

DOI: 10.15593/RZhBiomeh/2018.2.01

УДК 532:612.3

## **ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО КРОССЛИНКИНГА НА БИОМЕХАНИКУ РОГОВИЦЫ**

**М.М. Бикбов, А.Р. Халимов**

Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан, Россия, 450008, Уфа, ул. Пушкина, 90, e-mail: azrakhal@yandex.ru

**Аннотация.** Ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы – лечебная методика, основанная на сшивании компонентов стромы роговой оболочки за счет ее ультрафиолетового облучения (370 нм) в сочетании с рибофлавином. В представленной работе исследовано влияние растворов изотонического рибофлавина, рибофлавина с декстраном, рибофлавина с гидроксипропилметилцеллюлозой и ультрафиолетового облучения (370 нм, 3 мВт/см<sup>2</sup>, 30 мин) на прочностно-механические свойства свиной роговицы. По этому же критерию изучено воздействие ультрафиолетового излучения без рибофлавина и полимера декстран. Ультрафиолетовый кросслинкинг с использованием рибофлавинсодержащих растворов вызывал значимое увеличение модуля продольной упругости (модуля Юнга) свиных роговиц (от 164 до 198%) и повышение их предела прочности (от 181 до 242%) по сравнению с интактным контролем. Существенных различий исследуемых показателей между группами, где использовались испытываемые растворы рибофлавина, не обнаружено. Декстран оказывал дегидрирующее действие на роговицу, чем способствовал увеличению ее жесткости. Ультрафиолетовое воздействие без рибофлавина значительно в меньшей степени обеспечивало устойчивость роговиц к растяжению и влияло на их прочностные свойства.

**Ключевые слова:** роговица, ультрафиолетовое сшивание (кросслинкинг), биомеханика роговицы.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Ультрафиолетовый кросслинкинг (сшивание) роговицы – метод укрепления роговой оболочки, который применяется с целью приостановки прогрессирования кератэктазий. Способ основан на ультрафиолетовом облучении роговицы длиной волны 370 нм в присутствии рибофлавина [6]. К настоящему времени расширяются показания к применению кросслинкинга, разрабатываются и внедряются различные рибофлавинсодержащие растворы, которые оказывают на роговую оболочку модулирующие эффекты, обеспечивающие ультрафиолетовые индуцированные сшивки с учетом индивидуальных особенностей роговицы [2]. При этом одним из основных критериев оценки эффективности ультрафиолетового кросслинкинга роговицы неизменно остается степень восстановления ее прочностных свойств [1].

Цель исследования – оценить биомеханические свойства роговицы при ультрафиолетовом кроссликинге с использованием различных рибофлавинсодержащих растворов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на 48 свиных роговицах, разделенных на шесть групп (по 8 роговиц в каждой). Распределение образцов материала исследований в группах указано в табл. 1.

Таблица 1

Образцы материала исследований

№ группы п/п	<i>n</i>	Ультрафиолетовое облучение (370 нм, 3 мВт/см <sup>2</sup> , 30 мин)	№ группы п/п	<i>n</i>	Без ультрафиолетового облучения
1	8	+ 0,1%-ный изоосмотический раствор рибофлавина	5	8	20%-ный декстран
2	8	+ 0,1%-ный рибофлавин с 20%-ным декстраном			
3	8	+ 0,1%-ный рибофлавин с 1,0%-ной гидроксипропилметил-целлюлозой	6	40	Интактные (контроль)
4	8	Без рибофлавина			

Из роговицы после ее деэпителизации готовили лоскут, из которого с помощью вырубного штампа в горизонтальном меридиане вырезали две полоски одинаковой ширины по 4 мм, затем измеряли их толщину и длину. Для исследований использовали свиные роговицы толщиной  $1,18 \pm 0,05$  мм; для измерений брали толщиномер EG-100 (Япония).

Одна из двух подготовленных полосок роговицы использовалась как опытная (группы 1–5), другая – служила интактным контролем (группа 6). Роговичные полосы помещали на сферическую выпуклую поверхность и производили инстилляцию соответствующих растворов. В 1-й группе закапывания производились из расчета по 2 капли в минуту, во 2-й, 3-й и 5-й группах с растворами полимеров – по 1 капле каждые 2 мин. Роговичные полосы облучали ультрафиолетом от светодиодного источника при 370 нм, 3 мВт/см<sup>2</sup> в течение 30 мин, после чего (в течение 10–15 мин) поочередно укрепляли на зажимах и посредством электропривода производили их растяжение до полного разрыва с использованием разрывной установки, снабженной персональным компьютером.

Оценку увеличения жесткости роговой оболочки после ультрафиолетового облучения проводили по величине порога прочности материала и рассчитанному модулю продольной упругости (модулю Юнга), характеризующему сопротивляемость роговицы к растяжению, по следующей формуле:

$$E = \frac{P \cdot l_0}{S \cdot \Delta l_0} = \frac{m \cdot g \cdot l_0}{S \cdot \Delta l_0},$$

где  $l_0$  – длина образца до растяжения, мм;  $\Delta l_0$  – приращение длины образца, мм;  $S$  – площадь поперечного сечения образца, мм<sup>2</sup>;  $m$  – масса образца, кг;  $g$  – ускорение свободного падения, м/с<sup>2</sup>.

Статистическая обработка полученных данных была проведена с использованием пакета программ *Microsoft Excel* в виде корреляционного анализа растяжения материала.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Максимум на кривой диаграммы растяжения роговичных полос характеризует предел их прочности, при этом кривая оканчивается в точке разрыва материала (рисунок). Так, порог прочности для интактной роговицы составил  $4,9 \pm 0,8$  Н, при этом продолжающаяся удлиненная пологая кривая на диаграмме свидетельствовала о ее высоких эластичных свойствах. Расчет значения модуля Юнга для роговицы в норме (6-я группа) дал следующий результат –  $0,089 \pm 0,018$  МПа (табл. 2).

Статистически значимое повышение прочности демонстрировали роговицы, облученные ультрафиолетом в присутствии рибофлавинсодержащих растворов (изоосмотического, с декстраном и с гидроксипропилметилцеллюлозой). Такое рибофлавин-е-ассоциированное воздействие способствует эффективному сшиванию коллагеновых фибрилл и белков межклеточной адгезии роговицы, приводящему к усилению ее биомеханических свойств. На диаграмме показано, что кривые 1–3-й групп достигали наибольших значений предела прочности в сравнении с прочими. Величина продольной упругости Юнга роговичных полос, сшитых ультрафиолетом, в группе 1 достоверно превышала данные контроля на 187% ( $p < 0,01$ ), во 2-й – на 198% ( $p < 0,01$ ), в 3-й – на 164% ( $p < 0,01$ ), а максимальные показатели силы  $P$ , приложенной для растяжения, были выше интактных величин на 200% ( $p < 0,01$ ), 242% ( $p < 0,01$ ) и 181% ( $p < 0,01$ ) соответственно. Статистически значимых отличий между группами 1, 2 и 3 не обнаружено.

Полученные нами результаты согласуются с данными *Wollensak G.* и соавт. (2003), в которых было показано увеличение механической прочности свиных роговиц при растяжении после их ультрафиолетовой обработки с рибофлавином на 72% и модуля Юнга в 1,8 раза при центральной толщине роговой оболочки 0,85 мм. Кроме этого, авторами установлено повышение биомеханических свойств донорских роговиц человека на 328% и в 4,5 раза соответственно при ее средней толщине 0,56 мм [7].

Таблица 2

### Влияние офтальмологических растворов на биомеханические свойства свиной роговицы после ультрафиолетового облучения *ex vivo*

Растворы 0,1%-ного рибофлавина		Модуль Юнга, МПа	Предел прочности $P$ , Н	
Ультрафиолетовое облучение (3 мВт/см <sup>2</sup> )	1	Изоосмотический	$0,256 \pm 0,028^{**}$	$14,7 \pm 1,2^{**}$
	2	С 20%-ным декстраном	$0,266 \pm 0,030^{**}$	$16,8 \pm 2,3^{**}$
	3	С 1%-ным гидроксипропилметилцеллюлозой	$0,235 \pm 0,028^{**}$	$13,8 \pm 1,8^{**}$
	4	Без рибофлавина	$0,205 \pm 0,029^*$	$11,46 \pm 2,9^*$
5	Декстран 20%		$0,161 \pm 0,023^*$	$10,1 \pm 1,9^*$
6	Интактные (контроль)		$0,089 \pm 0,018$	$4,9 \pm 0,8$

Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

Выявлено семикратное увеличение модуля Юнга донорских человеческих роговиц после ультрафиолетового кросслинкинга с рибофлавином в искусственной передней камере глаза в экспериментальном тесте с изменяющимся внутриглазным давлением [4]. Стабильность полученных результатов улучшения биомеханики сшитых ультрафиолетом роговиц в дальнейшем была подтверждена долгосрочными экспериментальными исследованиями (8 месяцев и более) [5].

В опубликованной в 2010 г. работе *Kling S.* с соавт. было показано, что ультрафиолетовый кросслиндинг свиных роговиц с рибофлавином/декстраном *ex vivo* происходил при снижении корнеальной толщины за счет действия полимера и вместе с этим улучшал биомеханику роговой оболочки в условиях изменяющегося внутриглазного давления [3].

Авторами указанных исследований ультрафиолетовый кросслиндинг выполнялся с использованием 0,1%-ного рибофлавина и 20%-ного декстрана, однако возможное влияние последнего на биомеханику роговицы не учитывалось [7].

Вместе с тем полосы, сшитые ультрафиолетом с рибофлавин/декстраном, показали наибольшее значение модуля Юнга и предела прочности. При этом разрыв роговичных лоскутов, наблюдаемый на диаграмме, происходил на максимуме предельных прочностных свойств материала, что указывает на уменьшение его эластичности.

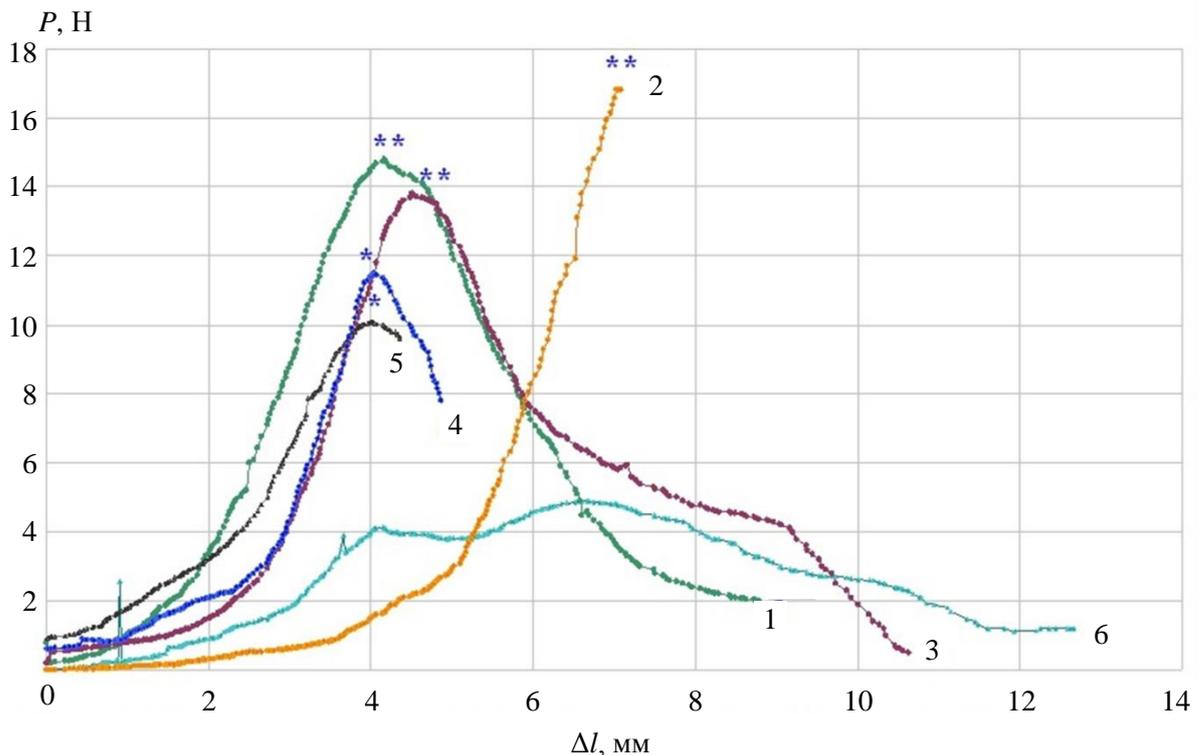


Рис. Диаграмма растяжения полос из свиных роговиц *ex vivo* после ультрафиолетового облучения с использованием офтальмологических растворов для кросслинкинга: 1 – 0,1%-ный изотонический раствор рибофлавина; 2 – 0,1%-ный рибофлавин с 20%-ным декстраном; 3 – 0,1%-ный рибофлавин с 1,0%-ным гидроксипропилметилцеллюлозой; 4 – без рибофлавина; 5 – 20%-ный декстран; 6 – интактные (контроль). По оси абсцисс – абсолютное удлинение материала  $\Delta l$ , мм; по оси ординат – сила приложенной нагрузки  $P$ , Н. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,05$  – достоверность различий показателя при сравнении с контролем (интактные)

На эффект увеличения жесткости ткани роговицы, кроме ультрафиолетового кросслинкинга, может дополнительно влиять дегидрирующее действие полимера декстрана, входящего в состав раствора. Этот выявленный эффект находит свое подтверждение при анализе результатов группы 5, где необлученные роговицы обрабатывались декстраном. Здесь наблюдаемое усиление жесткости материала, очевидно, происходит за счет его обезвоживания – модуль Юнга и предел прочности роговицы превышали данные нормы на 59 и 106% соответственно. На снижение эластичности роговичных полос этой группы указывал их ранний разрыв, регистрируемый непосредственно после достижения максимальных значений прочности. Следует отметить, что процесс обезвоживания роговицы при применении растворов с декстраном в условиях *in vivo* носит обратимый характер.

Роговичные полосы после ультрафиолетового воздействия без рибофлавина (группа 4) также демонстрировали увеличение исследуемых величин прочности – модуль Юнга превысил норму на 130% ( $p < 0,05$ ), а значение  $P$  – на 133% ( $p < 0,05$ ). Диаграмма растяжения облученных ультрафиолетом роговиц указывает на незначительное падение эластичности материала.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, в исследуемых группах, где проводился комбинированный рибофлавин-ультрафиолетовый кросслиндинг (370 нм, мощность 3 мВт/см<sup>2</sup>, в течение 30 мин) свиных роговичных полос, наблюдалось статистически значимое увеличение модуля продольной упругости (модуля Юнга) (от 164 до 198%) и повышение их предела прочности (от 181 до 242%) по сравнению с интактным контролем, что свидетельствовало о выраженном повышении биомеханических свойств роговицы. Существенных различий между исследованными критериями в группах, где использовался ультрафиолет с рибофлавинсодержащими растворами, не выявлено. Декстран, входящий в состав средства для кросслинкинга, оказывал дегидрирующее действие на роговицу, чем способствовал дополнительному увеличению ее жесткости в эксперименте, в то время как ультрафиолетовое воздействие без рибофлавина значительно в меньшей степени обеспечивало устойчивость роговиц к растяжению и влияло на их прочностные свойства.

### **БЛАГОДАРНОСТИ**

Авторы выражают искреннюю признательность профессору *G. Wollensak* (Германия) за сотрудничество.

### **ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ**

Исследование выполнено при полном финансовом обеспечении Уфимского научно-исследовательского института глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан.

### **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы // Вестник РАМН. – 2016. – Т. 71, №3. – С. 224–232.

2. Халимов А.Р., Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Бикбова Г.М., Усубов Э.Л., Зайнуллина Н.Б. Уровень рибофлавина во влаге передней камеры глаза при использовании фотосенсибилизаторов на различной полимерной основе (экспериментальное исследование) // Вестник Волгоградского гос. мед. ун-та. – 2013. – Т. 4, № 48. – С. 195–198.
3. Kling S., Remon L., Pérez-Escudero A., Merayo-Llodes J., Marcos S. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2010. – Vol. 51, № 8. – P. 3961–3968.
4. Knox Cartwright N.E., Tyrer J.R., Marshall J. *In vitro* quantification of the stiffening effect of corneal cross-linking in the human cornea using radial shearing speckle pattern interferometry // J. Refract. Surg. – 2012. – Vol. 28, № 7. – P. 503–508.
5. Wollensak G., Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking // Acta Ophthalmol. – 2009. – Vol. 87, № 1. – P. 48–51.
6. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 2003. – Vol. 135, № 5. – P. 620–627.
7. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking // J. Cataract. Refract. Surg. – 2003. – Vol. 29, № 9. – P. 1780–1785.

## EFFECTS OF ULTRAVIOLET CROSS-LINKING ON BIOMECHANICS OF THE CORNEA

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov (Ufa, Russia)

Corneal cross-linking is the method of ultraviolet irradiation (370 nm) of cornea with the use of riboflavin. We studied the influence of solutions of isoosmotic riboflavin, riboflavin with dextran, hydroxypropylmethylcellulose riboflavin and ultraviolet irradiation (370 nm, 3 mW/cm<sup>2</sup>, 30 min) on biomechanical properties of porcine corneas *ex vivo*. We also studied the impact of ultraviolet irradiation on the cornea without using riboflavin and dextran polymer. Ultraviolet cross-linking with riboflavin solutions caused a significant increase in the Young's modulus of elasticity from 164 to 198%, and increase in its maximum strength from 181 to 242% comparing to intact control group. There were no significant differences in the studied parameters between two groups where solutions of riboflavin were used. Dextran provided dehydrogenating effect on the cornea and also increased its rigidity. Ultraviolet exposure without riboflavin was to a far lesser degree of resistance to stretching of the cornea and affected its mechanical properties.

**Key words:** cornea, ultraviolet cross-linking, biomechanics of cornea.

*Получено 10 ноября 2016*