

Ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы

В обзоре представлены основные сведения об ультрафиолетовом кроссликинге (шивании) роговицы. Метод нашел широкое применение в офтальмологии, а именно в лечении различных видов кератэктазий, для которых характерны прогрессирующие дистрофические изменения роговой оболочки, связанные с ее истончением, нередко помутнением и рубцеванием, что приводит к значительному снижению остроты зрения. Кросслинкинг основан на ультрафиолетовом облучении роговицы при длине волны 370 нм (УФ-А) с использованием рибофлавина, вызывающем интракорнеальные фотохимические взаимодействия. В результате процедуры сшивания коллагена отмечается увеличение прочностно-механических свойств роговицы, замедление прогрессирования заболевания. В статье отображены как этапы разработки метода, так и способы его выполнения, сферы клинического применения; описаны особенности происходящих биомеханических, биохимических, морфологических и ультраструктурных изменений в роговице, вызванных рибофлавин-УФ-А-индуцированным сшиванием.

Ключевые слова: ультрафиолетовый кросслинкинг, роговица, кератоконус, рибофлавин.

(Для цитирования: Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы. *Вестник РАМН*. 2016;71(3):224–232. doi: 10.15690/vramn562)

Актуальность

Во всем мире ежегодно отмечается значительный рост заболеваний роговицы, сопровождающихся деструктивными изменениями коллагена в ее составе, что связывают с ухудшением экологии, интенсификацией глазной хирургии, травмами глаза, а также с увеличившимся числом офтальмоинфекций [1]. В Российской Федерации на больных с заболеваниями роговицы приходится до 18% общего числа слепых и слабовидящих [2].

В основе кератэктазий, в частности кератоконуса, лежит прогрессирующая дегградация коллагеновой структуры роговицы и, соответственно, снижение ее прочностно-механических свойств, приводящие к помутнению, нередко рубцеванию и значительному снижению остроты зрения. Как правило, это билатеральный патологический процесс, чаще наблюдаемый у лиц молодого трудоспособного возраста. Качественные и количественные изменения состава коллагена органа зрения, отрицательно сказываясь на его структуре, проявляются в различных сочетаниях симптоматики болезни.

Этиология кератоконуса считается многофакторной и наряду с вышеуказанными причинами включает также наследственную, эндокринную, аллергическую, имму-

нологическую и другие теории, среди которых наиболее признанной у специалистов считается генетическая гипотеза [3]. Несомненно, в пользу этого свидетельствуют семейные случаи заболевания, а также их сочетание с некоторыми наследственными синдромами. Так, по данным мультицентрового проспективного исследования CLERK (США), генетические формы кератоконуса были выявлены в 13,5% случаев [4].

В последнее десятилетие так называемый инжиниринг тканей, базирующийся на процессах фотополимеризации, стали использовать для лечения широкого спектра заболеваний. В частности, с целью укрепления роговой оболочки глаза при хронических дегенеративных процессах успешно применяется ультрафиолетовый (УФ) кросслинкинг роговицы (UV Corneal Crosslinking, CXL), основанный на ее облучении при длине волны 370 нм с использованием светочувствительного рибофлавина [5].

Кросслинкинг (перекрестное связывание, или сшивание) способствует стабилизации биомеханических свойств роговицы за счет увеличения количества связей между фибриллами стромального коллагена, кератоцитами и белками межклеточной адгезии посредством рибофлавин-УФ-индуцируемых фотохимических реакций [5–8].

М.М. Bikbov, A.R. Khalimov, E.L. Usubov

The Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russian Federation

Ultraviolet Corneal Crosslinking

This review presents basic information on UV corneal crosslinking. The method is widely used in ophthalmology to treat various types of ectasia, which are characterized by progressive degenerative changes in the cornea, associated with its thinning, hazing and scarring, which leads to a significant reduction in visual acuity. Crosslinking is based on ultraviolet (UV) irradiation of the cornea wavelength 370 nm in the presence of riboflavin, leading to photochemical intracorneal interactions. As a result of crosslinking of collagen treatments, an increase of strength and mechanical properties of the cornea, stops the progression of the disease. The article displays the steps of the method development and the ways of its implementation are described especially occurring biomechanical, biochemical, morphological and ultrastructural changes, as well as the main areas of clinical application of riboflavin-UV-A-induced crosslinking of cornea.

Key words: UV crosslinking, cornea, keratoconus, riboflavin.

(For citation: Bikbov M.M., Khalimov A.R., Usubov E.L. Ultraviolet Corneal Crosslinking. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(3):224–232. doi: 10.15690/vramn562)

Ультрафиолетовый кросслинкинг роговичного коллагена

Механизм УФ-кросслинкинга

Как известно, наиболее выраженное действие на живой организм и глаз в частности оказывает коротковолновая область света, а именно ультрафиолетовое излучение, диапазон длин волн которого делят на три части:

- УФ-А — 315–400 нм;
- УФ-В — 280–315 нм;
- УФ-С — 100–280 нм.

Отметим, что земной поверхности достигают УФ-лучи с длиной волны более 290 нм (УФ-А и УФ-В), избыточное воздействие которых на незащищенный орган зрения может служить причиной развития катаракты и заболеваний макулярной области сетчатки [9, 10].

Используемая для СХЛ плотность УФ-излучения при длине волны 370 нм составляет 5,4 Дж/см², что соответствует 3 мВт/см². При этом интенсивность облучения после абсорбции в слоях роговицы толщиной около 400 мкм, насыщенной рибофлавином, снижается до 0,18 мВт/см² [11, 12]. В качестве фотосенсибилизатора при проведении кросслинкинга, прежде всего в силу своей безопасности, был предложен рибофлавин — витамин В₂. Основная роль препарата при перекрестном сшивании коллагена определяется его способностью за счет наличия хромофорных группировок повышать чувствительность тканей роговицы к действию ультрафиолетового излучения и индуцировать химические взаимодействия, а также, поглощая энергию излучения, оказывать протективное действие на внутриглазные структуры. Рибофлавин имеет два максимума абсорбции света — при 370 и 430 нм — и при облучении поглощает излучение заданной длины волны. Для воздействия на роговицу выбрано ультрафиолетовое излучение с $\lambda=370$ нм, что связано с более высокой энергией кванта и значительно большей способностью к сшиванию коллагена.

Рибофлавинсенсибилизированное УФ-облучение генерирует образование свободных радикалов и активных форм кислорода, таких как супероксид-анион (O₂⁻), гидроксильный радикал (-ОН) и перекись водорода. Витамин В₂, поглощая УФ-излучение, переходит в возбужденное состояние — сначала в синглетный рибофлавин-радикал, в последующем — в триплетный рибофлавин-радикал. Последний, взаимодействуя с молекулярным кислородом, образует его активные формы — триплетный и синглетный кислород [6]. Синглетный кислород — высокоактивный, естественный клеточный метаболит аэробных организмов, в зависимости от интенсивности его образования может оказывать как положительное, так патологическое воздействие.

А. McCall и соавт. убедительно доказывают, что рибофлавин, индуцирующий фотосенсибилизацию, фотоокисление и фотополимеризацию, классически связан с производством синглетного кислорода, который вступает во взаимодействие с доступными группами, в частности тирозина и гистидина, в составе коллагенов и протеогликанов стромы роговицы [13].

Кроме фотосенсибилизирующих свойств при УФ-А-облучении рибофлавин оказывает защитное действие на ткани роговицы. Так, при кератоконусе он способствует синтезу нормального межклеточного матрикса и снижению уровня оксидаз, активных форм кислорода (АФК) и, соответственно, АФК-ассоциированных нарушений [11, 14].

Следует отметить, что поглощение УФ-излучения стромой роговицы в присутствии рибофлавина составля-

ет около 30%, в то время как в сочетании с другими фотомедиаторами — 30–95% [15, 16]. Так, увеличение времени рибофлавин-УФ-А обработки свинных роговиц *ex vivo* не приводило к желаемому повышению биомеханических свойств корнеальных тканей. Напротив, продолжительное облучение способствовало структурному ослаблению роговиц [17]. Е. Sporel и соавт. показано, что повышение концентрации рибофлавина в строме обратно пропорционально степени связывания фибрилл коллагена [18]. При этом роговицу с рибофлавином следует рассматривать как двухсоставную систему: строма-рибофлавин и прекорнеальная рибофлавиновая пленка, которая является неотъемлемой частью процедуры кросслинкинга и играет важную роль в достижении дозирования УФ-А-излучения [19].

Опытным путем доказано, что стандартные параметры ультрафиолетового облучения в присутствии рибофлавина приводят к абсорбции ~ 90–95% энергии излучения, в том числе в роговице на глубине до 200 мкм — 65%, от 200 до 400 мкм — лишь 25–30%. Следовательно, структурные изменения в составе коллагена происходят в основном в верхних слоях роговицы [20].

Морфологические изменения при УФ-кросслинкинге

Лечение кератоконуса методом СХЛ способствует улучшению организации ультраструктуры роговицы: увеличивается переплетение ламелей в передней строме, в средней строме упорядочивается чередование фибриллярных пластин — параллельно друг к другу. Иммуногистохимический анализ показал значительное увеличение диаметра волокон коллагена I типа УФ-А-сшитых роговиц по сравнению с таковыми при кератоконусе [21]. Диаметр коллагеновых фибрилл роговиц у пациентов с кератоконусом составляет 15–25 нм, а после СХЛ находится в диапазоне 20–30 нм. Интрафибрилярное расстояние в роговицах после сшивания соответствует нормальным значениям, хотя не исключено, что наблюдаемые изменения могут быть связаны с послеоперационным отеком роговицы. Экспериментально доказано, что в передней строме роговицы в зоне активного воздействия рибофлавина и УФ-А увеличение диаметра коллагеновых волокон более выражено по сравнению со средней и задней стромой [22]. По данным S. Choi и соавт., УФ-кросслинкинг донорских роговиц на моделях *in vitro* способствует увеличению диаметра фибриллярного коллагена (103%) и его плотности (112%) [23].

Существует тесная взаимосвязь между образованием коллагеновых фибрилл и содержанием основных протеогликанов (люмикан, кератокан, декорин), синтез которых после УФ-кросслинкинга нормализуется. Богатые лейцином протеогликаны, сшитые с коллагеном в системе *in vitro*, способны к защите от катаболизма матриксных металлопротеиназ (ММП). Показано, что коллагены I и IV типа, обработанные рибофлавин-УФ-А, становятся устойчивыми к действию ММП-1, ММП-2, ММП-9 и ММП-13 [24].

Следует отметить, что основные неблагоприятные морфологические последствия УФ-сшивания коллагена связаны с активацией апоптоза кератоцитов, наблюдаемого преимущественно в передней строме роговицы в течение первых 3 мес после процедуры. Данные конфокальной микроскопии пациентов с кератоконусом после СХЛ указывают на полную потерю суббазальных нервных сплетений и снижение количества передних стромальных кератоцитов в раннем послеоперационном периоде [25]. Через 3 мес зона усиленного клеточного апоптоза посте-

пенно заселяется кератоцитами, а через 6 мес их репопуляция полностью завершается [26].

В кератоцитах и эндотелиальных клетках роговиц после УФ-сшивания наряду с отсутствием ингибитора апоптоза Bcl-2 (Apoptosis Regulator Bcl-2) обнаружен проапоптозный белок Вах [27]. Н. Matalia и соавт. определили супрессию антиапоптозного Bcl-2 и активатора клеточной гибели Вах-белка в УФ-облученных *ex vivo* культивируемых лимбальных клетках эпителия; кроме этого, выявлена повышенная экспрессия ферментов клеточной гибели — каспазы 3 и 9. Примечательно, что в присутствии рибофлавина активация факторов апоптоза становится менее выраженной [28].

Кросслинкинг роговичного коллагена приводит к УФ-дозозависимому повреждению корнеальных кератоцитов на глубине до 300 мкм. Причем УФ-А-индуцированный апоптоз стромальных клеток в эксперименте выявлен уже через 24 ч после операции [29].

G. Wollensak и Н. Herbst описывают появление в передней строме (250 мкм) после рибофлавин-УФ-А сшивания роговицы глаза кролика *in vivo* характерного лакунарного отека, вызванного гибелью кератоцитов и являющегося причиной временного хейза (от англ. haze — легкий туман, дымка; субэпителиальный флер роговицы, помутнение стромы роговицы) [30]. Эти исследования подтверждены и клиническими наблюдениями: по данным конфокальной микроскопии, у пациентов с кератоконусом, пролеченных СХЛ в раннем послеоперационном периоде (до 7 дней), наблюдаются признаки эпителиопатии с полиморфизмом клеток базального эпителия. В передней строме (до 300 мкм) выявляется апоптоз кератоцитов, обуславливающий явления псевдохейза [31].

Использование HRT II конфокальной лазерной сканирующей микроскопии у пациентов после СХЛ позволило установить глубину сшивания стромального коллагена, которая определяется в виде разделительной демаркационной линии до 340 мкм. Стабильность этих морфологических результатов была подтверждена трехлетними наблюдениями [32].

Учитывая уже известные особенности УФ-сшивания, термин «кросслинкинг роговичного коллагена» не совсем верен: в сущности, правильным будет выражение «кросслинкинг роговицы», которое более объективно отражает механизм происходящих процессов.

УФ-кросслинкинг, протеиназная и термическая устойчивость

Фотохимическое сшивание стромального коллагена свиньи повышает устойчивость роговицы к ферментативному расщеплению трипсином, пепсином, коллагеназой [18]. Лоскуты из свиных рибофлавин-УФ-А-обработанных роговиц, помещенные в раствор с коллагеназой А, сохраняют прочностные свойства не только в переднем слое 200 мкм, но и на глубине от 200 до 400 мкм [20].

Исследования Б.Э. Малогина и соавт. показали, что донорские СХЛ-обработанные роговицы человека также обладают устойчивостью к действию коллагеназы, сохраняют компактное межламеллярное пространство и поперечную направленность пластин коллагена без признаков разрушения [33].

СХЛ-обработанные роговицы *in vitro* проявляют стойкость к воздействию повышенных температур, причем более высокая термостабильность была характерна для лоскутов передней, более сшитой стромы по сравнению с задней [34].

Биомеханика роговицы при УФ-кроссликинге

Качественные изменения структурной организации роговичного коллагена, которые наблюдаются после ультрафиолетового кроссликинга, указывают на восстановление одной из важнейших функциональных особенностей роговицы — повышение ее биомеханических свойств, что является определяющим в остановке прогрессирования кератоконусов [35]. Изменяющаяся по времени интракорнеальная морфологическая трансформация, наблюдаемая после проведения кроссликинга, точно коррелирует с динамикой развития зрительных функций.

Известно, что в течение жизни жесткость человеческой роговицы увеличивается примерно в 2 раза. Это может быть связано с дополнительной возрастной неферментативной сшивкой, затрагивающей стромальные коллагеновые фибриллы [36]. Жесткость корнеальной ткани при кератоконусе составляет около 70% от прочностных свойств здоровой роговицы [37]. Н. Oxlund и А. Simonsen пришли к выводу, что снижение механической стабильности конусных роговиц не связано с изменениями в молекулярной структуре и аминокислотном составе коллагена [38]. По данным разных авторов, прочность коллагена зависит от диаметра образующих его волокон и длины фибрилл. Показано, что боковое межфибрилярное связывание представляет важным в формировании устойчивости при низкой деформации, в то время как линейное сцепление, приводящее к удлинению волокон, призвано обеспечивать прочностные свойства при высокой деформации [39].

Рибофлавин-УФ-А-индуцированное сшивание коллагена приводит к повышению механической прочности свиных роговиц более чем на 70%, человеческих — на 328%, при этом наблюдается увеличение коэффициента продольной упругости (модуля Юнга) в 1,8 и 4,5 раза, соответственно [40]. Долгосрочные результаты (8 мес) кроссликинга *in vitro* также демонстрируют значительное увеличение предела прочности, модуля упругости Юнга и уменьшение предельной деформации корнеальной ткани у кролика [41]. Показано, что кросслинкинг *ex vivo* в условиях изменения внутриглазного давления также улучшает биомеханику свиной роговицы [42] и человеческих донорских роговиц [43]. Установлено увеличение жесткости СХЛ-обработанных роговиц свиньи в основном в наружной строме (до 200 мкм), которая поглощает до 70% энергии УФ-А-излучения. Лоскут из средней стромы (от 200 до 400 мкм) уступает по прочности передней примерно в 1,5–2 раза [44]. Данные атомно-силовой микроскопии также указывают на то, что эффекты сшивания коллагена ограничиваются преимущественно передней стромой (до 200 мкм) и не распространяются на более глубокие области роговицы [45].

Показатели коэффициента резистентности и гистерезиса, описывающие эластичные свойства роговицы, у пациентов с кератоконусом снижены в сравнении с нормой. При этом установлена низкая корреляционная зависимость между толщиной роговицы и величиной гистерезиса, который может меняться в течение суток в результате изменений корнеальной гидратации. После УФ-сшивания величина эластичности роговицы становится еще меньше [46]. Тогда как, по сведениям М. Sedaghat и соавт., повышенная после кроссликинга жесткость роговиц не влияет на данные корнеального коэффициента резистентности и гистерезиса у пациентов до и через 6 мес после процедуры [47].

Установлено, что вследствие уплотнения стромального коллагена после СХЛ происходит снижение корне-

альной проницаемости для последующих инстилляций лекарственных препаратов, что необходимо учитывать при медикаментозной терапии сопутствующей офтальмопатологии пациентов с УФ-кросслинкингом в анамнезе [48].

Имеются сведения, что кросслинкингопосредованное изменение жесткости роговицы может влиять на точность измерений истинного внутриглазного давления (ВГД). Так, для послеоперационного периода (6 мес) характерно снижение ВГД, которое коррелирует с уменьшением корнеальной толщины, при этом некоторое восстановление размеров роговицы, как и значительное увеличение офтальмотонуса, наблюдается только через 12 мес после CXL, что может служить доказательством увеличения корнеальной резистентности к этому сроку [49].

УФ-кросслиндинг и эндотелий роговицы

Применяемая для CXL мощность УФ-излучения (3 мВт/см^2) ниже известного порога повреждающего действия для эндотелия роговицы. Максимальное значение фотохимического ущерба для эндотелиальных клеток вследствие УФ-активации свободно-радикальных процессов составляет $0,35 \text{ мВт/см}^2$. В насыщенной рибофлавином роговице толщиной 400 мкм УФ-излучение способно достигнуть уровня эндотелия при мощности $0,18 \text{ мВт/см}^2$, что в 2 раза ниже критического значения [11, 50]. В исследованиях *in vitro* G. Wollensak с соавт. определен цитотоксический эффект рибофлавин-УФ сшивания для кератоцитов — $0,5 \text{ мВт/см}^2$. В клинических условиях при использовании стандартного метода CXL такое воздействие может наблюдаться на глубине роговицы до 300 мкм [12]. Продолжительные наблюдения пациентов с прогрессирующим кератоконусом после CXL стандартным способом неизменно демонстрируют стабильную плотность эндотелиальных клеток.

Стандартный протокол УФ-кросслинкинга

Е. SroegI и соавт. при разработке кросслинкинга ориентировались на следующие основные критерии процедуры: ее умеренную продолжительность, сохранение прозрачности роговицы и достижение сшивающего эффекта исключительно в пределах корнеальных тканей. Предварительно в экспериментах были апробированы ультрафиолетовый свет с длиной волны 254 нм, синий свет 436 нм и даже солнечный свет. Была исследована и комбинация УФ-А-излучения (365 нм) с рибофлавином, которая оказалась наиболее эффективной по коллагенсшивающей способности. Это сочетание, ставшее впоследствии стандартом кросслинкинга, придавало максимальную жесткость роговице *ex vivo* [9]. Е. SroegI и соавт. изучали также возможность укрепления коллагена с использованием УФ-А-излучения (365 нм) мощностью 2 мВт/см^2 [15, 51]. После многочисленных исследований оптимальными характеристиками ультрафиолетового кросслинкинга роговицы были признаны предварительное насыщение стромы 0,1% рибофлавином в течение 15 мин и последующее УФ-облучение при длине волны 370 ± 5 нм и мощности 3 мВт/см^2 в течение 30 мин. Эти параметры легли в основу техники наиболее безопасного и эффективного сшивания корнеального коллагена. Стандартный кросслиндинг, описанный в 2003 г. в Дрезденском протоколе, положил начало клиническому применению этой уникальной технологии [5]. Позже, в 2011 г., было предложено проводить предварительное стромальное насыщение в течение 30 мин [11].

При выполнении процедуры кросслинкинга источник облучения размещают примерно на расстоянии 1–2 см от поверхности роговицы. Вследствие рассеяния света (принцип Колера) происходит поступление незначительной части энергии излучения, недостаточной для лучевого поражения тканей глаза (эндотелий роговицы, хрусталик и сетчатка), находящихся по ходу лучей [18, 44].

Стандартный метод кросслинкинга состоит из трех этапов:

- первый — дезэпителизация роговицы глаза (Epi-Off);
- второй — насыщение стромы роговицы раствором рибофлавина в течение 30 мин;
- третий — ультрафиолетовое облучение роговицы (3 мВт/см^2 , 30 мин) длиной волны 370 нм с одновременными инстилляциями рибофлавина.

Состоятельность насыщения роговицы рибофлавином контролируется при биомикроскопии с кобальтовым (синим) светофильтром. По мнению К.М. Vottos и соавт., проводивших флуоресцентную микроскопию свиных роговиц, корнеальный эпителий может быть существенным препятствием на пути рибофлавина, предотвращая проникновение препарата в строму, не ограничивая при этом пропускания УФ-А. В свою очередь, недостаточная интрастромальная концентрация фотосенсибилизатора может привести к снижению эффекта кросслинкинга [52]. По данным оптической когерентной томографии, эффективность стромального проникновения рибофлавина *in vivo* при CXL зависит от характера и степени дезэпителизации роговицы [53].

Следует отметить, что удаление эпителия нередко сопровождается роговичным синдромом с выраженным болевым ощущением и дополнительно усугубляет состояние эктазированной роговицы. Кроме этого, дезэпителизация может служить потенциальным источником постоперационных инфекций.

Предложен способ доставки рибофлавина в строму донорских роговиц человека посредством дозированной скарификации корнеального эпителия, который по своей эффективности сопоставим с методом полной дезэпителизации [54]. Данная процедура, незначительно нарушающая целостность эпителия, является наиболее близкой к описанной ниже трансэпителиальной доставке рибофлавина в строму.

Трансэпителиальный УФ-кросслиндинг

Усовершенствование процедуры обычного рибофлавин-УФ-А сшивания преследует цель снижения возможных осложнений, связанных со стандартным протоколом. В связи с этим предложен еще один способ проведения процедуры кросслинкинга, предполагающий доставку рибофлавина в строму с сохранением роговичного эпителия (Epi-On) — трансэпителиальный (TE-CXL). Существует множество модификаций выполнения TE-CXL, в частности многократное применение местных анестетических капель, позволяющее ослабить плотные соединения эпителиальных клеток роговицы, создание «сеткообразной» дезэпителизации, формирование центрального стромального кармана роговицы с помощью фемтосекундного лазера.

Трансэпителиальный CXL — менее болезненная для пациента процедура, при этом не происходит выраженной активации процессов постратраневой иммунобиохимической модуляции, снижается риск послеоперационных осложнений. К тому же сохраненный эпителий может служить дополнительным защитным барьером для УФ-А-воздействия, что позволяет проводить кросслиндинг роговиц толщиной менее 400 мкм. В силу явных достоинств

метода ведутся активные исследования совершенствования этой техники CXL и сфер ее применения [55].

М.М. Бикбовым и Г.М. Бикбовой предложен способ трансэпителиальной доставки рибофлавина в строму роговицы посредством электрофореза [56]. Имеются сведения о том, что использование ультразвука увеличивает насыщаемость рибофлавином интактной роговицы у кролика [57]. А. Kissner и соавт. ставят в прямую зависимость эффективность кросслинkinга от качества стромального насыщения рибофлавином, которое зависит от целостности эпителия или присутствия в растворе пенетраторов, облегчающих трансэпителиальную диффузию фотосенсибилизатора [58]. Транспорт рибофлавина через корнеальный эпителий можно осуществлять с использованием бензалкония хлорида, входящего, в частности, в состав ряда глазных капель в качестве консерванта. Бензалкония хлорид способствует «разрыхлению» стромы роговицы, облегчая тем самым проникновение рибофлавина. К.М. Vottos и соавт. на свиных глазах *ex vivo* продемонстрировали эффективность внутрикамерной инъекции рибофлавина, легко преодолевающего эндотелиальный барьер [52].

Традиционные исследования, данные топографии, пахиметрии и конфокальной микроскопии роговицы при использовании трансэпителиальной техники у детей с кератоконусом показывают схожую эффективность, сравнимую с показателями при стандартной методике. При этом неинвазивный характер процедуры и меньшее количество постоперационных осложнений свидетельствуют о ее преимуществе [59]. Для трансэпителиального сшивания коллагена нехарактерны такие обычные кросслинkinг-индуцированные изменения в роговице, как выраженный отек со значительным снижением плотности кератоцитов в передних отделах стромы, глубокая и стойкая гиперрефлективная стромальная линия [60].

Экспериментальные исследования Х. Тао и соавт. показали, что CXL-обработанные роговицы кроликов с сохраненным эпителием, так же как и сшитые стандартным способом, демонстрируют увеличение модуля Юнга и механической прочности, хотя и в несколько меньшей степени [61].

Потенциальные преимущества Epi-On-подхода значительны, однако на сегодняшний день не существует достаточных доказательств его эквивалентной эффективности методу Epi-Off. А по мнению ряда авторов, трансэпителиальная техника УФ-сшивания роговицы уступает стандартному методу кросслинkinга [62].

Сравнительное исследование различных способов пропитывания роговицы кроликов по уровню рибофлавина в строме и влаге передней камеры глаза с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и ионизирующей масс-спектрометрии показало, что насыщение посредством ионофореза по своей эффективности превосходит обычную трансэпителиальную диффузию, но тем не менее уступает Epi-Off-технологии [63].

Z. Shalchi и соавт. проанализировали 773 публикации библиографической базы MEDLINE, посвященные стандартному и трансэпителиальному кросслинkinгу в сравнительном аспекте. В общей сложности эти исследования охватывали более 24 критериев и тестов, сопоставляющих обе методики. В итоге, совокупный обзор работ по проблеме свидетельствует об эффективности Epi-Off-кросслинkinга в прекращении прогрессирования кератоконуса, который можно принять за стандарт лечения, а также необходимости дальнейших исследований в области оценки этих способов терапии [64].

Таким образом, несмотря на достоинства трансэпителиальной техники кросслинkinга, функциональные преимущества стандартного способа сшивания роговицы не менее очевидны.

Рибофлавин и декстран в процедуре УФ-сшивания

Первоначально для УФ-сшивания роговицы применяли раствор 0,1% рибофлавина. Позднее его стали использовать в комбинации с 20% декстраном молекулярной массой 450–550 kDa. В настоящее время многочисленные препараты с рибофлавином/декстраном под разными торговыми названиями нашли широкое применение в оптимизированной методике кросслинkinга.

Декстран — полимер глюкозы, полисахарид бактериального происхождения, продуцируемый из сахарозы бактериями *Leuconostoc mesenteroides*, — обладает детоксицирующими и противоотечными свойствами, обеспечивает вязкостные свойства раствора. Однако при использовании данного средства следует учитывать снижение влагосодержания роговицы, обусловленное влиянием полимера. J.M. Vueno и соавт. посредством мультифотонной микроскопии свиных и бычьих роговичных дисков выявили происходящие структурные изменения коллагена и прогрессивное снижение толщины роговиц до 280 мкм сразу после ее обработки рибофлавином/декстраном или в сочетании с УФ-А-воздействием [65]. У пациентов с кератоконусом при использовании рибофлавина/декстрана наиболее существенное снижение толщины роговицы по данным оптической когерентной томографии наблюдается в первые 10 мин инстилляций — примерно на 17% от исходных значений, что соответствует 80 мкм без учета дезэпителизации [66].

УФ-кросслинkinг тонких роговиц

Как известно, критерии сшивания коллагена с использованием стандартного CXL требуют минимальной толщины роговицы 400 мкм. При этом использование изосолярного рибофлавина с декстраном способно привести к снижению толщины человеческой роговицы в среднем на 55 мкм продолжительностью около 30 мин. Однако все-таки возможен кросслинkinг при корневальной толщине 250–350 мкм за счет искусственного предоперационного отека роговицы, увеличивающего ее толщину до 60 мкм, гипосолярным раствором рибофлавина [67]. Предложена также оригинальная методика кросслинkinга тонких роговиц (350–400 мкм) с использованием контактных линз, пропускающих УФ-излучение [68].

Ускоренный УФ-кросслинkinг

В настоящее время активно применяется ускоренная процедура CXL, при которой снижение продолжительности УФ-облучения компенсируется пропорциональным повышением ее мощности. S. Schumacher и соавт. доказали схожесть результатов испытаний прочностно-механических свойств свиных роговичных полос, сшитых ускоренным (9 мин, 10 мВт/см²) и традиционным (30 мин, 3 мВт/см²) методом [69]. Установлен аналогичный характер структурных изменений пластинок фибриллярного коллагена под воздействием нормального и ускоренного кросслинkinга свиных роговиц [70]. В целом оцениваются как положительные результаты наблюдений ускоренного CXL (3 мин, 30 мВт/см²) роговицы у кошек с кератомалацией [71]. Роговицы кроликов *in vivo*, насыщенные с помощью ионофореза и сшитые при 10 мВт/см² в течение 9 мин, исследованные по технологии ультразвукового сдвига, которая обеспечивает отображе-

ние упругости роговицы в режиме реального времени, обладали повышенной жесткостью и возросшим сопротивлением к давлению [72].

Сравнительное клиническое исследование среди пациентов с кератоконусом, один глаз которых был пролечен методом ускоренного CXL (15 мин, 7 мВт/см²), а другой — стандартного CXL (30 мин, 3 мВт/см²), показало схожие клинические результаты с точки зрения безопасности, эффективности и предсказуемости исходов лечения. У пациентов на обоих глазах наблюдалось улучшение остроты зрения и кератометрических параметров, при этом отсутствовали какие-либо побочные эффекты, в том числе признаки повреждения эндотелия [73].

Однако, существует мнение, что сокращение продолжительности УФ-облучения за счет увеличения его интенсивности отрицательно влияет на качество сшивания коллагена [18]. J. Wernli и соавт., исследовав биомеханику свиной роговицы, обработанной УФ-излучением по методу ускоренного сшивания в диапазоне от 3 до 90 мВт/см² и от 30 до 1 мин, соответственно, сделали заключение о различиях в эффективности кросслинкинга в пользу стандартного способа [74]. По данным атомно-силовой микроскопии, свиные роговицы, обработанные по Дрезденскому протоколу, в сравнении с ускоренным CXL (3 мин, 30 мВт/см²), обладают более высокой корнеальной жесткостью, демонстрируя существенное увеличение модуля Юнга, главным образом в передней области стромы роговицы [45]. На основании изучения техники ускоренного CXL в дозе 18 мВт/см² в течение 5 мин А.К. Singu и соавт. пришли к такому же заключению [75]. Было показано, что ускоренный, как и стандартный кросслиндинг повышает по сравнению с нормой устойчивость свиных роговиц к ферментативному расщеплению, однако лучшие результаты корнеальной резистентности обеспечивает все-таки традиционная техника сшивания [76].

Таким образом, до настоящего времени не принята единая техника ускоренного УФ-кросслинкинга, как и оспаривается его эффективность ввиду недостаточных экспериментальных и клинических наблюдений.

Возможности клинического применения УФ-кросслинкинга

Многочисленные клинические наблюдения, проведенные к настоящему времени, показали высокую эффективность ультрафиолетового кросслинкинга коллагена роговицы. Процедура УФ-сшивания коллагеновых фибрилл позволяет стабилизировать биомеханические и топографические показатели роговицы, приостановить прогрессирование заболевания, добиться позитивной динамики изменения некорригированной и корригированной остроты зрения, а также уплощения роговицы с уменьшением среднего сферического коэффициента рефракции, существенно повысить качество жизни пациентов.

Данные о росте заболеваемости кератоконусом в педиатрической практике способствовали применению этой методики у детей. Было установлено более агрессивное течение болезни в детском возрасте, при котором запущенные стадии кератоконуса выявлялись в 3 раза чаще, чем у взрослых [77]. Использование УФ-кросслинкинга у детей показало безопасность этой техники при ее высокой эффективности. Исход лечения характеризовался существенным улучшением функциональных показателей, основанных на специфичных морфологических изменениях в роговице [78]. Хорошие результаты продемонстрировала транспицеллярная

техника CXL, выполненная у подростков от 10 до 18 лет с помощью ионофореза в ускоренном режиме облучения (5 мин, 10 мВт/см²) [79].

Накоплен опыт применения кросслинкинга у пациентов с буллезной кератопатией [80]. Положительные результаты УФ-сшивания поврежденных роговиц в эксперименте положили начало новому способу лечения корнеальных ранений [81]. Показано, что комбинация УФ-А и рибофлавина ингибирует бактериальный рост и несет потенциальные возможности лечения инфекционных кератитов [82]. Кросслиндинг в сочетании с имплантацией роговичных колец или сегментов способствует существенному повышению рефракционных результатов [83]. Имеются данные, что УФ-сшивание комбинируют с лазерным кератомилезом LASIK [84]. Кросслиндинг используют для обработки биосинтетических роговичных имплантов и донорской роговицы с целью последующей кератопластики [85, 86]. Предложен локальный (секторальный) CXL роговицы как способ повышения стабильности и остроты зрения у пациентов с радиальной кератотомией в анамнезе [87]. Рибофлавин-УФ-А кросслиндинг успешно применяют для повышения биомеханических свойств гидрогелей из внеклеточного матрикса, используемых в тканевой инженерии [88].

Совершенствование методики УФ-кросслинкинга включает оптимизацию клинических протоколов и расширение показаний к ее применению. Использование этой уникальной, относительно новой медицинской технологии, позволяющей эффективно воздействовать на патогенетические механизмы развития ряда заболеваний роговой оболочки, способствовало созданию целого направления в офтальмологии, основанного на фотохимическом сшивании коллагена роговицы.

Заключение

Сведения, представленные в настоящем обзоре, указывают на многообразие иммунобиохимических, морфофункциональных, ультраструктурных и биомеханических изменений роговицы, обусловленных УФ-сшиванием корнеального коллагена. При этом завершенность процесса ультрафиолетового кросслинкинга роговицы характеризуется:

- увеличением толщины коллагеновых волокон [22];
- возрастанием жесткости и модуля упругости роговицы [9, 40, 44];
- увеличением устойчивости к процессам ферментативного разложения [18, 20, 33];
- повышением устойчивости к воздействию температуры [34];
- образованием макромолекулярных зон в стромальном коллагене [89];
- уменьшением корнеальной проницаемости [48].

Наряду с совершенствованием самой техники УФ-кросслинкинга расширяются сферы применения и спектр показаний к его проведению, что связано с очевидной простотой метода, его малой инвазивностью, сочетающейся с высокой эффективностью. В настоящее время ведутся активные исследования новых потенциальных возможностей этой технологии на основе изучения механизмов ее биологического действия. Открываются дополнительные перспективы применения ультрафиолетового кросслинкинга в клинической медицине, физиотерапии, молекулярной биологии и биотехнологии.

Источник финансирования

Исследование выполнено при полном финансовом обеспечении ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Вклад авторов в подготовку рукописи: концепция написания и дизайн обзора, внесение принципиальных изменений в содержание статьи — М.М. Бикбов; подготовка текста статьи, оформление, редактирование — А.Р. Халимов, Э.Л. Усубов; окончательное утверждение версии статьи — М.М. Бикбов.

Выражение признательности

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Слонимский А.Ю. Тактика ведения больных при остром кератоконусе // *PMЖ. Клиническая офтальмология*. — 2004. — Т. 5. — №2 — С. 75–77. [Slonimskii AYU. Tactic of conducting patients with acute keratoconus. *RMZh. Klinicheskaya oftalmologiya*. 2004;5(2):75–77. (In Russ).]
2. Мороз З.И., Тахчиди Х.П., Калинин Ю.Ю., и др. *Современные аспекты кератопластики*. В кн.: *Федоровские чтения: Сборник научных трудов*. — М.; 2004. — С. 280–288. [Moroz ZI, Takhchidi KhP, KalinnikovYuYu, et al. *Sovremennye aspekty keratoplastiki*. In: *Fedorovskie chteniya: Sbornik nauchnykh trudov*. Moscow; 2004. p. 280–288. (In Russ).]
3. Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneur E, Liu Y. The genetic and environmental factors for keratoconus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:795738. doi: 10.1155/2015/795738.
4. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(13):2537–2546.
5. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):620–627. doi: 10.1016/S0002-9394(02)02220-1.
6. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 2007;26(4):385–389. doi: 10.1097/ico.0b013e3180334f78.
7. Spoerl E, Raiskup-Wolf F, Pillunat LE. Biophysical principles of collagen cross-linking. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2008;225(2):131–137. (In German). doi: 10.1055/s-2008-1027221.
8. Koller T, Seiler T. Therapeutische quervernetzung der hornhautmittels UVA und riboflavin. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2007;224(9):700–706. (In German). doi: 10.1055/s-2007-963492.
9. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97–103. doi: 10.1006/exer.1997.0410.
10. Ньюсэм П.Р., Ромеу М.Л., Сегьюти М. и др. Повреждающее действие ультрафиолетового и видимого света на глаза // *Вестник оптометрии*. — 2007. — №3 — С. 53–60. [Newsome PR, Romeu ML, Seguiti M, et al. The effects of ultraviolet and visible light on the eye. *Vestnik optometrii*. 2007;(3):53–60. (In Russ).]
11. Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, Raiskup F. Corneal cross-linking and safety issues. *Open Ophthalmol J*. 2011;5:14–16. doi: 10.2174/1874364101105010014.
12. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (Lond)*. 2004;18(7):718–722. doi: 10.1038/sj.eye.6700751.
13. McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, et al. Mechanisms of corneal tissue CXL in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):129–138. doi: 10.1167/iovs.09-3738.
14. Cheung IMY, McGhee CNJ, Sherwin T. Beneficial effect of the antioxidant riboflavin on gene expression of extracellular matrix elements, antioxidants and oxidases in keratoconic stromal cells. *Clin Exp Optom*. 2014;97(4):349–355. doi: 10.1111/cxo.12138.
15. Spoerl E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg*. 1999;15(6):711–713.
16. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, et al. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res*. 2003;35(6):324–328. doi: 10.1159/000074071.
17. Lanchares E, del Buey MA, Cristobal JA, et al. Biomechanical property analysis after corneal collagen cross-linking in relation to ultraviolet A irradiation time. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(8):1223–1227. doi: 10.1007/s00417-011-1674-0.
18. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. 2004;29(1):35–40. doi: 10.1080/02713680490513182.
19. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Sel S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. 2010;36(1):114–120. doi: 10.1016/j.jcrs.2009.07.044.
20. Schilde T, Kohlhaas M, Spoerl E, Pillunat LE. Enzymatic evidence of the depth dependence of stiffening on riboflavin/UVA treated corneas. *Ophthalmologie*. 2008;105(2):165–169. doi: 10.1007/s00347-007-1587-9.
21. Mencucci R, Marini M, Paladini I, et al. Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2010;38(1):49–56. doi: 10.1111/j.1442-9071.2010.02207.x.
22. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*. 2004;23(5):503–507. doi: 10.1097/01.ico.0000105827.85025.7f.
23. Choi S, Lee SC, Lee HJ, et al. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light. *Lasers Med Sci*. 2013;28(5):1289–1296. doi: 10.1007/s10103-012-1237-6.
24. Zhang Y, Mao X, Schwend T, et al. Resistance of corneal RFUVA-cross-linked collagens and small leucine-rich proteoglycans to degradation by matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(2):1014–1025. doi: 10.1167/iovs.12-11277.
25. Jordan C, Patel DV, Abeysekera N, McGhee CN. In vivo confocal microscopy analyses of corneal microstructural changes in a prospective study of collagen cross-linking in keratoconus. *Ophthalmology*. 2014;121(2):469–474. doi: 10.1016/j.opht.2013.09.014.
26. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea*. 2007;26(4):390–397. doi: 10.1097/ico.0b013e318030df5a.
27. Messmer EM, Meyer P, Herwig MC, et al. Morphological and immunohistochemical changes after corneal cross-linking. *Cornea*. 2013;32(2):111–117. doi: 10.1097/ICO.0b013e31824d701b.
28. Matalia H, Shetty R, Dhamodaran K, et al. Potential apoptotic effect of ultraviolet-A irradiation during cross-linking: a study on ex vivo cultivated limbal epithelial cells. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(10):1339–1345. doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-301811.

29. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea*. 2004;23(1):43–49. doi: 10.1097/00003226-200401000-00008.
30. Wollensak G, Herbst N. Significance of the lacunar hydration pattern after corneal cross linking. *Cornea*. 2010;29(8):899–903. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181ca3293.
31. Бикбова Г.М., Заболотная В.А. Гистоморфология роговицы в отдаленный период после кросслинкинга по поводу кератоконуса. Сборник научных трудов конференции с международным участием по офтальмохирургии «Восток-Запад». — Уфа: ДизайнПолиграфСервис; 2011. — С. 64–67. [Bikbova GM, Zabolotnaya VA. Histomorphology of the cornea in long-term follow-up after crosslinking for keratoconus. Collection of scientific papers of the Conference on Ophthalmosurgery with International Participation «East-West». Ufa: DizainPoligrafServis; 2011. p. 64–67. (In Russ).]
32. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(4):527–533. doi: 10.1016/j.ajo.2008.05.042.
33. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мороз З.И., и др. Экспериментальное изучение ферментативной устойчивости донорской роговицы, обработанной по методике УФ-кросслинкинга // *Офтальмохирургия*. — 2014. — №1 — С. 20–23. [Malyugin BA, Borzenok SA, Moroz ZI, et al. Experimental study of a donor cornea UV cross-linking enzymatic stability. *Ophthalmosurgery*. 2014;(1):20–23. (In Russ).]
34. Spoerl E, Wollensak G, Dittter DD, Seiler T. Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea. *Ophthalmologica*. 2004;218(2):136–140. doi: 10.1159/000076150.
35. Петров С.Ю., Подгорная Н.Н., Решикова В.С., и др. Исследование биомеханических свойств различных структур глаза: настоящее и перспективы // *Офтальмология*. — 2015. — Т. 12. — №1 — С. 8–14. [Petrov SY, Podgornaya NN, Reshchikova VS, et al. Ocular biomechanics study: current state and perspectives. *Ophthalmology*. 2015;12(1):8–14. (In Russ).]
36. Elsheikh A, Wang D, Brown M, et al. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr Eye Res*. 2007;32(1):11–19. doi: 10.1080/02713680601077145.
37. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*. 1980;31(4):435–441. doi: 10.1016/S0014-4835(80)80027-3.
38. Oxlund H, Simonsen AH. Biochemical studies of normal and keratoconus corneas. *Acta Ophthalmol*. 1985;63(6):666–669. doi: 10.1111/j.1755-3768.1985.tb01578.x.
39. Christiansen DL, Huang EK, Silver FH. Assembly of type I collagen: fusion of fibril subunits and the influence of fibril diameter on mechanical properties. *Matrix Biol*. 2000;19(5):409–420. doi: 10.1016/S0945-053X(00)00089-5.
40. 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;29(9):1780–1785. doi: 10.1016/S0886-3350(03)00407-3.
41. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol*. 2009;87(1):48–51. doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01190.x.
42. Kling S, Remon L, Perez-Escudero A, et al. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking for porcine eye inflation experiments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(8):3961–3968. doi: 10.1167/iovs.09-4536.
43. Knox Cartwright NE, Tyrer JR, 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;28(7):503–508. doi: 10.3928/1081597X-20120613-01.
44. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, et al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(2):279–283. doi: 10.1016/j.jcrs.2005.12.029.
45. Dias J, Diakonis VF, Lorenzo M, et al. Corneal stromal elasticity and viscoelasticity assessed by atomic force microscopy after different cross linking protocols. *Exp Eye Res*. 2015;138:1–5. doi: 10.1016/j.exer.2015.06.015.
46. Braun E, Kanellopoulos J, Pe L, Jankov M. Riboflavin ultraviolet A-induced collagen cross-linking in the management of keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(13):4964.
47. Sedaghat M, Naderi M, Zarei-Ghanavati M. Biomechanical parameters of the cornea after collagen crosslinking measured by waveform analysis. *J Cataract Refract Surg*. 2010;36(10):1728–1731. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.06.056.
48. Stewart JM, Lee OT, Wong FF, et al. Cross-linking with ultraviolet-A and riboflavin reduces corneal permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):9275–9278. doi: 10.1167/iovs.11-8155.
49. Kasumovic SS, Mavija M, Kasumovic A, et al. Intraocular pressure measurements referring to the corneal thickness in keratoconic eyes after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. *Med Arch*. 2015;69(5):334–338. doi: 10.5455/medarch.2015.69.334-338.
50. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29(9):1786–1790. doi: 10.1016/S0886-3350(03)00343-2.
51. Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, et al. Studies on the stabilization of the cornea in rabbits. *Ophthalmologe*. 2000;97(3):203–206. doi: 10.1007/s003470050515.
52. Bottos KM, Schor P, Dreyfuss JL, et al. Effect of corneal epithelium on ultraviolet-A and riboflavin absorption. *Arq Bras Oftalmol*. 2011;74(5):348–351. doi: 10.1590/S0004-27492011000500008.
53. Malhotra C, Shetty R, Kumar RS, et al. In vivo imaging of riboflavin penetration during collagen cross-linking with hand-held spectral domain optical coherence tomography. *J Refract Surg*. 2012;28(11):776–780. doi: 10.3928/1081597X-20121011-05.
54. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Шацких А.В., и др. Экспериментальное обоснование эффективности различных методов доставки рибофлавина в строму роговицы как начального этапа выполнения УФ-кросслинкинга // *Офтальмохирургия*. — 2014. — №1 — С. 24–29. [Malyugin BE, Izmaylova SB, Shatskikh AV, et al. Experimental rationales of the efficacy of different methods of riboflavin delivery into the corneal stroma as the initial step of corneal UV cross-linking. *Ophthalmosurgery*. 2014;(1):24–29. (In Russ).]
55. Filippello M, Stagni E, O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(2):283–291. doi: 10.1016/j.jcrs.2011.08.030.
56. Bikbova G, Bikbov M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(1):30–34. doi: 10.1111/aos.12235.
57. Lamy R, Chan E, Zhang H, et al. Ultrasound-enhanced penetration of topical riboflavin into the corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(8):5908–5912. doi: 10.1167/iovs.13-12133.
58. Kissner A, Spoerl E, Jung R, et al. Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin CXL. *Curr Eye Res*. 2010;35(8):715–721. doi: 10.3109/02713683.2010.481068.
59. Magli A, Forte R, Tortori A, et al. Epithelium-off corneal collagen cross-linking versus transepithelial cross-linking for pediatric keratoconus. *Cornea*. 2013;32(5):597–601. doi: 10.1097/ICO.0b013e31826cf32d.
60. Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, et al. Morphological modification of the cornea after standard and transepithelial corneal cross-linking as imaged by anterior segment optical coherence tomography and laser scanning in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2013;32(6):855–861. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182844c60.
61. Tao X, Yu H, Zhang Y, et al. Role of corneal epithelium in riboflavin/ultraviolet-A mediated corneal cross-linking treatment in rabbit eyes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:624563. doi: 10.1155/2013/624563.
62. Koppen C, Wouters K, Mathysen D, et al. Refractive and topographic results of benzalkonium chloride-assisted transepithelial crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(6):1000–1005. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.01.024.
63. Novruzlu S, Turku UO, Kvrak I, et al. Can riboflavin penetrate stroma without disrupting integrity of corneal epitheli-

- um in rabbits? Iontophoresis and ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Cornea*. 2015;34(8):932–936. doi: 10.1097/ICO.0000000000000438.
64. Shalchi Z, Wang X, Nanavaty MA. Safety and efficacy of epithelium removal and transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus. *Eye (Lond)*. 2015;29(1):15–29. doi: 10.1038/eye.2014.230.
65. Bueno JM, Gualda EJ, Giakoumaki A, et al. Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5325–5331. doi: 10.1167/iovs.11-7184.
66. Mazzotta C, Caragiuli S. Intraoperative corneal thickness measurement by optical coherence tomography in keratoconic patients undergoing corneal collagen cross-linking. *Am J Ophthalmol*. 2014;157(6):1156–1162. doi: 10.1016/j.ajo.2014.02.042.
67. Kaya V, Utine CA, Yilmaz OF. Intraoperative corneal thickness measurements during corneal collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *Cornea*. 2012;31(5):486–490. doi: 10.1097/ico.0b013e31821e4286.
68. Jacob S, Kumar DA, Agarwal A, et al. Contact lens-assisted collagen cross-linking (CACXL): A new technique for cross-linking thin corneas. *J Refract Surg*. 2014;30(6):366–372. doi: 10.3928/1081597X-20140523-01.
69. Schumacher S, Oeftiger L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):9048–9052. doi: 10.1167/iovs.11-7818.
70. McQuaid R, Li J, Cummings A, et al. Second-harmonic reflection imaging of normal and accelerated corneal crosslinking using porcine corneas and the role of intraocular pressure. *Cornea*. 2014;33(2):125–130. doi: 10.1097/ICO.0000000000000015.
71. Famose F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in ten cats. *Vet. Ophthalmol*. 2015;18(2):95–104. doi: 10.1111/vop.12112.
72. Touboul D, Gennisson JL, Nguyen TM, et al. Supersonic shear wave elastography for the in vivo evaluation of transepithelial corneal collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(3):1976–1984. doi: 10.1167/iovs.13-13445.
73. Kanellopoulos AJ. Long term results of a prospective randomized bilateral eye comparison trial of higher fluence, shorter duration ultraviolet A radiation, and riboflavin collagen cross linking for progressive keratoconus. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:97–101. doi: 10.2147/OPTH.S27170.
74. Wernli J, Schumacher S, Spoerl E, Mrochen M. The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(2):1176–1180. doi: 10.1167/iovs.12-11409.
75. Cingu AK, Sogutlu-Sari E, Cinar Y, et al. Transient corneal endothelial changes following accelerated collagen cross-linking for the treatment of progressive keratoconus. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014;33(2):127–131. doi: 10.3109/15569527.2013.812107.
76. Aldahlawi NH, Hayes S, O'Brart DP, Meek KM. Standard versus accelerated riboflavin-ultraviolet corneal collagen crosslinking: resistance against enzymatic digestion. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41(9):1989–1996. doi: 10.1016/j.jcrs.2015.10.004.
77. Leoni-Mesplie S, Mortemousque B, Touboul D, et al. Scalability and severity of keratoconus in children. *Am J Ophthalmol*. 2012;154(1):56–62. doi: 10.1016/j.ajo.2012.01.025.
78. McAnena L, O'Keefe M. Corneal collagen crosslinking in children with keratoconus. *J AAPOS*. 2015;19(3):228–232. doi: 10.1016/j.jaapos.2015.02.010.
79. Buzzonetti L, Petrocelli G, Valente P, et al. Iontophoretic transepithelial corneal cross-linking to halt keratoconus in pediatric cases: 15-month follow-up. *Cornea*. 2015;34(5):512–515. doi: 10.1097/ICO.0000000000000410.
80. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Хабибуллин А.Ф. Применение кросслинкинга роговичного коллагена в лечении буллезной кератопатии // *Офтальмохирургия*. — 2011. — №1 — С. 24–27. [Bikbov MM, Bikbova GM, Habibullin AF. Corneal collagen crosslinking management in bullous keratopathy treatment. *Ophthalmosurgery*. 2011;(1):24–27. (In Russ).]
81. Нероев В.В., Петухова А.Б., Гундорова Р.А., Оганесян О.Г. Влияние кросслинкинга на заживление экспериментальных хирургических ранений роговицы // *Практическая медицина*. — 2012. — №4–1. — С. 107–110. [Neroev VV, Petukhova AB, Gundorova RA, Oganesyanyan OG. Cross-linking effect on experimental surgical corneal wounds healing. *Prakticheskaya meditsina*. 2012;(4–1):107–110. (In Russ).]
82. Martins SA, Combs JC, Noguera G, et al. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3402–3408. doi: 10.1167/iovs.07-1592.
83. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Результаты лечения кератоконуса методом имплантации интрастромальных роговичных колец MyoRing в сочетании с кросслинкингом роговичного коллагена // *Офтальмохирургия*. — 2012. — №4. — С. 6–9. [Bikbov MM, Bikbova GM. Intrastromal corneal MyoRings with corneal collagen cross-linking in keratoconus treatment. *Ophthalmosurgery*. 2012;(4):6–9. (In Russ).]
84. Celik HU, Alagoz N, Yildirim Y, et al. Accelerated corneal crosslinking concurrent with laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(8):1424–1431. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.03.034.
85. Wand K, Neuhann R, Ullmann A, et al. Riboflavin-UV-A crosslinking for fixation of biosynthetic corneal collagen implants. *Cornea*. 2015;34(5):544–549. doi: 10.1097/ICO.0000000000000399.
86. Ковшун Е.В., Мороз З.И., Власова В.А., Горохова М.В. Возможности использования кросслинкинг-модифицированного донорского материала для кератопластики и кератопротезирования // *Катарактальная и рефракционная хирургия*. — 2014. — Т. 14. — №1 — С. 27–31. [Kovshun EV, Moroz ZI, Vlasova VA, Gorokhova MV. The possibility of using cross-linking modified donor material for keratoplasty and keratoprosthesis. *Kataraktal'naya i refraktsionnaya khirurgiya*. 2014;14(1):27–31. (In Russ).]
87. Анисимов С.И., Пожарицкий М.Д., Ларионов Е.В. и др. Первый опыт коррекции прогрессирующего гиперметропического сдвига методом роговичного кросслинкинга у пациентов, перенесших в прошлом радиальную кератотомию // *Офтальмология*. — 2010. — Т. 7. — №4 — С. 5–8. [Anisimov SI, Pozaritskiy MD, Larionov EV, et al. First experience of progressive hyperopic shift correction by corneal crosslinking in patients after radial keratotomy. *Ophthalmology*. 2010;7(4):5–8. (In Russ).]
88. Ahearne M, Coyle A. Application of UVA-riboflavin crosslinking to enhance the mechanical properties of extracellular matrix derived hydrogels. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;54:259–267. doi: 10.1016/j.jmbm.2015.09.035.
89. Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea*. 2008;27(3):353–356. doi: 10.1097/ICO.0b013e31815cf66a.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Бикбов Мухаррам Мухтарамович, доктор медицинских наук, профессор, директор ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»

Адрес: 450008, Уфа, ул. Пушкина, д. 90, тел.: +7 (347) 272-37-75, e-mail: eye@anrb.ru

Халимов Азат Рашидович, кандидат биологических наук, заведующий научно-производственным отделом ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»

Адрес: 450008, Уфа, ул. Пушкина, д. 90, тел.: +7 (347) 273-29-52, e-mail: azrakhal@yandex.ru

Усубов Эмин Логман оглы, кандидат медицинских наук, заведующий отделением хирургии роговицы и хрусталика ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»

Адрес: 450008, Уфа, ул. Пушкина, д. 90, тел.: +7 (347) 273-03-72, e-mail: emines.us@inbox.ru