VI Всероссийская научная конференция молодых ученых в рамках научно-практической конференции «Федоровские чтения — 2011». Сборник тезисов. — М., 2011. — С. 229—231.

5. Солодкова Е. Г., Ремесников И. А. Анализ отдаленных результатов кросслинкинга роговичного коллагена при лечении прогрессирующего кератоконуса // Практическая медицина. — 2012. — Т. 1. — С. 118—120.

6. Патент № 2556791. Способ лечения кератоконуса / Борискина Л. Н., Блинкова Е. С., Солодкова Е. Г.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова Минздрава России»; Заявл. 09.06.2014; Опубл. 20.07.2015 // Бюл. — 2015. — № 20.

7. Патент № 2487691. Способ лечения кератоконуса / Борискина Л. Н., Ремесников И. А., Блинкова Е. С., Солодкова Е. Г.; Заявитель и патентообладатель ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздравсоцразвития России»; Заявл. 12.04.2012; Опубл. 20.07.2013 // Бюл. — 2013. — № 20.

8. Фейнбаум К. Современные аспекты этиопатогенеза и лечения кератоконуса // Офтальмохирургия. — 2011. — № 3. — С. 80—83.

9. Kaya V., Utin C. A., Yilmaz O. F. Efficacy of Corneal Collagen Cross-linking Using a Custom Epithelial Debridement Technique in Thin Corneas: A confocal Microscopy Study // J. of Refract. Surg. — 2011. — Vol. 27. — № 6. — P. 444—450.

10. Pinelli R. C3-R treatment opens new frontiers for keratoconus and corneal ectasia // Eyeword. — 2007. — Vol. 34. — P. 36—39.

11. Rabinowitz Y. S. Keratokonius // Survey of ophthalmology. — 1998. — Vol. 42. — P. 297—319.

12. Spoerl E., Schreiber J., Hellmund K., Seiler T., Knuschke P. Crosslinking Effects in the cornea of Rabbits // Ophthalmol. — 2000. — Vol. 97. — P. 203—206.

13. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D., Seiler T. Thermomechanical Behavior of Collagen-Crosslinked Porcine Cornea // Ophthalmologica. — 2004. — Vol. 218. — P. 136—140.

14. Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. Increased Resistance of Crosslinked Cornea against Enzymatic Digestion // Current Eye Research. — 2004. — Vol. 29. — № 1. — P. 35—40.

15. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Collagen- Crosslinking for the Treatment of Keratokonius // Am. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 135. — P. 620—627.

16. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea after Collagen-Crosslinking by Riboflavin/UVA // J. Cornea. — 2004. — Vol. 23. — P. 503—507.

Контактная информация

Солодкова Елена Геннадьевна — заведующая офтальмологическим отделением коррекции аномалий рефракции Волгоградского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, e-mail:solo23el@mail.ru