

Кросслинкинг роговичного коллагена – новый способ лечения кератоконуса. Обзор литературы.

В человеческой роговице коллагеновые волокна ориентированы преимущественно горизонтально и вертикально (под углом 90° и 180°), параллельно друг другу и поверхности роговицы, что определяет ее кривизну и прозрачность. Подобная закономерность имеет место на большей части роговицы, за исключением полосы шириной 2 мм вдоль лимба. Коллагеновые волокна, идущие от лимба до лимба, связаны между собой в передне-заднем направлении с помощью матричных белков (протеогликаны и др.), а также коллагена VI типа, являющегося своеобразным «мостом» между коллагеновыми фибриллами I типа. Кератоциты, благодаря наличию отростков, также участвуют в образовании поперечных связей, взаимодействуя друг с другом и коллагеновыми фибриллами (11,13).

Известно, что биомеханические свойства роговицы зависят от состояния волокон коллагена (4,22), межколлагеновых связей (8) и их структурной организации (15).

Кератоконус – дегенеративное невоспалительное заболевание роговицы, характеризующееся прогрессирующим истончением роговицы с выпячиванием ее центральных отделов, формированием миопической рефракции и нерегулярного астигматизма. В общей популяции частота кератоконуса составляет 1/2000 (1), однако, в последнее время с повышением диагностических возможностей, частота обнаружения этой патологии возрастает до 1/400 – 1/600 (3).

Активное прогрессирование кератоконуса происходит в 20% случаев и, как правило, начинается в пубертатный период (16). Прогрессирование заболевания приводит к значительному снижению остроты зрения и неэффективности способов ее коррекции. Основным методом лечения кератоконуса в настоящее время остается послойная или сквозная кератопластика, сопряженная с крайне высоким риском осложнений.

Этиология кератоконуса и других видов кератоконусов в настоящее время неизвестна. Обсуждаются генетические аномалии коллагена и межколлагеновых связей, секреции матричных металлопротеиназ и других ферментов, иные факторы (7,14).

Различие биомеханических свойств роговиц больных кератоконусом и здоровых людей было подтверждено серией экспериментальных работ, в то время как морфологические и биохимические особенности данного заболевания остаются до конца неизученными. По сравнению с нормальной роговицей биомеханическая резистентность роговицы с кератоконусом снижена вдвое. Многочисленные исследования показали, что при кератоконусе изменения в структуре и организации роговичного коллагена (4,15,22) и экстрацеллюлярного матрикса приводят к полному апоптозу (23) и некрозу (30) кератоцитов, затрагивая, в основном, центральную строму и Боуменову мембрану (17).

Обнаружено, что у пациентов с кератоконусом в ткани роговицы значительно снижена антиоксидантная активность ферментов, призванных инактивировать свободные радикалы, образующиеся в результате роговичного метаболизма (2). Кроме того, было обнаружено повышение активности катепсина В и G, желатиназы, дефект синтеза гликопротеинов, а также различные нарушения в регуляции синтеза протеогликанов (11). Повышенная коллагеназная активность также может играть роль в патогенезе заболевания. Подтверждением этому служит 2,5-кратное увеличение в слезе больных коллагеназа-индуцированных продуктов биодegradации, так называемых телопептидов (21).

В результате воздействия комплекса факторов происходит нарушение структуры экстрацеллюлярного матрикса, ослабление связей между фибриллами и матриксом, разделение и смещение коллагеновых волокон в результате ослабления поперечных межколлагеновых связей, что приводит к деформации и удлинению волокон (11,14). С помощью X-ray scattering было доказано, что при кератоконусе в центральной зоне роговицы нарушается регулярность расположения волокон, многие из них оказываются ориентированы косо, под углом 60° и 120° , а также тангенциально и циркулярно.

Первоочередное повреждение центральных отделов роговицы обусловлено анатомической особенностью – наименьшей выраженностью поперечных связей между коллагеновыми волокнами в этой области (11).

Идея использования консервативного метода лечения кератоконуса родилась в Германии у группы исследователей Дрезденского Технического Университета. Перед учеными встала задача достичь стабилизации процесса с целью максимальной отсрочки сквозной кератопластики.

Основанием для проведения исследований в этой области послужила серия работ, посвященных эффекту «склеивания» фибрилл коллагена с образованием димеров из двух α -цепей под влиянием различных внешних факторов: ферментов, озона, ультрафиолетового излучения и т.д.

Данный эффект является результатом окислительного механизма, сопровождающегося высвобождением различных свободных радикалов. Оказалось, что в отличие от других способов индукции «склеивания», ультрафиолетовое излучение стимулирует образование синглетного кислорода, не вызывающего, в отличие от гидроксильного радикала, сопутствующей дегградации CNBr белков коллагена (6). Кроме того, была подтверждена способность ультрафиолетового излучения стимулировать продукцию матричных металлопротеиназ (12). В эксперименте было выявлено, что в присутствии рибофлавина степень абсорбции ультрафиолетового излучения в ткани роговицы повышалась с 32% до 95%, а повреждение коллагеновых белков под воздействием ультрафиолетового облучения сводилось к минимуму (12).

Первые исследования в офтальмологии были начаты в 1990 году попыткой оценить возможность биологического окислительного «склеивания» роговичного коллагена под воздействием энзимов, тепла или излучения определенной длины волны, что приводило бы к повышению резистентности стромального коллагена (9). Известно, что похожий механизм уплотнения и утолщения приблизительно на 4,5% коллагеновых волокон сопровождает «старение» роговицы, а также имеет место при сахарном диабете и связан с активацией гликозилирования в молекулах тропоколлагена (5,6). Механизм индукции «склеивания» коллагена при сахарном диабете включает каскад биохимических окислительных реакций, отражающих неферментативное гликозилирование (18). Феномен повышения диаметра волокон коллагена может быть продемонстрирован с помощью сканирующей электронной микроскопии в стекловидном теле у больных сахарным диабетом (29). Подобный процесс лежит в основе снижения эластичности стенок сосудов и развития микроангиопатии у этих больных (18).

В результате серии работ была разработана наиболее эффективная и безопасная техника кросслинкинга (поперечного «склеивания») роговичного коллагена, основанная на эффекте фотополимеризации стромальных волокон под воздействием фоточувствительной субстанции (раствор рибофлавина) и низких доз ультрафиолетового излучения твердотельного UVA – источника (24,25). Было доказано, что под влиянием ультрафиолетового излучения и рибофлавина происходит усиление поперечных внутримолекулярных связей роговичного коллагена с образованием димеров из двух α -цепей без дегградации коллагеновых белков (6).

Идея разработки клинического метода заключалась во временном приостановлении прогрессирувания кератоконуса в рефракционной фазе за счет «склеивания» коллагеновых фибрилл и повышения биомеханической стабильности роговицы. Для использования в клинической практике был разработан прибор с твердотельным ультрафиолетовым источником, имеющий два наконечника и кнопку регулировки мощности.

Описание процедуры кросслинкинга роговичного коллагена. Перед процедурой кросслинкинга проводится местная анестезия. Шпателем удаляется роговичный эпителий в пределах предварительно отмеченной окружности диаметром 7 мм. Затем пациенту закапывают 2-4 капли раствора, содержащего 0,1% рибофлавин, 20% декстран и анестетик. Луч ультрафиолетового излучения с длиной волны 365 нм фокусируется на вершине

роговице, расстояние от источника до роговицы - 10-12 мм. Воздействие производится в течение 5 минут, мощность излучения на поверхности роговицы - 3 МВт/см² (5,4 Дж/ см²). Инстилляцией раствора рибофлавина с последующим воздействием ультрафиолетового излучения повторяют 5 раз (общее время экспозиции - 25 минут, время процедуры в целом - 30 минут), после чего роговицу промывают физиологическим раствором, закапывают офлоксацин, циклопентонат и надевают мягкую контактную линзу. В послеоперационном периоде больному назначают парацетамол с кодеином в течение 4 дней. На 5 день после полной эпителизации роговицы снимают контактную линзу и назначают инстилляцию кортикостероидов и антибиотиков в течение 20 дней.

Результаты.

До внедрения новой методики в клиническую практику было проведено множество экспериментальных работ, доказавших ее эффективность и безопасность.

Wollensak и соавт. с помощью электронной микроскопии подтвердили факт «склеивания» фибрилл и утолщения коллагеновых волокон в роговице под воздействием рибофлавина и ультрафиолетового излучения, что приводило к повышению биомеханической устойчивости ткани. В передних отделах стромы диаметр коллагеновых волокон достоверно повышался на 12,2% (3,64 нм), в задних отделах стромы диаметр волокон увеличивался лишь на 4,6% (1,63 нм). Выявленные изменения оказываются значительно ниже критического порога толщины волокон, приводящего к помутнению роговицы (29).

В экспериментах было доказано значительное повышение устойчивости ткани роговицы кроликов к механическому воздействию после процедуры кросслинкинга (19). В другой серии работ в результате экспериментально индуцированного кросслинкинга роговичного коллагена ригидность человеческой роговицы возросла приблизительно на 300%, роговицы свиней – на 75% (25). Повышение биомеханической ригидности ткани авторы связывают с фактом «склеивания» фибрилл и увеличения толщины коллагеновых волокон.

Экспериментальные исследования подтвердили двукратное повышение устойчивости роговицы после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения к действию ферментов: пепсина, трипсина и колагеназы. Стабилизирующий биохимический эффект кросслинкинга может быть объяснен изменением третичной структуры коллагеновых фибрилл и блокированием специфических участков, взаимодействующих с ферментами. Данный факт объясняет эффективность метода в лечении язвы роговицы, а также частично обуславливает остановку прогрессирования кератоконуса, в патогенезе которого также играет роль повышенная активность колагеназы. Подобный эффект повышения устойчивости ткани к колагеназной биодegradации в результате процедуры кросслинкинга широко используется в современных биотехнологиях изготовления различных имплантов на основе коллагена (21).

Помимо биомеханического и биохимического эффекта, процедура кросслинкинга роговичного коллагена ведет к формированию повышенной устойчивости роговицы к термическому воздействию. Денатурация коллагена с разрушением ковалентных связей между молекулами в роговицах, подвергшихся комбинированному воздействию UVA и рибофлавина, происходила при более высокой температуре, чем в контроле (20).

Во всех проведенных исследованиях эффект кросслинкинга оказался максимальным в передних отделах стромы толщиной не более 300 мкм. Это связано с высокой степенью абсорбции излучения в присутствии рибофлавина и поглощением до 95% излучения на уровне передних и средних слоев стромы. Данный факт объясняет преимущественно переднюю локализацию зоны утолщения коллагеновых волокон, асимметрию между передними и задними отделами стромы относительно устойчивости к ферментному, механическому и термическому воздействию, а также обуславливает минимальную степень воздействия ультрафиолетового излучения на эндотелий роговицы, хрусталик и другие структуры глаза (20,29). Следует учитывать, что именно передние отделы стромы роговицы наиболее важны для поддержания кривизны роговицы и формирования оптического эффекта процедуры (13).

Для подтверждения безопасности процедуры была проведена дополнительная серия экспериментальных работ. Специфический цитотоксический эффект на эндотелий роговицы отмечался при интенсивности ультрафиолетового излучения на уровне эндотелия $0,65 \text{ Дж/см}^2$ ($0,36 \text{ МВт/см}^2$), что вдвое превышает мощность при терапевтических параметрах излучения ($0,32 \text{ Дж/см}^2$; $0,18 \text{ МВт/см}^2$). Зная коэффициент абсорбции излучения в ткани человеческой роговицы в присутствии рибофлавина, было рассчитано, что при стандартной терапевтической мощности излучения (3 МВт/см^2) на поверхности роговицы толщиной более 400 мкм , энергия на уровне глубоких слоев роговицы безопасна для эндотелия. Однако, в случаях язвы роговицы, развитого кератоконуса с выраженным истончением роговицы стандартная доза воздействия оказывается токсичной для эндотелиальных клеток. В таких случаях рекомендуется использовать альтернативные способы лечения или снижать мощность излучения. Однако, по мнению исследователей, у пациентов с кератоконусом и локальным истончением роговицы на ограниченном участке возможно использование стандартных доз излучения, так как локальная потеря эндотелиальных клеток компенсируется путем миграции с соседних участков (26).

С помощью конфокальной биомикроскопии было выявлено разрежение кератоцитов в передних отделах стромы роговицы, что свидетельствует об их апоптозе и последующем некрозе под воздействием ультрафиолетового излучения заданной мощности. Степень гибели кератоцитов зависела от интенсивности ультрафиолетового излучения. При стандартных терапевтических дозах облучения в роговице человека гибель кератоцитов отмечалась в пределах передних отделов стромы толщиной около 300 мкм . Постепенное восстановление популяции клеток происходило в течение 3 месяцев за счет миграции из зоны неповрежденной роговицы (28).

Кроме того, в первые дни после процедуры было обнаружено исчезновение субэпителиальных нервов. Однако полная реиннервация роговицы с восстановлением ее чувствительности отмечалась уже через 1 месяц (28).

Ни в одном эксперименте не было выявлено помутнения роговицы, хрусталика или признаков воспалительной реакции в глазах животных после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового облучения (19,21,25,29). Дегенеративный эффект излучения подтверждается отсутствием воспалительной реакции в ткани роговицы (28).

К настоящему времени в мировой практике накоплен достаточно большой опыт клинического применения метода кросслинкинга роговичного коллагена, подтверждающий эффективность и безопасность процедуры для приостановления прогрессирования кератоконуса и повышения остроты зрения. Показаниями для проведения процедуры является наличие у пациентов прогрессирующего кератоконуса II – IV стадии и непереносимость контактных линз.

Срок наблюдения за пациентами по данным различных авторов составляет от нескольких месяцев до 4 лет (1,2,3,16,24,26). В течение этого периода практически на всех пролеченных глазах была обнаружена стабилизация показателей офтальмометрии. Кроме того, во многих случаях ($51,7\% - 70\%$ глаз) отмечалось уплощение роговицы со снижением среднего сферического коэффициента рефракции по данным различных авторов в среднем на $2,87 - 3,01 \text{ D}$ (колебания индивидуальных показателей от $0,18 \text{ D}$ до $9,97 \text{ D}$) (1,2,3,16,24,26). Процесс уплощения роговицы начинался в ближайшие дни после проведения процедуры.

Снижение цилиндрического компонента отмечалось в среднем на $1,2 \text{ D}$, среднего значения сферозэквивалента – на $2,2 \text{ D}$ (3).

Измерение показателя эластичности роговицы выявило его снижение в среднем от $1,9$ (колебания в пределах $1,6 - 2,5$) до процедуры до $1,2$ (колебания от $0,8$ до $1,8$) после воздействия (1). Анализ корнеальной симметрии, основанный на автоматическом расчете индекса симметрии, показал повышение степени симметрии роговицы со снижением среднего значения индекса от $6,263$ до лечения до $4,25$ после лечения (1,3).

Похожие результаты были получены при анализе полумеридианов. В течение 3 месяцев наблюдалось уменьшение асимметрии между вертикальными полумеридианами,

уменьшение разницы между горизонтальными полумеридианами, а также понижение элевации вершины роговицы по отношению к опорной сфере (3).

Аберрометрический анализ волнового фронта показал значимое снижение RMS в течение 3 месяцев. Анализ сферических аберраций и аберраций высшего порядка не показал статистически значимых изменений до и после лечения, в то время как компонент комы значительно снизился. Депрессия горизонтальной комы была достоверна уже через 1 месяц после процедуры (3).

Функциональные результаты оценивались на основании динамики изменения некорригированной (UCVA) и максимально корригированной (BCVA) остроты зрения. Значимое улучшение зрения отмечалось у 50-65% пациентов (1,16,24,26). Статистически достоверное повышение UCVA в среднем на 3 линии по таблице Снеллена и BCVA на 1,2 линии наблюдалось уже через 1 месяц после лечения (30). Через 3 месяца по данным различных авторов повышение UCVA отмечалось в пределах 2,4-3,6 линии, BCVA улучшилась в среднем на 1,4-2,0 линии (1,3,16,24,26).

Единственным побочным эффектом процедуры явился кратковременный отек ткани роговицы. Данный эффект отмечался приблизительно в 40% случаев, сопровождаясь транзиторным повышением среднего сферического коэффициента рефракции (3,16).

В течение 4-летнего периода наблюдения за пролеченными пациентами не было отмечено изменения прозрачности роговицы и хрусталика, плотности эндотелиальных клеток, изменений внутриглазного давления, поражения сетчатки по данным оптической когерентной томографии. В большинстве случаев не потребовалось проведения повторных процедур (1,2,16,24).

Таким образом, многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали эффективность и безопасность процедуры рибофлавин-UVA-индуцированного кросслинкинга роговичного коллагена для лечения прогрессирующего кератоконуса. Снижение показателей офтальмометрии, горизонтальной комы, повышение симметричности и ригидности роговицы свидетельствуют об улучшении оптических свойств роговиц пациентов и приостановлении патологического процесса.

В большинстве случаев процедура кросслинкинга роговичного коллагена приводила к повышению переносимости контактных линз и улучшению качества жизни пациентов (1,2,16,24).

Другие возможные сферы клинического применения процедуры кросслинкинга роговичного коллагена касаются профилактики регрессии миопии и развития ятрогенной кератэктазии после рефракционной хирургии. Имеются сообщения об успешном использовании процедуры кросслинкинга у пациентов с ятрогенной кератэктазией после операции ЛАСИК. С помощью данной методики удалось повысить биомеханическую прочность роговицы и остановить прогрессирование данного осложнения (10).

В последнее время появились сообщения об успешном использовании метода в клинике при лечении больных с язвой роговицы (21). Не исключено, что кросслинкинг склерального коллагена станет эффективной методикой повышения ригидности склеры с целью лечения прогрессирующей миопии.

Таким образом, кросслинкинг роговичного коллагена является технически несложным, относительно дешевым и гораздо менее инвазивным способом лечения кератоконуса и ятрогенной кератэктазии, чем имплантация интрастромальных колец и эксимерлазерная хирургия, которые не приостанавливают прогрессирование заболевания, а только влияют на его рефракционный компонент.

Список литературы.

1. Braun E., Kanellopoulos J., Pe L., Jankov M. Riboflavin/Ultraviolet-A-Induced Collagen Crosslinking in the Management of Keratoconus // ARVO 2005; www.iovs.org 4964/B167.
2. Brian S. Boxer Wachler. Corneal Collagen Crosslinking with Riboflavin // Cataract and Refract. Surg. Today, Jan. 2005; 73-74.

3. Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C., Traversi C. Parasurgical Therapy of Keratoconus by Riboflavin–UVA–Induced Crosslinking of Corneal Collagen: Preliminary Refractive Results in Italian Study //
4. Cheng E.L., Maruyama I., Sundar Raj N., Sugar J., Feder R.S., Yue B.Y.J.T. Expression of Type XII Collagen and Hemidesmosome-associated Proteins in Keratoconus Corneas // *Curr. Eye Res.* 2001; 22; 333-340.
5. Doxer A., Misof K., Grabner B., Etti A., Fratzi P. Collagen Fibrils in the Human Corneal Stroma: Structure and Aging // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; Vol. 39; 644-648.
6. Fujimori E. Cross-linking and Fluorescence Changes of Collagen by Glycation and Oxidation // *Biochimica et Biophysica Acta*, 998 (1989); 105-110.
7. Kaufman H.E. Strengthening the Cornea // *Cornea*, Jul.2004: Vol. 23; N.5; 432.
8. Kenney M.C., Nesburn A.B., Burgeson R.E., Butkowski R.J., Ljubimov A.V. Abnormalities of the Extracellular Matrix in Keratoconus Corneas // *Cornea* 1997; 16(3); 345-351.
9. Khadern J., Truong T., Ernest J.T. Photodynamic Biologic Tissue Glue // *Cornea* 1994; 13; 406-410.
10. Kohlhaas M., Spoerl E., Speck A., Schilde T., Sander D., Pillunat L.E. A New Treatment of Keratectasia after LASIK by Using Collagen with Riboflavin/UVA Light Crosslinking // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 2005, May; 222(5); 430-436.
11. Meek K.M., Tuft S.J., Huang Y. et al. Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; Vol. 46; N.6; 1948-1956.
12. Menter J.M., Patta A.M., Sayre R.M., Dowdy J., Willis I. Effect of UV Irradiation on Type I Collagen Fibril Formation in Neural Collagen Solutions // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2001; Vol. 17; 114-120.
13. Muller L.J., Pels E., Vrensen G.F. The Specific Architecture of the Anterior Stroma Accounts for Maintenance of Corneal Curvature // *Br. J. Ophthalmol.* 2001; Vol. 85; 437-443.
14. Rabinowitz Y.S. Major Review Keratoconus // *Surv. Ophthalmol.*, Jan-Feb 1998; Vol. 42, N.4; 297-319.
15. Radner W., Zehemayer M., Skorpik Ch., Mallinger R. Altered Organization of Collagen in Apex of Keratoconus Corneas // *Ophthalmic Res.* 1998; 30; 327-332.
16. Sanders D., Spoerl E., Kohlhaas M., Unger G., Pillunat L.E. Collagen Crosslinking by Combined Riboflavin/Ultraviolet-A (UVA) Treatment Stop Progression of Keratoconus // *ARVO* 2006; www.iovs.org 2887/B522.
17. Scroggs M.W., Proia A.D. Histopathological Variation in Keratoconus // *Cornea* 1992; 11; 553-559.
18. Seiler T., Huhle S., Spoerl E., Kunath H. Manifest Diabetes and Keratoconus: a Retrospective Case-Control Study // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2000; Vol. 238; 822-825.
19. Spoerl E., Schreiber J., Hellmund K., Seiler T., Knuschke P. Crosslinking Effects in the Cornea of Rabbits // *Ophthalmologie* 2000; Vol. 97; 203-206.
20. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D., Seiler T. Thermomechanical Behavior of Collagen-Cross-Linked Porcine Cornea // *Ophthalmologica* 2004; Vol. 218; 136-140.
21. Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. Increased Resistance of Crosslinked Cornea against Enzymatic Digestion // *Current Eye Research*, 2004; Vol. 29; N. 1; 35-40.
22. Tuori A.J., Virtanen I., Aine E., Kalluri R., Miner J.H., Uusitalo H.M. The Immunohistochemical Composition of Corneal Basement membrane in Keratoconus // *Curr. Eye Res.* 1997; 16; 792-801.
23. Wilson S.E., Kim W.G. Keratocyte Apoptosis: Implication on Corneal Wound Healing, Tissue Organization and Disease // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; 39; 220-226.
24. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Collagen Crosslinking for the Treatment of Keratoconus // *Am. J. Ophthalmol.* 2003; Vol. 135;

620-627.

25. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Stress Strain Measurements of Human and Porcine Corneas after Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Crosslinking // J. Cataract Refract. Surg.; Sep. 2003; Vol. 29; 1780-1785.
26. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Behandlung von Keratokonus Durch Kollagenvernetzung // Ophthalmologie 2003; 100; 44-49.
27. Wollensak G., Spoerl E., Wilsh M., Seiler Th. Endothelial Cell Damage after Riboflavin–Ultraviolet–A Treatment in the Rabbit // J. Cataract Refract. Surg.; Sep. 2003; Vol. 29; 1786-1790.
28. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M., Seiler Th. Keratocyte Apoptosis after Corneal Collagen Crosslinking Using Riboflavin/UVA Treatment // Cornea 2004; Vol. 23; 43-49.
29. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea after Collagen Crosslinking by Riboflavin/UVA // Cornea, Jul 2004; Vol. 23; N.5; 503-507.
30. Zaldaway R.M., Wagner J., Ching S., Seigel G.M. Evidence of Apoptotic Cell Death in Keratoconus // Cornea 2002; 21; 206-209.