

На правах рукописи

Халимов Азат Рашидович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО СШИВАНИЯ РОГОВИЦЫ

03.01.02 – биофизика

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Уфа - 2018

Работа выполнена в государственном бюджетном учреждении «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Бикбов Мухаррам Мухтарамович

доктор медицинских наук, профессор

Дроздова Галина Александровна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук

Темнов Андрей Александрович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», лаборатория специальных клеточных технологий, заместитель заведующего лабораторией

Доктор медицинских наук, доцент

Светлова Ольга Валентиновна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра офтальмологии, профессор кафедры

Доктор медицинских наук, профессор

Анисимов Сергей Игоревич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра глазных болезней, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.14 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <http://rsmu.ru> и в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.072.14

доктор медицинских наук, профессор

Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы вопросы изучения механизмов развития патологических процессов дистрофического характера в роговице глаза и особенностей их коррекции остаются важной медико-биологической проблемой. Роговица человека и большинства животных представляет собой уникальную тканевую структуру, состоящую преимущественно из специфического коллагена, исключительной особенностью которого является прозрачность, что в свою очередь обеспечивает физиологическую рефракцию за счет стабильных опорных свойств оптической оболочки (Кошиц И.Н. и соавт., 2017). В результате влияния комплекса патогенетических факторов при дистрофических изменениях последней, в частности кератэктазиях, развивается деструкция коллагена роговицы и снижаются ее прочностные свойства (Бикбов М.М., Бикбова Г.М., 2011). При этом, патологический процесс затрагивает в той или иной степени все тканевые, клеточные и молекулярные структуры роговой оболочки (Xia Y. et al., 2014; Jouve L. et al., 2017).

Среди первичных кератэктазий в подавляющем большинстве случаев встречается кератоконус (КК). По данным разных авторов частота КК составляет 1,3-22,3 на 100 тыс. человек, а распространенность – 0,4-0,86 случаев на 100 тыс. населения, что связывают с ухудшением экологии, совершенствованием методов диагностики заболевания, растущей популярностью эксимерлазерных рефракционных операций на роговице, вызывающих снижение ее биомеханических свойств (Аветисов С.Э. и соавт., 2014; Gordon-Shaag A. et al., 2015; Анисимов С.И. и соавт., 2016; Kohlhaas M., 2017).

В настоящее время одним из эффективных методов лечения КК признано ультрафиолетовое (УФ) сшивание (кросслинкинг) роговицы с фотосенсибилизатором (рибофлавин), способствующее повышению прочностных свойств оптической оболочки глаза и приостановке прогрессирования заболевания. В результате УФ кроссликинга происходит фотополимеризация коллагена и компонентов основного вещества стромы (Wollensak G. et al., 2003). Однако остаются мало изучены механизмы патофизиологических процессов, опосредованных дисбалансом продукции и утилизации АФК (активных форм кислорода), которые протекают в тканях глаза при кроссликинге роговицы и воздействии ультрафиолета на орган зрения. Постоянное совершенствование технологии УФ сшивания требует проведения всестороннего и углубленного исследований в соответствии с критериями безопасности и эффективности (Нероев В.В. и соавт., 2012б; Mastropasqua L., 2015; Nemeth G. et al., 2018; Nohava J. et al., 2018). При этом качество предлагаемых модификаций кроссликинга определяется адекватным дозированием УФ излучения и выбором приемлемых растворов для фотосенсибилизации и протекции роговицы с учетом ее индивидуальных

особенностей (Дроздова Г.А. и соавт., 2015; Бикбов М.М. и соавт., 2016; 2017; Lombardo M. et al., 2015a, 2017; Razmjoo H. et al., 2017; Lhuillier L. et al., 2018).

К настоящему времени недостаточно изучены способы оценки активности свободно-радикальных процессов в роговице, происходящих после УФ кросслинкинга, особенности изменения локального и системного цитокинового и антиоксидантного статуса человека. Учитывая продолжительное нахождение современного человека в среде искусственных источников освещения, нередко имеющих повышенную долю ультрафиолета в спектре света (Wong W. et al., 2014; Капцов В.А. и соавт., 2017), требуют исследования и обобщения патофизиологические аспекты УФ воздействия на орган зрения и организм в целом. Вышеизложенное послужило основанием для изучения этих вопросов в настоящем исследовании.

Степень разработанности темы. В основном научные исследования связаны с клиническими аспектами применения процедуры УФ кросслинкинга роговицы (Spoerl E. et al., 2007; Mazzotta C. et al., 2008; Raiskup F. et al., 2013; Bikbova G., Bikbov M., 2014; Ucakhan O., Bayraktutar B., 2017; Choi M. et al., 2017; Mazzotta C. et al., 2018). Описаны лишь отдельные патофизиологические (Shalchi Z. et al., 2015) и биофизические процессы (Lin J., 2018), происходящие в тканях роговицы после ее УФ сшивания. Не изучена сопряженность процедуры кросслинкинга с происходящими иммунобиохимическими и морфофункциональными изменениями (Esquenazi S. et al., 2010). На начальном этапе находятся исследования о состоянии местных метаболических сдвигов в тканях глаза, в особенности, антиоксидантной системы и процессов свободно-радикального окисления, инициируемых УФ излучением.

Цель исследования. Установить закономерности и механизмы ультраструктурной трансформации и изменения метаболизма роговицы при ультрафиолетовом воздействии.

Задачи исследования:

1. Оценить динамику содержания рибофлавина в структурах переднего отрезка глаза при инстилляциях разработанных офтальмологических растворов для ультрафиолетового сшивания роговицы.

2. Изучить характер изменений биометрических и биомеханических показателей роговицы экспериментальных животных после рибофлавин-ультрафиолетового воздействия с фотосенсибилизаторами и без них.

3. Исследовать на экспериментальной модели *ex vivo* сравнительную эффективность абсорбции ультрафиолетового излучения роговицей при использовании предложенных растворов рибофлавина и обосновать показания к их применению.

4. Оценить активность процессов свободно-радикального окисления в тканях и биологических жидкостях глаз экспериментальных животных и их значимость в механизмах ультрафиолетового сшивания роговицы.

5. Изучить в эксперименте особенности морфологических и ультраструктурных изменений роговицы под воздействием ультрафиолетового излучения, в том числе в присутствии фотосенсибилизаторов, дать оценку качественного состояния коллагеновых фибрилл в отдаленные сроки.

6. Выявить общие закономерности изменений местных и системных уровней цитокинов в различные сроки после ультрафиолетового сшивания роговицы у пациентов с кератоконусом.

7. Исследовать особенности локального и общего антиоксидантного статуса пациентов с кератоконусом в динамике ультрафиолетового кросслинкинга роговицы.

Научная новизна. Впервые установлены механизмы УФ сшивания роговицы на основе оценки биометрических, биомеханических, морфологических, биохимических и иммунных изменений, выявленных на различных экспериментальных моделях.

Показано, что степень проницаемости и динамика интраокулярного содержания рибофлавина в роговице и влаге передней камеры глаза лабораторных животных обусловлены как составом разработанных офтальмологических растворов, так и площадью корнеальной деэпителизации.

Получены сведения, отражающие динамику изменений биометрических и биомеханических показателей роговицы экспериментальных животных, и обоснована необходимость дифференцированного подхода к применению рибофлавинсодержащих растворов при проведении УФ сшивания роговицы.

Выявлено усиление процессов свободно-радикального окисления и изменение метаболизма продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в интраокулярных тканях животных на фоне ослабления системы антиоксидантной защиты при воздействии УФ излучения, в том числе в присутствии различных растворов рибофлавина.

Получены новые данные об ультраструктурной организации коллагеновых волокон передних и средних слоев корнеальной стромы крыс, проявляющиеся в увеличении диаметра фибрилл и снижении плотности фибриллярной упаковки после УФ сшивания роговицы с использованием разработанных растворов рибофлавина.

По данным конфокальной прижизненной микроскопии выявлены морфологические особенности роговицы животных после УФ воздействия и УФ сшивания с растворами рибофлавина, характеризующиеся набуханием стромы, снижением количества кератоцитов в передних и средних слоях стромы в первые 30 дней эксперимента с последующим восстановлением архитектоники оптической оболочки (90 сут) при отсутствии повреждения эндотелия.

Показаны степень иммунного реагирования, общий и локальный антиоксидантный статус в различные сроки после УФ сшивания роговицы у пациентов с кератоконусом. Установлено, что данная процедура не вызывает

значимых воспалительных реакций, сопровождается кратковременным местным повышением содержания IL-1 β , TGF- β 1, - β 2, IFN- α в ответ на деэпителизацию роговицы, характеризуется локальным ослаблением антиоксидантного статуса и угнетением выработки супероксиддисмутазы при отсутствии системных изменений.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты исследования свидетельствуют о многофакторном характере формирования механизмов трансформации роговицы при УФ воздействии на нее, включая рибофлавин-ультрафиолет-индуцированное сшивание, что представляет научную основу для разработки перспективных путей и оригинальных подходов к коррекции дисбаланса процессов свободно-радикального окисления, про- и антиоксидантной систем, цитокинового статуса.

Результаты исследований использованы в процессе разработки научно-технической документации и испытаний протекторов роговицы «Декстралинк» и «Риболинк». Разработаны, зарегистрированы и внедрены в клиническую практику новые медицинские изделия для УФ сшивания роговицы, экспериментально подтверждена их эффективность и безопасность, предложены практические рекомендации по применению.

Исследования проводились автором в рамках Инновационных проектов по государственной научно-технической программе Академии наук Республики Башкортостан (2007-2011 гг.), НИР по государственной научно-технической программе Академии наук Республики Башкортостан (2012-2014 гг.).

Методология и методы диссертационного исследования. Особенности интраокулярных изменений после УФ воздействия без рибофлавина и УФ сшивания роговицы исследованы *in vivo* на экспериментальных моделях с использованием лабораторных крыс линии Вистар, кроликов породы «Шиншилла» и *ex vivo* на свиных глазах с помощью устройства офтальмологического «УФалинк» (Россия), измерителя мощности ультрафиолетового излучения УФ-радиометр (ООО «НТП ТКА», Россия), контактного пахиметра Tomey SP-100 (Япония), толщиномера Digital linear gauge EG-100 (Япония), универсальной разрывной испытательной машины МТ-140 («Метротекс», Россия), операционного микроскопа Carl Zeiss (Германия).

Количественное определение рибофлавина в свиных и кроличьих роговицах осуществляли с использованием спектрофотометра СФ-56 (Россия); в образцах влаги передней камеры (ВПК) кроликов – с помощью автоматического ИФА-анализатора «Multiscan» и тест-систем ID-Vit (Immundiagnostik, Германия).

Железоиндуцированная и люминолзависимая хемилюминесценция оценивалась с помощью хемилюминометра ХЛ-003 (Россия). Продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-рп) определяли с применением набора реактивов «ТБК-АГАТ» (Россия) на спектрофотометре СФ-56 (Россия).

Оценка общего антиоксидантного статуса и уровня супероксиддисмутазы проводилась с использованием тест-систем Randox Laboratories Ltd. (Великобритания) и «eBioscience» (Австрия) на фотометре SF-Ultra (Россия), StatFax (США) и TECAN INFINITE F-50 (Австрия).

Морфологическое изучение гистологических срезов из образцов роговиц крыс выполняли с использованием светового микроскопа LEICA DM 2500 с цифровой фотокамерой LEICA DFC 450 (Leica Microsystems, Германия). Электронную микроскопию ультратонких срезов средних слоев стромы роговицы крыс проводили с помощью электронного микроскопа «JEM-1011» (Jeol, Япония).

Прижизненное морфологическое исследование роговицы кроликов проведено методом конфокальной микроскопии с помощью лазерного сканирующего томографа Heidelberg Retinal Tomographer HRT-III («Heidelberg Engineering», Германия) с насадкой «Rostok».

Определение уровня цитокинов выполнялось методом иммуноферментного анализа с использованием анализатора «Multiscan» (Финляндия) и стандартных диагностических наборов «Вектор-Бест» (Россия) и «eBioscience» (Австрия).

Морфологические и электронномикроскопические исследования выполнялись на базе лаборатории морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ при консультативной помощи д.м.н., профессора С.А. Муслимова.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на курсах повышения квалификации врачей в научно-образовательном отделе ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан», на кафедрах медицинской физики с курсом информатики, нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Зарегистрированы и внедрены новые медицинские изделия: устройство офтальмологическое для ультрафиолетового облучения роговицы глаза «УФалинк» (регистрационное удостоверение №ФСР 2009/05489) и протектор роговицы «Декстралинк» (регистрационное удостоверение №ФСР 2010/09071). Указанные медизделия применяются более, чем в 120 клиниках Российской Федерации.

Положения, выносимые на защиту.

1. Степень проницаемости и динамика интраокулярной концентрации рибофлавина в роговице и переднекамерной влаге глаза экспериментальных животных при выполнении ультрафиолетового сшивания обусловлены составом растворов и площадью корнеальной дезэпителизации.

2. Для повышения безопасности корнеального ультрафиолетового сшивания предложены растворы рибофлавина различного состава, что позволяет

дифференцированно использовать их на роговицах разной толщины (более 450 мкм – рекомендуется Декстралинк, при 400-450 мкм – Риболинк). Ультрафиолетовое облучение в присутствии исследуемых растворов рибофлавина достоверно повышает прочностно-механические свойства роговицы.

3. На величину абсорбции ультрафиолетового излучения роговицей экспериментальных животных влияют физико-химические свойства растворов фотосенсибилизаторов, интрастромальное содержание рибофлавина, толщина роговой оболочки глаза и стабильность прекорнеальной пленки, образуемой после инстилляций рибофлавинсодержащего средства.

4. УФ облучение роговицы и ее стандартное ультрафиолетовое сшивание вызывают активацию процессов свободно-радикального окисления в тканях глаза, сопровождающихся повышенным образованием конечных продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, интенсивность которых обусловлена сроком давности выполнения процедуры.

5. Основные морфологические изменения роговицы после ультрафиолетового сшивания с использованием рибофлавинсодержащих растворов характеризуются развитием отека стромы, при этом снижение плотности кератоцитов происходит без повреждения эндотелия с последующим восстановлением архитектоники оптической оболочки (90 сут). Особенности ультраструктурной трансформации роговицы связаны с увеличением межфибрилярного пространства и диаметра коллагеновых фибрилл. Недостаток рибофлавина в строме в условиях УФ облучения приводит к достоверной патоморфологической инволюции роговицы с потерей ее нативной структуры.

6. Динамика содержания цитокинов после ультрафиолетового сшивания при кератоконусе характеризуется транзиторным ростом концентрации IL-1 β , IFN- α , TGF- β 1, - β 2 в слезной жидкости при неизменных значениях TNF- α , что является иммунным ответом на деэпителизацию роговицы. Ранний срок после процедуры (1-3 сут) сопровождается снижением локального антиоксидантного статуса и уровня супероксиддисмутазы. Ультрафиолетовое сшивание роговицы в присутствии растворов рибофлавина не вызывает значимых системных изменений концентрации цитокинов и антиоксидантной активности.

Степень достоверности. Экспериментальные исследования выполнены на животных, полученных из Питомника лабораторных животных ФГУП «НПО «Микроген» при достаточном объеме выборки. Состояние животных подтверждено сертификатами качества и здоровья, выданными поставщиком. Воспроизведение экспериментальных моделей, проведение биохимических, биофизических, иммунологических, морфологических и электронномикроскопических исследований осуществлялось на оборудовании, зарегистрированном в установленном порядке и сертифицированном для данного вида работ. Степень достоверности работы определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок исследований животных и наблюдений пациентов. Применялись методы

статистической обработки, полностью соответствующие поставленным задачам, полученные данные достоверны и аргументированы.

Апробация результатов работы. Материалы исследования были представлены на научно-практических конференциях «Актуальные проблемы офтальмологии» (Уфа, 2009), «Невские горизонты» (Санкт-Петербург, 2012); I, III, IV, VI, VIII, IX международных конференциях по офтальмологии «ВОСТОК-ЗАПАД» (Уфа, 2010, 2012, 2013, 2015, 2017, 2018); VIII Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2013); XXXI, XXXII и XXXIV Конгрессах европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов «ESCRS» (Амстердам, 2013; Лондон, 2014; Копенгаген, 2016); III, IV, V, VI Конгрессах европейского общества роговицы «EuCornea» (Милан, 2012; Амстердам, 2013; Лондон, 2014; Барселона, 2015); X Съезде офтальмологов России (Москва, 2015); IV Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015); Международной конференции «Анатомия и Физиология» (Бирмингем, Англия, 2016); XVII научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2016); XXIII съезде Российского Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); совместной научной конференции научно-исследовательских отделений хирургии роговицы и хрусталика, витреоретинальной и лазерной хирургии, научно-производственного отдела, научно-образовательного отделения ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней АН РБ», кафедр медицинской физики с курсом информатики, нормальной физиологии, патологической физиологии и центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ (Уфа, 2018); научно-практической конференции с международным участием «Роговица П. Топография роговицы. Аберрации глаза» (Москва, 2018); Международной научной конференции «Актуальные проблемы офтальмологии», посвященной 95-летию акад. З. Алиевой (Баку, 2018); Ассоциации исследований в области зрения и офтальмологии (Гонолулу, США, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 54 работы, в том числе 19 статей в журналах, входящих в перечень, утверждённый ВАК при Министерстве образования и науки РФ; получено 14 патентов РФ на изобретения и полезные модели; издана 1 монография.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста, включает 33 таблицы, 71 рисунок, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, 4-х глав результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, приложения и списка литературы. Библиография содержит 451 источник российской и зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 96 крысах-самцах линии Вистар и 164 кроликах породы «Шиншилла», 360 свиных глазах (не позднее 2 ч после изъятия). Объекты исследования были разделены на 6 групп: 1-ая – интактные, во 2-ой производили УФ облучение роговицы без рибофлавина, в 3-ей – УФ сшивание с раствором изоосмотического рибофлавина (контроль), в 4-6-ой – УФ сшивание с разработанными растворами рибофлавина (соответственно, Декстралинк, Риболинк и Хитолинк). Токсикологические испытания проведены на 45 морских свинках альбиносах и 80 мышам-самцах.

Все эксперименты осуществляли в соответствии с нормативными документами, регламентирующими гуманное обращение с животными и порядок проведения лабораторных исследований (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации», «Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях», Страсбург, 18.03.1986 г.).

Модель стандартного УФ сшивания роговицы глаза крыс и кроликов *in vivo* воспроизводили при анестезиологическом пособии кетамин (50 мг/кг) и ксилазином («Ветфарм», Беларусь) внутримышечно в дозе 20 мг/кг и местной анестезии глазными каплями 0,4% оксибупрокаина («Инокаин», Индия). Корнеальную дезэпителизацию проводили микрохирургическим шпателем на участке роговицы, отмеченном метчиком диаметром 3 мм у крыс и 3, 6, 9 мм у кроликов под операционным микроскопом Carl Zeiss (Германия). Облучение роговицы выполняли с помощью устройства офтальмологического для УФО роговицы глаза «УФалинк» (Россия) с длиной волны 370 нм при мощности 3 мВт/см² продолжительностью 10-30 мин. УФ облучение свиных роговиц с рибофлавином и без производили *ex vivo* в режимах 3 и 5 мВт/см² продолжительностью от 1 мин до 30 мин.

Выполняли насыщение свиных роговиц *ex vivo*, а также роговиц крыс и кроликов *in vivo* посредством инстилляций разработанных растворов с рибофлавином монопуклеотидом (далее по тексту рибофлавином):

- «Декстралинк» (0,1% рибофлавин с 20% декстраном);
- «Риболинк» (0,1% рибофлавин с 1,0% гидроксипропилметилцеллюлозой);
- «Хитолинк» (0,1% рибофлавин с 1,0% хитозаном сукцинатом).

Токсикологическую оценку разработанных растворов проводили по ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Определяли цитотоксичность клеток *in vitro* на культуре фибробластов мыши. Выполняли исследования раздражающего действия *in vivo* на кожу и слизистую оболочку глаз

кроликов. Исследования сенсibilизирующего действия проводили на морских свинках с использованием адьюванта Фрейнда.

Забор влаги передней камеры (ВПК) кроликов производили в объеме около 0,2 мл через парацентез иглой 30 G (внешний диаметр 0,3 мм) после завершения инстилляций фотосенсибилизатора (ФС) и промывания конъюнктивальной полости стерильным физраствором.

Изменение динамики биометрических показателей роговицы *in vivo* определяли в двух перпендикулярных меридианах на 5 участках оптической оболочки глаза кролика с использованием контактного пахиметра Tomey (Япония). Толщину свиных роговиц *ex vivo* определяли в центральной зоне с помощью микрометра Digital linear gauge EG-100 (Япония). Измерения производили в течение 30 мин (с интервалом 5 мин).

Исследование биомеханических показателей роговицы выполняли после УФ воздействия и УФ сшивания с рибофлавином роговичных полос и дисков с последующим их тестированием на универсальной разрывной испытательной машине МТ-140 («Метротекс», Россия). Механическую прочность роговиц оценивали по величинам показателей разрывной нагрузки образцов на диаграмме «приложенная сила – относительное удлинение», величинам относительного удлинения и по результатам расчета модуля Юнга.

Величину сравнительной УФ абсорбции свиной роговицей в присутствии растворов рибофлавина *ex vivo* оценивали по поглощению света от излучателя «УФалинк», проходящего через изолированную роговицу, размещенную на фотоприемном элементе УФ-радиометра («НТП ТКА», Россия). Регистрацию показаний с УФ-радиометра после завершения насыщения роговицы и удаления излишков раствора рибофлавина с ее поверхности, осуществляли в течение 30 мин (с интервалом 5 мин).

Количественное определение рибофлавина проводили в прецизионных навесках свиных и кроличьих роговиц после извлечения из них действующего вещества и измерения его оптической плотности в растворе с использованием спектрофотометра СФ-56 (Россия). Содержание рибофлавина во ВПК кроликов производили с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия) при длине волны 610 нм и тест-систем ID-Vit (Immundiagnostik, Германия).

Для изучения интенсивности процессов свободно-радикального окисления проводили хемилюминесцентный анализ образцов ВПК и супернатантов гомогенатов роговиц кроликов, тканей глазного яблока крыс с использованием хемилюминометра ХЛ-003 (Россия). Исследовали железоиндуцированную (Владимиров Ю.А. и соавт., 1992) и люминолзависимую хемилюминесценцию; определяли спонтанную светимость, амплитуду медленной вспышки, светосумму свечения

(Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., 1995). Уровень ТБК-реагирующих продуктов исследовали с применением набора реактивов «ТБК-АГАТ» (Россия). Оптическую плотность образовавшихся комплексов определяли при длинах волн 535 и 570 нм с помощью спектрофотометра СФ-56 (Россия).

Срок наблюдений при проведении гистологического, электронномикроскопического и прижизненного морфологического исследований составил – 3, 7, 14, 30 и 90 суток. Распределение животных в группах показано в таблице 1.

Таблица 1 - Распределение животных в группах.

Группы животных		Исследования					
		Электронно-микроскопические		Морфологические		Морфологические прижизненные	
		n					
		крыс	глаз	крыс	глаз	кроликов	глаз
1	Интактные (контроль)	4	8	4	8	3	6
2	УФО без рибофлавина	4	8	10	20	3	6
3	УФО + изо-рибофлавин	4	8	10	20	3	6
4	УФО + Декстралинк	4	8	10	20	3	6
5	УФО + Риболинк	4	8	10	20	3	6
6	УФО + Хитолинк	4	8	10	20	3	6

Гистологические исследования выполняли по общепринятым методикам. Энуклеированные глазные яблоки фиксировали в 10% нейтральном формалине. Гистологические срезы (1-4 мкм) готовили на микротоме «RM 2145» (Leica Microsystems, Германия), окрашивали гематоксилином-эозином и по методу Ван Гизона. Световую микроскопию проводили с помощью микроскопа «LEICA DM 2500» с цифровой фотокамерой LEICA DFC 450» (Leica Microsystems, Германия).

Для электронномикроскопического исследования фрагменты роговицы животных фиксировали в растворе 2% глutarового альдегида. Обезвоживание и заливку в эпон-812 проводили по общепринятой методике. Ультратонкие срезы производили с помощью ультрамикротомы «LEICA EM UC7» (Leica Microsystems, Германия), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе «JEM-1011» (Jeol, Япония). Определение изменений плотности фибриллярной упаковки коллагеновых

волокон роговицы выполняли по методу Pinelli (2009) на микрофотографиях при увеличении $\times 15000$. На каждом фотоснимке подсчитывали количество коллагеновых фибрилл в 20 квадратах (500×500 нм).

Прижизненное морфологическое исследование и определение плотности кератоцитов роговицы кроликов проведены под внутримышечным наркозом методом конфокальной микроскопии с помощью лазерного сканирующего томографа Heidelberg Retinal Tomographer HRT-III («Heidelberg Engineering», Германия) с насадкой «Rostok».

В клинические наблюдения включены 92 пациента с кератоконусом I, II стадии по классификации Амслер (Amsler M., 1961), которым проводилось стандартное и трансэпителиальное УФ сшивание роговицы. Группа контроля – 42 практически здоровых добровольца.

Протокол стандартной техники УФ сшивания роговицы глаза: под местной анестезией (0,4% раствор оксибупрокаина /«Инокаин», Индия/) после дезэпителизации роговицы (Epi-Off) диаметром около 8-9 мм производятся инстилляции раствора «Декстралинк» (Россия, рег. удостоверение №ФСР 2010/09071) из расчета 1 капля / 2 мин в течение 30 мин. Состоятельность насыщения роговицы рибофлавином оценивается по люминесценции влаги передней камеры при биомикроскопии с кобальтовым (синим) светофильтром. Для облучения роговицы используется устройство офтальмологическое «УФалинк» (Россия, рег. удостоверение №ФСР 2009/05489) в режиме 3 мВт/см², 30 мин и длине волны 370 нм с одновременными инстилляциями средства «Декстралинк».

Трансэпителиальная техника УФ кросслинкинга выполняется без удаления эпителия (Epi-On) роговицы с этапом предварительного насыщения посредством электрофореза с раствором 0,1% рибофлавина в течение 15 минут, силой тока 1,0 мА с использованием гальванизатора «Поток-1» (Россия). Этап УФ облучения роговицы аналогичен стандартной методике.

Забор слезной жидкости (СЖ) выполняли у больных до операции, на 3, 7 и 14 сут после УФ сшивания стандартным и трансэпителиальным способами. Для получения сыворотки забор венозной крови производили из локтевой вены в утренние часы, натощак. После ретракции сгустка пробы центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин.

Определение уровней TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1, TGF- β 2, IFN- α в СЖ и сыворотке крови (СК) проводили с применением стандартных диагностических наборов «Вектор-Бест» (Россия) и «eBioscience» (Австрия) с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Оценку общего антиоксидантного статуса слезы и сыворотки крови пациентов осуществляли с помощью тест-системы «Total antioxidant status» (Randox Laboratories Ltd., Великобритания) на фотометре SF-Ultra (Россия). Определение содержания супероксиддисмутазы в СЖ и СК выполняли с использованием тест-набора «eBioscience» (Австрия) на фотометре StatFax (США) и TECAN INFINITE F-50 (Австрия).

Все числовые данные обрабатывали методом вариационной статистики, представляли в виде средней арифметической величины – М (Mean) и стандартного отклонения – σ (Standard Deviation). Для оценки достоверности непараметрических количественных данных использовали критерий Манна-Уитни, для определения достоверности нормально распределенных данных – критерий Стьюдента. Статобработку проводили с помощью пакета программ Statistica 6.1 и Excel 2010 методами параметрической и непараметрической статистики.

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для УФ сшивания роговицы были разработаны и предложены растворы рибофлавина (Декстралинк, Риболинк и Хитолинк) с фотосенсибилизирующими свойствами, предназначенные для насыщения стромы, отличающиеся составом основы. Токсикологическая оценка предложенных растворов не выявила их острой токсичности, цитотоксичности, раздражающего и сенсибилизирующего действия.

Инстилляции разработанных растворов при проведении экспериментальных исследований *ex vivo* и *in vivo* способствовали насыщению роговицы рибофлавином аналогично контрольному раствору (изоосмотический рибофлавин). Толщина роговицы при этом значимо не изменялась по сравнению с контролем (Рисунок 1). Исключением явилось средство Декстралинк, которое способствовало снижению толщины роговицы на 24% ($p < 0,05$) за счет ее дегидратации, наблюдаемой уже с 5-ой мин инстилляций.

Сохранение стабильной толщины роговицы при использовании средств Риболинк и Хитолинк в процессе инстилляций, наряду с выявленной особенностью Декстралинка снижать толщину оптической оболочки, позволило рекомендовать указанные растворы для дифференцированного использования при проведении УФ сшивания роговицы различной толщины: при показателе более 450 мкм – рекомендуется Декстралинк, 400-450 мкм – Риболинк.

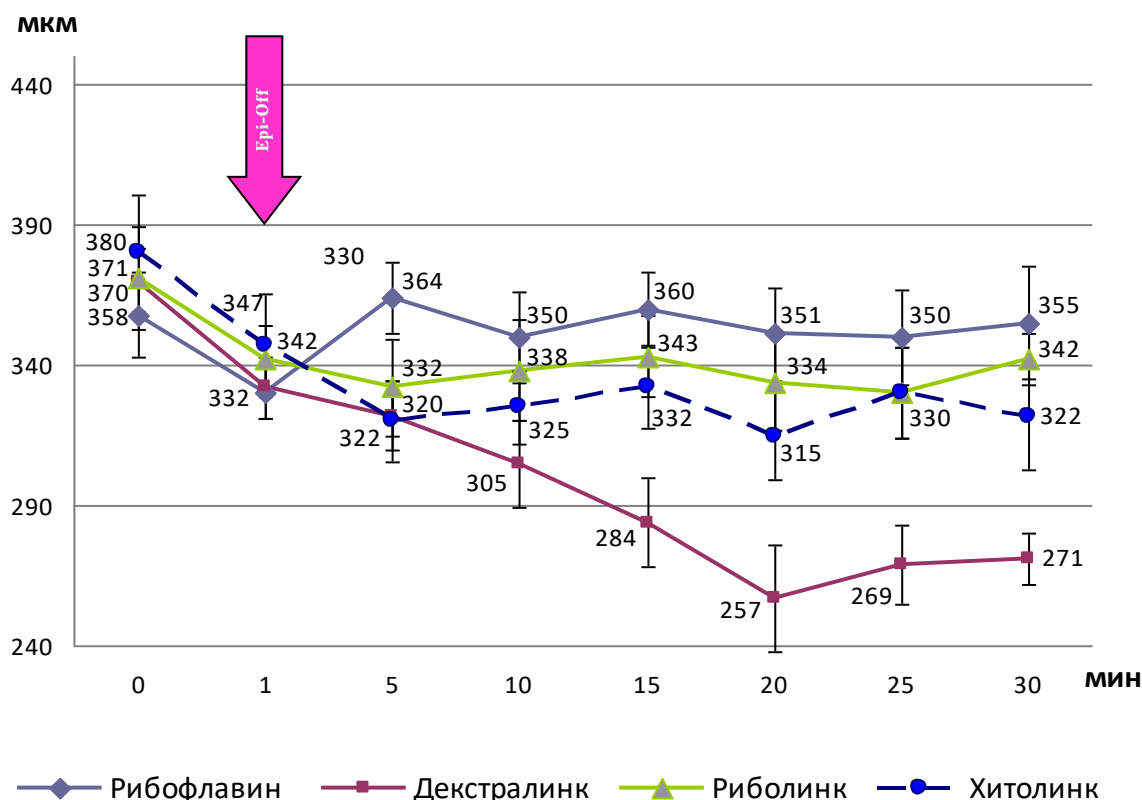


Рисунок 1 - Динамика толщины роговиц кролика *in vivo* в центральной зоне при ее насыщении офтальмологическими растворами. По оси абсцисс – период наблюдений (мин), по оси ординат – толщина роговицы (мкм). Стрелкой отмечен этап деэпителизации роговицы (Epi-Off).

Одним из основных критериев эффективности УФ сшивания роговицы является степень ответного увеличения её механической прочности. Показано, что УФ обработка роговиц в присутствии растворов рибофлавина способствовала значимому росту предела прочности свиных роговичных полос и дисков на 202-246% ($p < 0,01$), что соответствует максимуму кривой на графике (Рисунок 2). Отмечалось также увеличение модуля Юнга у свиных роговичных полос, обработанных ультрафиолетом с рибофлавинсодержащими растворами, на 203-232% ($p < 0,01$) по сравнению с результатами контрольной (интактные) группы. Все средства, используемые при УФ сшивании роговиц, способствовали повышению жесткости оптической оболочки, при этом значимых отличий между опытными группами установлено не было.

В исследование дополнительно включили группу, в которой проводилось УФ воздействие на роговицу без рибофлавина с тем, чтобы оценить возможное влияние излучения на ее биомеханику. Кроме этого, в отдельной группе изучали прочность роговиц, обработанных декстраном, без УФ облучения.

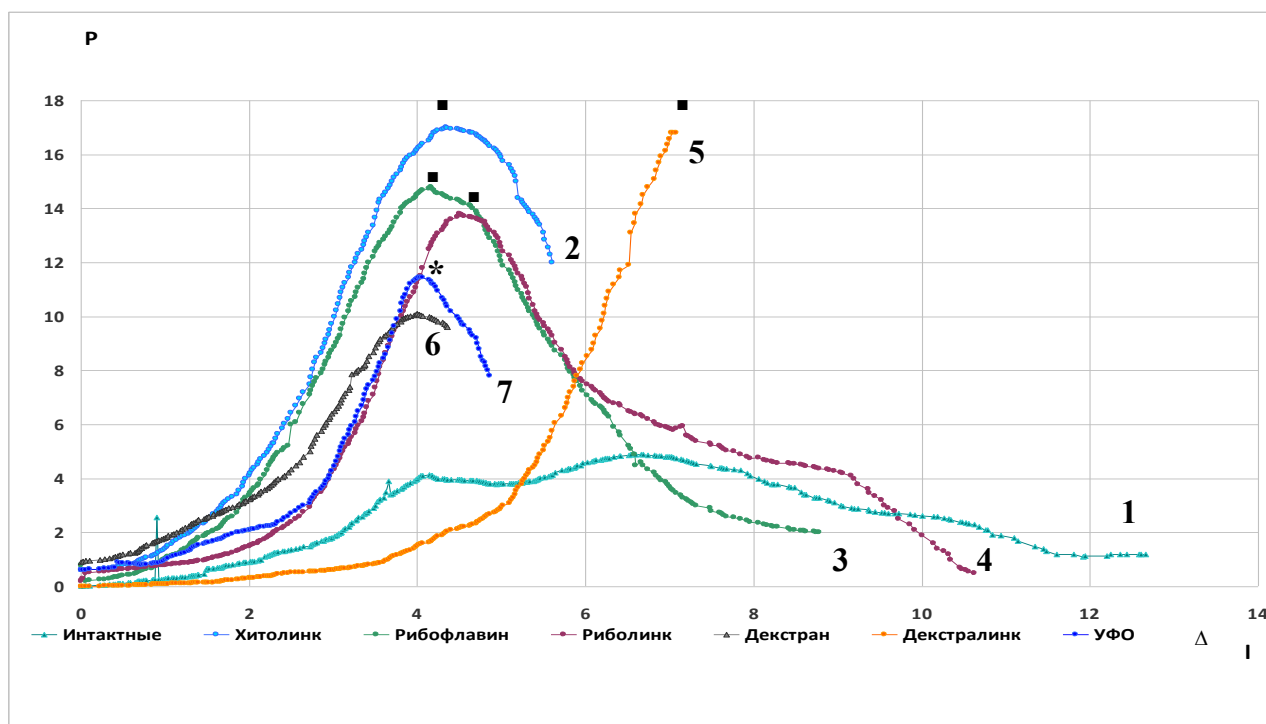


Рисунок 2 - Диаграмма растяжения свиных роговичных дисков ex vivo после УФ облучения с использованием растворов рибофлавина. По оси абсцисс – относительное удлинение материала Δl (мм), по оси ординат – сила приложенной нагрузки P (Н).

1 – интактные, 2 – УФО-хитолинк, 3 – УФО-рибофлавин, 4 – УФО-риболинк, 5 – УФО-декстралинк, 6 – декстран, 7 – УФО.

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

Нами было установлено также заметное увеличение прочностных свойств роговичных дисков и полос, облученных ультрафиолетом без рибофлавина, при котором модуль Юнга возрос в среднем на 54-130% ($p < 0,05$), а предел прочности – на 86-133% ($p < 0,05$); в группе, где применялся раствор декстрана, соответственно, на 13-73% и 24-77%. Следовательно, УФ воздействие или дегидратация стромы способствуют дополнительному увеличению жесткости роговицы.

Таким образом, ультрафиолетовое облучение свиных роговиц в присутствии исследуемых растворов рибофлавина (Декстралинк, Риболинк, Хитолинк) оказывало статистически значимое повышение прочностно-механических свойств корнеальной ткани, связанное с фотополимеризацией коллагеновых волокон стромы. Заметное увеличение жесткости роговицы может происходить также за счет ее УФ облучения или обезвоживания.

Эффективное УФ сшивание роговицы и повышение ее прочностных свойств может быть достигнуто за счет стабильной интрастромальной концентрации рибофлавина. Кроме этого, последний обеспечивает необходимую защиту глублежащих слоев роговицы, в т.ч. чувствительного

эндотелия и внутриглазных структур от негативного воздействия УФ облучения. Динамика уровня рибофлавина в роговице при инстилляциях исследуемых растворов характеризовалась непрерывным ростом концентрации фотосенсибилизатора в течение 60 мин наблюдений (Рисунок 3).

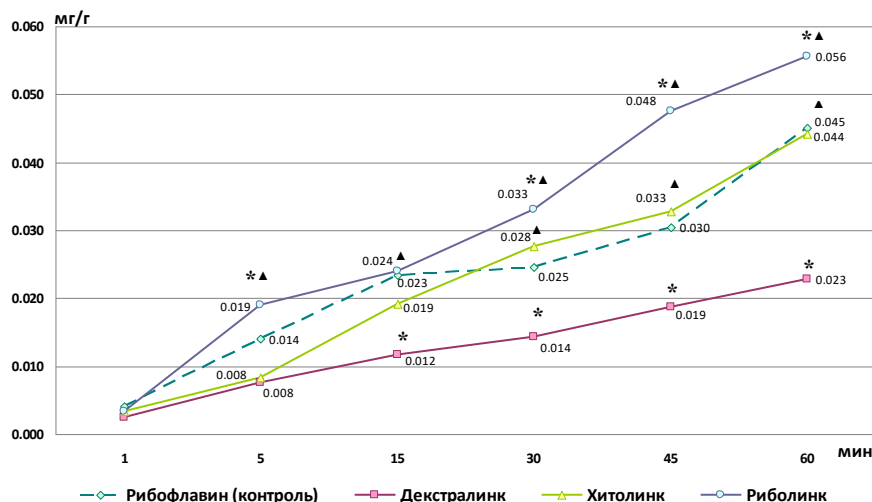


Рисунок 3 - Динамика уровня рибофлавина (мг/г) в свиной роговице *ex vivo* после насыщения офтальмологическими растворами для УФ сшивания.

* $p < 0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

▲ $p < 0,05$ – достоверность различий при сравнении с группой Декстралинк.

Однотипность изменений содержания рибофлавина выявлена как для исследований *in vivo*, так и *ex vivo*. При исходно равной концентрации действующего вещества в растворе наибольшую способность к насыщению стромы демонстрировал раствор Риболинк (рибофлавин с гидроксипропилметилцеллюлозой).

Также было подтверждено, что количественное содержание рибофлавина в ткани роговицы при инстилляциях имеет прямую зависимость от площади удаленного эпителия, что было определено по уровню ФС во влаге передней камеры кроликов в условиях деэпителизации оптической оболочки диаметром 3, 6 или 9 мм (Рисунок 4). По нашим экспериментальным данным наиболее эффективное насыщение и достаточное пропитывание оптимальной площади стромы рибофлавином может быть обеспечено за счет тотальной деэпителизации роговицы – около 9 мм.

Концентрация рибофлавина в роговице после насыщения препаратом Декстралинк, начиная с 15 мин наблюдений, была меньше, чем при использовании других растворов. Это может быть связано с декстранопосредованным снижением толщины и, соответственно, объема роговицы.

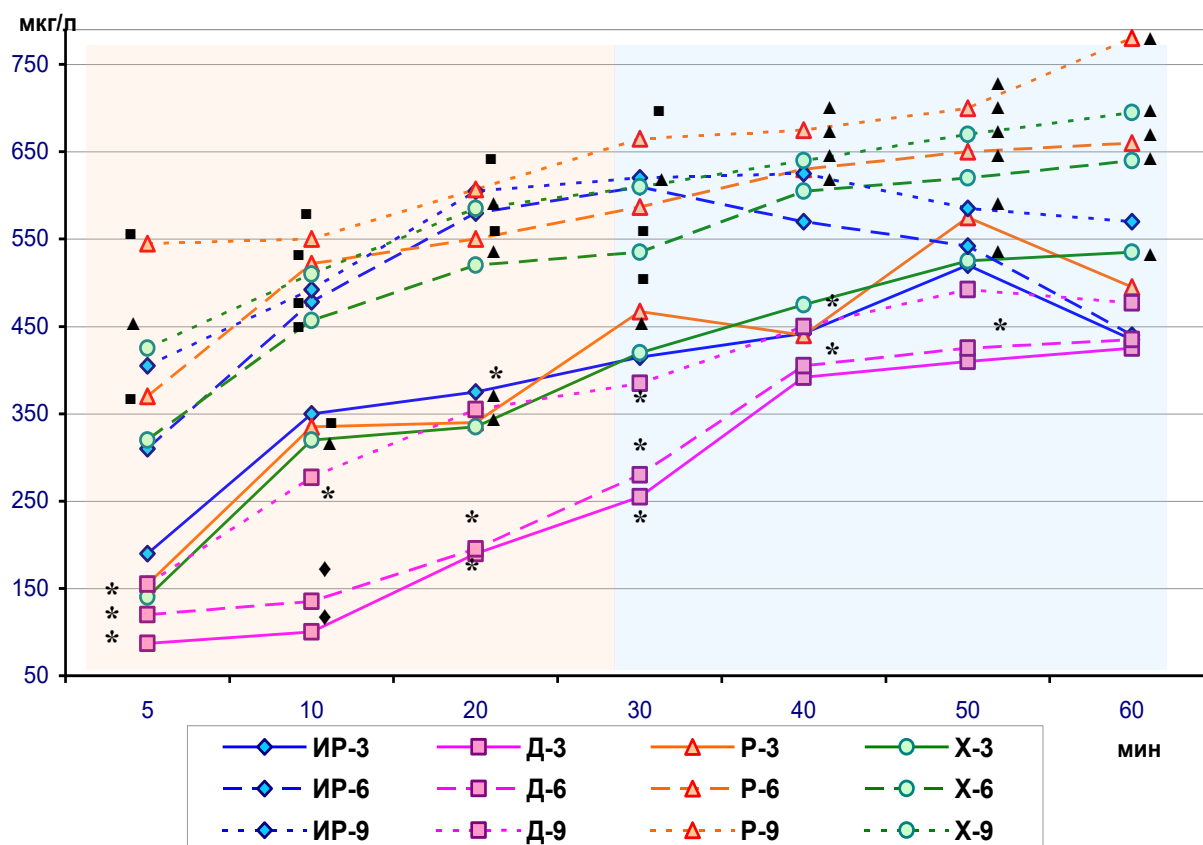


Рисунок 4 - Динамика уровня рибофлавина в ВПК кроликов в зависимости от площади деэпителизации (3, 6, 9 мм) и вида используемого раствора для УФ сшивания роговицы (ИР – изоосмотический рибофлавин, Д – Декстралинк, Р – Риболинк, Х – Хитолинк). По оси абсцисс: время наблюдения (мин), по оси ординат: концентрация рибофлавина (мкг/л).

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

▲ $p < 0,05$; ■ $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с показателями Декстралинк.

Таким образом, диффузия рибофлавина в роговицу обусловлена составом основы используемых растворов, а эффективность насыщения стромы ФС может быть достигнута за счет максимального устранения эпителиального барьера.

Насыщенная рибофлавином строма образует систему «роговица – рибофлавин» (Р-Р), которая, обладая возросшей степенью УФ поглощения, по сравнению с интактной оптической оболочкой, обеспечивает защиту глублежащих интраокулярных тканей (Рисунок 5). Нами было установлено, что интактная свиная роговая оболочка пропускала около 20% ультрафиолета от исходной мощности, в то время как после 5-30 мин инстилляций раствора 0,1% изоосмотического рибофлавина интенсивность проникновения УФ излучения достоверно снижалась, соответственно, в 5,7-315 раз от значений необработанной роговицы. УФ поглощающая способность роговиц, насыщенных рибофлавином с помощью средства Декстралинк, была ниже, чем при использовании изоосмотического раствора, Риболинк или Хитолинк.

Однако к 30 мин наблюдений светопропускающая способность системы Р-Р во всех группах находилась в пределах от 0,002 до 0,06 мВт/см², что значительно ниже порога повреждающего действия ультрафиолета (0,35 мВт/см²) для эндотелия роговицы (Spoerl E. et al., 2011).

На поглощение ультрафиолета роговицей при выполнении УФ сшивания может влиять также пленка рибофлавина, образующаяся на поверхности при инстилляциях растворов. Нами была исследована УФ абсорбция системы «роговица – рибофлавин – прекорнеальная пленка» (Р-Р-П). На диаграмме (Рисунок 5) показана остаточная мощность ультрафиолета (или его интенсивность в передней камере глаза) после абсорбции системами Р-Р и Р-Р-П.

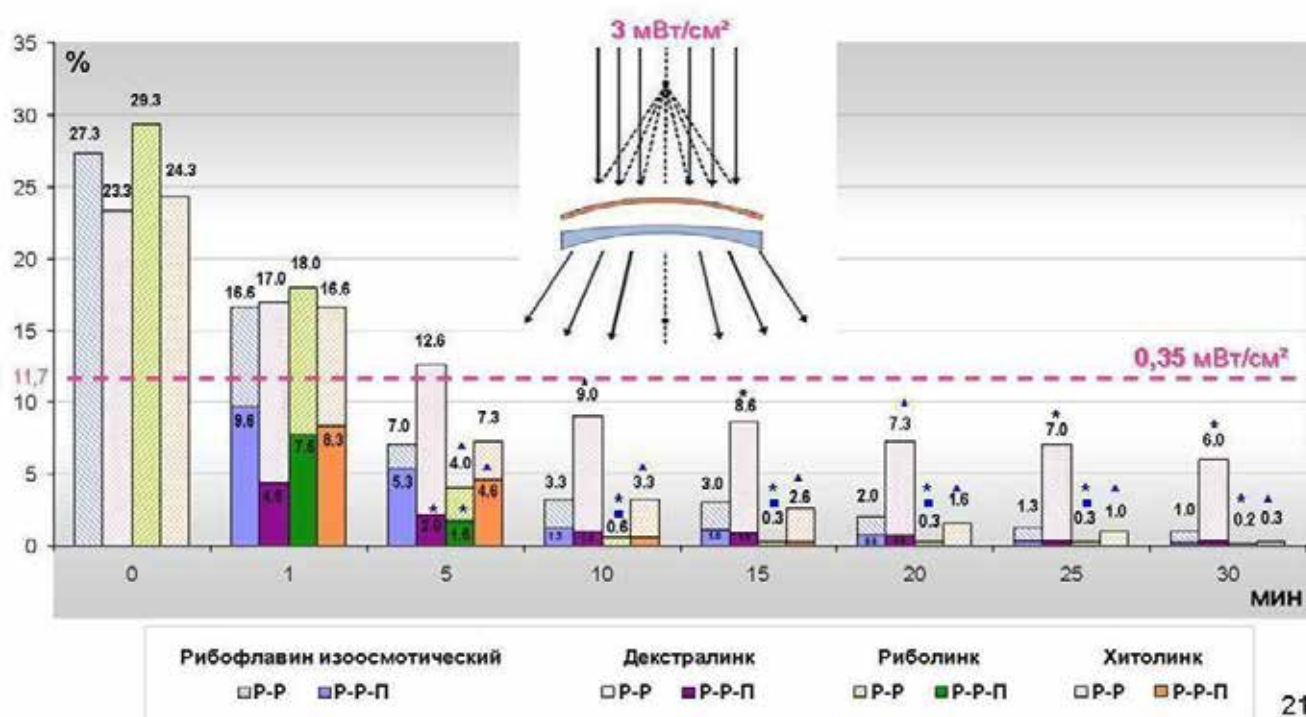


Рисунок 5 - Остаточная мощность УФ излучения после абсорбции системами «роговица – рибофлавин» (Р-Р) и «роговица – рибофлавин – прекорнеальная пленка» (Р-Р-П) при использовании офтальмологических растворов для сшивания роговицы ex vivo (% от исходной мощности УФО 3 мВт/см²).

* $p < 0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

▲ $p < 0,05$; ■ $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с показателями группы Декстралинк.

Установлено протекторное действие по отношению к ультрафиолету средств Декстралинк, Риболинк и Хитолинк, при использовании которых более устойчивый вязкий рибофлавиновый слой поглощал до 50% энергии излучения, а при инстилляциях изотонического раствора рибофлавина – только 25%. Следовательно, последний оказывал ультрафиолетовую протекцию в основном за счет физиологической диффузии действующего вещества в строму. Риболинк и Хитолинк, кроме повышенной, по сравнению с изотоническим раствором, проникающей способности рибофлавина в роговицу, обеспечивали стабильность

образуемой пленки ФС. Декстралинк, истончая роговицу и в меньшей степени насыщая ее рибофлавином, свой защитный эффект от УФО реализовывал преимущественно за счет прекорнеальной рибофлавиновой пленки.

Дана оценка состояния параметров свободно-радикального окисления (СРО), которые изучали по генерации активных форм кислорода методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗ ХЛ) и интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), исследованных посредством железоиндуцированной хемилюминесценции (ЖИ ХЛ) с определением в супернатантах гомогенатов роговиц и глазного яблока экспериментальных животных одного из маркеров активности ПОЛ – ТБК-реагирующих продуктов.

Динамика изменений параметров ЛЗ ХЛ в переднекамерной влаге кроликов демонстрировала 5-кратный рост спонтанной светимости ($p<0,01$) и 6-кратный – светосуммы свечения ($p<0,01$) уже с 1-го часа после УФО воздействия без рибофлавина с последующим постепенным (14 сут) снижением показателей (Рисунок 6).

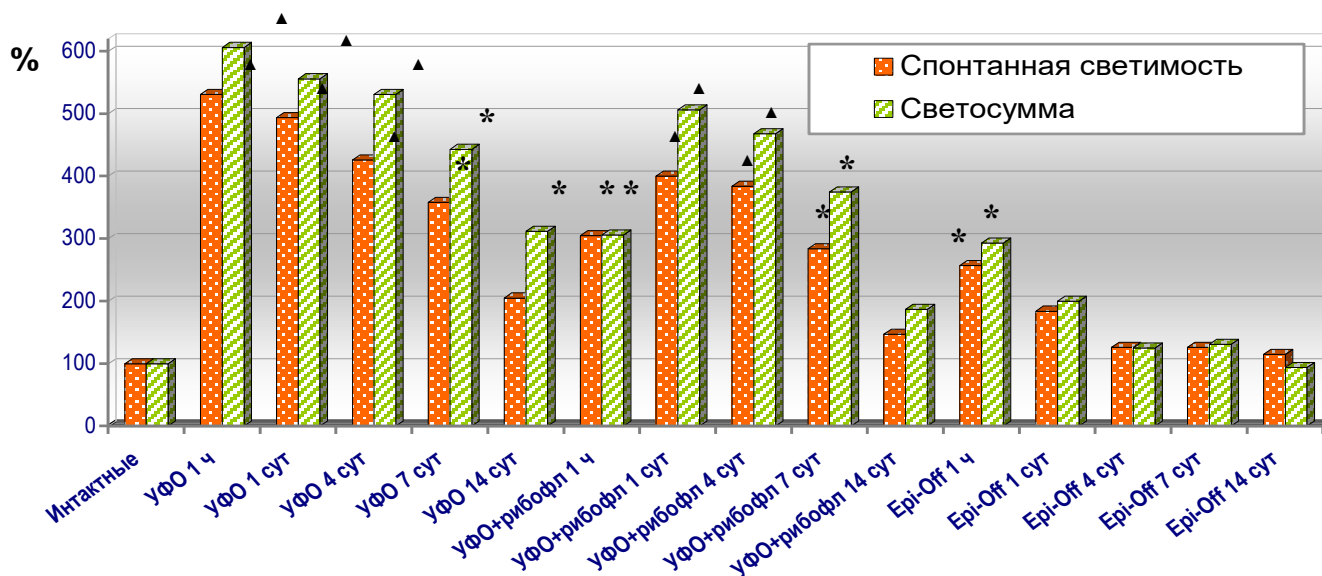


Рисунок 6 - Люминолзависимая хемилюминесценция влаги передней камеры кроликов после УФ облучения роговицы (% к контролю).

* $p<0,05$; ▲ $p<0,01$ – достоверность различий показателя при сравнении с интактным контролем.

Аналогичное, но менее выраженное усиление интенсивности образования АФК наблюдали в группе УФ сшивания с растворами рибофлавина. При этом влияние последних на показатели ХЛ в основном было однотипным. Отмечали менее значимый рост спонтанной светимости и светосуммы свечения ВПК кроликов, а к 14 сут эксперимента регистрировали восстановление значений ХЛ наиболее приближенных к норме.

Нами исследовано влияние травмирующего воздействия дезэпителизации (без облучения) на процессы СРО, которое характеризовалось кратковременным

2-3-хкратным ростом спонтанной светимости и светосуммы ЛЗ ХЛ. Данные параметры были на уровне нормы уже к 4-м сут после воздействия, что соответствует сроку завершенной эпителизации роговицы животных.

Показатели ЛЗ ХЛ, исследованные нами в супернатантах гомогенатов роговиц кроликов, имели сходную с предшествующими данными динамику, только с менее выраженными абсолютными значениями спонтанной светимости и светосуммы, с их нормализацией на 7-14 сут эксперимента.

Оценка результатов ЖИ ХЛ супернатантов из гомогенатов роговиц в группе УФ воздействия и УФО с рибофлавином показала, что диапазон значений спонтанной светимости и амплитуды медленной вспышки был более широк и носил разнонаправленный характер.

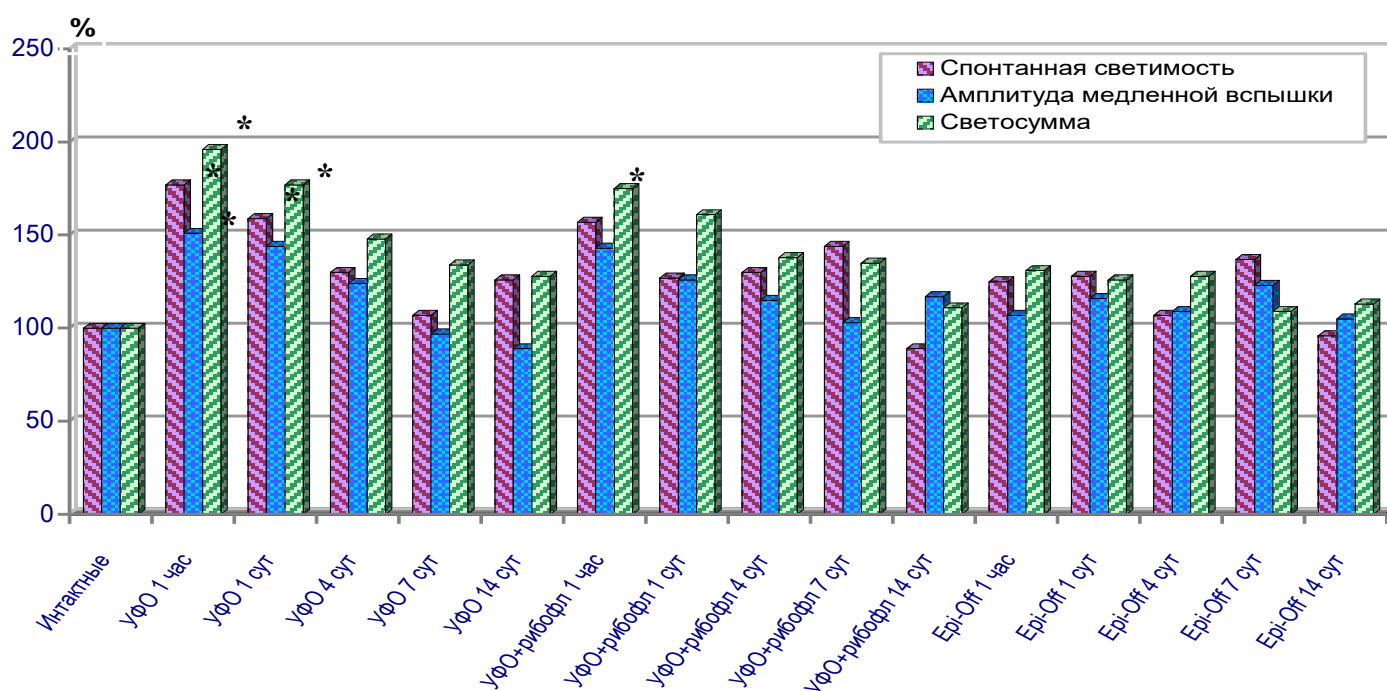


Рисунок 7 - Показатели железоиндуцированной хемилюминесценции супернатантов гомогенатов глазного яблока крыс после УФ облучения и деэпителизации роговицы (% к контролю).

* $p < 0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с интактным контролем.

Однако ключевой интегральный показатель ХЛ – светосумма через 1 час после воздействия во всех группах демонстрировала свой рост (на 30-70%) и постепенное снижение до нормы (14 сут).

Активацию процессов ПОЛ отмечали не только в роговице, но и тканях глазного яблока, о чем свидетельствует 1,5-2-кратный ($p < 0,05$) рост значений ЖИ ХЛ в группах, где проводилось УФ облучение в течение 1 часа после воздействия с последующим (14 сут) восстановлением параметров до уровня интактных животных (Рисунок 7). Это также подтверждается исследованиями уровня ТБК-рп в супернатантах гомогенатов роговиц, которые характеризуют интенсивность процессов ПОЛ по количеству их конечных метаболитов. Так

через 1 ч наблюдений УФО способствовало достоверному росту концентрации ТБК-рп на 26% ($p<0,05$), а при сшивании с рибофлавином – на 15% (Рисунок 8-1). На 4-14 сут величина показателя в группах приближалась к контрольным значениям. Уровень ТБК-рп в супернатантах гомогенатов глазного яблока крыс после воздействия УФ излучения (1 ч) на роговицу достоверно увеличивался на 44% ($p<0,05$) с последующей (на 7-17 сут) его нормализацией (Рисунок 8-2). Дезэпителизация роговицы на данный параметр значимо не влияла.

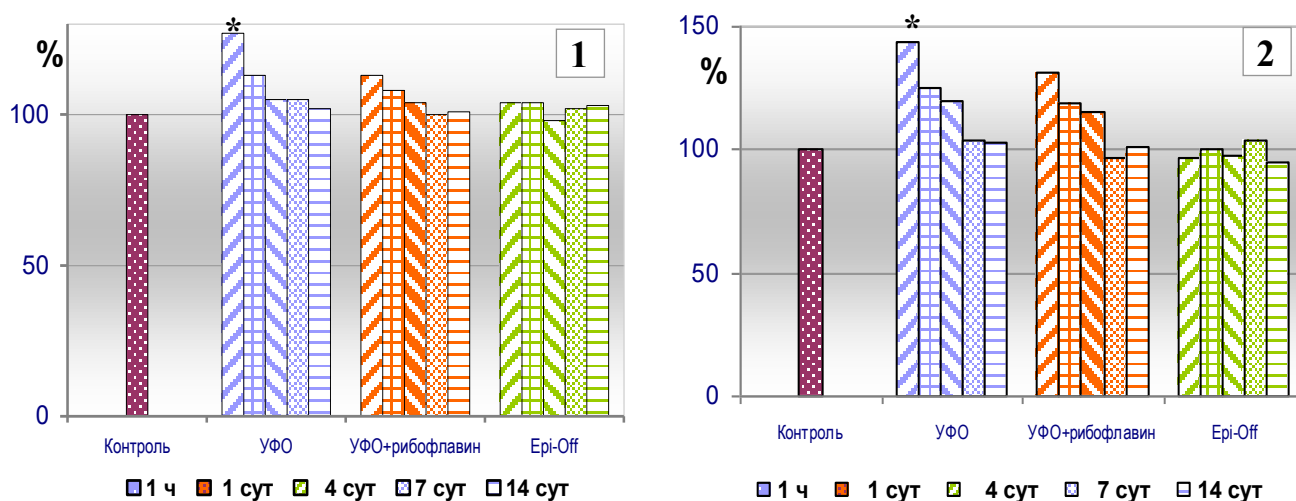


Рисунок 8 - Содержание ТБК-реагирующих продуктов в супернатантах гомогенатов роговиц кроликов – 1 и глазных яблок крыс – 2 после УФ облучения и дезэпителизации роговицы (% к контролю).

* $p<0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с интактным контролем.

Таким образом, одним из ключевых патогенетических факторов УФ воздействия на роговицу является индукция свободно-радикальных процессов с активацией ПОЛ, которые в определенной степени компенсируются при облучении в присутствии рибофлавина. Незначительное повреждающее воздействие дезэпителизации роговицы выраженного влияния на интенсивность процессов свободно-радикального окисления не оказывало. Состояние роговичной ультраструктуры после УФ сшивания в присутствии разработанных растворов рибофлавина оценивали по изменению плотности фибриллярной упаковки и диаметра коллагеновых фибрилл роговицы крыс.

Во всех группах отмечали снижение плотности фибриллярной последовательности на 3 сут после УФ воздействия, в т.ч. в присутствии рибофлавина, по сравнению с интактной роговицей (Таблица 2). К завершению срока наблюдений (90 сут) значения показателя приближались к норме. При этом существенных отличий между группами, при использовании исследуемых растворов рибофлавина, не обнаружено.

Таблица 2 - Влияние ультрафиолетового облучения роговицы крыс на плотность фибриллярной упаковки волокон и диаметр фибрилл коллагена ($M \pm \sigma$)

Группа		Диаметр фибрилл (нм)		Плотность волокон (фибрилл / 0,25 мкм ²)	
		3 сут	90 сут	3 сут	90 сут
1	Интактные (контроль)	35,59±2,33		130,5±11,98	
2	УФО без рибофлавина	36,92±2,88	36,67±2,42	106,90±8,97	124,90±5,00
3	УФО / изо-рибофлавин	39,62±3,21	39,46±3,08	102,05±7,05	118,05±7,38
4	УФО / Декстралинк	39,04±2,70	39,31±3,30	93,31±6,71*	122,31±7,92
5	УФО / Риболинк	38,90±2,92	38,63±2,11	96,55±8,12*	116,55±9,34
6	УФО / Хитолинк	37,78±3,16	37,22±3,25	104,55±10,02	113,55±9,34

* $p < 0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с интактным контролем.

Уменьшение плотности фибрилл в волокнах коллагена роговицы, очевидно, связано с послеоперационным отеком стромы, что согласуется с данными других авторов (Akhtar S. et al., 2013).

Наши исследования показали, что УФ сшивание роговицы в присутствии рибофлавинсодержащих растворов способствовало увеличению диаметра фибриллярного коллагена в среднем на 6-9% (Рисунок 9). При УФ облучении без ФС также определяли незначительный (на 3,5%) прирост диаметра фибрилл.

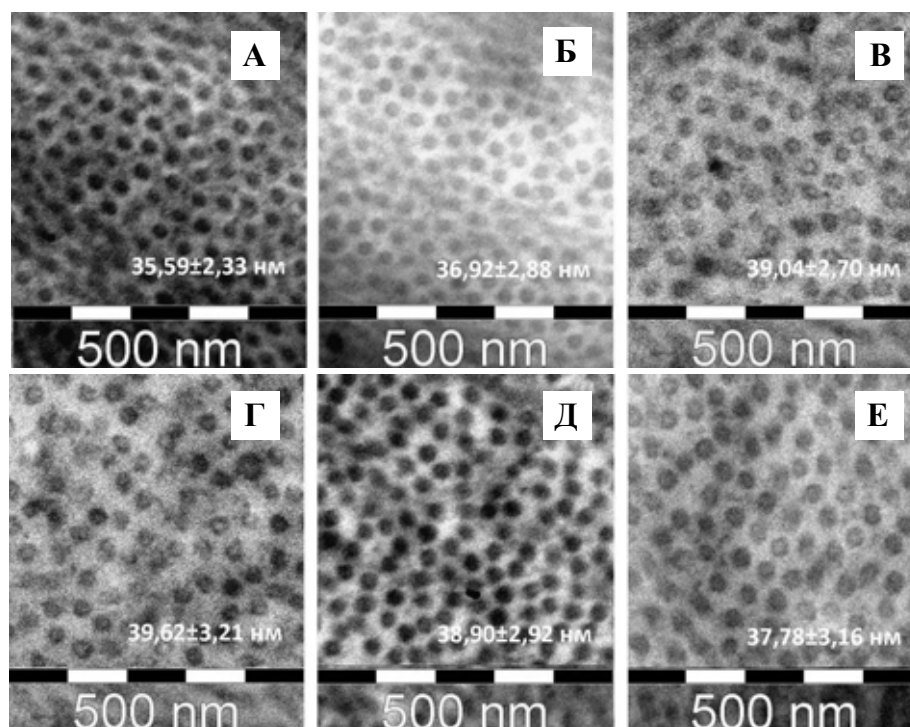


Рисунок 9 - Коллагеновые фибриллы средних слоев стромы роговицы крыс.

Электронная микроскопия. А – в норме; 90 сут после УФ облучения:

Б – без рибофлавина, В – с раствором Декстралинк, Г – рибофлавином изоосмотическим, Д – Риболинк, Е – Хитолинк.

Полученные нами результаты исследований основались на статистических данных нормального распределения диаметра коллагеновых фибрилл роговицы (Рисунок 10). Установлено, что наибольшее количество фибрилл после УФ воздействия без рибофлавина имели диаметр 34-36 нм, после сшивания с разработанными растворами рибофлавина – 36-40 нм (в норме – 34-38 нм).

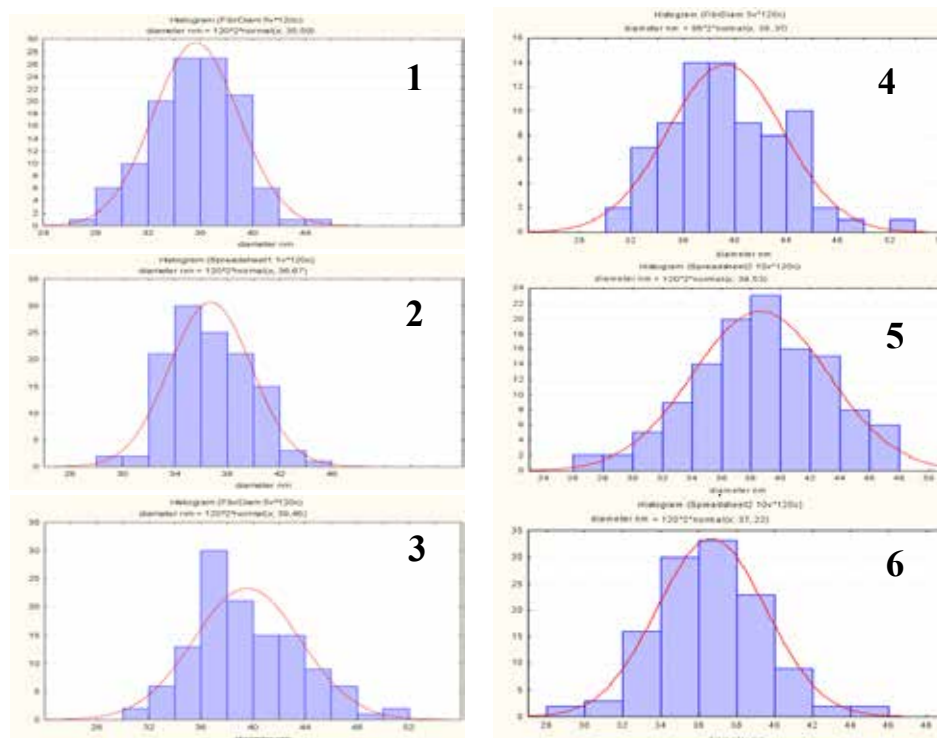


Рисунок 10 - Гистограммы нормального распределения диаметра коллагеновых фибрилл. По оси абсцисс диаметр коллагеновых фибрилл (нм), по оси ординат – количество измерений диаметра фибрилл.

1 – норма; **90** сут после УФ облучения: **2** – без рибофлавина, **3** – раствор рибофлавина изотонического, **4** – Декстралинк, **5** – Риболинк, **6** – Хитолинк.

Морфология роговицы крыс после воздействия на нее УФ излучения без рибофлавина характеризовалась выраженным развитием патологических изменений в виде отека стромы с 3 сут эксперимента и последующим на 7-30 сут вращением в нее новообразованных сосудов и интенсивной гибелью кератоцитов (Рисунок 11). Наблюдались признаки эндотелиальной дистрофии с нарушением целостности десцеметовой мембраны и полной утратой нативной структуры роговой оболочки к 90 сут.

УФ сшивание роговицы с использованием растворов изотонического рибофлавина и Риболинка в целом было идентичным: на 3-7 сут в строме отмечали разрыхление пучков коллагеновых волокон, свидетельствующее об отеке (Рисунок 12).

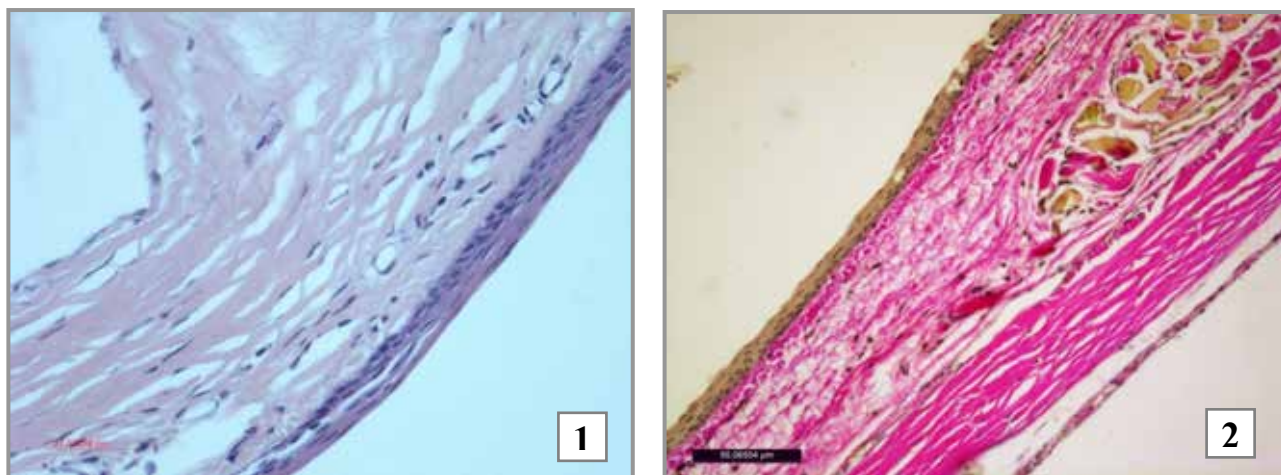


Рисунок 11 - Гистологическая картина роговицы крысы после УФ облучения без рибофлавина. **1** – 3 сут. Окраска гематоксилином-эозином, **2** – 90 сут. Окраска по Ван Гизону.

К 30 сут локальное набухание пучков волокон стромы сохранялось, регистрировали снижение относительной плотности кератоцитов. Структура эндотелия и десцеметовой мембраны соответствовали норме. Следует отметить, что к 90 сут в строме роговицы при уплотнении коллагеновых волокон местами наблюдали очаги разволокнения, свидетельствующие о сохранении локальных зон отека.

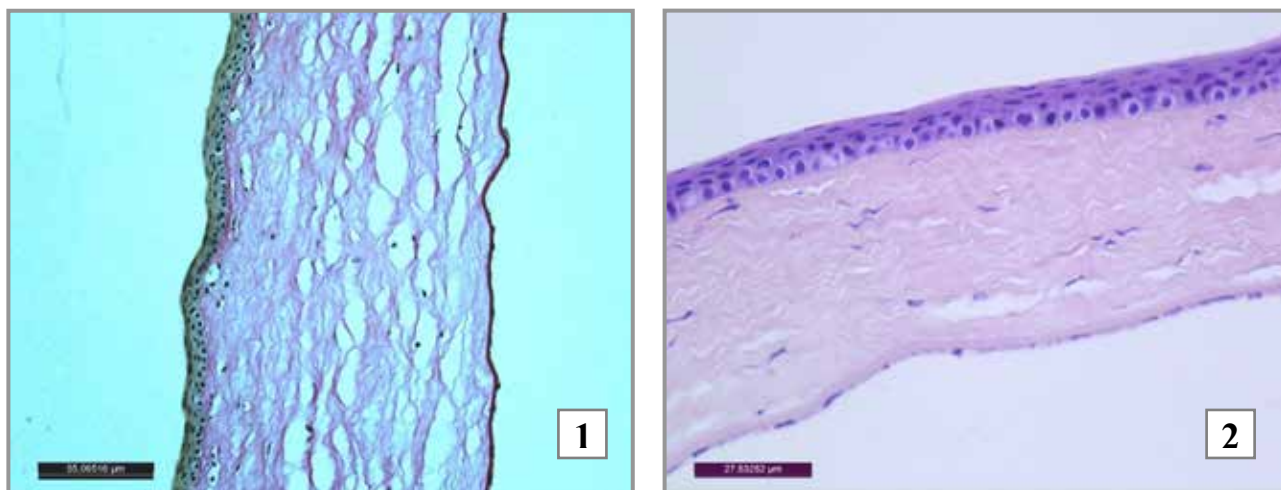


Рисунок 12 - Гистологическая картина роговицы крысы после УФ сшивания с раствором Риболинк. **1** – 3 сут, **2** – 90 сут. Окраска гематоксилином-эозином.

Основным морфологическим отличием после УФ сшивания роговицы с раствором Декстралинк было менее выраженное набухание стромы в сроки до 30 сут (Рисунок 13). Архитектоника эпителия и роговичных пластин была близка к нормальной с очагами отека пучков коллагеновых волокон. Единичные участки разволокнения встречались и к концу эксперимента (90 сут).

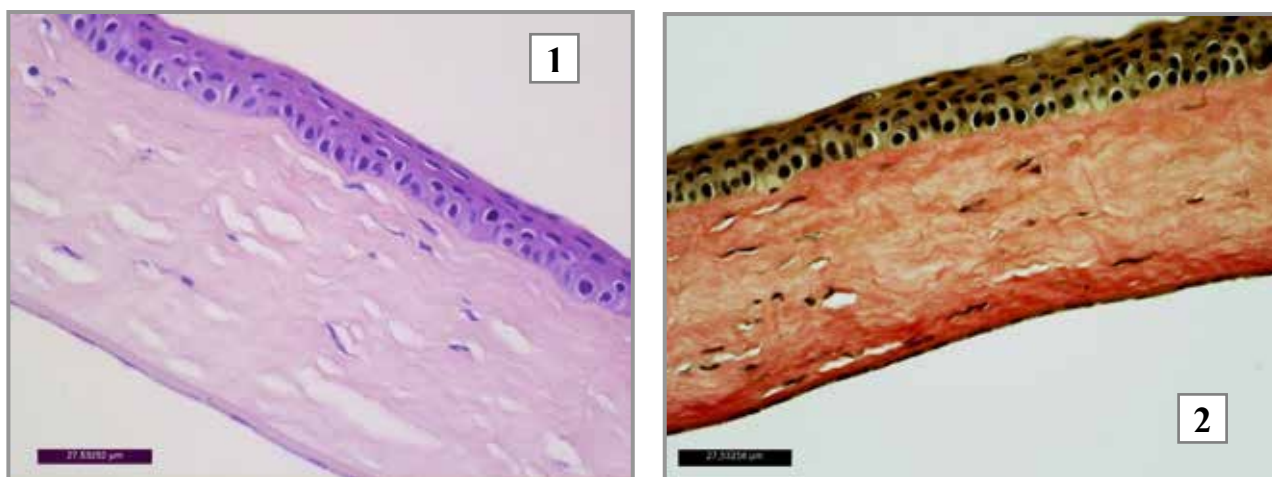


Рисунок 13 - Гистологическая картина роговицы крысы после УФ сшивания с раствором Декстралинк. **1** – 3 сут. Окраска гематоксилином-эозином, **2** – 90 сут. Окраска по Ван Гизону.

УФ сшивание роговицы с фотосенсибилизатором Хитолинк характеризовались более выраженным отеком стромы с утолщением Десцеметовой мембраны на 3 сут (Рисунок 14). На 14 сут в строме определяли новообразованные сосуды. Признаки отека роговицы сохранялись до 90 сут эксперимента, при этом пучки коллагеновых волокон стромы имели вид соединительной ткани с гомогенной структурой.

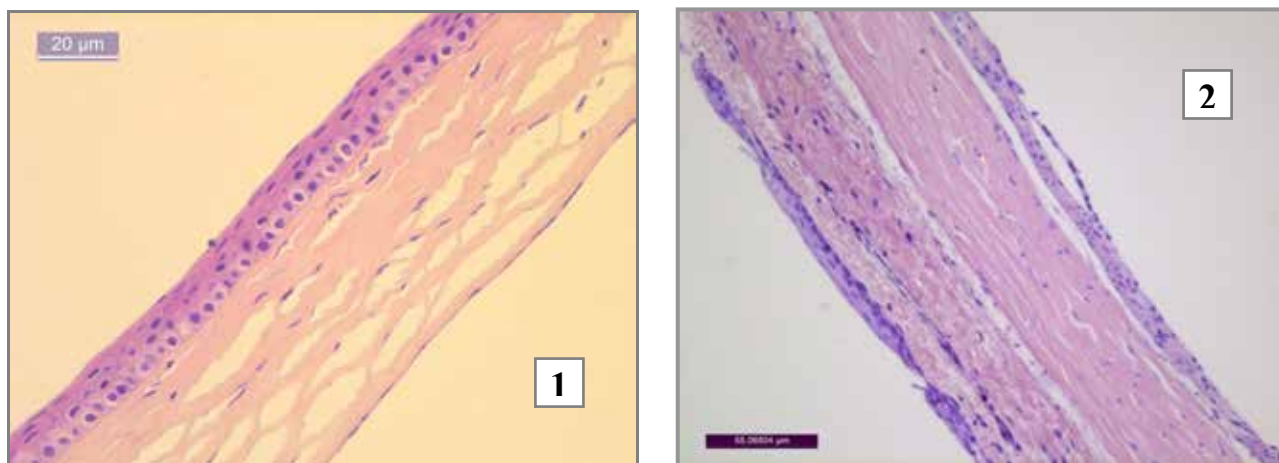


Рисунок 14 - Гистологическая картина роговицы крысы после УФ сшивания с раствором Хитолинк. **1** – 3 сут. Окраска по Ван Гизону, **2** – 90 сут. Окраска гематоксилином-эозином.

Для выявления прижизненных морфологических особенностей роговицы кроликов после УФ сшивания с растворами рибофлавина использовали метод конфокальной микроскопии, позволяющий исследовать изменения в слоях оптической оболочки глаза на микроструктурном уровне, оценивать состояние клеток на различной глубине стромы в динамике. По данным конфокальной микроскопии, УФ сшивание с применением изоосмотического (контроль) и

исследуемых растворов рибофлавина (Декстралинк, Риболинк и Хитолинк) вызывало однотипные морфологические изменения в роговице кролика *in vivo*. До 14 сут во всех опытных группах наблюдали явления эпителиопатии с десквамацией клеток и полиморфизм клеток базального эпителия (с визуализацией различных по размерам и контрастности клеток), являющихся следствием дезэпителизации роговицы. Определяли апоптоз кератоцитов в виде сетчато-расположенных клеток на 3-30 сут после УФ сшивания в переднем и менее выражено – в среднем слое роговицы. Такая морфологическая картина характерна для лакунарного отека роговицы (Рисунок 15, 1В). В последующем (30-90 сут) явления отека в слоях стромы спадали, что отмечалось уменьшением сетчатости.

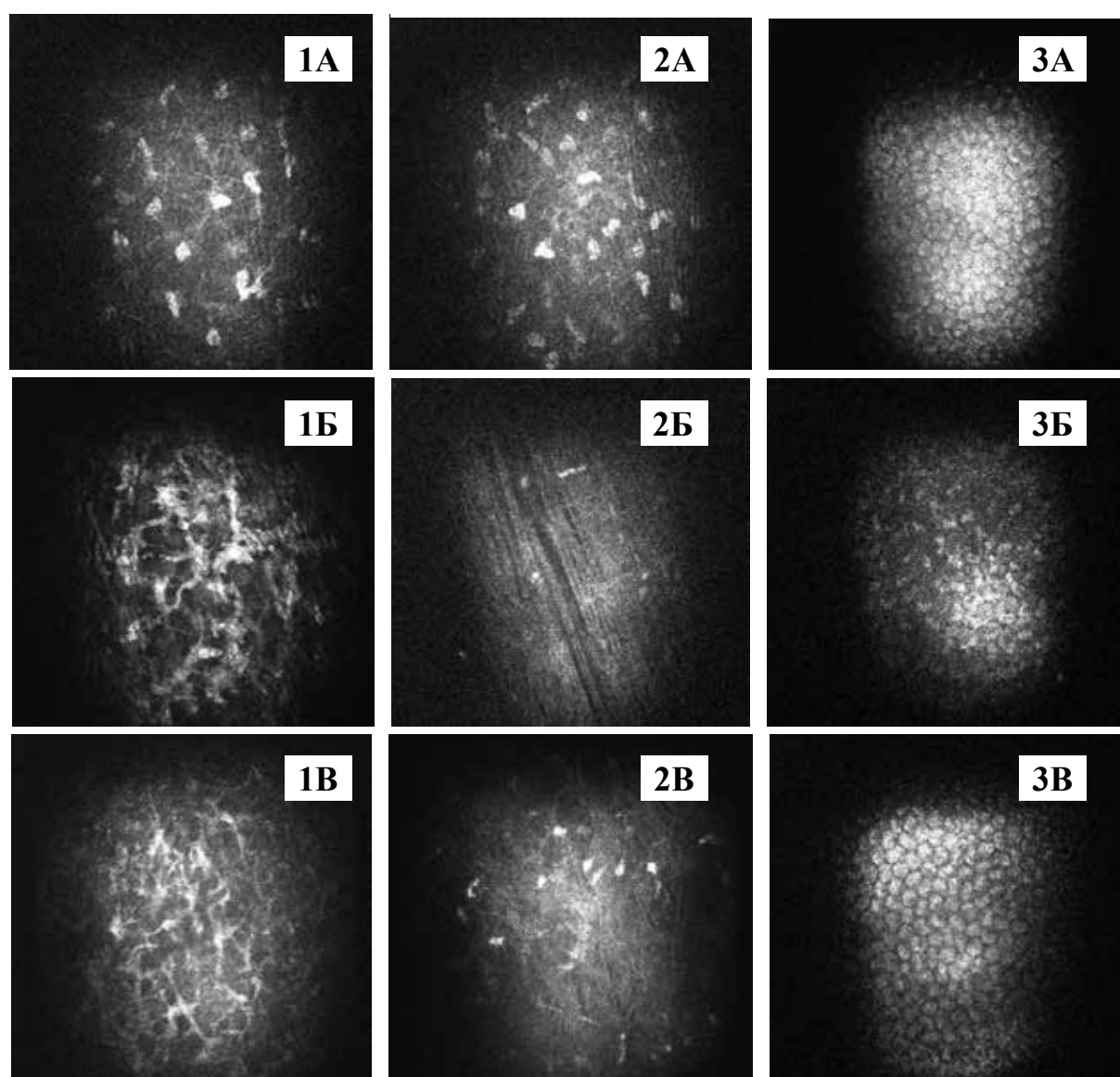


Рисунок 15 - Микроскопическая картина слоев роговицы кролика на 30 сут после УФ воздействия: А – интактные, Б – УФО (без рибофлавина), В – УФО с рибофлавином (Риболинк). Конфокальная микроскопия, увеличение×300. Глубина: 1 – до 120-160 мкм, 2 – до 280-320 мкм, 3 – эндотелий роговицы (400-420 мкм).

На 7-30 сут после рибофлавин-УФ-сшивания в передней строме (120-160 мкм) отмечали максимальное снижение плотности кератоцитов на 48% ($p<0,05$) от значений интактного контроля (Таблица 3). При этом апоптотированные клетки роговицы наблюдали на глубине до 360 мкм, в слоях стромы регистрировалась складчатость, обусловленная эффектом «стягивания» (Рисунок 15, 2В). К 30 сут определяли появление единичных активированных кератоцитов (фибробластов) в виде ярких контрастных клеток. К этому сроку плотность кератоцитов полностью не восстановилась, как и не отмечался процесс их активной репопуляции (Рисунок 15, 2В). В задних слоях стромы (380-420 мкм) и эндотелии патоморфологических особенностей не обнаруживали (Рисунок 15, 3В).

По данным конфокальной микроскопии морфологические изменения после УФО (без рибофлавина) носили выраженный патологический характер. Наблюдали явления эпителиопатии, значительный отек стромы, сопровождающийся интенсивной гибелью кератоцитов и помутнением (хейзом) роговицы. Усиленный апоптоз кератоцитов отмечали в сроки до 30 сут, который визуализировался в виде контрастной сетчатости (Рисунок 15, 1Б). Апоптотированные кератоциты обнаруживали на всю толщину стромы (до 400 мкм) в течение всего эксперимента (90 сут), при этом полного восстановления их количества так и не наблюдали.

Таблица 3 - Влияние УФ излучения на плотность кератоцитов и эндотелиальных клеток роговицы кролика по данным конфокальной микроскопии (клеток / мм², $M\pm\sigma$)

Группа / срок наблюдений		Плотность кератоцитов в слоях стромы			Плотность клеток эндотелия
		120-160 мкм	280-320 мкм	380-420 мкм	
Интактные (контроль)		346±29	297±28	269±19	3120±86
УФО без рибофлавина	3 сут	91,5±12*	78,5±19*	83±10*	2197±75*
	7 сут	83,5±14*	70±11*	92,5±11*	2080±93*
	14 сут	142±15*	101,5±18*	134,5±22*	1920±71*
	30 сут	104±32*	123±21*	160±27*	1564±82*
	90 сут	98±24*	108±22*	135,5±29*	1435±118*
УФО + Риболинк	3 сут	202±17*	151±30*	244±23	3032±84
	7 сут	183,5±20*	135,5±24*	221±27	3125±98
	14 сут	180±22*	139±21*	235±24	3105±80
	30 сут	191,5±20*	177,5±17*	218,5±30	2994±106
	90 сут	220±21	185±24*	235,5±32	3220±91

* $p<0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с интактным контролем.

Определяли складчатость стромальных слоев за счет коллагеновых «сшивок» (Рисунок 15, 2Б). В последующем на 30-90 сут явления отека снижались. УФ излучение вызвало повреждение эндотелиального слоя клеток, которое регистрировали в виде статистически значимого снижения их плотности (на 54%, $p<0,05$), изменения правильной гексагональной формы и нарушения упорядоченности оставшихся клеток (Рисунок 15, 3Б). Все говорило о повреждающем действии УФ излучения на ткани роговицы в отсутствие ФС.

Таким образом, анализ гистоморфологической картины роговицы экспериментальных животных показал, что воздействие УФ излучения в присутствии рибофлавинсодержащих растворов характеризуется временным набуханием стромы и десцеметовой мембраны (3-7 сут), гибелью кератоцитов преимущественно в передних и средних слоях стромы (3-30 сут), не затрагивая задние слои и эндотелий. Отсутствие рибофлавина в роговице при ее УФ облучении, кроме отека и гибели кератоцитов во всех слоях стромы, вызывало патологические последствия необратимого характера: интракорнеальная васкуляризация, нарушение целостности десцеметовой мембраны, эндотелиальная дистрофия.

Для оценки влияния ультрафиолетового кросслинкинга роговицы на динамику локального и системного уровня цитокинов и антиоксидантного статуса были проведены клинические наблюдения пациентов с кератоконусом. Особенности локального цитокинового статуса больных КК до процедуры УФ сшивания были связаны с 10 и 25-кратным повышением содержания соответственно $TGF\beta 1$ и $-\beta 2$, в сравнении с нормой (Таблица 4).

Таблица 4 - Уровень цитокинов в слезной жидкости пациентов с кератоконусом после стандартного (s-CXL) и трансэпителиального (t-CXL) УФ сшивания роговицы в динамике исследования ($M\pm\sigma$, пг/мл)

Показатель	Группы пациентов		Метод сшивания роговицы	Срок наблюдения		
	Контроль	Кератоконус		3 сут	7 сут	14 сут
$TGF\beta 1$	$40,6\pm 7,2$	$437,4\pm 81,9^{\blacksquare}$	s-CXL	$641,5\pm 100,2^{\blacksquare}$	$1150,8\pm 91,5^{\blacksquare\blacktriangle}$	$235,1\pm 56,2^{\blacksquare}$
			t-CXL	$682,4\pm 58,2^{\blacksquare}$	$733,6\pm 69,8^{\blacksquare}$	$309,1\pm 61,1^{\blacksquare}$
$TGF\beta 2$	$36,8\pm 5,5$	$1017,2\pm 137,2^{\blacksquare}$	s-CXL	$2514,4\pm 149,3^{\blacksquare\blacktriangle}$	$1635,1\pm 103,8^{\blacksquare}$	$1343,5\pm 121,8^{\blacksquare}$
			t-CXL	$1736,5\pm 125,2^{\blacksquare}$	$1274,1\pm 104,8^{\blacksquare}$	$1163,2\pm 109,5^{\blacksquare}$
$TNF-\alpha$	$8,9\pm 1,3$	$20,9\pm 2,1^*$	s-CXL	$21,8\pm 2,5^*$	$19,0\pm 2,8^*$	$14,5\pm 1,9^*$
			t-CXL	$22,7\pm 3,1^*$	$18,1\pm 2,5^*$	$12,6\pm 2,0$
$IL-1\beta$	$8,8\pm 1,6$	$7,5\pm 0,8$	s-CXL	$14,9\pm 3,0$	$12,5\pm 3,1$	$8,2\pm 1,7$
			t-CXL	$11,7\pm 2,4$	$11,2\pm 2,3$	$9,1\pm 2,0$
$IFN-\alpha$	$4,2\pm 0,7$	$11,1\pm 2,7^*$	s-CXL	$28,8\pm 4,1^{\blacktriangle}$	$22,4\pm 4,6^{\blacksquare}$	$16,5\pm 3,3^*$
			t-CXL	$22,2\pm 3,7^*$	$20,4\pm 4,3^*$	$13,5\pm 3,8^*$

* $p<0,05$ $\blacksquare$ $p<0,01-0,001$ – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

$\blacktriangle$ $p<0,05$ – достоверность различий при сравнении с показателями пациентов с кератоконусом.

Соответственно, в динамике стандартного сшивания роговицы выявлен 2,5-кратный рост содержания факторов роста на 7-е и 3-и сутки наблюдений, относительно дооперационных значений, очевидно как следствие проведенной процедуры.

Содержание TNF- α в СЖ больных с КК превышало показатели контроля более, чем в 2 раза. Через 3-7 дней после s-CXL и t-CXL сшивания роговицы местный уровень TNF- α практически не изменялся, при некотором снижении на 14 сут (Таблица 4).

Дооперационная концентрация IL-1 β была в пределах контрольных значений. На 3 сут после s-CXL уровень цитокина превышал в 2 раза, а после t-CXL – в 1,5 раза дооперационные данные с последующей нормализацией показателей до исходных величин.

Уровень IFN- α в слезе больных КК достоверно отличался от контроля – в 2,7 раза. Его максимальную концентрацию обнаруживали на 3 сут после процедуры в обеих наблюдаемых группах при более выраженном росте у пациентов со s-CXL. На 7-14 сут наблюдений содержание IFN- α в СЖ после s-CXL и t-CXL достоверно уменьшалось, приближаясь к дооперационным значениям.

Следует отметить, что у пациентов с КК после t-CXL каких-либо значимых изменений в уровнях исследованных цитокинов не установлено, что, очевидно, обусловлено с отсутствием травмирующего воздействия стандартной методики, связанного с деэпителизацией роговицы.

Существенных изменений системной концентрации трансформирующего фактора роста β 2 как при стандартной, так и трансэпителиальной технике УФ сшивания по отношению к дооперационным данным выявлено не было. Однако при этом обнаруживали увеличение на 71% ($p<0,05$) уровня изоформы β 1 к 14 сут после процедуры s-CXL.

Динамика содержания TNF- α , IL-1 β и IFN- α в сыворотке крови пациентов с КК после s-CXL и t-CXL не имела статистически значимых отличий от параметров нормы и дооперационных показателей в течение всего периода наблюдений.

Выявлено достоверное снижение общего антиоксидантного статуса (ОАС) слезной жидкости пациентов с КК до лечения на 40% ($p<0,05$). При этом содержание супероксиддисмутазы (СОД) на фоне заболевания было меньше нормы в среднем на 18,8% (Таблица 5). Стандартное УФ сшивание усугубляло патологическое состояние антиоксидантной системы роговицы в раннем послеоперационном периоде (3-7 сут), что выражалось в уменьшении уровня СОД слезы на 70% ($p<0,05$) и ОАС на 52% ($p<0,05$), по сравнению с дооперационными данными. Трансэпителиальная техника вызывала менее значимые отличия от исходных значений, соответственно, на 58% ($p<0,05$) и 41% ($p<0,05$).

Таблица 5 - Содержание супероксиддисмутазы (нг/мл) и общий антиоксидантный статус (ммоль/л) слезной жидкости пациентов с кератоконусом после стандартного и трансэпителиального УФ сшивания роговицы ($M \pm \sigma$)

Показатель	Группы пациентов		Метод сшивания роговицы	Срок наблюдения		
	Контроль	Кератоконус		3 сут	7 сут	14 сут
СОД нг/мл	119,1 $\pm$ 14,5	96,7 $\pm$ 11,3	s-CXL	29,1 $\pm$ 8,5*	49,2 $\pm$ 9,6*	59,3 $\pm$ 12,7
			t-CXL	40,2 $\pm$ 11,2*	62,4 $\pm$ 10,1	81,5 $\pm$ 13,2
ОАС ммоль/л	2,82 $\pm$ 0,15	1,68 $\pm$ 0,21*	s-CXL	0,81 $\pm$ 0,12*	0,98 $\pm$ 0,13*	1,19 $\pm$ 0,18*
			t-CXL	0,98 $\pm$ 0,15*	1,10 $\pm$ 0,16*	1,29 $\pm$ 0,21*

$p < 0,05$ – достоверность различий показателя при сравнении с контролем.

Минимальные значения СОД и ОАС слезы регистрировали на 3 сут после процедуры УФ кросслинкинга с последующей тенденцией к восстановлению дооперационных показателей, что в целом по срокам соответствовало росту активности процессов СРО. Не наблюдали значимых системных отличий ОАС и уровня СОД у пациентов с кератоконусом в сроки до 14 сут после УФ кросслинкинга, по сравнению с нормой.

Установленные нами механизмы межклеточных и межмолекулярных взаимодействий в тканях роговицы после ее УФ сшивания с рибофлавином представлены в виде схемы (Рисунок 19). Одним из первоочередных внешних воздействий на роговицу является удаление эпителия, которое инициирует выброс провоспалительных цитокинов, в частности IL-1 β , в сроки 3-7 сут после выполнения процедуры. При этом отмечается активная продукция трансформирующих факторов (TGF β 1, - β 2). В дальнейшем деэпителизация роговицы с ее ультрафиолетовым облучением способствует усилению процессов клеточной пролиферации и миграции с образованием активированных кератоцитов (фибробластов).

Использование фотосенсибилизатора рибофлавина для насыщения стромы с последующим УФ облучением роговицы длиной волны 370 нм приводило к усиленному образованию в ней активных форм кислорода, таких как супероксид анион-радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород (Spoerl E. et al., 2011), которые инициировали фотохимические взаимодействия в тканях оптической оболочки, изменяя ее ультраструктуру и, соответственно, повышая биомеханические свойства. Вместе с тем, продукция АФК вызывала интенсификацию свободно-радикального окисления в роговице с усилением процессов ПОЛ и образованием их метаболитов. Отмечается местное снижение антиоксидантного статуса, наряду с уменьшением уровня супероксиддисмутазы. При этом наблюдается гибель

кератоцитов, которая охватывает преимущественно переднюю и среднюю строму, не затрагивая глублежащие слои и эндотелий оптической оболочки.

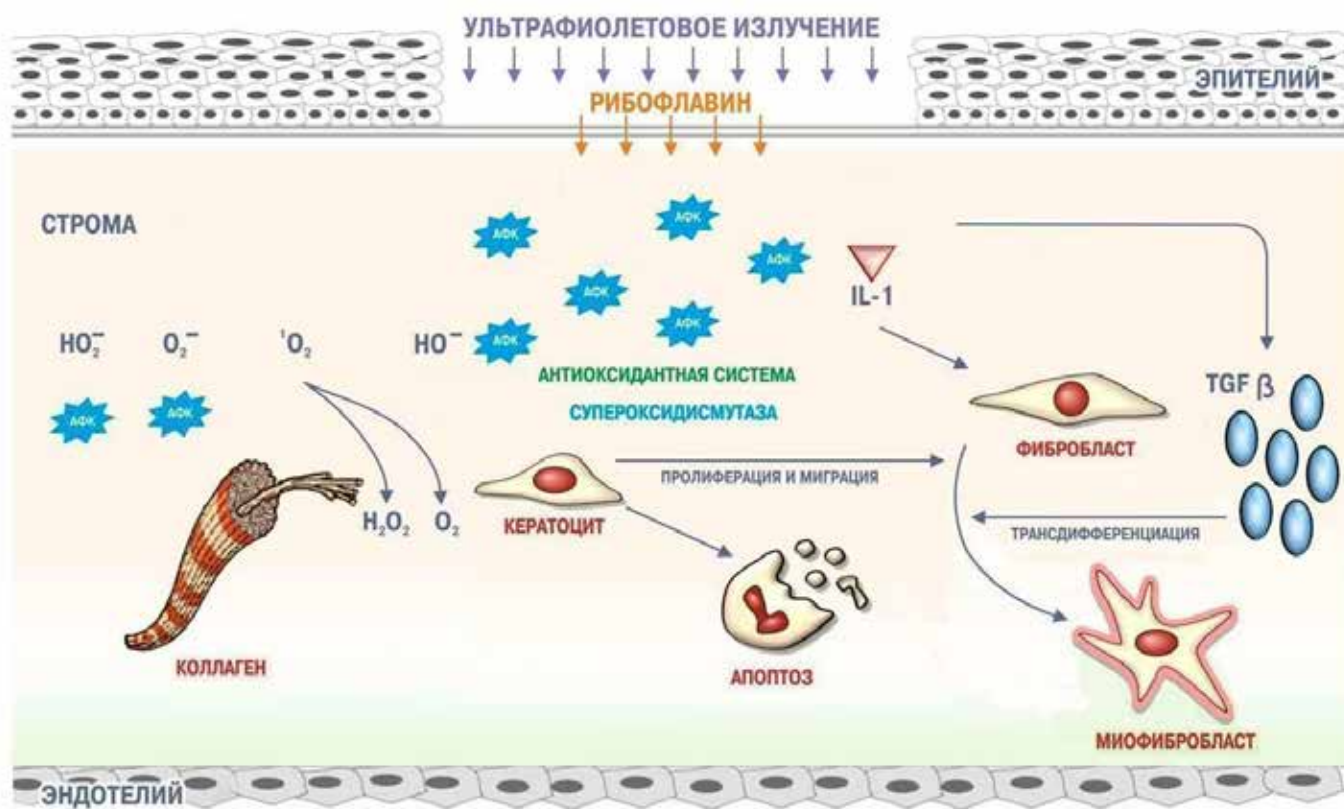


Рисунок 19 - Схема межклеточных и межмолекулярных взаимодействий в роговице при ультрафиолетовом сшивании с фотосенсибилизатором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было установлено, что ультрафиолетовое сшивание роговицы с применением разработанных растворов рибофлавина в качестве фотосенсибилизаторов способствует повышению ее прочностных свойств, связанных с изменением структурного состояния коллагеновых фибрилл. Доказано, что рибофлавин-УФ воздействие на оптическую оболочку глаза обусловлено кратковременным локальным усилением свободно-радикальных процессов, снижением общего антиоксидантного статуса, отсутствием некротических и значимых воспалительных реакций. Показано, что недостаток рибофлавина в строме формирует каскад патоморфологических событий необратимого характера, приводящих к потере нативной структуры роговицы. На основании проведенных исследований обоснована необходимость дифференцированного подхода к применению рибофлавинсодержащих растворов при проведении ультрафиолетового сшивания роговицы.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено отсутствие цитотоксичности, раздражающего и сенсибилизирующего действия разработанных офтальмологических растворов, обеспечивающих эффективное и безопасное ультрафиолетовое сшивание роговицы. Степень проницаемости и динамика интраокулярного содержания рибофлавина в роговице и влаги передней камеры глаза экспериментальных животных обусловлены составом растворов и площадью деэпителизации (8-9 мм).
2. Ультрафиолетовое облучение в присутствии исследуемых растворов рибофлавина способствовало повышению прочностно-механических свойств роговицы – увеличению модуля Юнга на 103-221% ($p<0,01$) и предела прочности на 146-246% ($p<0,01$). Экспериментально обоснована необходимость дифференцированного подхода к применению рибофлавинсодержащих растворов при проведении УФ сшивания роговицы в зависимости от ее толщины: при показателе более 450 мкм – рекомендуется Декстралинк, 400-450 мкм – Риболинк. Определено, что декстран-опосредованное обезвоживание корнеальной ткани, характерное для раствора Декстралинк, увеличивает жесткость роговицы.
3. Экспериментально показано, что поглощение ультрафиолета роговицей при проведении ее ультрафиолетового сшивания зависит от физико-химических свойств растворов фотосенсибилизаторов и толщины оптической оболочки глаза. Степень УФ абсорбции роговицей на $7\pm1,6\%$ выше при использовании препаратов Риболинк и Хитолинк, чем Декстралинк. Определено значение формирования прекорнеальной пленки в дополнительной защите глаза от УФ излучения в зависимости от вида рибофлавинсодержащего раствора: применение растворов на основе биополимеров увеличивает поглощающую способность системы «роговица–рибофлавин–прекорнеальная пленка» на $29\pm8,1\%$ ($p<0,05$). Недостаточная УФ абсорбция роговицей после инстилляций средства Декстралинк, обусловленная снижением корнеальной толщины, компенсируется стабильностью образуемой пленки.
4. Показано значимое усиление образования активных форм кислорода и процессов свободно-радикального окисления в тканях глаза, проявляющееся ростом значений светосуммы железоиндуцированной (на 56-75%, $p<0,05$) и люминолзависимой хемилюминесценции (на 58-406%, $p<0,05$ - $p<0,01$); продуктов фотопероксидации, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой на 26-44% ($p<0,05$) в супернатантах гомогенатов роговиц и глазных яблок, влаги передней камеры животных после рибофлавин-ультрафиолетового воздействия.

5. По данным гистологии и прижизненной конфокальной микроскопии выявлены морфологические особенности роговицы животных после ультрафиолетового сшивания с использованием рибофлавинсодержащих растворов, характеризующиеся набуханием стромы, уменьшением плотности кератоцитов в передних (до 40-51%, $p < 0,05$) и средних (до 35-46%, $p < 0,05$) слоях в первые 30 дней эксперимента с последующим восстановлением архитектоники оптической оболочки (90 сут) при отсутствии повреждения эндотелия. Установлено, что ультраструктурные изменения роговицы сопровождаются повышением диаметра коллагеновых фибрилл (на 4-10%) и расширением межфибриллярного пространства (на 5-13%).

6. Установлено повышение локальных уровней TNF- α , IFN- α , TGF- β 1 (в 10 раз, $p < 0,001$), TGF- β 2 (в 25 раз, $p < 0,001$) у пациентов с кератоконусом при отсутствии значимых системных изменений. Особенности стандартного ультрафиолетового сшивания роговицы с рибофлавином являются транзиторное увеличение содержания IL-1 β , IFN- α ($p < 0,05$), TGF- β 1 и - β 2 ($p < 0,05$) в слезной жидкости, при неизменных значениях TNF- α . Значимых системных изменений концентрации цитокинов не обнаружено.

7. У пациентов с кератоконусом отмечается снижение антиоксидантного статуса слезы (на 40%, $p < 0,05$). Ультрафиолетовое сшивание роговицы сопровождается ослаблением локальной системы антиоксидантной защиты (на 52%, $p < 0,05$) и снижением уровня супероксиддисмутазы (на 70%, $p < 0,05$) в ранние сроки после процедуры (1-3 сут), вызванные усилением выработки активных форм кислорода и процессов свободно-радикального окисления в тканях глаза. При этом общий антиоксидантный статус организма не изменяется.

8. Механизмы улучшения ультраструктуры роговицы и повышения ее биомеханических свойств под воздействием ультрафиолетового облучения с предложенными растворами рибофлавина обусловлены изменением диаметра коллагеновых фибрилл, сопровождающимся транзиторным увеличением межфибриллярного пространства, усилением образования активных форм кислорода и процессов свободно-радикального окисления, снижением локального антиоксидантного статуса, отсутствием некротических и выраженных воспалительных реакций в тканях глаза. Недостаток содержания рибофлавина в строме формирует каскад патоморфологических событий необратимого характера (васкуляризация в слоях роговицы, нарушение целостности десцеметовой мембраны, эндотелиальная дистрофия), приводящих к потере нативной структуры роговицы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Раствор «Декстралинк» рекомендуется при проведении процедуры ультрафиолетового сшивания (кросслинкинга) роговицы при кератэктазиях для применения в офтальмологической практике.

Для выполнения безопасного и эффективного ультрафиолетового сшивания роговицы необходимо качественное насыщение стромы рибофлавином, которое может быть достигнуто преимущественно за счет достаточной площади деэпителизации (не менее 8-9 мм).

При выполнении ультрафиолетового сшивания роговицы фотосенсибилизаторами, содержащими декстран, рекомендуется предварительное насыщение роговицы продолжительностью не менее 30 мин. Минимальная толщина роговицы, при которой может использоваться средство «Декстралинк», должна быть не менее 440-450 мкм.

Применение раствора «Риболинк» с гидроксипропилметилцеллюлозой, обладающего хорошей способностью к пенетрации в строму, допустимо на роговицах не менее 400 мкм, а длительность этапа насыщения может быть сокращена до 20-25 мин.

Не рекомендуется использование раствора «Хитолинк» в связи васкуляризацией и разрастанием соединительной ткани в роговице.

Значимым аспектом безопасности процедуры ультрафиолетового сшивания роговицы является наличие прекорнеальной пленки рибофлавина, стабильность которой определяется вязкостью раствора. В связи с этим во время выполнения ультрафиолетового сшивания роговицы, как на этапе насыщения, так и на этапе облучения, рекомендуется придерживаться следующей частоты инстилляций в глаз: для средств «Декстралинк» и «Риболинк» – 1 капля в 2 мин, для изоосмотического раствора рибофлавина – 1 капля в мин.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Предложенные нами методические подходы оценки интенсивности протекания процессов свободно-радикального окисления и образования активных форм кислорода в тканях глаза открывают новые возможности для сравнительных экспериментальных и клинических исследований эффективности различных протоколов ультрафиолетового сшивания роговицы и патогенетических аспектов воздействия данной процедуры на состояние роговой оболочки, в том числе с учетом применения разнообразных способов коррекции кросслинкингиндуцированных осложнений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Монография

1. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л., Казакбаева Г.М. Эктазии роговицы (избранные лекции) // М.: Апрель, 2018. – 123 с.

Публикации в научных изданиях

1. Бикбова, Г.М. Кросслинкинг + рибофлавин в лечении кератоконуса / Г.М. Бикбова, М.М. Бикбов, А.Р. Халимов // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии: материалы IX научно-практической конференции с международным участием. - М., 2008. – С. 29-31.
2. Бикбова, Г.М. Кросслинкинг + рибофлавин в лечении буллезной кератопатии / Г.М. Бикбова, М.М. Бикбов, А.Р. Халимов // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2008. – № 12. – С. 24-26.
3. Бикбов, М.М. Устройство для перекрестного связывания коллагена роговицы «УФалинк» / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова // Актуальные проблемы офтальмологии: материалы научно-практической конференции. - Уфа, 2009. – С. 247-250.
4. Бикбов, М.М. Результаты клинического применения устройства для перекрестного связывания коллагена роговицы «УФалинк» / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2009. – Т. 9, № 2. – С. 14-18.
5. Халимов, А.Р. Средство для диагностики травм и заболеваний роговицы / А.Р. Халимов, А.Э. Бабушкин // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2009. – № 12. – С. 151-152.
6. Устройство «УФалинк» для УФО роговицы / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова, Н.Э. Баймухаметов // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов международной научно-практической конференции по офтальмохирургии. - Уфа, 2010. – С. 68-70.
7. Офтальмологическое средство для УФ-кросслинкинга / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова [и др.] // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов международной научно-практической конференции по офтальмохирургии. - Уфа, 2010. – С. 70-71.
8. Бикбова, Г.М. «УФалинк» для ультрафиолетового облучения роговицы / Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов, Н.Э. Баймухаметов // Сборник научных трудов V Всероссийской научной конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов в рамках IX Съезда офтальмологов России. - М., 2010. – С. 28-30.
9. Корнеосклеральное кольцо для удержания лекарственного средства на поверхности роговицы / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова, В.К. Суркова // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2010. – № 12. – С. 38-39.
10. Бикбов, М.М. Декстралинк – новый протектор роговицы для кросслинкинга / М.М. Бикбов, Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием по офтальмохирургии. - Уфа, 2011. – С. 60-61.

11. Бикбова, Г.М. Кросслинкинг роговичного коллагена в лечении кератоконуса, отдаленные результаты / Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов, Н.Э. Баймухаметов // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием по офтальмохирургии. - Уфа, 2011. – С.67-68.
12. Способы перекрестного связывания коллагена в лечении кератоконуса / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова [и др.] // Инновационные технологии реабилитации больных с социально значимой офтальмопатологией: материалы научно-практической конференции с международным участием, к 20-летию Независимости Республики Казахстан. - Астана, 2011. – С. 133-135.
13. Бикбова, Г.М. Результаты клинического применения протектора роговицы «Декстралинк» для УФ-кросслинкинга / Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов, Э.Ф. Файзуллина // Инновационные технологии реабилитации больных с социально значимой офтальмопатологией: материалы научно-практической конференции с международным участием, к 20-летию Независимости Республики Казахстан. - Астана, 2011. – С. С. 137-139.
14. Халимов, А.Р. Влияние кросслинкинга роговичного коллагена на процессы свободно-радикального окисления в тканях глаза / А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова, В.А. Катаев // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2011. – № 14. – С. 391-393.
15. Зайнуллина, Н.Б. Исследование интенсивности ультрафиолетового излучения при экспериментальном кросслинкинге роговицы / Н.Б. Зайнуллина, А.Р. Халимов, С.В. Харитонов // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием. - Уфа, 2012. – С. 97-98.
16. Bikbov, M. Chitosan-based ophthalmological solution for corneal cross-linking / M. Bikbov, A. Khalimov // 3rd EuCornea Congress. - Milan, 2012. – Режим доступа: <http://www.eucornea.org/abstracts-online>
17. Халимов, А.Р. Офтальмологический раствор для кросслинкинга коллагена роговицы с рибофлавином и хитозаном / А.Р. Халимов // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2012. – № 12. – С. 223-224.
18. Кросслинкинг роговичного коллагена с различными фотосенсибилизаторами / Н.Б. Зайнуллина, Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием. - Уфа, 2013. – С. 87-89.
19. Новое офтальмологическое устройство для перекрестного связывания коллагена роговицы глаза «УФалинк» с системой гомогенизации ультрафиолетового излучения / А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова, С.В. Харитонов, Н.Э. Баймухаметов // ВОСТОК-ЗАПАД: сборник научных трудов научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием. - Уфа, 2013. – С. 463-465.
20. Кросслинкинг роговицы при ятрогенной эктазии после LASIK / Н.Б. Зайнуллина, Э.Л. Усубов, А.Р. Халимов, В.К. Суркова // Актуальные проблемы офтальмологии: сборник научных работ VIII Всероссийской научной конференции молодых ученых. - М., 2013. – С. 87-88.

21. Riboflavin content in rabbits anterior chamber fluid after transepithelial cross-linking / E. Usubov, M. Bikbov, A. Khalimov [et al.] // 4th EuCornea Congress. - Amsterdam, 2013. – Режим доступа: <http://www.eucornea.org/abstracts-online>
22. Khalimov, A. Dynamics of riboflavin in aqueous humor of anterior chamber of rabbit eye following the cross-linking with different solutions of photosensitizer / A. Khalimov, M. Bikbov, G. Bikbova // XXXI Congress of the ESCRS. - Amsterdam, 2013. – Режим доступа: <http://www.es CRS.org/abstracts/details.asp?confid=16&sessid=449&type=poster&paperid=19409>
23. Содержание рибофлавина во влаге передней камеры глаза при стандартной и модифицированной методике кросслинкинга. Экспериментальное исследование / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов [и др.] // **Катарактальная и рефракционная хирургия**. – 2013. – Т. 13, № 3. – С. 43-45.
24. Клинические результаты лечения кератоконуса методом УФ-кросслинкинга роговичного коллагена с применением фотосенсибилизаторов на различной основе / М.М. Бикбов, Э.Л. Усубов, Г.М. Бикбова, В.К. Суркова, А.Р. Халимов [и др.] // Современные технологии диагностики и лечения при поражениях органа зрения: материалы юбилейной конференции. - СПб., 2013. – С. 24.
25. Бикбов, М.М. Новый аппарат с оптической системой для перекрестного связывания коллагена роговицы в лечении кератоктазий / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Н.Э. Баймухаметов // Современные технологии диагностики и лечения при поражениях органа зрения: материалы юбилейной конференции. - СПб., 2013. – С. 25-26.
26. Халимов, А.Р. Локальные уровни цитокинов в динамике кросслинкинга при эктазиях роговицы / А.Р. Халимов, Н.Е. Шевчук // Современные технологии диагностики и лечения при поражениях органа зрения: материалы юбилейной конференции. - СПб., 2013. – С. С. 145-146.
27. Динамика содержания рибофлавина во влаге передней камеры глаза кролика при трансэпителиальном насыщении роговицы / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова [и др.] // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2013. – № 4. – С. 58-61.
28. Бикбов, М.М. Динамика локальных уровней трансформирующего фактора роста β у пациентов с дегенеративными заболеваниями роговицы при ультрафиолетовом кросслинкинге коллагена / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, А.Р. Халимов // **Российский иммунологический журнал**. – 2013. – Т. 7 (16), № 4. – С. 372-376.
29. Кинетика рибофлавина и протектора роговицы «Декстралинк» во влаге передней камеры глаза кролика / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, Г.М. Бикбова, А.Р. Халимов // VI Российский общенациональный офтальмологический форум: сборник трудов научно-практической конференции с международным участием. - М., 2013. – Т. 2. – С. 474-478.
30. Уровень рибофлавина во влаге передней камеры глаза при использовании фотосенсибилизаторов на различной полимерной основе (экспериментальное исследование) / А.Р. Халимов, М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук [и др.] // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета**. – 2013. – № 4 (48). – С. 195-198.

31. Экспериментальное исследование насыщаемости роговицы и влаги передней камеры фотосенсибилизаторами / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, А.Р. Халимов, Н.Б. Зайнуллина // VII Российский общенациональный офтальмологический форум: сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием. - М., 2014. – Т. 2. – С. 401-405.
32. Dynamics of local TGF- β 1 and TGF- β 2 levels in patients with keratoconus and bullous keratopathy after corneal collagen cross-linking with ultraviolet-A / A. Khalimov, M. Bikbov, N. Shevchuk, G. Bikbova // 5th EuCornea Congress. - London, 2014. – Режим доступа: <http://www.eucornea.org/abstracts-online>
33. Dynamics of cytokines local levels in patients with corneal ectasis after UV cross-linking / A. Khalimov, M. Bikbov, N. Shevchuk, G. Bikbova // XXXII Congress of the ESCRS. - London, 2014. – Режим доступа: <http://www.es CRS.org/abstracts/details.asp?confid=18&sessid=491&type=poster&paperid=20735>
34. Новые медицинские изделия в фототерапии заболеваний роговицы Г.А. Дроздова, М.М. Бикбов, А.Р. Халимов [и др.] // **Вестник Российского университета дружбы народов**. – 2015. – № 1. – С. 94-101.
35. Корреляция биомеханических свойств роговицы с данными конфокальной микроскопии у пациентов с кератоконусом после кросслинкинга роговичного коллагена / М.М. Бикбов, Н.Б. Зайнуллина, В.К. Суркова, А.Р. Халимов [и др.] // Точка зрения. Восток-Запад. – 2015. – № 1. – С. 33-35.
36. Исследования ex vivo нового офтальмологического средства для кросслинкинга / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Н.Е. Шевчук [и др.] // Точка зрения. Восток-Запад. – 2015. – № 1. – С. 38-39.
37. Халимов, А.Р. Рибофлавин + полимер целлюлозы – новое средство для насыщения роговицы при ультрафиолетовом кросслинкинге коллагена / А.Р. Халимов, Н.Е. Шевчук, Г.М. Казакбаева // Сборник научных материалов X Съезда офтальмологов России. - М., 2015. – С. 201.
38. Эффективность раствора рибофлавина с хитозаном для УФ-сшивания коллагена роговицы / А.Р. Халимов, М.М. Бикбов, В.А. Катаев, Г.А. Дроздова // Современные проблемы системной регуляции физиологических функций: материалы IV Международной междисциплинарной конференции. - М., 2015. – С. 664-668.
39. Riboflavin dynamics in cornea of porcine eyes using various photosensitisers for cross-linking / A. Khalimov, M. Bikbov, N. Shevchuk, G. Bikbova // 6th EuCornea Congress. - Barcelona, 2015. – Режим доступа: <http://www.eucornea.org/abstracts-online>
40. Бикбов, М.М. Влияние ультрафиолетового кросслинкинга на уровень цитокинов в слезной жидкости у пациентов с кератэктазиями / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, А.Р. Халимов // **Цитокины и воспаление**. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 54-57.
41. Early clinical outcomes of transepithelial corneal cross-linking with 0.2% solution of riboflavin in the treatment of corneal ectasia / M. Bikbov, G. Bikbova, E. Usubov, N. Zaynullina, A. Khalimov // XXXIV Congress of the ESCRS. Copenhagen, 2016. – Режим доступа: <http://www.es CRS.org/Copenhagen2016/programme/posters-details.asp?id=25926>

42. Влияние стандартного и трансэпителиального УФ сшивания роговицы на динамику системного и локального уровня цитокинов у пациентов с кератоконусом / А.Р. Халимов, М.М. Бикбов, Г.А. Дроздова [и др.] // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т. 10 (19), № 1. – С. 65-72.
43. Бикбов, М.М. Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов // **Вестник Российской академии медицинских наук**. – 2016. – Т. 71, № 3. – С. 224-232.
44. Динамика уровня рибофлавина во влаге передней камеры глаза экспериментальных животных при стандартном насыщении стромы растворами для УФ кросслинкинга роговицы / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, А.Р. Халимов, Г.М. Бикбова // **Вестник офтальмологии**. – 2016. – Т. 132, № 6. – С. 29-35.
45. Халимов, А.Р. Прекорнеальная пленка рибофлавина в системе ультрафиолетового кросслинкинга роговицы. Ex vivo исследование / А.Р. Халимов // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2017. – Т. 12, № 1 (67). – С. 65-67.
46. Результаты лечения пеллюцидной маргинальной дегенерации роговицы методом роговичного кросслинкинга / М.М. Бикбов, В.К. Суркова, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов // **Вестник офтальмологии**. – 2017. – Т. 133, № 3. – С. 58-64.
47. Изучение антиоксидантной активности роговицы при различных методиках кросслинкинга роговичного коллагена в эксперименте / М.М. Бикбов, В.К. Суркова, Э.Л. Усубов, А.Р. Халимов [и др.] // **Современные технологии в офтальмологии**. – 2017. – № 6. – С. 223-226.
48. Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы (обзор литературы) / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов [и др.] // *Oftalmologiya*. – 2017. – № 2 (24). – С. 117-123.
49. Результаты ex vivo исследования нового офтальмологического средства для рибофлавин-УФ-А индуцированного сшивания коллагена тонких роговиц / А.Р. Халимов, В.А. Катаев, Г.А. Дроздова [и др.] // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2018. – Т. 81, № 2. – С. 30-32.
50. Molecular mechanisms of corneal collagen crosslinking / G. Bikbova, A. Khalimov, G. Kazakbaeva, M. Bikbov // **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. – 2018. – Vol. 59, № 9. – P. 522.
51. Халимов, А.Р. Локальный уровень TGF- β у пациентов с кератоконусом в динамике ультрафиолетового кросслинкинга роговицы / А.Р. Халимов, Н.Е. Шевчук, Э.Л. Усубов // *Oftalmologiya*. – 2018. – № 1 (26). – С. 147-150.
52. Топографическая локализация демаркационной линии после УФ-кросслинкинга роговицы при прогрессирующем кератоконусе / М.М. Бикбов, В.К. Суркова, А.Р. Халимов [и др.] // **Офтальмология**. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 32-37.
53. Бикбов, М.М. Влияние ультрафиолетового кросслинкинга на биомеханику роговицы / М.М. Бикбов, А.Р. Халимов // **Российский журнал биомеханики**. – 2018. – № 2. – С. 148-153.
54. Халимов, А.Р. Роль декстрана в офтальмологическом растворе рибофлавина для УФ кросслинкинга роговицы / А.Р. Халимов // **Точка зрения. Восток-Запад**. – 2018. – № 1. – С. 136-138.

Патенты РФ

1. Приспособление офтальмологическое для удержания лекарственного средства на поверхности роговицы: пат. RU № 94150 от 20.05.2010 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М., Суркова В.К., Баймухаметов Н.Э., Файзуллина Э.Ф. - Бюл. № 14.
2. Препарат для диагностики травм роговицы: пат. RU № 2404811 от 27.11.2010 / Халимов А.Р., Бикбов М.М., Сибиряк С.В. - Бюл. № 33.
3. Офтальмологическое средство для кросслинкинга: пат. RU № 2412707 от 27.02.2011 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. - Бюл. № 6.
4. Устройство для перекрестного сшивания коллагена роговицы глаза: пат. RU № 108963 от 17.02.2011 / Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Халимов А.Р. - Бюл. № 28.
5. Офтальмологическое средство-2 для кросслинкинга: пат. RU № 2475248 от 20.02.2013 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. - Бюл. № 5.
6. Способ защиты роговицы и лимбальной зоны глаза от воздействия ультрафиолетового излучения при кросслинкинге: пат. RU № 2496457 от 27.10.2013 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М., Зайнуллина Н.Б., Харитонов С.В. - Бюл. № 30.
7. . Устройство-2 для перекрестного сшивания коллагена роговицы глаза: пат. RU № 134788 от 27.11.2013 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М., Харитонов С.В. - Бюл. № 33.
8. Способ лечения эктатических заболеваний роговицы: пат. RU № 2510258 от 27.03.2014 / Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л., Зайнуллина Н.Б., Харитонов С.В., Баймухаметов Н.Э. - Бюл. № 9.
9. Расчет параметров формирования отверстия в мягкой контактной линзе соответственно зоне кератэктазии при выполнении процедуры ультрафиолетового кросслинкинга роговичного коллагена: св-во о гос. рег. прогр. для ЭВМ № 2014619639 от 18.09.2014 / Бикбов М.М., Суркова В.К., Зайнуллина Н.Б., Халимов А.Р., Харитонов С.В.
10. Офтальмологическое средство для трансэпителиального ультрафиолетового кросслинкинга коллагена роговицы глаза: пат. RU № 2560669 от 22.07.2015 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. - Бюл. № 23.
11. Устройство-3 для ультрафиолетового сшивания коллагена роговицы глаза: пат. RU № 162618 от 20.06.2016 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л., Харитонов С.В. - Бюл. № 17.
12. Устройство-4 для ультрафиолетового сшивания роговицы глаза: пат. RU № 172763 от 21.07.2017 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М., Усубов Э.Л., Харитонов С.В., Казакбаева Г.М., Симонов А.Б., Халимова Л.И. - Бюл. № 21.
13. Устройство для ионофореза роговицы глаза: пат. RU № 175231 от 28.11.2017 / Бикбов М.М., Усубов Э.Л., Халимов А.Р., Харитонов С.В., Зайнуллина Н.Б., Казакбаева Г.М. - Бюл. № 34.
14. Офтальмологическое средство для ультрафиолетового кросслинкинга роговицы: пат. RU № 2646452 от 05.03.2018 / Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М., Казакбаев Р.А., Усубов Э.Л., Казакбаева Г.М., Халимова Л.И. - Бюл. № 7.

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода
ВПК – влага передней камеры
ГПМЦ – гидроксипропилметилцеллюлоза
ЖИ ХЛ – железоиндуцированная хемилюминесценция
ЛЗ ХЛ – люминолзависимая хемилюминесценция
КК – кератоконус
ОАС – общий антиоксидантный статус
ПОЛ – перекисное окисление липидов
Р-Р – роговица-рибофлавин
Р-Р-П – роговица-рибофлавин-прекорнеальная пленка
СЖ – слезная жидкость
СК – сыворотка крови
СОД – супероксиддисмутаза
СРО – свободно-радикальное окисление
ТБК-рп – ТБК (тиобарбитуровая кислота)-реагирующие продукты
УФ – ультрафиолетовый
УФО – ультрафиолетовое облучение
ФС – фотосенсибилизатор
ХЛ – хемилюминесценция
CXL – (UV corneal collagen cross-linking) ультрафиолетовое сшивание (кросслинкинг) роговицы
s-CXL – стандартное ультрафиолетовое сшивание роговицы с удаленным эпителием
t-CXL – трансэпителиальное ультрафиолетовое сшивание роговицы с эпителием
Epi-On – (epithelium On) сохранение эпителия роговицы
Epi-Off – (epithelium Off) деэпителизация роговицы
IFN – (interferon) интерферон
IL-1 β – (interleukin-1 beta) интерлейкин-1 бета
TGF- β – (transforming growth factor) трансформирующий фактор роста
TNF – (tumor necrosis factor) фактор некроза опухоли