

# **ЭКСПРЕСС-КРОССЛИНКИНГ РОГОВИЦЫ**

Бишкек 2018

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
КЫРГЫЗСКО-РОССИЙСКИЙ СЛАВЯНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**МЕДИЦИНСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра офтальмологии**

# **ЭКСПРЕСС-КРОССЛИНКИНГ РОГОВИЦЫ**

**Методические рекомендации**

**Бишкек 2018**

Рецензенты:

*Б. М. Мамытова* – канд. мед. наук,  
зав. отд. микрохирургии глаза №2, доц. КГМИ и ПК,  
*Ч. С. Базарбаева* – канд. мед. наук, доц. кафедры офтальмологии КРСУ

Составители:

*М. А. Медведев,*  
*А. И. Островерхов,*  
*Н. А. Тургунбаев,*  
*М. К. Дикамбаева,*  
*Л. Б. Гогаева*

Рекомендовано к изданию  
кафедрой офтальмологии КРСУ

Э 41 Экспресс-кросслинкинг роговицы: методические рекомендации /  
сост.: М. А. Медведев, А. И. Островерхов, Н. А. Тургунбаев,  
М. К. Дикамбаева, Л. Б. Гогаева. Бишкек: КРСУ, 2018. 16 с.: ил.

Методические рекомендации предназначены для практикующих офтальмологов и врачей, а также для обучающихся в ординатуре, аспирантуре на кафедрах офтальмологии медицинских вузов, а также врачей терапевтического профиля.

## **СОДЕРЖАНИЕ**

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>                                                                     | <b>4</b>  |
| <b>КРОССЛИНКИНГ – ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ .....</b>                                              | <b>5</b>  |
| <b>ЧТО ПРОИСХОДИТ ПРИ КРОССЛИНКИНГЕ? .....</b>                                            | <b>6</b>  |
| <b>ЗА КРОССЛИНКИНГОМ БУДУЩЕЕ! .....</b>                                                   | <b>9</b>  |
| <b>ЧТО ТАКОЕ ЭКСПРЕСС-КРОССЛИНГ? В ЧЕМ ЕГО ОТЛИЧИЕ<br/>ОТ СТАНДАРТНОЙ МЕТОДИКИ? .....</b> | <b>10</b> |
| <b>ОСЛОЖНЕНИЯ КРОССЛИНКИНГА .....</b>                                                     | <b>12</b> |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>                                                                    | <b>14</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>                                                                   | <b>15</b> |

## **ВВЕДЕНИЕ**

На сегодняшний день заболевания роговицы занимают 35% в структуре глазной патологии и являются серьезной медико-социальной проблемой, так как в основном поражают трудоспособное население, приводят к значительному снижению остроты зрения, вплоть до полной утраты зрительных функций, к затруднению социальной адаптации и резкому снижению качества жизни пациентов. В связи с этим поиск и исследование новых путей в лечении патологии роговицы могут быть отнесены к одному из актуальных направлений в офтальмологии. Разработанный уже около 18 лет назад метод коллагенового кросслинкинга активно начинает применяться только сейчас. Однако за эти годы было накоплено достаточно как экспериментальных, так и клинических данных подтверждающих эффективность кросслинкинга при различных нозологических формах, не нашедших отражения в официальных показаниях.

## КРОССЛИНКИНГ – ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ

Метод коллагенового кросслинкинга (UVX-linking, C3-R, crosslinking method, UVA method, CCL method) был разработан для биомеханической стабилизации роговицы и основан на эффекте полимеризации стромальных волокон за счёт фотодинамических реакций в результате взаимодействия фоточувствительной субстанции (раствор рибофлавина) и ультрафиолетового излучения. Впервые термин фотодинамическая реакция был введен Н. von Tappeiner в 1904 г. для описания специфического фотохимического взаимодействия, которое приводит к гибели биологических систем в присутствии света, красителя, поглощающего световое излучение, и кислорода. Дальнейшее развитие научной мысли привело к рождению нового направления в медицине – фотодинамической терапии (ФДТ). Наиболее широкое распространение этот метод получил в онкологии; с начала 80-х гг. XX в. ФДТ стали применять в лечении опухолей головного мозга и шеи. J. McCaughan et al. впервые использовали фотодинамический эффект для разрушения хориоидальной меланомы. Сегодня возможности применения ФДТ не ограничиваются злокачественными новообразованиями, рядом авторов описаны хорошие клинические результаты при использовании ФДТ для лечения гнойных ран, трофических язв, а также воспалительных заболеваний в ЛОР практике и гинекологии. В основе методики коллагенового кросслинкинга также лежит фотодинамическая реакция с высвобождением синглетного кислорода, который и обеспечивает образование новых ковалентных связей.

## ЧТО ПРОИСХОДИТ ПРИ КРОССЛИНКИНГЕ?

Первооткрывателями кросслинкинга роговицы является группа исследователей Дрезденского технического университета в 1990 году. Метод разрабатывался для стабилизации течения кератоконуса с целью предупреждения или максимальной отсрочки сквозной кератопластики. В результате многолетних трудов, среди которых значительную роль сыграли работы группы ученых Института рефракционной и глазной хирургии Цюрихского университета (Швейцария) под руководством Т. Seiler, была разработана наиболее эффективная и безопасная технология кросслинкинга (поперечного «сшивания») роговичного коллагена, основой которой является фотополимеризация стромальных волокон под влиянием фотосенсибилизатора и подпорогового воздействия длинноволнового ультрафиолетового излучения. В результате фотохимического и фотофизического процессов происходит высвобождение свободных радикалов кислорода, индуцирующих образование интра и интерфибриллярных ковалентных связей между молекулами коллагена. Благодаря появлению «поперечных сшивков» происходит уплотнение стромы роговицы, обеспечивается тем самым ее большая биомеханическая прочность. Помимо того, изменение третичной структуры коллагеновых фибрилл приводит к блоку специфических участков, взаимодействующих с протеолитическими ферментами слезы и воспалительных клеток, обеспечивая тем самым устойчивость ткани к коллагеназной биodeградации.

Воздействие кросслинкинга на морфофункциональные изменения клеточного состава и коллагенового каркаса разностороннее. Имеются работы, изучающие процессы эпителизации после кросслинкинга роговицы, а также динамику изменений качественного и количественного состава клеток роговицы. Выявлено, что в зоне УФ-облучения по причине цитотоксического действия и апоптоза роговица лишается своего клеточного состава по всей толще, вплоть до эндотелия (в зоне воздействия ультрафиолета), репопуляция клеток происходит в течение 4–6 недель после кросслинкинга. Исследователями из Китая было наглядно показано, что под влиянием кросслинкинга происходит увеличение диаметра коллагеновых фибрилл (рис. 1).



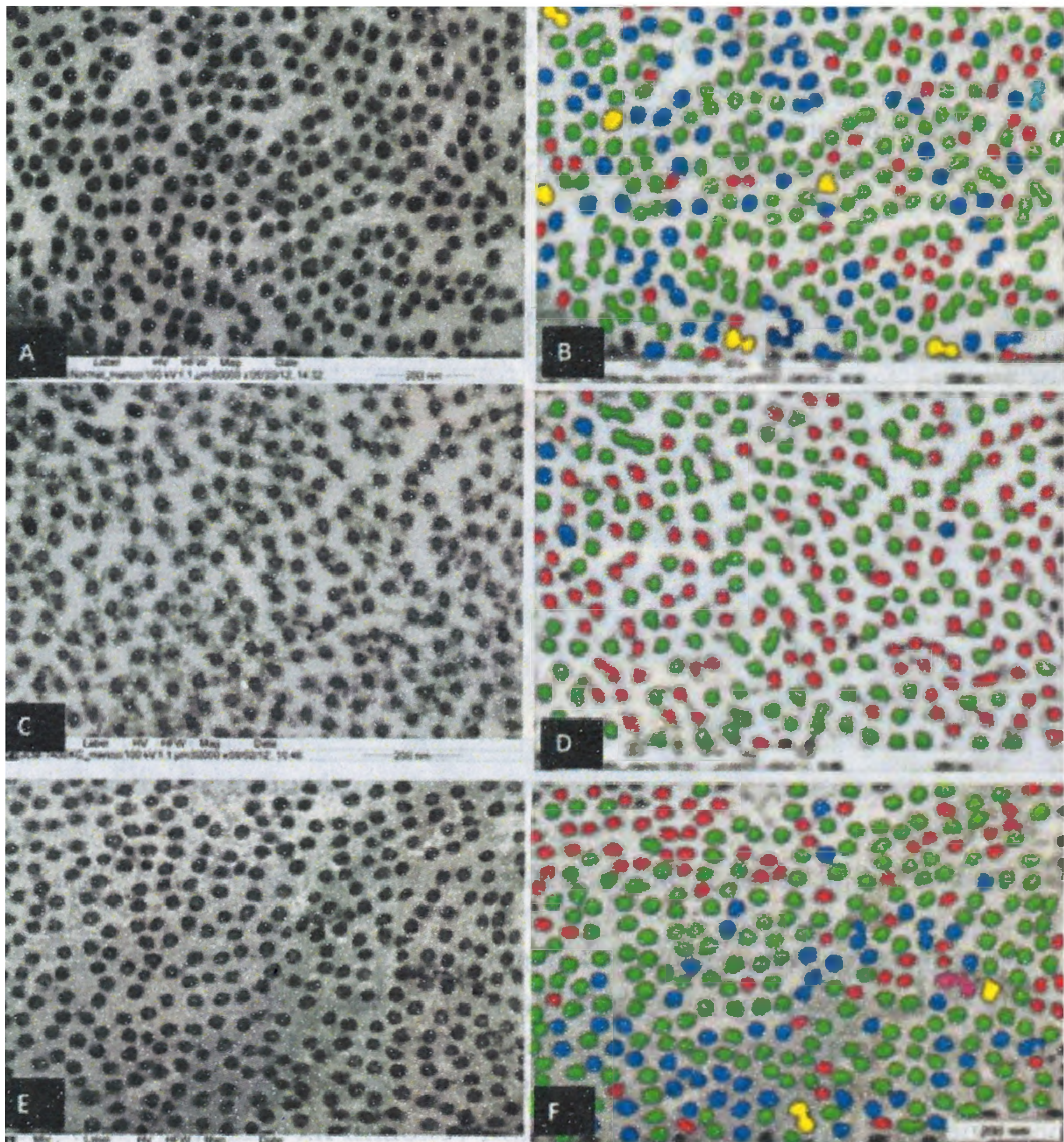


Рис. 1. Коллагеновые фибриллы роговицы в норме: электронная микрофотография (А), цифровое изображение (В). Коллагеновые фибриллы роговицы при кератоконусе: электронная микрофотография (С), цифровое изображение (D). Коллагеновые фибриллы роговицы после кросслинкинга: электронная микрофотография (Е), цифровое изображение (F). Для наглядности использовано цветовое кодирование размеров коллагеновых фибрилл: красный = 10–15 нм, зеленый = 15–20 нм, синий = 20–25 нм, желтый = 24–30 нм, красный = 35–40 нм, коричневый = 40–45 нм. (10 Saeed Akhtar, Turki Almubrad, Iacopo Paladini. Keratoconus corneal architecture after riboflavin/ultraviolet A cross-linking: Ultrastructural studies // Molecular Vision 2013; 19: 1526–1537).



Исследования показывают, что эффект кросслинкинга оказался максимальным в передних слоях стромы на толщину не более 300 мкм. Это связано с высокой степенью абсорбции излучения в присутствии рибофлавина и поглощением до 95% излучения на уровне передних и средних отделов стромы, что обуславливает минимальную степень воздействия ультрафиолетового излучения на эндотелий роговицы, хрусталик и другие глубже лежащие структуры глаза (рис. 2).

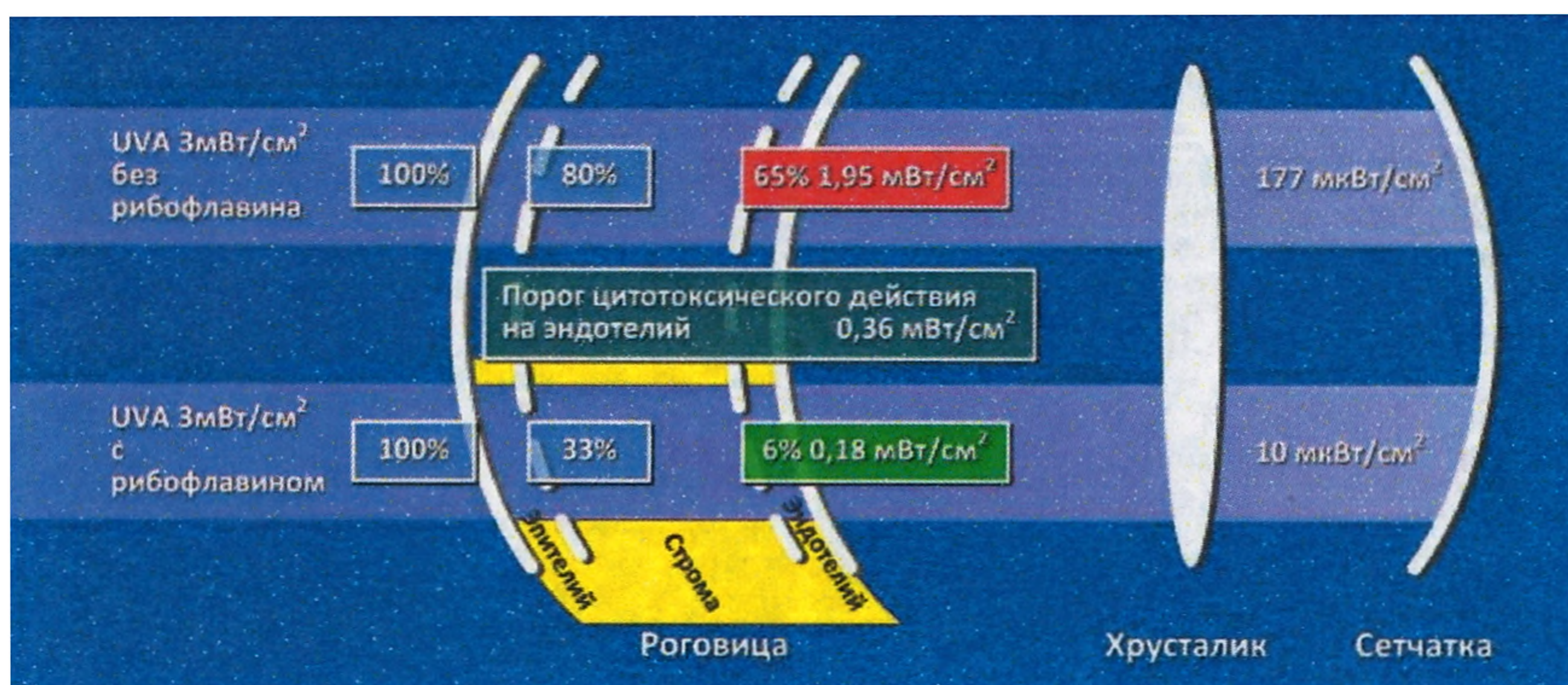


Рис. 2. Воздействие ультрафиолета на ткани глаза

Степень воздействия УФ-излучения на эндотелий роговицы, хрусталик и сетчатку в присутствии рибофлавина и без него.

Было доказано, что вследствие кросслинкинга роговицы лимбальные и конъюнктивальные клетки, находящиеся вне зоны облучения, не претерпевают никаких изменений при условии их защиты. Рибофлавин и продукты его распада изучались в течение длительного времени и доказали высокую безопасность его применения.

## ЗА КРОССЛИНКИНГОМ БУДУЩЕЕ!

Перспективы использования метода: новые показания к применению. Сегодня данная методика успешно применяется для приостановки прогрессирования кератоконуса I–II стадии, ятрогенной кератоктазии после LASIK, пеллюцидной маргинальной дистрофии, кератомалиции различного генеза, а также в лечении буллезной кератопатии с болевым синдромом. Благодаря малой инвазивности метода фотомодификации роговицы, простоте выполнения и экономичности, актуальным является вопрос о расширении показаний к кросслинкингу. Благодаря этому в настоящее время во всем мире активно ведутся исследования по изучению биохимического, биомеханического и других биотехнологических возможностей кросслинкинга. Методику применяют при язвенных поражениях роговицы, и имеет смысл при инфекционном характере. Последнее обстоятельство – результат проведенного S. Martins обширного исследования *in vitro*, продемонстрировавшего антимикробное действие рибофлавина с УФ-излучением в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp.* Открытие противомикробного действия кросслинкинга послужило причиной для ряда исследований по применению его в лечении инфекционных, негрибковых кератитов. К сожалению, из-за ограничения проникновения УФ-излучения в слои роговицы кросслинтинг не подходит для лечения инфекции глубоких слоев роговицы. В НИИ глазных болезней имени Гельмгольца г. Москва была проведена серия лабораторных экспериментов по применению кросслинкинга в качестве метода лечения проникающих и непроникающих ранений роговицы. В результате проведенного исследования были получены морфологические данные, свидетельствующие о положительном влиянии кросслинкинга на течение раневого процесса: наблюдались активация кератогенеза в зоне повреждения стромы и преобразование молодыми кератоцитами фиброцеллюлярной ткани в полноценную строму с оптическими свойствами. Положительные клинические результаты использования кросслинкинга при эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы, поскольку данное заболевание с трудом поддается терапии, что безусловно является прорывом в лечении данного состояния. Множество предложенных ранее альтернативных методов лечения не нашли широкого применения, поэтому до сих пор методом выбора на стадии буллезной кератопатии является сквозная кератопластика, но даже она не гарантирует полноценную реабилитацию вследствие различных послеоперационных осложнений. На сегодняшний день растет количество работ, подтверждающих высокую

эффективность методики кросслинкинга при ЭЭД роговицы легкой степени и возможность его проведения на более поздних стадиях как подготовка к предстоящей кератопластике. Метод кросслинкинга на сегодняшний день в связи с несовершенством законодательной базы Кыргызской Республики является единственной надеждой, так как отсутствует кератопластика. С практической точки зрения большой интерес представляют асептические язвы роговицы (по классификации Д. Вендера и Д. Голта, 2005 г.) в связи со сложностью и низкой эффективностью их лечения. Первые попытки изучить влияние кросслинкинга на заживление язв, резистентных к консервативной терапии, уже были предприняты, причем авторы описывают сокращение площади и глубины дефекта роговицы уже на 7-е сутки, а к 6-му месяцу – полную эпителизацию.

### **ЧТО ТАКОЕ ЭКСПРЕСС-КРОССЛИНГ? В ЧЕМ ЕГО ОТЛИЧИЕ ОТ СТАНДАРТНОЙ МЕТОДИКИ?**

Е. Spoerl 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*. Е. Spoerl и соавт. изучали также возможность укрепления коллагена с использованием УФ-А-излучения (365 нм) мощностью 2 мВт/см<sup>2</sup>. 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<sup>2</sup> в течение 30 мин. Эти параметры легли в основу техники наиболее безопасного и эффективного сшивания корнеального коллагена. Стандартный кросслинтинг, описанный в 2003 г. в Дрезденском протоколе, положил начало клиническому применению этой уникальной технологии. Позже, в 2011 г., было предложено проводить предварительное стромальное насыщение в течение 30 мин. При выполнении процедуры кросслинкинга источник облучения размещают примерно на расстоянии 1–2 см от поверхности роговицы. Вследствие рассеяния света (принцип Колера) происходит поглощение незначительной части энергии излучения, недостаточной для



лучевого поражения тканей глаза (эндотелий роговицы, хрусталик и сетчатка), находящихся по ходу лучей.

Стандартный метод кросслинкинга состоит из трех этапов: 1-й – дезэпителизация роговицы глаза (Epi-Off); 2-й – насыщение стромы роговицы раствором рибофлавина в течение 30 мин; 3-й – ультрафиолетовое облучение роговицы ( $3 \text{ мВт/см}^2$ , 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. Bottos и соавт., проводивших флуоресцентную микроскопию свинных 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. По данным оптической когерентной томографии, эффективность стромального проникновения рибофлавина *in vivo* при СХЛ зависит от характера и степени дезэпителизации роговицы. 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.

Рибофлавин сенсibilизированное УФ-облучение генерирует образование свободных радикалов и активных форм кислорода, таких как супероксиданион ( $\text{O}_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $-\text{OH}$ ) 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.

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.

Исходя из вышеизложенного, нами разработана усовершенствованная методика коллагенового кросслинкинга «Экспресс-кросслинкинг». Методика подразумевает следующее:

1-й этап – подготовительный – проводится инстиляция миотиков (пилокарпин 1%) 2 раза с интервалом 15 минут (с целью уменьшения пагубного воздействия ультрафиолета на сетчатку), затем предварительная инсталляционная анестезия.

2-й этап – в операционной производится ретробульбарная анестезия (лидокаин 2% – 5мл), затем интрастромально вводится кислородно-рибофлавиновая смесь в соотношении 50/50, (рибофлавин 0,02%), при этом насыщается вся роговица (обычно это получается в 2 – 3 укола), при насыщении используется игла размером 30G.

3-й этап – облучение ультрафиолетом (3 мВт/см<sup>2</sup>, 10 мин) длиной волны 370 нм с одновременными инстиляциями рибофлавина.

Затем в конъюнктивальную полость закладывалась комбинированная мазь (антибиотик и кортикостероид).

Разработанная нами методика исключает этап дезэпителизации тем самым уменьшая риск инфицирования роговицы, реабилитационный период укорачивается и уменьшается время операции, а в присутствии кислорода эффективность операции повышается. Уменьшается время воздействия ультрафиолета тем самым снижается пагубное воздействие УФ на сетчатку и добавочные слезопродуцирующие железы.

В послеоперационном периоде нет необходимости использовать мягкую контактную линзу, что необходимо при проведении стандартной методики кросслинкинга, так как эпителий остается интактный. При проведенной и предложенной нами методике при сохранности эпителия возможно применение комбинированного препарата, содержащего антибиотик и кортикостероид, что в свою очередь укорачивает реабилитационный период.

## **ОСЛОЖНЕНИЯ КРОССЛИНКИНГА**

В большинстве случаев прогноз при выполнении кросслинкинга благоприятный. В литературе имеются данные, что процент осложнений после проведения процедуры кросслинкинга составляет 2,6. Среди проведенных нами операций мы наблюдали только имеющий обратимый характер хейз. В то же время, как любое инвазивное вмешательство, процедура может иметь ряд осложнений, при этом последние обычно носят обратимый характер. Возможные осложнения включают:

1. Временное ухудшение зрения. Обычно зрение восстанавливается после кросслинкинга в течение 1–4 месяцев полностью. Ухудшение зрения происходит из-за снижения прозрачности роговой оболочки, что и является следующим временным осложнением кросслинкинга.

2. Снижение прозрачности роговицы или субэпителиальное помутнение роговицы еще называют «хейз» или «флер». От истинных помутнений роговицы «хейз» отличается, в первую очередь, доброкачественным течением: развиваясь обычно на следующий день после кросслинкинга и достигая максимальной интенсивности, он претерпевает спонтанное обратное развитие. По данным конфокальной микроскопии, «хейз» развивается в результате отложения гликозаминогликанов, синтеза коллагена, пролиферации и миграции активированных кератоцитов в поверхностные слои стромы в зоне фотоабляции, то есть представляет собой субэпителиальный фиброз.
3. Традиционное длительное применение кортикостероидных препаратов после кросслинкинга позволяет не только снижать интенсивность и частоту развития «хейза», но и в какой-то степени управлять послеоперационной динамикой остроты зрения. Вместе с тем нередко помутнения роговицы в зоне фотоабляции оказываются более стойкими и интенсивными, требуя более активного лечения: медикаментозного, лазерного или даже хирургического.
4. Покраснение и раздражение глаз. Это является защитной реакцией на вмешательство, применение в этом случае комбинированного препарата, содержащего кортикостероид и антибиотик, десенсибилирующая терапия исправляют ситуацию.
5. Длительная эпителизация роговицы может наблюдаться после проведенной операции по стандартной методике. Усовершенствованная нами методика – экспресс-кросслинкинг – исключает этап дезэпителизации, но возможно развитие дезэпителизации в послеоперационном периоде. Обычно применение давящих повязок с корнеорепаратными в этом случае дает хороший эффект, либо применение лечебных контактных линз улучшает сроки эпителизации.



## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Стремительно развивающиеся новые технологии для лечения заболеваний активно внедряются в повседневную лечебную практику, не является исключением и кросслинкинг, который дает отличные результаты в лечении кератэктазий и заболеваний роговицы воспалительного характера. При кератэктазиях кросслинкинг обладает этиопатогенетически направленным действием, при заболеваниях воспалительного характера кросслинкинг производит обеззараживающий эффект. Предложенная нами методика укорачивает время проведения процедуры, хоть и исключает этап дезпителлизации, тем самым улучшая методику кросслинкинга и снижая риск осложнений.

Кроме того, кросслинкинг является малозатратным и малоинвазивным, помогает не только приостановить прогрессирование заболевания, но и в ряде случаев улучшить функции органа зрения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Перспективы использования фотомодификации роговичного коллагена в офтальмологии / Н. А. Тургунбаев, М. А. Медведев, А. И. Островерхов, У. Н. Исаков, А. А. Аскеева // Вестник КРСУ. 2015. Т. 15. № 4. С. 163–164.
2. Новая технология экспресс-кросслинкинга роговичного кросслинкинга / А. И. Островерхов, Н. А. Тургунбаев, М. К. Дикамбаева // Вестник КРСУ. Т. 17. №3. С. 112–113.
3. Фотомодификация (Кросслиндинг) в офтальмологии: настоящее и будущее / М. А. Медведев, М. К. Дикамбаева, А. И. Островерхов, У. Н. Исаков // Сборник научных статей, посвящённых 75-летию Микрочirurgии глаза №1 Национального госпиталя при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики. Бишкек, 2014. С. 62–64.
4. Сквозная кератопластика при буллезной кератопатии после ранее проведенного кросслинкинга роговичного коллагена / Н. А. Тургунбаев, М. А. Медведев, Б. Х. Бебезов и др. // Вестник КРСУ. 2013. №13 (12). С. 177–178.
5. Dalton M. Кросс-линдинг без удаления эпителия. Многообещающее начало. Eye World-Russia. 2012; N 2: 14.

Составители:

*Михаил Анатольевич Медведев,  
Александр Иванович Островерхов,  
Нурлан Айтбаевич Тургунбаев,  
Марта Казыевна Дикамбаева,  
Лайла Борисовна Гогаева*

Экспресс-кросслинкинг роговицы  
Методические рекомендации

Редактор *А. А. Матвиенко*  
Компьютерная верстка – *Э. А. Галляудинова*

Подписано в печать 11.01.18.  
Формат 60х84<sup>1/16</sup>  
Офсетная печать. Объем 1,0 п. л.  
Тираж 100 экз. Заказ 153

Отпечатано в типографии КРСУ  
720048, г. Бишкек, ул. Горького, 2