

## ФОТОТЕРАПІЯ ЗАХВОРЮВАНЬ РОГІВКИ ОКА

Й.Р.Салдан, М.Б.Луцук, Ю.Й.Салдан, О.В.Ільченко, Д.О.Некрут

Кафедри очних хвороб та мікрохірургії ока і біохімії та загальної хімії  
Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова,  
21018 Україна, м. Вінниця, вул. Пирогова, 46, тел.: (0432) 251-15-81

УДК 617.713:615. 831

*У статті представлено аналітичний огляд літератури стосовно фототерапії ультрафіолетовим (УФ) випромінюванням захворювань рогівки. Наведені сучасні дані відносно біохімічних механізмів, які лежать в основі змін в структурі колагену рогівки під впливом хімічних перетворень рибофлавіну, опроміненого УФ випромінюванням з довжиною хвилі 365 нм.*

**Ключові слова:** ультрафіолетове випромінювання, рогівка, зшивка колагену.

### Вступ

Найбільш виражену дію на рогівку має короткохвильова частина світла, а саме ультрафіолетове (УФ) випромінювання. Усю УФ частину спектру ділять на три частини: УФ-А - довжина хвилі від 400 до 320 нм; УФ-В - від 320 до 290 нм; УФ-С - від 290 до 200 нм. Більша частина випромінювання УФ-С затримується озоновим шаром атмосфери. Випромінювання УФ-В майже повністю поглинається епітелієм рогівки. Випромінювання УФ-А набагато менше поглинається рогівкою; частина його проходить крізь оптичні середовища ока, а при відсутності кришталика (афакії) людина сприймає цю частину спектра і бачить навколишні предмети блакитними.

Шкідливий вплив випромінювання УФ-А опосередкований через утворення активних форм кисню (АФК), що вірогідно є причиною частішого розвитку катаракти і патології макулярної області сітківки (вікової її дегенерації) в районах з підвищеною інсоляцією. Ендогенні хромофори, такі як рибофлавін, порфірини, а також НАДФ, активують процес утворення АФК, тобто виступають у ролі фотосенсибілізаторів.

В останні роки процеси фотополімеризації колагенових структур - так званого «інженірінга тканин» - стали використовувати для лікування широкого спектру захворювань рогівки ока, які проявляються її ектазіями, тобто вип'ячуваннями [1]. Як відомо, під дією УФ випромінювання в речовинах виникають нові хімічні зв'язки, змінюються їх біомеханічні, оптичні та інші властивості [2]. Фототерапія захворювань рогівки ока УФ випромінюванням після насичення її стромі рибофлавіном в літературі одержала назву «зшивка колагену» (collagen-crosslinking). Відповідна процеду-

ра є простою у виконанні, не вимагає багато часу та має високу терапевтичну ефективність. Метод «зшивки колагену» використовують для лікування різних форм ектазії рогівки ока, таких як кератоконус, кератоглобус, кератоторус, маргінальна дегенерація рогівки, ятрогенна кератоектазія.

### Принцип методу

Лікувальна процедура складається з трьох етапів: перший етап - деепітелізація рогівки ока, другий - насичення стромі рогівки рибофлавіном, третій етап - опромінення рогівки УФ-світлом. При цьому рибофлавін діє як фотосенсибілізатор, що поглинає УФ випромінювання певної довжини хвилі і стимулює утворення АФК, які викликають поперечне зшивання ланцюгів колагену (конкретні хімічні реакції наведені нижче).

Деепітелізація рогівки ока потрібна з двох причин. По-перше, епітелій має низьку проникливість для рибофлавіну, тобто тільки після деепітелізації є можливість в достатній кількості наситити строму рогівки рибофлавіном. По-друге, епітелій сам по собі активно поглинає УФ випромінювання та значно зменшує його проникнення в строму, де знаходиться колаген. Для деепітелізації попередньо знеболюють рогівку, а потім трепаном окреслюють площу діаметром 7-8 мм, з якої механічно видаляють епітелій. Оскільки епітелій рогівки ока має високу регенеративну здатність, то його повне відновлення настає через 3-4 доби після процедури.

Рибофлавін (вітамін В<sub>2</sub>) складається з гетероциклічного ядра ізоалоксазину та п'ятиатомного спирту рибітолу. Рибофлавін має 2 максимуми абсорбції світла - при 370 та 430 нм. Речовина є фотосенсибілізатором.

ром: при поглинанні УФ випромінювання вона перетворюється на активні форми, які в свою чергу продукують АФК. Насичення стромі рогівки рибофлавіном здійснюється шляхом частого закапування 0,1% розчину рибофлавіну протягом 30 хвилин.

Для опромінювання рогівки вибрано УФ випромінювання з довжиною хвилі 370 нм, а не 430 нм, на основі більш високої енергії його кванта та, як показали експерименти на тваринах, його вищої здатності до зшивання колагену. Дослідним шляхом вибрані параметри УФ опромінювання (щільність потужності 3 мВт/см<sup>2</sup>, тривалість експозиції 30 хвилин), при яких в рогівці ока (її товщина біля 400 мкм) в присутності рибофлавіну абсорбується біля 90-95% енергії випромінювання, у тому числі в передньому шарі товщиною 200 мкм - 65%, а в наступних 200 мкм - лише 25-30% енергії [3]. Тобто, у відповідності до закону Ламберта-Бера та глибини проникнення УФ випромінювання лікування в комбінації з рибофлавіном викликає структурні зміни лише верхніх (250-300 мкм) шарів рогівки.

Крім того, джерело опромінювання розміщують на відстані біля 2 см від рогівки ока, і внаслідок розсіяння світла (принцип Колера) УФ випромінювання не пошкоджує сітківку [4, 5]. Тобто в подальші структури ока, що знаходяться по ходу променів - в ендотелій рогівки, кришталік та сітківку - надходить незначна частина енергії випромінювання, недостатня для їх променевого ураження.

Таким чином, рибофлавін виконує дві функції - сенсibilізатора (утворення АФК) та екрана, що захищає ендотелій, кришталік та сітківку ока від пошкоджуючої дії УФ випромінювання. Крім того, після завершення процедури рогівка залишається прозорою. Все це свідчить про безпеку цього методу лікування захворювань рогівки ока.

У 80% пацієнтів після вищезазначеної процедури діоптрійна сила рогівки зменшується приблизно на 2 діоптрії, що су-

проводжується покращенням гостроти зору та припиненням прогресування хвороби. Уже є шестирічні спостереження, які вказують на тривалий позитивний ефект такого лікування цієї категорії хворих [6].

На основі біомеханічних та інших методів дослідження рогівки ока людини та експериментальних тварин показано, що колаген під впливом рибофлавіну та УФ випромінювання набуває нових властивостей, які прямо або опосередковано, але однозначно свідчать про виникнення додаткових міжмолекулярних зв'язків. Конкретно виявлені такі зміни властивостей колагену рогівки ока: підвищення міцності, температури зморщування та резистентності до ферментів, зокрема протеолітичної дії, збільшення діаметру колагенових волокон, зменшення набухання білка та інші [4, 7].

Біохімічні зміни, які відбуваються під час «зшивки колагену» з використанням комбінації «УФ випромінювання + рибофлавін», можна поділити на три етапи: 1) виникнення АФК; 2) дія АФК на амінокислоти, що входять до складу колагену; 3) реакції поперечного зшивання двох ланцюгів колагену за допомогою залишків активованих амінокислот.

#### Виникнення активних форм кисню

Рибофлавін (його структурна формула наведена на рис. 1) має властивість поглинати УФ випромінювання та переходити у збуджений стан - спочатку у синглетний рибофлавін-радикал (<sup>1</sup>РФ<sup>\*</sup>), а потім у триплетний рибофлавін-радикал (<sup>3</sup>РФ<sup>\*</sup>): РФ + УФ > <sup>1</sup>РФ<sup>\*</sup> > <sup>3</sup>РФ<sup>\*</sup>. Останній реагує з молекулярним киснем, перетворюючи його в активні форми - триплетний (<sup>3</sup>О<sub>2</sub>) та синглетний (<sup>1</sup>О<sub>2</sub>) кисень: [<sup>3</sup>РФ<sup>\*</sup>] + О<sub>2</sub> > <sup>3</sup>О<sub>2</sub> > <sup>1</sup>О<sub>2</sub>.

Показано, що при взаємодії рибофлавіну з УФ випромінюванням на довжині хвилі 365 нм виникають, крім синглетного кисню, інші АФК - супероксидний аніон-радикал (<sup>•</sup>О<sub>2</sub><sup>-</sup>) та перекис водню (Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>), а циклічна частина рибофлавіну руйнується з утворенням 3-метоксисаліцилової кислоти [8].

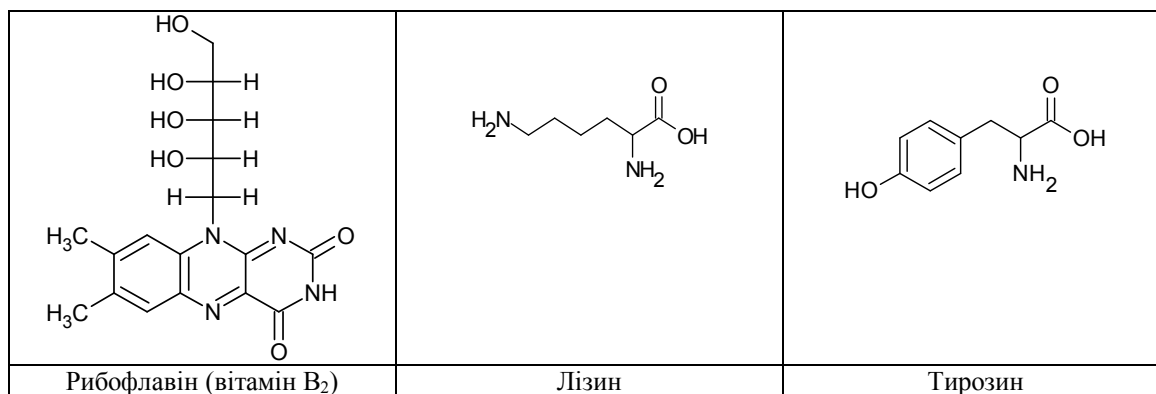


Рис. 1. Структурні формули рибофлавіну, амінокислот лізину та тирозину

### Дія активних форм кисню на амінокислоти, що входять до складу колагену

На рис. 2 наведено приклад такої дії - окисне дезамінування лізину ( $-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{O} > -\text{CHO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3$ ) з утворенням реакційно активної альдегідної групи.

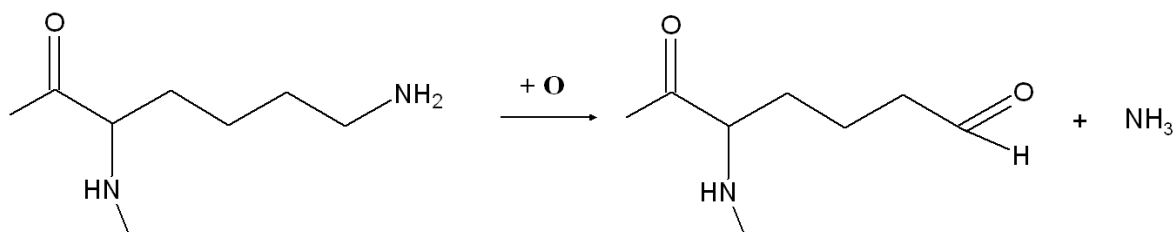


Рис. 2. Окисне дезамінування лізину з утворенням реакційно активної альдегідної групи

### Реакції поперечного зшивання двох ланцюгів колагену за допомогою залишків активованих амінокислот

*Утворення імінів.* Реакція відбувається між залишком лізину, що належить

одному ланцюгу, та залишком альдегіду лізину, що належить іншому ланцюгу. Внаслідок реакції утворюється міцний ковалентний зв'язок між ланцюгами двох молекул колагену (рис. 3).

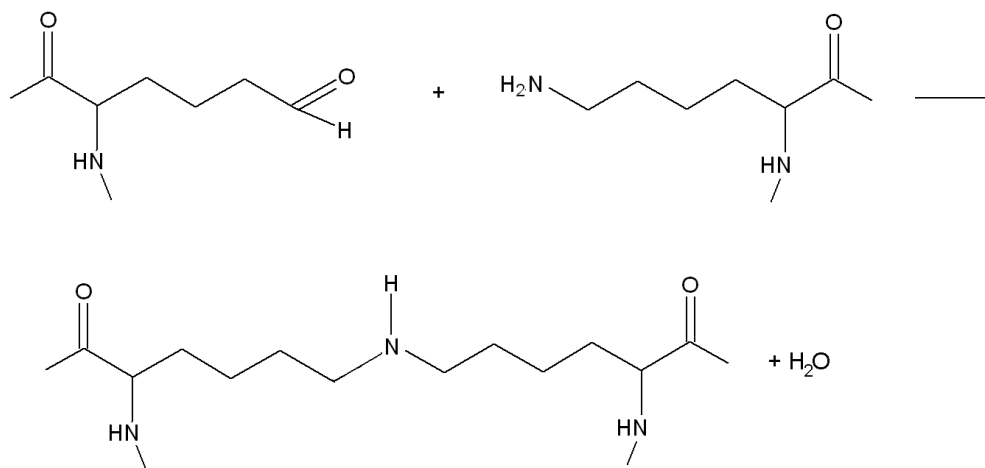


Рис. 3. Утворення ковалентного зв'язку між ланцюгами двох молекул колагену

*Реакція альдольної конденсації альдегідів.* Реакція відбувається між двома залишками альдегідів лізину, що належать

двома різними ланцюгами (молекулами) колагену, внаслідок чого між ними також утворюється міцний ковалентний зв'язок.

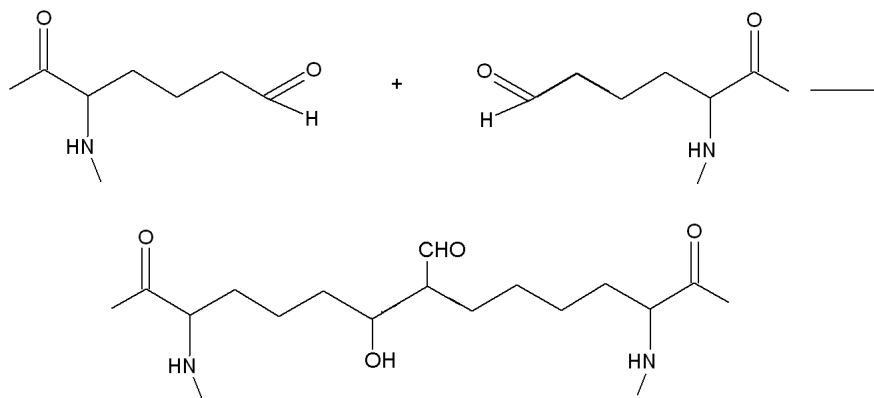
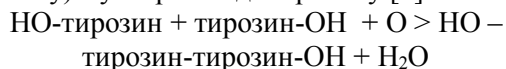


Рис. 4. Реакція між двома залишками альдегідів лізину

*Утворення дитирозину.* Крім залишків лізину, в реакціях зшивання ланцюгів колагену за допомогою УФ випромінювання та рибофлавіну можуть приймати участь також залишки тирозину (димеризація тирозину) з утворення дитирозину [4].



У даному випадку відбувається пряме зшивання ланцюгів колагену без утворення проміжних продуктів.

#### Репаративні зміни в рогівці після фототерапії УФ випромінюванням

Як було сказано вище, зшиванню колагенових волокон за допомогою рибофлавіну та УФ випромінювання передують деепітелізація поверхні рогівки ока діаметром 7-8 мм. Реепітелізація, тобто відновлення епітеліального шару, відбувається дуже швидко і закінчується протягом 5 діб після процедури лікування. Упродовж цього часу пацієнти відчувають біль, яка зменшується після застосування корнерегеля та інших лікарських засобів [4].

Більш серйозні зміни відбуваються в стромі рогівки ока, особливо в її передній частині - до глибини біля 300 мкм, де щільність потужності випромінювання сягає 0,35 мВт/см<sup>2</sup>. Мабуть, під впливом УФ випромінювання відбувається пошкодження кератоцитів, і через 6 тижнів кератоцити у передній стромі не виявляються.

В дослідках на культурі клітин *in vitro* було виявлено, що поріг пошкодження клітин УФ випромінюванням дорівнює щільності потужності 0,45 мВт/см<sup>2</sup> [1]. Відновлення кількості кератоцитів рогівки відбувається шляхом міграції клітин з лімбу і закінчується у пацієнтів протягом 6 місяців після лікувальної процедури [9].

Можна припустити, що загибель кератоцитів (шляхом апоптозу), яка відбувається при дії на рогівку ока УФ випромінювання та рибофлавіну [1], спричинена не тільки цими факторами, але й пошкоджуючим впливом АФК, що при цьому виникають. Дійсно, оксидативний стрес за участю АФК можна вважати загальнобіологічним фактором - стимулятором апоптозу [10]. Висловлена думка, що боротьба з АФК може запобігати апоптичній загибелі клітин сітківки ока [11].

У цілому після процедури лікування ускладнення виявляються приблизно у 2% пацієнтів і проявляються незначними тимчасовими помутніннями рогівки ока, які істотно не впливають на її прозорість. У зв'язку з цим лікування захворювань рогівки ока за допомогою УФ випромінювання та рибофлавіну вважають безпечною процедурою.

Авторами цієї роботи видозмінена методика фототерапії захворювань рогівки ока (терапія УФ випромінюванням з іншими фотосенсибілізаторами - донорами кисню) [12, 13] і одержані позитивні результати лікування дистрофії та запальних процесів рогівки, що будуть предметом окремого повідомлення.

#### Література

1. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope // *Curr. Opin. Ophthalmol.*- 2006.- №17.- P.356-360.
2. Салдан И.Р. Изменение оптических параметров полиметилметакрилата под влиянием химических и физических воздействий / И.Р.Салдан, Е.С.Смолинский, В.Г.Петрук, Л.Родригес // *Офтальмологический журнал.*- 1991.- №2.- С.110-112.
3. Schilde T. Enzymatischer Nachweis der

Tiefenabhängigkeit der Vernetzungswirkung von Riboflavin/UVA an der Hornhaut / T.Schilde, M.Kohlhaas, E.Spoerl et al. // Ophthalmologie.- 2008.- Bd.105.- S.165-169.

4. Kohlhaas M. Kollagen-Crosslinking mit Riboflavin und UVA-Licht beim Keratokonus // Ophthalmologie.- 2008.- Bd.105.- S.785-793.

5. Spoerl E. Biophysikalische Grundlagen der Kollagenvernetzung / E.Spoerl, F.Raiskup-Wolf, L.E.Pillunat // Klin. Monatsbl. Augenheilkund.- 2008.- Bd.225.- S.131-137.

6. Raiskup-Wolf F. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A light in keratoconus. Long term results / F.Raiskup-Wolf, A.Hoyer, E.Spoerl et al. // J. Cataract. Refract. Surg.- 2008.- Vol.34.- P.796-901.

7. Kohlhaas M. Biomechanical evidence of the distribution of crosslinks in the riboflavin/UVA-light treated cornea / M.Kohlhaas, E.Spoerl, T.Schilde et al. // J. Cataract. Refract. Surg.- 2006.- Vol.32.- P.279-283.

8. Ramu A. The riboflavin-mediated photooxidation of doxorubicin / A.Ramu, M.M.Mehta, J.Liu et al. // Cancer. Chemometr. Pharmacol.- 2000.- Vol.46 (6).- P.449-458.

9. Mazzotta C. 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 / C.Mazzotta, A.Balestrazzi, C.Traversi et al. // Cornea.- 2007.- Vol.26, №4.- P.390-397.

10. Gadjev I. Programmed cell death in plants: New insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide / I.Gadjev, J.M.Stone, T.S.Gechev // Int. Rev. Cell. Mol. Biol.- 2008.- Vol.270.- P.87-144.

11. Harada C. Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1)-mediated signaling pathway during ischemic retinal injury // Nippon Ganka Gakkai Zasshi.-2008.- Vol.112 (11).- P.965-974.

12. Патент №33520 UA. МКВ А 61 В 5/02. Оптико-електронний пристрій дослідження дна ока / Й.Р.Салдан, С.В.Павлов, Ю.Й.Салдан, І.В.Шевчук - № у 2008 02442; заявл. 25.02.2008; опубл. 25.06.2008.- Бюл. №12.- 3 с.

13. Патент №36407 UA. МКВ А 61 В 5/02. Оптико-електронний пристрій дослідження дна ока / Й.Р.Салдан, С.В.Павлов, Ю.Й.Салдан, М.П.Бакало - № у 2008 06334; заявл. 13.05.2008; опубл. 27.10.2008.- Бюл. №20.- 3 с.

#### ФОТОТЕРАПІЯ ЗАБОЛЕВАНІЙ РОГОВИЦЬ ГЛАЗА

И.Р.Салдан, М.Б.Луцюк, Ю.И.Салдан, О.В.Ильченко, Д.О.Некрут

Кафедры глазных болезней и микрохирургии глаза, биохимии и общей химии  
Винницкого национального медицинского университета им. Н.И.Пирогова

*В статье представлен аналитический обзор литературы о фототерапии заболеваний роговицы ультрафиолетовым (УФ) излучением. Представлены современные данные о биохимических механизмах, лежащих в основе изменения структуры коллагена роговицы в результате химических преобразований рибофлавина под действием УФ излучения с длиной волны 365 нм.*

**Ключевые слова:** ультрафиолетовое излучение, роговица, сшивка коллагена.

#### PHOTOTHERAPY OF CORNEA DISEASES

J.R.Saldan, M.B.Lutsyuk, Yu.J.Saldan, O.V.Ilchenko, D.O.Nekrut

Eye diseases, Eye microsurgery, Biochemistry and General chemistry Departments  
of the M.I.Pirogov Vinnitsa National Medical University

*In the paper the analytic review of literature is presented about an phototherapy of cornea diseases by means of ultraviolet (UV) radiation. Modern information is pointed about biochemical mechanisms which are under laid change of structure of collagen of cornea as a result of riboflavin chemical transformations under UV radiation with wavelength of 365 nm action.*

**Ключові слова:** ultraviolet radiation, cornea, collagen-crosslinking.

© Й.Р.Салдан, М.Б.Луцюк, Ю.Й.Салдан, О.В.Ильченко, Д.О.Некрут, 2009