

УДК 543.42, 617.713-007.64, 617.713-089

## Фотофизические аспекты кросслинкинга роговицы. Проблемы и перспективы (обзор)

© 2020 г. **В. А. СЕРЕБРЯКОВ\***, ДОКТОР ФИЗ.-МАТ. НАУК;  
**Э. В. Бойко\*\***, \*\*\*\*\* , ДОКТОР МЕД. НАУК;  
**В. Г. Маслов\*\*\*\*\***, ДОКТОР ФИЗ.-МАТ. НАУК;  
**М. В. Мелихова\*\***; **Г. В. Папаян\*\*\***, \*\*\*\* , КАНД. ТЕХ. НАУК

\*Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова, Санкт-Петербург

\*\*МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», Санкт-Петербург

\*\*\*СПГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

\*\*\*\*ФЦ сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

\*\*\*\*\*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

\*\*\*\*\*Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: serebryakov@hotmail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020

DOI:10.17586/1023-5086-2020-87-08-21-40

В обзоре рассмотрены различные аспекты кросс-линкинга роговицы, преимущественно, с точки зрения протекающих в нём фотофизических процессов, включая сравнение с фотодинамической терапией. Это позволило провести более глубокий анализ процессов кросс-линкинга, оценить проблемы и указать пути повышения эффективности и сокращения длительности процедуры лечения.

**Ключевые слова:** кросс-линкинг, рибофлавин, коллаген, протеогликан, фотодинамическая терапия, субстрат клетки, внеклеточный матрикс.

**Коды OCIS:** 170.4470, 170.5180, 340.7460.

### ВВЕДЕНИЕ

Одно из относительно новых, но уже завоевавших признание клиницистов применений методов фотодинамического воздействия на биоткань, наряду с фотодинамической терапией (ФДТ), является их использование для лечения эктатических заболеваний роговицы [1, 2]. Эктазию роговицы (кератоконус, пеллюцидная краевая дегенерация, эктазия после LASIK-коррекции зрения) характеризует её прогрессирующее истончение, связанное с патологическими изменениями решётчатой структуры стромального коллагена. Оно ведёт к выпячиванию роговицы, нерегулярному

астигматизму и снижению остроты зрения. К тому же, что также не менее важно, кератоконус (двусторонняя, асимметричная дегенерация роговицы) — один из наиболее распространенных видов эктазии, обычно наблюдается у молодых людей в возрасте от 10 до 20 лет. Существует ряд методов, направленных на борьбу с последствиями развития эктазии: использование очков, мягких и/или жёстких газопроницаемых внутрироговичных колец. И, хотя развитие кератоконуса обычно прекращается после 40 лет, у более 20% пациентов он приводит к необходимости трансплантации роговицы.

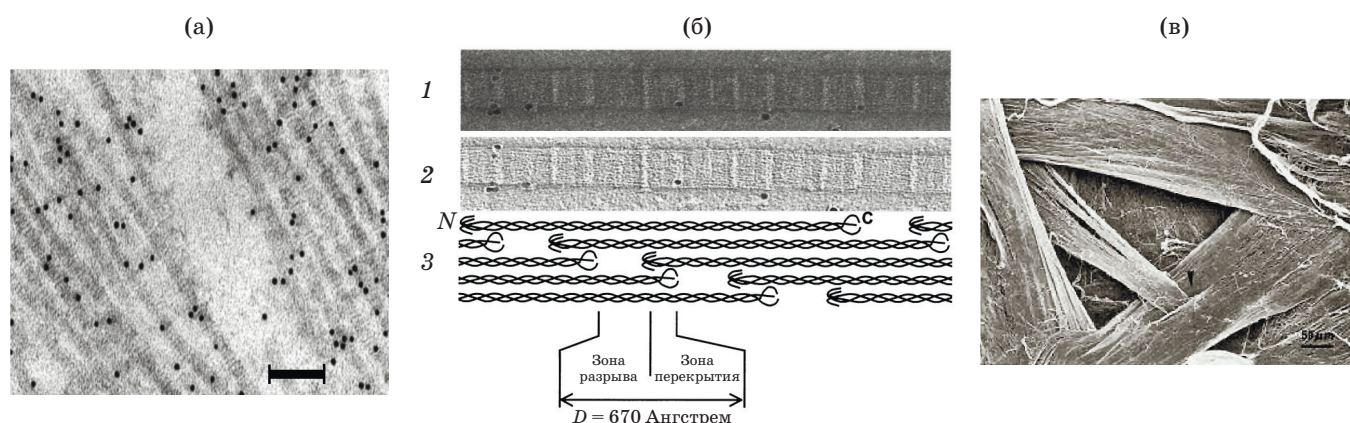
Кросс-линкинг (Corneal Cross-Linking, CXL) — «сшивание» роговицы, в настоящее время является единственной процедурой неинвазивного лечения роговицы, а не только последствий её нарушения [3–5].

Роговица — прочная, прозрачная передняя часть глазной системы (толщина в норме 400–625 мкм) является основной преломляющей поверхностью глаза, обеспечивающей до 75% его фокусирующей способности, а также защиту его внутренних структур. Эти функции реализуются строением роговицы, состоящей из трёх основных слоёв: эпителия, стромы и эндотелия. Эпителий — наружная многослойная клеточная структура, толщиной порядка 50 мкм, выполняет защитную функцию. Эндотелий — внутренний монослой уплощённых клеток, толщиной около 5 мкм, отвечает за прозрачность роговицы, поддерживая её в слабо дегидрированном состоянии (дисфункция эндотелия может привести к отеку стромы). Строма, составляющая около 90% общей толщины роговицы, состоит из слоёв коллагеновых фибрилл (рис. 1а), погружённых в богатый протеогликанами (PG) внеклеточный матрикс (78% воды). Структура коллагена в строме организована иерархически. В её основе лежит трёхспиральная молекула ( $\varnothing 1,5 \times 280$  нм), обладающая большой прочностью на растяжение (рис. 1б).

Самосборка с последовательным сдвигом (осевая периодичность  $D = 67$  нм) пяти таких

молекул образует микрофибриллы, которые, в свою очередь, скручиваются в фибриллы  $\varnothing 30$  нм. Фибриллы образуют ламели толщиной 0,2–2,5 мкм и шириной 10–300 мкм. В строме 200–250 ламелей с параллельными друг другу фибриллами, в отличие от непрозрачной, более плотной склеры. Ламели переплетаются между собой, достигая других слоёв (рис. 1в), что повышает прочность роговицы. Между ламелями расположены плоские клетки кератоцитов, участвующих в синтезе коллагена. Прозрачность роговицы в значительной мере определяется малым диаметром и близким расположением (20–30 нм) фибрилл, которое поддерживается их взаимодействием с межфибриллярными субстанциями внеклеточного матрикса (протеогликаны и гликопротеины, молекулы коллагена, неколлагеновые структурные белки и др.). Предполагается, что протеогликаны, прикрепляясь своими белковыми основаниями к коллагеновым молекулам фибрилл, действуют как межфибриллярные разделители. При этом их гликозамино-гликановые цепочки (GAG) образуют вокруг фибрилл гидрофильное покрытие, участвующее в регулировке активности воспалительно-пролиферативных реакций в строме [9].

При кератоконусе роговица, постепенно истончаясь, под действием внутреннего давления приобретает всё более аномальную



**Рис. 1.** Микроструктура роговицы. (а) Электронная микрофотография стромальных коллагеновых фибрилл, с прикрепленными протеогликами (маркировка чёрными точками). Масштаб 200 нм [6]. (б) 3D реконструкция ламели. (1, 2) Электронная томография. Чередующиеся светлые и тёмные полосы соответствуют зонам зазора и перекрытия молекул коллагена в микрофибрилле. (3) Виртуальная топография осевого расположения 12 молекул фибрилл с D-периодом, как в (1, 2) [7]. (в) Электронная микрофотография срединного слоя парацентральной области роговицы [8] (с разрешения правообладателя, предоставлено проф. W. Radner).

кривизну, искажая зрение [6]. CXL повышает биомеханическую прочность роговицы и её устойчивость к ферментативному расщеплению путём создания в строме поперечных связей внутри и между коллагеновых фибрилл. И хотя CXL не является окончательным лечением эктазии, но это эффективная процедура для остановки заболевания. В течение предыдущих двух десятилетий успешно развивается методика CXL, основанная на фотодинамическом воздействии УФ-А облучения (315–400 нм) на структуры внеклеточного матрикса (УФ-А CXL) [3, 4]. Эта методика во многом схожа с «классической» ФДТ, широко используемой в клинической онкологии. Основное их различие связано с исключением повреждения клеток в CXL, благодаря введению так называемого Дрезденского протокола [1] (одобрен FDA (США) в 2016 г.). При этом усилия разработчиков в последнее время направлены, в основном, на повышение эффективности процедуры лечения, включая уменьшение её длительности, и снижение неблагоприятных для пациента эффектов в процессе CXL (удаление эпителия, светобоязнь и др.). В то же время, кинетика CXL на молекулярном уровне ещё до конца не определена [5, 9].

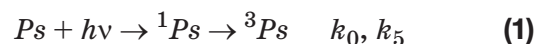
Особенность данного обзора состоит в рассмотрении процедуры CXL, преимущественно с точки зрения протекающих в нём фотофизических процессов. Сравнение CXL с ФДТ позволяет провести более глубокий анализ возникающих проблем и понять возможные пути их решения.

## ФДТ. ПРИНЦИП И ПРОБЛЕМЫ

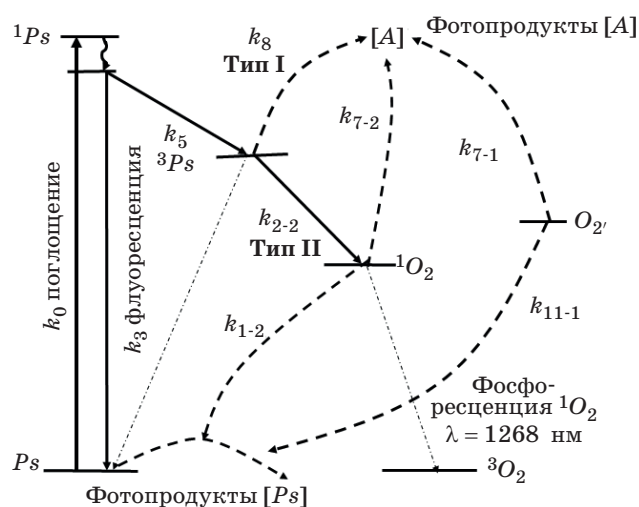
Многие биомолекулы недостаточно чувствительны к прямому воздействию видимого или УФ-А излучения. Однако в присутствии фотосенсибилизаторов (Фс) и молекулярного кислорода ( $O_2$ ) они могут проявлять активность в ходе фотохимических реакций. ФДТ, как метод лечения злокачественных и доброкачественных новообразований, использует свет для активации молекул Фс, индуцирующих, в свою очередь, цитотоксические реакции селективного повреждения патологических клеток [10, 11]. ФДТ одобрена для лечения рака кожи, лёгких, пищевода, предракового актинического кератоза и других заболеваний.

## Фотофизика и фотохимия ФДТ

После системного ввода Фс в организм и его транспорта кровью молекулы Фс первоначально фиксируются на мембране патологической клетки, затем в течение определённого времени проходят внутрь клетки и адсорбируются на мембранах органелл (митохондрии и др.), запуская при освещении фотохимические процессы клеточного апоптоза или некроза [11]. Молекулы Фс поглощают энергию фотона ( $h\nu$ ) в основном состоянии ( $Ps$ ), возбуждаясь до возбуждённого синглетного уровня ( $^1Ps$ ). Часть из них флуоресцирует ( $k_3$ ), а другая — путём интеркомбинационной конверсии (ISC) переходит за время  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  с ( $k_5$ ) в триплетную форму ( $^3Ps$ ) (рис. 2) [12, 13]. Молекула Фс в триплетном состоянии имеет время жизни  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  с, что повышает вероятность подвергнуться дальнейшим химическим реакциям по сравнению с более короткоживущим синглетным состоянием.



Большинство Фс в присутствии кислорода катализируют реакции типа II, создавая синглетную форму кислорода ( $^1O_2$ ). Клетки не имеют специального сенсора для  $^1O_2$  [14]. Однако наличие спаренных электронов на одной орбитали и вакантной второй орбитали позволяет синглетному кислороду обладать



**Рис. 2.** Фотоактивация Фс в присутствии кислорода и биомолекул. ( $k_0$ – $k_9$ ) — константы скоростей реакций (см. табл. в [13]). Цифры -1 и -2 в индексе  $k$  относятся к реакции типа I или типа II.

высокой реакционной способностью, вызывающей гибель клеток и/или фотобиомодуляционные эффекты.



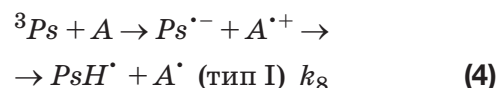
${}^1O_2$  воздействует на рецепторы субстратов клетки-мишени (А) с образованием, как правило, нелюминесцирующих продуктов окисления (фотораспада) клетки (АО).



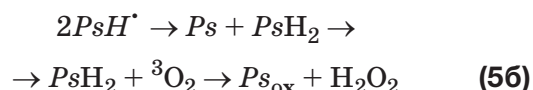
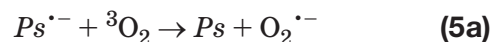
Карбонильные группы являются функциональной доминантой ФДТ типа II [15]. Так, в результате окисления гистидина (с лизином и аргинином входит в группу основных аминокислот белка), являющегося основной мишенью для  ${}^1O_2$ , образуется промежуточный реакционный имидазолон, который, реагируя с аминокислотной группой лизина, создаёт внутри- или межмолекулярную ковалентную связь (АО — фотопродукт (ФП)). При этом окисленные белки могут подвергаться конформационным изменениям, раскручиванию молекулярной спирали (unfolded protein), фрагментации и СХЛ. Эти изменения нарушают функции белка, включая потерю каталитической ферментативной активности, ведущей, в конечном счёте, к гибели клетки. [10]. В то же время, окисленные полисахариды внеклеточного матрикса, взаимодействуя с белками (неферментативная реакция Майяра), создают «сахарные альдегиды» — конечные продукты гликирования, AGE (Advanced Glycation End Product), которые в свою очередь ускоряют окисление белков и формируют с ними необратимые СХЛ-сшивки [16, 17]. Окисление же липидов ведёт к образованию гидропероксида липида, приводящего к повреждению клеточных мембран [10].

С другой стороны, в реакциях типа I (более вероятны при гипоксии)  ${}^3Ps$  создаёт при непосредственном контакте с субстратом клетки радикальные частицы (избыток кислорода, напротив, ингибирует фотополимеризацию, образуя при взаимодействии с радикалами пероксидные молекулы). В реакции типа I (4), не требующей присутствия кислорода, активная форма  ${}^3Ps$  тушится молекулой субстрата клетки (донор электронов), захватывая у неё электрон с созданием анион-радикала Фс ( $Ps^{\bullet-}$ )

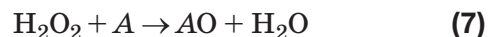
и катион-радикала субстрата. В частности, при содействии Фс с белковыми молекулами (случай бенгальского розового *Rb*), наиболее активной вблизи N-концевых аминокислот лизина (А), его катион-радикал ( $A^{\bullet+}$ ) может создаваться и при полной гипоксии [18]. Последующее депротонирование  $A^{\bullet+}$  создаёт внутри клетки радикал лизина  $A^{\bullet}$ , нарушая его функции в процессе клеточного метаболизма.



На втором этапе реакции (4) в присутствии кислорода анион-радикал  $Ps^{\bullet-}$  может переносить электрон на молекулярный кислород, образуя активный анион-супероксид  $O_2^{\bullet-}$  (5а). Параллельно,  $Ps^{\bullet-}$  преобразуется в гидрированный радикал  $PsH^{\bullet}$ , восстанавливаемый до  $PsH_2$  при высокой концентрации  $Ps$  [3, 12], а восстановленная форма  $PsH_2$  подвергается окислению с образованием перекиси водорода  $H_2O_2$  (5б). При этом, окисленный Фс ( $Ps_{ox}$ ), в отличие от  $PsH_2$ , обладает свойствами и поглощения УФ-А, и сенсibilизации, аналогичными исходному состоянию  $Ps$  (реакция (5б) проходит без истощения Фс).



Высокоактивные окислители  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$ , реагируя с молекулами клетки, также вызывают окисление (повреждение) её субстратов.



В то же время, прямого АФК окисления липидов (реакции 3, 6, 7), которое как предполагается, осуществляет, в частности, повреждение мембран опухолевых клеток [19], как правило, недостаточно для их дисфункции. Даже полное превращение ненасыщенных липидов в гидропероксиды не вызывает сквозного открытия пор, не позволяя, в частности, сахарам проникать через мембрану [10, 20].



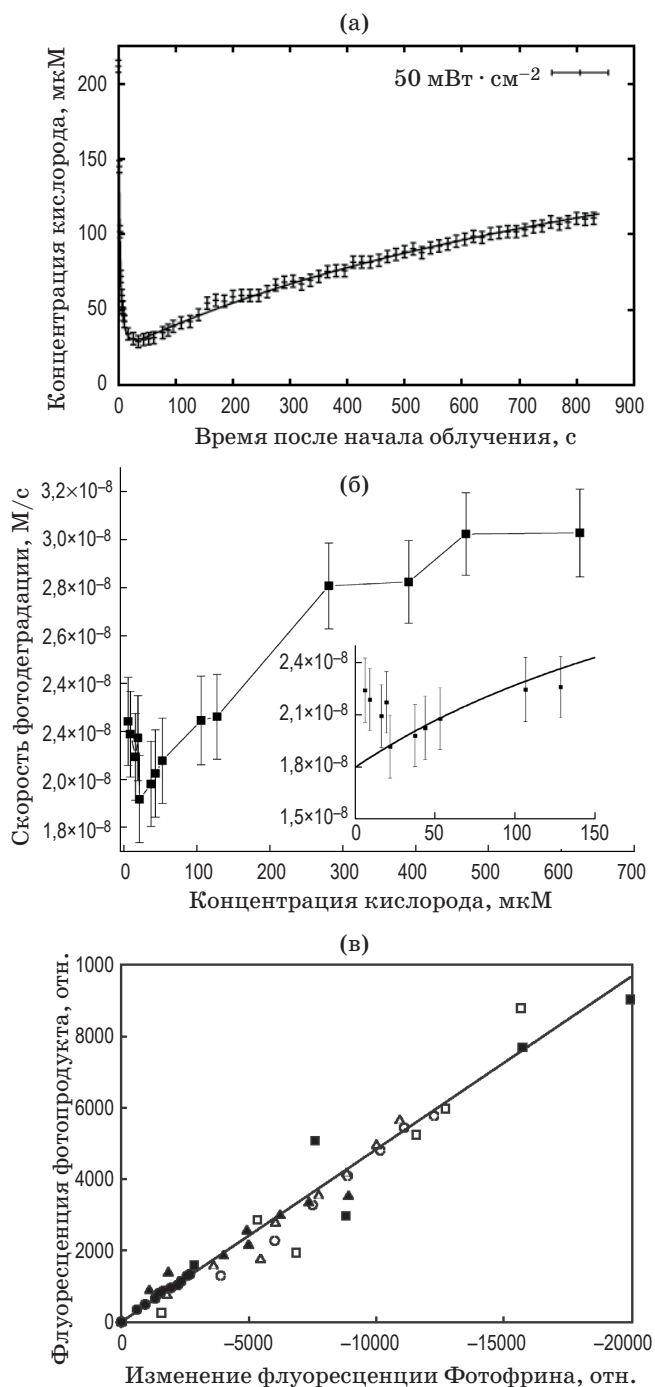
## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФДТ

### Создание фотопродукта и обесцвечивание Фс

При ФДТ освещение поглощённого патологической клеткой Фс запускает фотохимические процессы клеточного апоптоза или некроза. В аэробных условиях первоначальным процессом является прямое окисление субстрата клетки синглетным кислородом, реакция (3). При этом выход фотопродукта коррелирует с обесцвечиванием Фс, идентифицируемое, как снижение сигнала флуоресценции Фс [22–24]. Однако, как показал модельный эксперимент на микросфероидах, окрашенных фотофрином, эта фаза продолжается всего в течение первых двух-трёх десятков секунд облучения (рис. 3а), после чего кислород в них истощается, и для продолжения реакции окисления требуется приток кислорода извне [22]. В живой ткани это зависит от кровоснабжения, а в случае рога — от его диффузии из окружающей среды в строму. Как результат, при недостатке кислорода обесцвечивание замедляется и аэробная реакция типа II (3) плавно переходят в анаэробную реакцию типа I (4). В этих условиях накопление фотопродукта оказывается значительно выше при низкой освещённости Фс, для которой истощение кислорода проще компенсировать его притоком извне, поддерживая постоянным уровень оксигенации, например, в опухолях. И, наоборот, наблюдается снижение накопления фотопродукта при высокой освещённости гипоксических базальных клеток [22].

Переход между реакциями типа I и II из-за наступления гипоксии ткани во время облучения верифицируется также изменением направления скорости обесцвечивания Фс (рис. 3б) [23]. В то же время, наблюдаемая линейная связь между выходом фотопродуктов фотофрина от начальных условий (оксигенации ткани и концентрации Фс) (рис. 3в) [24] предполагает идентичность фотопродуктов, создаваемых, как в высоко-, так и в низкооксигенированных условиях (превалирование реакций окисления (3) над (4)).

Наиболее очевидный подход к пониманию и оптимизации процедуры ФДТ состоит во включении обоих механизмов типа I и II и в моделировании фотохимических процессов и в их метрику.



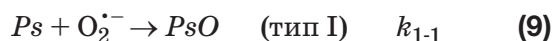
**Рис. 3.** Кинетическая модель механизма ФДТ смешанного типа I–II. (а) Оксигенация окрашенного фотофрином микросфероида во время облучения ( $\lambda_{\text{возб}} = 514$  нм). [22]. (б) Скорость фотодегradации фотогема (флуоресцентный контроль) в зависимости от концентрации кислорода. Во вставке та же зависимость при  $[pO_2]$  менее 20 мкМ [23]. (в) Выход фотопродукта Фс ( $\lambda_{\text{люм}} \text{ ФП} = 655$  нм) в зависимости от обесцвечивания фотофрина ( $\lambda_{\text{флу}} = 627$  нм). Концентрация Фс: кружок — 1 мкг/мл, треугольник — 5 мкг/мл, квадрат — 25 мкг/мл; оксигенация: насыщенная кислородом ткань (светлые значки), гипоксия  $[pO_2]$  более 11,9 мкМ (тёмные значки) [24].

### Механизм фотообесцвечивания Фс

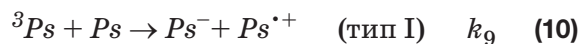
Конкуренция между фотохимическими реакциями типов I и II неизбежна и её результат сильно зависит от концентрации кислорода. При ФДТ опухолей большинство Фс локализуется на мембранах клетки, где парциальное давление кислорода  $[pO_2]$  достаточно высокое, что даёт предпочтение механизму типа II, в отличие от гипоксии внутри клетки, при которой активируются реакции типа I [14, 25, 26]. Для Фс бенгальский розовый (*Rb*) в аэробных условиях ключевым реакционным агентом ФДТ является  $^1O_2$ , (квантовый выход  $\Phi_A = 0,80$ ), в то время, как для других АФК  $\Phi_{АФК} < 0,20$ . Что касается рибофлавина (витамин  $B_2$ ), *Rf*, также применяемого в ФДТ при УФ-А облучении кожи и роговицы, то в ткани, насыщенной кислородом, генерация  $^1O_2$  столь же эффективна ( $\Phi_A = 0,54$  при  $\Phi_{АФК} = 0,01$  для  $[pO_2] = 45$  мкМ), однако она снижается до  $\Phi_A = 0,20$  для  $[pO_2]$  менее 7,5 мкМ [4, 26].

Таким образом, свойства Фс и оксигенация биоткани — факторы, определяющие соотношение между типами реакций ФДТ [12, 13].

Молекулы  $^1O_2$ , активированные в местах локализации молекул Фс, могут за время жизни (40–100 нс) диффундировать до наступления реакции окисления на расстояние до 100 нм [20]. При этом воздействию  $^1O_2$  подвергается относительно небольшой объём ткани, включающий создавшую его молекулу Фс, вернувшуюся в основное состояние *Ps* [24, 28]. Поэтому наряду с повреждением клетки ( $k_{7-2}$ ), идёт, пропорциональное выходу  $^1O_2$  и других АФК, и обесцвечивание Фс (окисление с образованием необратимого продукта *PsO*) [22]



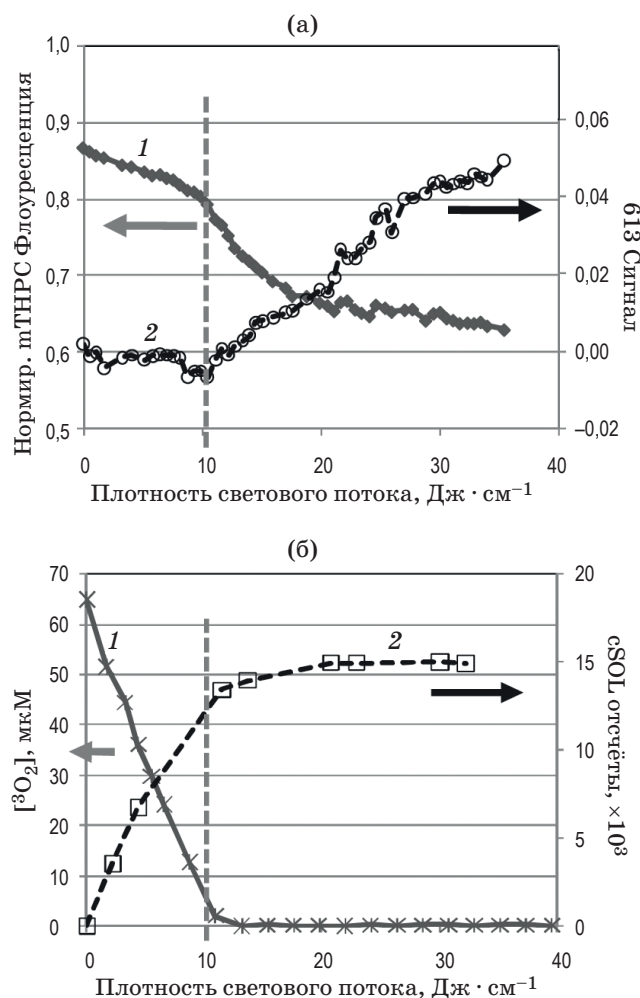
*PsO* обладают значительно более низким поглощением и более слабой люминесценцией по сравнению с Фс, что затрудняет её регистрацию. Причём, она может быть вызвана не только окислением, но и реакцией типа I (10).



Фотофрин показывает люминесценцию фотопродукта при 655 нм в результате окисле-

ния Фс. Метрика на этой длине волны более точна по сравнению с флуоресценцией самого Фс, поскольку исключается самотухнение (формула (10)) смежной молекулой Фс в основном *Ps* или возбуждённом (синглетном или триплетном) состоянии  $^*Ps$  [12, 27].

Так, фотопродукт Фс хлоринового ряда mTHPC (meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin) люминесцирует исключительно в анаэробных условиях (рис. 4а (2)). Эта реакция, как и пассивная агрегация, уменьшающая связывание *Ps* с  $O_2$  (выход  $^1O_2$ ), снижает эффективность ФДТ [27].



**Рис. 4.** Мониторинг ФДТ смешанного типа при использовании mTHPC. (а) Нормализованные сигналы флуоресценции mTHPC при 652 нм (1) и обратимого фотопродукта при 613 нм (2), (б) оксигенации  $[pO_2]$  (1) и концентрации  $^1O_2$  (2) в зависимости от потока облучения. [cSOL] — кумулятивный счёт фотонов фосфоресценции  $^1O_2$  при 1270 нм. Пунктир:  $[pO_2] = 5$  мкМ, где М — моль/л [28].

Как результат, процесс обесцвечивания Фс определяют оба типа реакций [3, 13].

$$d[Ps]/dt = -k_8[{}^3Ps][A] - k_{1-2}[Ps][{}^1O_2] - k_{1-1}[Ps][O_2^{\cdot-}] - k_9[{}^3Ps][*Ps], \quad (11)$$

где  $[Ps]$ ,  $[{}^3Ps]$ ,  $[A]$ ,  $[{}^1O_2]$  и  $[O_2^{\cdot-}]$  — зависящие от времени концентрации  $Ps$ ,  ${}^3Ps$ ,  $A$ ,  ${}^1O_2$  и  $O_2^{\cdot-}$ , а  $(k_1 - k_9)$  — константы скорости реакций между ними (рис. 2).

#### Метрика эффективности ФДТ

Клиническая оценка эффективности процесса ФДТ *in vivo* может быть основана на взаимосвязи между поражением клеток и «дозой» цитотоксичных АФК. При этом результат воздействия АФК на ткань *in vivo* достаточно просто определяется по падению сигнала флуоресценции Фс (реакция (3)), вызванного его деградацией во время облучения [24]. Более того, она позволяет объединить взаимозависимые окислительные процессы ФДТ в одну метрику. Тем не менее, дозиметрия эффективности ФДТ на основе порфиринов (фотофрин и вертепорфин) показала, что метрика фотообесцвечиванием (продуктом окисления) Фс менее точна по сравнению с концентрацией  $[{}^1O_2]$ , поскольку она не учитывает ход реакции (10), вклад которой особенно заметен при истощении кислорода [13, 20]. Однако прямая дозиметрия  $[{}^1O_2]$  (фосфоресценция  $\lambda = 1268$  нм,  $k_6$ , рис. 2) из-за крайней слабости этого свечения требует привлечения техники счёта фотонов, что затрудняет её применение в клинике. Кроме того, при гипоксии её использование проблематично из-за того, что накопление  $[{}^1O_2]$  в опухоли не отслеживает даже качественно ожидаемый отклик на её повреждение [21, 28]. Поэтому для большей точности оценки эффективности ФДТ *in vivo* желательно проводить флуоресцентные измерения, регистрируя одновременно обесцвечивание (деградацию) Фс и относительно более слабый спектрально селективируемый выход фотопродукта в результате окисления Фс, который ассоциируется с повреждением клеток. Так, при оценке фотоповреждения или старения кожи предложено использовать наряду с измерением спада флуоресценции (флу) рибофлавина ( $370_{\text{возб}} / 525_{\text{флу}}$  нм), также люминесценцию (люм) фотопродуктов (ФП) эластина, корре-

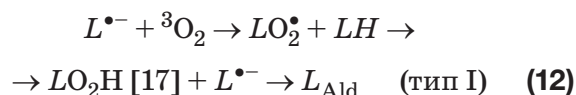
лирующую с реакциями как окисления (3) — ( $440_{\text{возб}} / 520_{\text{люм}}$  ФП нм), так и гликирования (4) — ( $370_{\text{возб}} / 440_{\text{люм}}$  ФП нм) [29, 30].

#### Критерии разделения реакций типа I и II

В аэробных условиях доля реакций типа I (4) в обесцвечивании Фс мала, и концентрация  $[{}^1O_2]$ , реакция (3), определяющая выход фотопродукта АО, пропорциональна тушению флуоресценции Фс (обесцвечиванию) (рис. 3). В развитие модели ФДТ смешанного типа I–II [22, 24, 28] проведён одновременный мониторинг флуоресценции хлорина mTHPC и его фотопродукта, а также степени оксигенации ткани  $[pO_2]$  и накопления  $[{}^1O_2]$  в зависимости от потока облучения (рис. 4) [28].

Как следует из рис. 4а, при плотности светового потока порядка  $10 \text{ Дж/см}^2$  ход кривых 1 и 2 резко изменяется, что вызвано истощением кислорода ( $[pO_2]$  менее 5 мкМ, рис. 4б (1)) и прекращением роста  $[{}^1O_2]$  (рис. 4б (2)). Этот момент соответствует переходу от реакции типа II к реакции типа I. В то же время, критический уровень  $[pO_2]$ , визуализируемый люминесценцией на 613 нм (рис. 4а (2)), совпадает как с началом её роста, так и с изменением скорости выцветания флуоресценции Фс на 652 нм (рис. 4а (1)). Спад флуоресценции Фс в условиях гипоксии предположительно связан с взаимодействием вновь образованной молекулы в возбуждённом состоянии со смежной молекулой Фс в триплетном состоянии (длина волны люминесценции фотопродукта Фс короче длины волны флуоресценции Фс) в результате радикальной реакции (10) типа I [24, 28].

Данный модельный эксперимент наглядно показал границы применимости механизмов ФДТ обоих типов реакций в зависимости от оксигенации биоткани, позволяя прогнозировать повышение эффективности ФДТ и, в первую очередь, за счёт более селективных, радикальных реакций типа I. При этом, безусловный интерес вызывает возможность формирования сквозного повреждения мембран опухолевых клеток путём непосредственного взаимодействия Фс с ненасыщенными липидами мембран [10, 19, 20]. В случае если в качестве субстрата выступают липиды реакция (4) записывается как



Реакционные радикалы липида  $L^{\bullet-}$  запускают многоэтапный процесс генерации усечённых липидных альдегидов  $L_{Ald}$  (продукт), вызывающих полную проницаемость мембран, в отличие от их прямого АФК окисления с образованием лишь недостаточно глубоких (15–20% толщины мембраны) поверхностных пор [20]. Особенность этой цепной реакции в том, что она продолжается и после прерывания облучения, и прекращается только при истощении реагентов (биомолекул или кислорода) [11]. Другой процесс, не наблюдаемый при реакциях механизма типа II, заключается в росте цитотоксичности в гипоксической ткани при радикальных реакциях возбуждённого Фс ( $k_8 \rightarrow k_{7-1}$ ). В частности,  $^3Rf$  в поверхностных слоях кожи инактивирует в бактериях фермент (6-phosphate dehydrogenase), и, что характерно, инактивация усиливается при тушении  $^1O_2$  транс-урокановой кислотой, благодаря снижению деградации Фс ( $k_{1-2}$ ) [26].

С другой стороны, нанометровый масштаб области первоначального воздействия (порядка размера молекулы Фс) значительно меньше зоны активности реакций типа II, определяемой диффузией  $^1O_2$  (ниже вероятность контакта с биоминералом) [20]. Этот недостаток может быть скомпенсирован увеличением сродства Фс с реагентами биоткани в сочетании с существенно большей длительностью анаэробной фазы процесса ФДТ (рис. 3а).

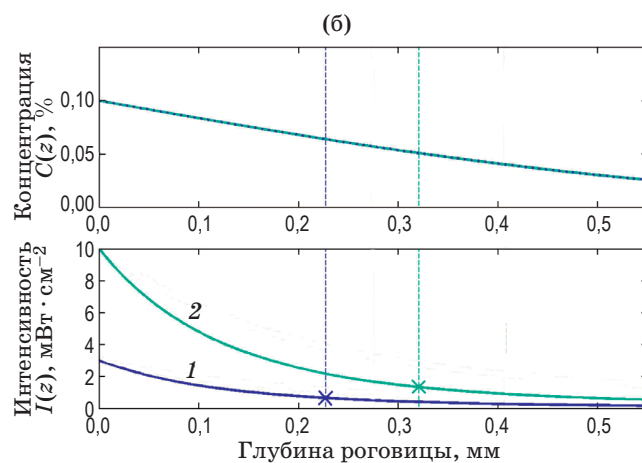
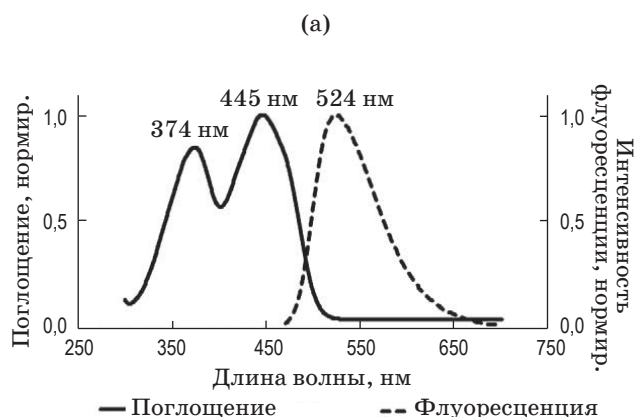
Однако большинство используемых Фс обладает низкой избирательностью к опухоле-

вой ткани, обычно достигающей отношения опухоль/нормальная ткань (2–5), что ведёт, к тому же, к побочным фототоксическим эффектам. Поэтому повышение селективности Фс в его прямых реакциях с биоминералом, дополненное «защитой» от неадекватного обесцвечивания или пост-регенерацией, должно стать приоритетной стратегией разработки новых Фс [20].

К сожалению, многие фундаментальные константы ФДТ реакций, требующиеся при поиске (моделировании) перспективных Фс, как для ФДТ опухолей, так и при изучении фотодинамических процессов в лечении эктазии роговицы, не доступны даже для Фс, применяемых в клинике (табл. 5 в [13]).

### ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ КРОСС-ЛИНКИНГ РОГОВИЦЫ

В настоящее время СХЛ является широко распространённым методом диагностики и лечения роговицы [31–33]. В СХЛ роговицы, основанном на УФ-А возбуждении,  $Rf$  инициирует фотохимические процессы в строме. В отличие от ФДТ, где Фс накапливается на поверхности или внутри патологической клетки, спецификой УФ-А СХЛ является локализация Фс во внеклеточном матриксе, где наличие гликопротеинов усиливает активность фотохимических реакций обоих типов I и II. При этом, концентрация Фс и, соответственно, коэффициент поглощения должны быть



**Рис. 5.** Характеристики  $Rf$  при оптимизации СХЛ. (а) Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции  $Rf$  (концентрация 0,01%,  $T = 20^\circ\text{C}$ ) [36]. (б) Концентрация  $Rf$  (вверху) и интенсивность УФ-А (внизу) как функции глубины роговицы. (1) 0,1%  $Rf$ , УФ-А 3 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 30 мин; (2) 0,1%, 10 мВт/см<sup>2</sup> и 9 мин. Пунктир — граница СХЛ [37].



не слишком высокими, чтобы эффект упрочнения захватывал как можно более толстый слой стромы. Вместе с тем, излучение не должно достигать слоя эндотелиальных клеток, чтобы исключить их повреждение. Пик поглощения  $Rf$  при  $\lambda = 365\text{--}370$  нм считается оптимальным, поскольку в этом случае в отличие от  $\Phi c$ , тестированных при  $\lambda = 430$  нм и 532 нм реализуется полное светопоглощение всей стромой (рис. 5) [27, 34–36].

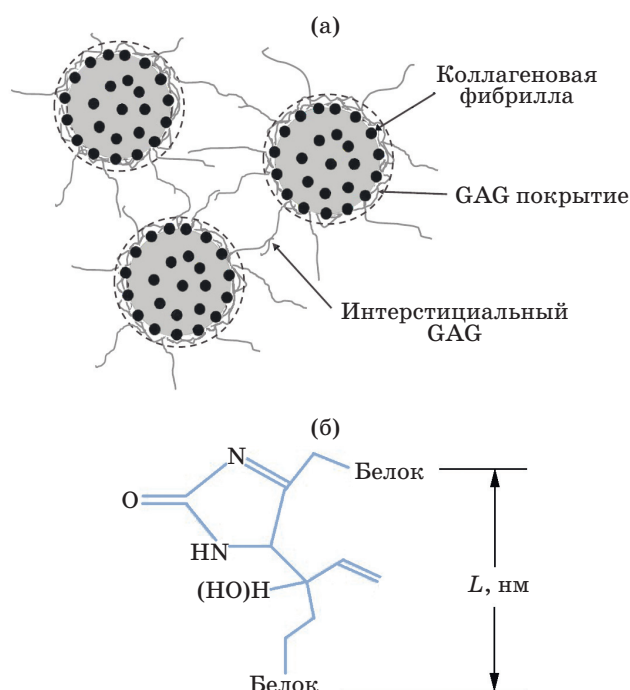
В результате, лечение CXL ограничивается, в основном, передними 300 мкм стромы с адекватной защитой подлежащего эндотелия и сетчатки для предельной лучевой нагрузки  $5,4 \text{ Дж/см}^2$  [35].

### УФ-А CXL

УФ-А, возбуждённый  $Rf$ , взаимодействуя с кислородом и субстратом стромы, создаёт АФК, которые запускают химические процессы формирования CXL, увеличивающие биомеханическую прочность и ферментативную устойчивость роговицы. Три основных ингредиента определяют механизм CXL: доза УФ-А облучения, концентрация  $Rf$  и степень оксигенации стромы. Требуется их оптимизация для снижения рисков процедуры лечения [38–40].

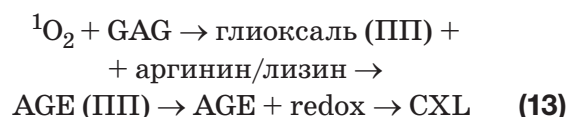
Анализ фотохимии CXL с учётом концентрации  $Rf$  и оксигенации стромы (рис. 5б) показывает, что УФ-А возбуждённые молекулы  $Rf$  выступают, как и при ФДТ, ключевым реагентом CXL, действуя по механизму смешанного типа I–II.

На ранней (аэробной) стадии процесса CXL (реакции типа II) возбуждённый  $^3Rf$  создаёт АФК (в водном растворе квантовый выход  $^1O_2$  49% и  $O_2^{\cdot-}$  1% [41, 42]), подвергающие окислению внеклеточный матрикс стромы. В результате реакции (3) образуются ковалентные связи между смежными молекулами. Карбонильные группы являются функциональной доминантой «коллагенового» CXL между коллагеновыми молекулами фибрилл [43] или между ними и белковыми основаниями протеогликанов, располагающимися на поверхности фибрилл (рис. 1а) [16, 44]. В то же время, особую роль в CXL роговицы играют AGE связи между коллагенами фибрилл и полисахаридами, окружающих их GAG-цепочек протеогликанов, создаваемые в процессе гликирования белков при УФ-А облучении (рис. 6а) [9, 16, 17, 42–46].

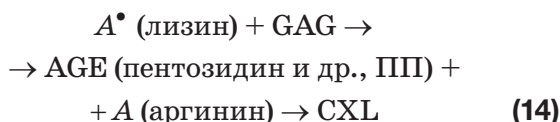


**Рис. 6.** Схематическое изображение: (а) стромальных коллагеновых фибрилл с пористым покрытием из прикреплённых к ним протеогликанов (пунктир) с ассоциированными молекулами GAG внеклеточного матрикса [9, 45]; (б) возможного сшивания AGE с белками. Нанометровый масштаб сшивки ( $L$ ) показывает дистанцию взаимодействия между белковыми молекулами при CXL.

Как известно, при диабете процесс гликирования, стимулирующий реакции окисления белков, ведёт к повреждению ткани за счёт роста необратимых продуктов (AGE). Накопление AGE наблюдается при образовании катаракты, в процессе развития ретинопатии, нефропатии, невропатии, патологии соединительной ткани, тромбоэмболии и атеросклерозе [47]. Альтернативно, окисленный синглетным кислородом GAG стромы, взаимодействуя с белками фибрилл через промежуточный продукт (реакционный глиоксаль), может создавать AGE. В свою очередь, AGE формирует CXL, либо после ряда окислительно-восстановительных реакций внутри белковой молекулы, либо ковалентно связываясь с аминокетонами других белковых молекул фибрилл или протеогликанов [16, 46], рис 6б:

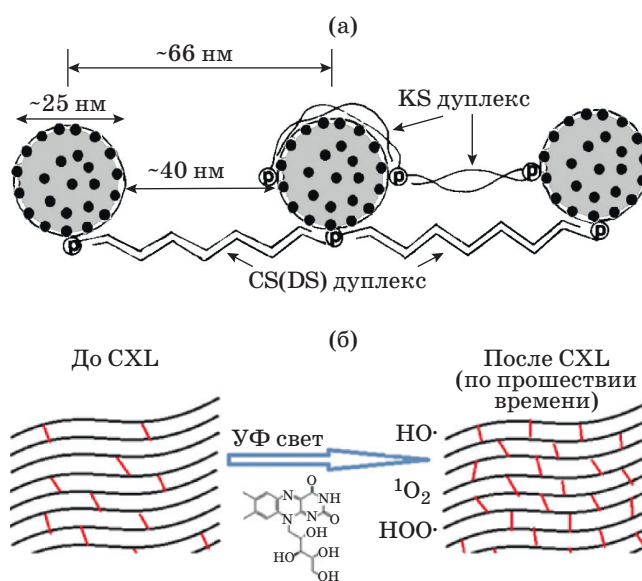


В другой, анаэробной фазе преимущественными в механизме CXL становятся фотохимические реакции (4) между  $^3Ps$  и широким кругом донор-электронных субстратов стромы [38–40]. Эти реакции, не игравшие заметной роли в ФДТ, при CXL роговицы образуют ковалентные сшивки (белок–белок) за счёт ионной связи свободных аминогрупп с карбоксильными группами коллагенов [48, 49].



Белковые CXL обоих типов реакций (13) и (14) повышают прочность стромы (показана прямая зависимость между её ферментативной устойчивостью и концентрацией вновь образованных CXL-сшивок [3, 38]). Однако они создаются, наиболее вероятно, внутри и между крайне тесно расположенных смежных молекул на поверхности фибрилл (длина ковалентной связи лимитирует молекулярный контакт (рис. 6б) [44, 46]. Это подтвердила рентгеновская диагностика [9, 45], которая после CXL не показала изменений, ни диаметра фибрилл, ни сокращения просвета между ними, на любой глубине роговицы. Эти эксперименты опровергают, по крайней мере, до более прецизионных измерений, цитируемую до сих пор [17] концепцию коллагенового УФ-А CXL, включающую формирование при CXL протяжённых коллагеновых связей между фибриллами [50] (результат недостаточно корректной для *ex-vivo* электронно-томографической диагностики стромы [9]).

С другой стороны, CXL эффективно инициируются, например, между лоскутом LASIK и основой стромы, что нельзя приписать созданию ковалентных связей (без или с AGE) только между смежными белковыми молекулами [5, 7]. К тому же, прочность стромы, как нативной [51], так и после CXL [16], существенно снижается в присутствии ингибитора роста продуктов гликации или их ферментативного гидролиза, что свидетельствует о влиянии процессов гликации на механические свойства роговицы [47]. Поэтому предполагается, что сульфатированные GAG-цепочки протеогликанов, вырастая в стороны от фибрилл, образуют внешнюю гидрофильную оболочку, толщина которой определяет



**Рис. 7.** Предполагаемое взаимодействие GAG с коллагенами фибрилл. (а) Схематическое изображение связи GAG с фибриллами [54]. (б) Процесс сшивания коллагеновых фибрилл при УФ-А CXL [56].

требуемый для прозрачности стромы межфибриллярный просвет [52]. К тому же, филаменты GAG способны образовывать периодические CXL с фибриллами и без белкового основания протеогликанов [53]. При этом допускается, что и межфибриллярные, и межламелярные CXL могут создаваться, ковалентно связывая фотоактивированные концевые GAG-домены (рис. 7а) [9, 44, 54, 55]. Подобные GAG–GAG связи, сшивая целые ламели, должны повышать механическую прочность стромы.

Подтверждением межламелярного CXL явилось взаимосвязанное положение фибрилл в склере (рис. 7б), выявленное с помощью сканирующего атомно-силового микроскопа (разрешение несколько Å с учётом неопределённости при диагностике мягкой ткани) [56, 57]. Однако пока нет прямых доказательств ни GAG–GAG сшивок, ни GAG управления просветом между фибриллами.

Тем не менее, *Rf* может активно взаимодействовать с роговицей, создавая CXL по обоим механизмам, в зависимости от оксигенации стромы. Однако одновременно происходит и обесцвечивание *Rf* в результате его реакций с синглетным кислородом или смежным *Rf* в триплетном состоянии [27, 58].

### Специфика метрики CXL *in vivo*

Из-за трудности диагностики биомеханических трансформаций, вызванных CXL, пока нет надёжных способов их оценки *in vivo* [59]. Доступные флуоресцентные методики позволяют, как было показано ранее для ФДТ, получать лишь качественную картину процесса, в том числе, из-за неясного до конца механизма обоих типов фотохимических реакций. Это приводит к отсутствию диагностик, реально отражающих выход CXL (количество и плотность сшивок). Однако существенный, а, возможно, и превалирующий вклад продуктов гликирования в образование (стимулирование) CXL роговицы может позволить создать подобную метрику. Основанием для этого служит корреляция эффективности CXL с выходом продукта гликирования AGE (люминесценция на 440 нм), ускоряющего реакции окисления белков по сравнению с их прямым окислением АФК (реакции (3), (6), (7)) [16, 47, 51]. Однако люминесценция на 440 нм не регистрирует продукты прямого окисления субстрата. Поэтому и эта диагностика тре-

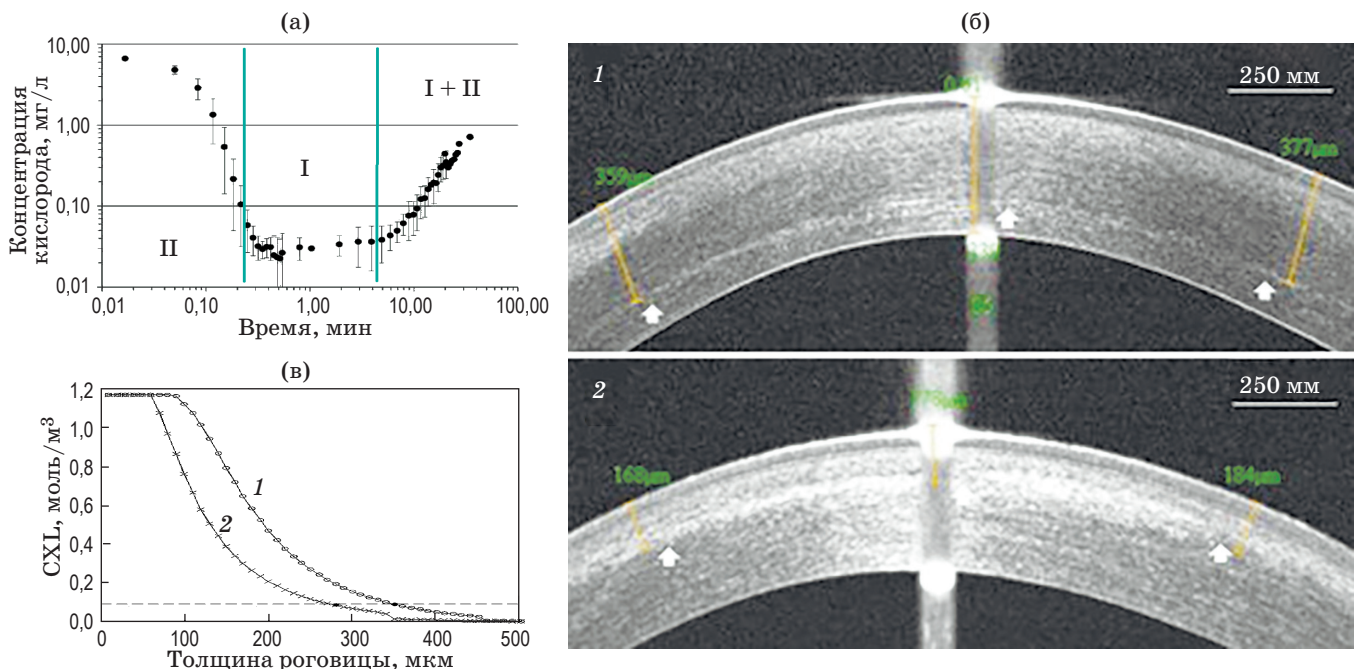
бует верификации, как механической прочностью, так и ферментативной устойчивостью роговицы.

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ УФ-А CXL

#### Золотой стандарт — SCXL (Standard Corneal Cross-Linking)

Дрезденский клинический протокол УФ-А кросс-линкинга роговицы 2003 г. включает в себя хирургическое удаление центрального эпителия ( $\varnothing 9$  мм) с последовательными закапываниями раствора Rf (0,1%) в течение 30 мин до и 30 мин во время УФ-А облучения ( $\lambda = 365\text{--}370$  нм, интенсивность  $3,0 \text{ мВт/см}^2$ , доза  $5,4 \text{ Дж/см}^2$ ). Вся процедура SCXL занимает более 1 часа [60].

В аэробной фазе SCXL реакция окисления субстрата стромы типа II идёт, как и в модели ФДТ (рис. 3а), в течение первых 10–15 с УФ-А облучения (рис. 8а) [40]. Последующие 15 мин длится анаэробная фаза CXL (реакции типа I, (4)→(5)), с крайне малым потреблением  $\text{O}_2$ .



**Рис. 8.** Метрика CXL. (а) Истощение и восполнение  $\text{O}_2$  в строме ниже лоскута роговицы толщиной 100 мкм (УФ-А  $3,0 \text{ мВт/см}^2$ ; Rf 0,1%) [40]. (б) AS-OCT визуализация демаркационной линии стромы через месяц после SCXL (1) и ACXL (2) (стрелки). При SCXL более глубокий CXL, DL = 358 мкм, чем при ACXL ( $30 \text{ мВт/см}^2$  в течение 3 мин), DL = 238 мкм [61]. (в) Глубина CXL в зависимости от протокола ACXL (9 и  $30 \text{ мВт/см}^2$  в течение 14 (1) и 3 (2) мин, соответственно; концентрация Rf 0,1%). Пунктир — демаркационная линия (порог апоптоза кератоцитов). [3].



Однако его быстрое истощение заставляет полагать, что именно  $^1\text{O}_2$  инициирует создание CXL [3]. Поэтому распределение освещённости УФ-А и концентраций  $Rf$  и  $\text{O}_2$  в строме имеют важнейшее значение для оптимизации процедуры лечения. Оставшиеся 15 мин облучения (диффузия  $\text{O}_2$  продолжается) действует смешанный механизм I–II типа.

SCXL доказал свою положительную роль в остановке развития эктазии роговицы с постоперационным наблюдением до 10 лет [62, 63]. Тем не менее, с целью сокращения времени процедуры лечения (основной недостаток SCXL) тестируются различные ускоренные протоколы облучения (ACXL, Accelerated Corneal Cross-Linking) [64, 65].

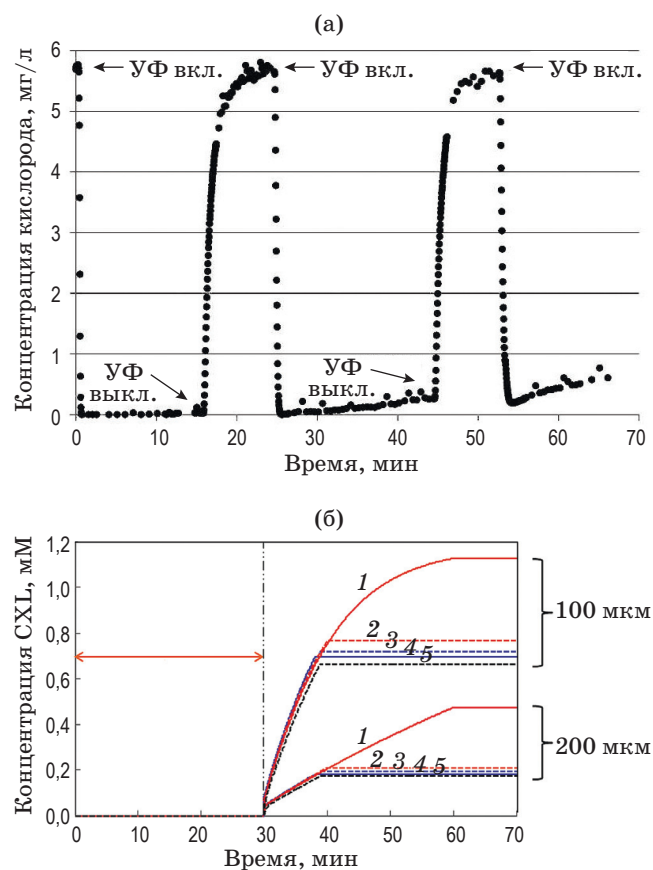
#### Ускоренные протоколы облучения ACXL

Протоколы ACXL основаны на законе фотохимической взаимозаместимости Бунзена–Роско (фотоэффект достигается при уменьшенном времени облучения, если поглощённая энергия поддерживается постоянной [66]). В случае его выполнения, требуемую Дрезденским протоколом дозу облучения ( $5,4 \text{ Дж/см}^2$ ) при существующих в настоящее время УФ-А источниках с интенсивностью  $45 \text{ мВт/см}^2$  можно достичь всего за 2 мин. Для оперативного контроля эффективности ACXL используется оптическая томография [61]. Маркером CXL-лечения кератоконуса роговицы служит демаркационная линия (DL) в томограмме стромы (рис. 8б). Вновь созданные поперечные связи, увеличивая плотность стромы, изменяют её показатель преломления, визуализируемый оптическим когерентным томографом переднего сегмента глаза (AS-OCT). С другой стороны, DL также указывает на границу апоптоза кератоцитов (клетки стромы, поддерживающие прозрачность и рефракцию света в роговице) [67, 68]. Как видно на рис. 8б, глубина DL и, соответственно, объём роговицы, подвергнутый обработке, при ACXL ( $DL = 238 \text{ мкм}$ ) меньше, чем у SCXL ( $DL = 358 \text{ мкм}$ ). Аналогичные зависимости глубины CXL от протокола ACXL показаны на рис. 8в (УФ-А 9 и  $30 \text{ мВт/см}^2$  в течение 14 и 3 мин, соответственно; концентрация  $Rf$  0,1%) [3, 69–71]. Относительно низкая диффузия кислорода в строму осложняет его восполнение в процессе ACXL и, соответственно, снижает эффективность лечения. С целью ускоре-

ния восстановления оксигенации стромы тестировалось также стробирование интервала УФ-А облучения с соответствующим повышением его интенсивности (рис. 9а).

При таком «импульсном» ACXL после короткого времени освечивания уровень  $\text{O}_2$  в строме восстанавливался к следующему импульсу УФ-А [40]. Однако и импульсный ACXL, увеличив на 30–40% поглощение УФ-А, не достиг эффективности SCXL (рис. 9б) [3, 38].

Таким образом, ACXL, включая импульсный, не улучшил процедуру лечения [71], что объясняется нарушением закона взаимозаместимости [72]. Так, увеличение фотообесцвечивания  $Rf$  с ростом потока УФ-А приводит к снижению поглощения света к концу реакции типа II и к уменьшению эффективности последующего процесса CXL типа I.



**Рис. 9.** Ускоренные протоколы CXL. (а) Истощение/восполнение  $\text{O}_2$  в строме при импульсном УФ-А ( $Rf$  0,1%) [40]. (б) Выход CXL, как функция времени на стромальных глубинах 100 и 200 мкм для SCXL (1), ACXL ( $9 \text{ мВт/см}^2$ ) (2) и импульсный CXL (30 и  $100 \text{ мВт/см}^2$ ) (3–5). Стрелка — время диффузии  $Rf$  в строму [3].



Это подтверждает важную роль введения добавок  $Rf$  во время УФ-А облучения, а также высоких начальных концентраций  $Rf$  (рис. 9б) [3, 38, 39], как и при ФДТ. Однако закапывание  $Rf$  во время короткого периода действия ACXL проблематично, в том числе, из-за маскирующего эффекта мениска  $Rf$  на поверхности стромы. Отсюда понятна, кстати, и ещё более низкая эффективность транспилитального CXL, где ниже и диффузия  $O_2$ , и концентрация  $Rf$  по сравнению с SCXL [73–75].

Таким образом, определяющим фактором эффективности процесса CXL для заданной дозы УФ-А облучения является не его интенсивность, а время. При этом временной фактор зависит от скорости диффузии  $O_2$  и кинетики обоих типов фотохимических реакций, которые не могут быть изменены в стандартных операционных условиях (1,0 ГПа, 21%  $O_2$ , 25 °C) [3].

### КИНЕТИКА CXL И КОНЦЕНТРАЦИЯ $Rf$

Успех SCXL-терапии кератоконуса хорошо документирован, хотя минимальное упрочнение роговицы для стабилизации эктазии ещё не установлено, и в частности, из-за длительного постоперационного обновления коллагена стромы [76–78]. К тому же, при наличии буллезной кератопатии (постоянный отёк роговицы из-за дисфункции эндотелия) SCXL не даёт долгосрочного положительного результата. Оценка возможности УФ-А CXL-лечения различных заболеваний роговицы требует лучшего понимания динамики, локализации и функциональности индуцированного сшивания стромы [9]. Однако кинетика УФ-А CXL на молекулярном уровне окончательно не определена [5].

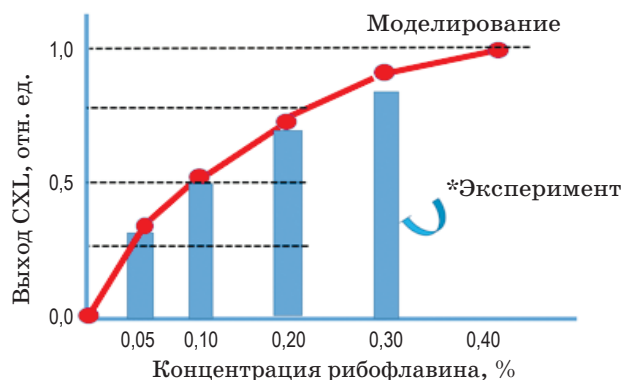
При этом нужно отметить, что, наряду с обширной клиникой (более 1000 статей в период 2003–2019 гг.), базовая кинетика процессов УФ-А CXL ограничена десятком серьезных публикаций (2012–2019 гг.): Камаев и др. [40], Мрохен и др. [37, 79], Карузо и др. [80], Кинг и др. [3], Кочевар и др. [18, 27, 81], Лин и др. [39, 82, 83]). Но и в них, процессы CXL моделировались, предполагая ряд допущений, вызывающих ошибки при оценке эффективности CXL. Как правило, дискутируется механизм CXL типа II с практическим замалчиванием механизма типа I, или рассматривается постоянная, а не истощаемая концентрация  $Rf$ ,

и, к тому же, с плоским профилем, и т.д. [3, 37, 39, 80, 82]. Поэтому неудивительно появление заключения такого рода о якобы неэффективности увеличения мощности УФ излучения, «поскольку ткань роговицы проявляет биохимическую активность, направленную против действия свободных радикалов. При этом повышение концентрации рибофлавина в роговице обратно пропорционально степени связывания фибрилл коллагена» [84].

### Новый подход к процедуре CXL

Альтернативно в работах [40, 82] анализируется возможность создания CXL в том числе на основе прямого взаимодействия возбуждённого  $^3Rf$  с субстратом стромы (реакции типа I), в то время как  $^1O_2$  (тип II) отведена более ограниченная, иницирующая роль в процессе CXL. Поддержку такому подходу оказал недавно выполненный эксперимент О'Брарта и др. [38, 85], объединивший режим ACXL с повышенной по отношению к Дрезденскому протоколу концентрацией  $Rf$ . Увеличение концентрации  $Rf$  с 0,05% до 0,3% при ACXL (9 мВт/см<sup>2</sup>, 10 мин, 5,4 Дж/см<sup>2</sup>) привело к прогрессивному росту ферментативной устойчивости стромы до уровня SCXL (табл.), что коррелирует с результатами моделирования процессов CXL по механизму смешанного типа I–II [39] (рис. 10).

В эксперименте в качестве критерия эффективности CXL верифицирована ферментативная резистентность стромы [37]. Для её оценки измерялись время полного расщепления переднего диска роговицы с помощью



**Рис. 10.** Выход CXL в зависимости от концентрации  $Rf$ . Моделирование CXL по механизму смешанного типа I–II (кривая) [39], эксперимент (столбцы) [38].

### Параметры ферментативной устойчивости стромы в зависимости от концентрации $Rf$ [38]

Концентрация $Rf$ в строме	Время ферментативного расщепления дисков роговицы после CXL, дни			Сухой вес облучённой роговицы через 10 дней после процедуры CXL, мг.	
	$D_{\min}$	$D_{\max}$	$D$	Опыт 1	Опыт 2
Необработанный	6	10	8 ( $\pm 2$ )	0	0
0,05% $Rf$ /УФ-А	36	40	39 ( $\pm 2$ )	1,4 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,45
0,1% $Rf$ /УФ-А	36	42	39 ( $\pm 2$ )	2,5 $\pm$ 0,16	2,68 $\pm$ 0,19
0,2% $Rf$ /УФ-А	39	45	41 ( $\pm 2$ )	3,4 $\pm$ 0,14	3,42 $\pm$ 0,32
0,3% $Rf$ /УФ-А	38	46	41 ( $\pm 3$ )	4,04 $\pm$ 0,18	3,86 $\pm$ 0,54

пепсина (реагент ферментативной диагностики, расщепляющий и коллаген, и белковое основание протеогликана стромы [86]), а также сухой вес облученной роговицы через 10 дней после процедуры CXL (прямое измерение толщины стромы даёт большую погрешность).

Таблица показывает, что обработанные диски роговицы более устойчивы, чем необработанные. Однако среднее время расщепления существенно не отличалось между CXL обработанными группами с различной концентрацией  $Rf$  из-за меньшей сохраняемости образцов с высокой концентрацией  $Rf$ . Иной результат получен при измерении сухого веса CXL обработанных роговиц, при котором есть чёткая корреляция между весом и концентрацией  $Rf$ . Пока неясно, в какой степени ферментативная устойчивость и рост механической прочности роговицы после CXL ответственны за результативность процедуры лечения, но оба критерия, несомненно, могут использоваться в качестве меры CXL.

Наряду с ростом ферментативной устойчивости, увеличение концентрации  $Rf$  сопровождается ростом поглощения УФ-А, снижая риск повреждения эндотелиальных клеток и обеспечивая возможность лечения тонких роговиц [87]. Кроме того, из-за обесцвечивания  $Rf$  постепенное, начиная с поверхности стромы, снижение его концентрации позволяет УФ-А достичь более глубоких слоёв, где сохраняется концентрация  $Rf$ , достаточная для создания CXL [38, 40, 85, 88].

Таким образом, ускорение процедуры без снижения количества сшивок (увеличение их плотности) по сравнению с клинической SCXL свидетельствует о реальной перспективе оптимизации процесса CXL путём увеличения концентрации  $\Phi$ с и изменения протокола

облучения (уменьшения длительности УФ-А с увеличением его интенсивности, протокол ACXL). Моделирование CXL на основе обоих типов фотохимических реакций показало, что эффективность УФ-А CXL может быть ещё повышена аддитивным иницированием радикальных реакций, а также увеличением времени жизни  $^1O_2$  или триплетного состояния  $Rf$  [83]. Например, использование раствора  $D_2O$  за счёт 10-кратного роста времени жизни  $^1O_2$  даёт возможность уменьшить на порядок концентрацию  $Rf$  при сохранении выхода CXL, позволяя, в свою очередь, поднять концентрацию  $Rf$  в строме ещё выше и соответственно увеличить выход CXL [44].

Аналогичная проблема снижения времени процедуры CXL существует и при лечении инфекционного кератита. Торможение роста бактерий *S. epidermis*, *S. aureus* и *P. aeruginosa* достигнуто за счёт удвоения времени облучения стандартной SCXL с 30 до 60 мин (доза УФ-А с 5,4 до 10,8 Дж / см<sup>2</sup>) [89].

Но, каким образом обнадёживающие результаты оптимизации процедуры CXL с более высокой концентрацией  $\Phi$ с [38] перейдут в её клиническую реальность до проведения дальнейших исследований пока неизвестно [85, 88, 90].

### CXL ИНФЕКЦИОННОГО КЕРАТИТА

Инфекционный кератит — потенциально опасное заболевание роговицы (задержка лечения ведет к значительной потере зрения в 50% случаев). Оно вызывается широким спектром инфекционных агентов (бактерий, грибов, вирусов), которые, попадая в роговицу после её повреждения, активизируют

специфические протеиназы, приводящие к её деградации и утончению. Большинство случаев инфекционного кератита лечится противомикробными препаратами. В то же время, УФ-А CXL демонстрирует положительный эффект и может служить дополнительной терапией при утончении роговицы, минимизируя или позволяя избежать таких осложнений, как её перфорация и рецидив инфекции.

В отличие от ФДТ инфекционных болезней, например, кожи, лечение с помощью УФ-А CXL останавливает инфекционный кератит роговицы (РАСК-CXL, photoactivated chromophore for keratitis CXL), как минимум двумя синергетическими механизмами. Во-первых, УФ-А CXL повышает устойчивость к ферментативному утончению роговицы, в частности, протеолизу нейтрофильными ферментами, участвующими в воспалительных процессах. Во-вторых, явление апоптоза, вызываемого окислением нуклеиновых кислот (ФДТ), убивает не только кератоциты, как отмечалось выше, но также и микробы, что замедляет инфекционный процесс [89]. Однако *Rf* CXL ингибирует ферментативную деградацию и утончение роговицы наиболее активно в первых 100 мкм стромы, где поглощается порядка 50% энергии УФ-А (рис. 56). Таким образом, *Rf* CXL может быть полезен в качестве терапии первой линии для неглубоких инфекций [91, 92]. С другой стороны, частое использование антибиотиков приводит к росту резистентных к лекарствам штаммов бактерий, таких как Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), которые лучше лечатся не одним, а комбинацией двух Фс, в частности *Rf* и *Rb* [89]. Также, но пока без серьёзных успехов ведутся исследования по применению УФ-А CXL для лечения акантамёбного кератита [93].

### БЕНГАЛЬСКИЙ РОЗОВЫЙ В CXL

В качестве альтернативы *Rf* для CXL роговицы рассматривается близкий по фотофизическим свойствам ксантоновый краситель бенгальский розовый (разрешен FDA для диагностики повреждения поверхности роговицы) [17, 27, 81]. *Rb* поглощает при  $\lambda = 550$  нм, но имеет, как и *Rf*, высокий квантовый выход возбуждённого триплетного состояния (в воде больше 0,9), но, к тому же, в 1,5 раза более высокий квантовый выход  $^1O_2$  (0,76). Однако,

в отличие от *Rf*, сродство *Rb* с коллагеном приводит к сильному падению времени жизни триплетного состояния *Rb* и его производных во внеклеточном матриксе (со 100 мкс до 3,5–4 мкс. Это приводит к существенно меньшей диффузии в роговицу до 100 мкм (толщина CXL порядка 30–40 мкм), что показано лишь для тонких роговиц [18]. В то же время, это сродство, ведёт к большей вероятности переноса электронов от аминокислот коллагена к *Rb* с образованием CXL даже при практически полной гипоксии (реакции типа I, (4)). Кроме того, облучаемый видимым светом *Rb* не вызывает апоптоза кератоцитов, как *Rf* [27, 94, 95]. Тем не менее, сравнение *Rb* CXL (0,1% *Rb*, 250 мВт/см<sup>2</sup>, 10 мин, доза 150 Дж/см<sup>2</sup>) с SCXL (доза 5,4 Дж/см<sup>2</sup>) показало существенно более низкий рост прочности стромы после *Rb* CXL при отсутствии возможности стабилизации стромы по глубине, в отличие от не ассоциируемого с коллагеном *Rf* (одинаковые спектры поглощения в растворе PBS и в роговице), более свободно диффундирующего в биоткань [96]. Другие же пригодные для CXL роговицы Фс (порфирины, ксантены, толуидин [89]) не обсуждаются, поскольку они не одобрены для клинической офтальмологии.

Таким образом, пока лишь *Rf* CXL повышает прочность роговицы в объёме установленного клинического лечения. Хотя, согласно систематическому обзору [97] стабилизация эктазии гарантируется только в течение одного года (данные ограничены малым количеством проведённых рандомизированных исследований, осложнённых, в отличие от ФДТ, длительным обновлением CXL обработанного коллагена). Любые клинические оценки занимают месяцы, чтобы стать очевидными, и годы для их стабилизации [62, 63]. Эта же причина затрудняет и поиск перспективных Фс для CXL роговицы [98].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на общность фотофизических процессов при CXL и ФДТ, обусловленную использованием для лечения одних и тех же агентов (фотосенсибилизатор, свет, кислород) их отличает не только целевое назначение (упрочнение вместо разрушения), но и среда, в которой они проходят (внеклеточный матрикс вместо клетки). Эти отличия приводят к тому, что

CXL справедливо рассматривается, как самостоятельный метод.

В то же время, при анализе фотодинамических процессов ФДТ и CXL можно использовать единый подход к трактовке процессов, включающий оба механизма фотохимических реакций типа I и II. Важно отметить, что непосредственное участие фотосенсибилизатора в реакциях типа I с генерацией высокореакционных радикалов вызывает более глубокую трансформацию биоткани, чем прямое окисление синглетным кислородом, что используется в лечении ряда онкологических и инфекционных заболеваний, а также при лечении эктазии роговицы. Однако нанометровый масштаб области первоначального воздействия (порядка размера молекулы фотосенсибилизатора) значительно меньше зоны активности реакций типа II, определяемой диффузией синглетного кислорода (ниже вероятность контакта с биомшенью). Этот недостаток может быть скомпенсирован увеличением сродства фотосенсибилизатора с определёнными компонентами биоткани в сочетании с существенно большей длительностью процесса и, в первую очередь, анаэробного взаимодействия. Поэтому повышение селективности фотосенсибилизатора в прямых реакциях с биомшенью, дополненное его «защитой» от фотообесцвечивания или регенерацией после него, должно стать приоритетной стратегией разработки новых препаратов и протоколов лечения.

Выполненные за последние годы в этом направлении теоретические и экспериментальные исследования CXL роговицы, позволяют

подойти к решению первоочередной проблемы CXL — снижению времени лечения кератоконуса, а, возможно, и инфекционного кератита. Предложен метод, основанный на сочетании высокой концентрации рибофлавина с ускоренным протоколом УФ-А облучения. Результаты тестирования на моделях показали возможность без снижения эффективности уменьшить время облучения со стандартных (SCXL) 30 минут до 10 минут. Эти обнадеживающие результаты должны быть ещё подтверждены последующими, в том числе, клиническими исследованиями.

Следует признать, что дальнейший прогресс УФ-АСXL роговицы тормозит до конца неясное представление о механизме создания межфибриллярных и межламеллярных связей. Предположительно, они отвечают за прочность и стабильность стромальной решётки и, соответственно, за её прозрачность. Недавние исследования показали, что наиболее вероятно организация межфибриллярных CXL идёт путём создания ковалентных связей между фотоактивированными концевыми доменами гликозамино-гликановых (GAG) цепочек протеогликанов. Это ставит под сомнение распространённую точку зрения о том, что при CXL происходит упрочнение стромальных фибрилл с формированием протяжённых межфибриллярных коллагеновых связей. И, хотя пока нет прямых доказательств ни GAG–GAG сшивок, ни GAG управления межфибриллярными просветами, одно уже понятно — кросс-линкинг роговицы — это не только «коллагеновый кросс-линкинг».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *Am J Ophthalmol*. 2003. V. 135(5). P. 620–627.
2. ASCRS Cornea Clinical Committee. Reshaping procedures for the surgical management of corneal ectasia // *Cataract Refract Surg*. 2015. V. 41. P. 842–872.
3. Kling S., Hafezi F. An algorithm to predict the biomechanical stiffening effect in corneal cross-linking // *Refract Surg*. 2017. V. 33(2). P. 128–136.
4. Insinska-Rak M., Sikorski M. Riboflavin interactions with oxygen — a survey from the photochemical perspective // *Chem. Eur. J*. 2014. V. 20. P. 1–13.
5. Gatinel D., MacGregor C., Jawad M. Re-evaluating the effectiveness of corneal collagen cross-linking and its true biomechanical effect in human eyes // *Controversies in the Management of Keratoconus* / Ed. by Barbara A. Springer Nature Switzerland AG, 2019. P. 167–177.
6. Quantock A.J., Young R.D. Development of the stroma, and the collagen–proteoglycan associations that help define its structure and function // *Developmental Dynamics*. 2008. V. 237. P. 2607–2621. <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.21579>



7. Holmes D.F., Gilpin C.J., Baldock C., Ziese U., Koster A.J., Kadler K.E. Corneal collagen fibril structure in three dimensions: Structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization // PNAS. 2001. V. 98(13). P. 7307–7312.
8. Radner W., Zehetmayer M., Aufreiter R., Mallinger R. Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea // Cornea. 1998. V. 17(5). P. 537–543.
9. Hayes S., Kamma-Lorger C., Boote C., Young R.D., Quantock A.J., Rost A., Khatib Y., Harris J., Yagi N., Terrill N., Meek M. The effect of riboflavin/UVA collagen cross-linking therapy on the structure and hydrodynamic behaviour of the ungulate and rabbit corneal stroma // PLoS One. 2013. V. 8(1). e52860. P. 1–12.
10. Dos Santos A.F., de Almeida D.R.Q., Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment — an update review // J Cancer Metastasis Treat. 2019. V. 5(25). P. 1–20.
11. Bacellari O.L., Tsubone T.M., Pavan C., Baptista M.S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 20523–20559.
12. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects // Lasers Med. Sci. 2009. V. 24. P. 259–268.
13. Kim M.M., Ghogare A.A., Greer A., Zhu T.C. On the in vivo photochemical rate parameters for PDT reactive oxygen species modeling // Phys. Med. Biol. 2017. V. 62. P. R1–R48.
14. Uzdensky A.B. The biophysical aspects of photodynamic therapy // Biophysics. 2016. V. 61(3). P. 461–469.
15. Shen H.-R., Spikes J.D., Kopecekova P., Kopecek J. Photodynamic crosslinking of proteins. I. Model studies using histidine- and lysine-containing N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers // J Photochemistry and Photobiology B 1996. Biology 34, P. 203–210.
16. Brummer G., Littlechild S., McCall S., Zhang Y., Conrad G.W. The role of non-enzymatic glycation and carbonyls in collagen cross-linking for the treatment of keratoconus // IOVS. 2011. V. 52(9). P. 6363–6369.
17. McKay T.B., Priyadarsini S., Karamichos D. Mechanisms of collagen crosslinking in diabetes and keratoconus // Cells. 2019. V. 8(1239). P. 1–29.
18. Alarcon E.I., Poblete H., Roh H.G., Couture J.-F., Comer J., Kochevar I.E. Rose bengal binding to collagen and tissue photobonding // ACS Omega. 2017. V. 2. P. 6646–6657.
19. Кудинова Н.В., Березов Т.Т. Фотодинамическая терапия опухолей: иммунологический аспект лечения // Российский биотерапевтический журнал. 2010. Т. 9(1). С. 69–76.
20. Bacilli I.O.L., Baptista M.S. Mechanisms of photosensitized lipid oxidation and membrane permeabilization // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 21636–21646.
21. Yankovsky I. Evaluation of photodynamic activity of chlorine-type photosensitizers with  $\beta$ -cyclodextrin-nanovectors // Thesis. Human health and pathology. Université de Lorraine; Belarussian State University, 2016.
22. Finlay J.C., Mitra S., Patterson M.S., Foster T.H. Photobleaching kinetics of photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 482737–4860.
23. Pratavieira S., Santos P.L.A., Menezes P.F.C., Kurachi C., Sibata C.H., Jarvi M.T., Wilson B.C., Bagnato V.S. Phototransformation of hematoporphyrin in aqueous solution: anomalous behavior at low oxygen concentration // Laser Physics. 2009. V. 19(6). P. 1263–1271.
24. Dysart J.S., Patterson M.S. Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro // Phys. Med. Biol. 2005. V. 50. P. 297–2616.
25. Carreau A., El Hafny-Rahbi B., Matejuk A., Grillon C., Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia // J. Cell. Mol. Med. 2011. V. 15(6). P. 1239–1253.
26. Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Baumler W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers // Biophysical Journal. 2006. V. 91. P. 1452–1459.
27. Redmond R.W., Kochevar I.E. Medical applications of rose bengal- and riboflavin-photosensitized protein crosslinking // Photochemistry and Photobiology. 2019. <https://doi.org/10.1111/php.13126>
28. Jarvi M.T., Patterson M.S., Wilson B.C. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements // Biophysical Journal. 2012. V. 102(3). P. 661–671. (<https://www.cell.com/cms/10.1016/j.bpj.2011.12.043/attachment/a8350dd8-55e4-42b6-9bdc-34412b577c29/mmc1.pdf>. Supplemental Material)
29. Nomoto K., Yagi M., Hamada U., Naito J., Yonei Y. Identification of advanced glycation endproducts derived fluorescence spectrum in vitro and human skin anti-Aging // Anti-Aging Medicine. 2013. V. 10(5). P. 9–100.

30. Beisswenger P.J., Howell S., Mackenzie T., Corstjens H., Muizzuddin N., Matsui M.S. Two fluorescent wavelengths, 440ex/520em nm and 370ex/440em nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes // *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2012. V. 14(3). P. 285–292.
31. Mrochen M., McQuaid R., Lemanski N., Pajic B. Biomechanics of the eye // Kugter Publications, Amsterdam, The Netherlands. 2018. P. 233–244.
32. Маркова Е.Ю., Костенёв С.В., Григорьева А.Г., Перфильева Е.А. Современные тенденции в лечении кератоконуса у детей. Обзор литературы // *Офтальмология*. 2017. Т. 14(3). С. 188–194.
33. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросс-линкинг роговицы // *Вестник РАМН*. 2016. Т. 71(3). С. 224–232.
34. Andreanos K.D., Hashemi K., Petrelli M., Droutsas K., Georgalas I., Kymionis G.D. Keratoconus treatment algorithm // *Ophthalmol Ther*. 2017. V. 6(2). P. 245–262.
35. Sachdev G.S., Sachdev M. Recent advances in corneal collagen cross-linking // *Indian J Ophthalmol*. 2017. V. 65(9). P. 787–796.
36. Gore D.M., Margineanu A., French P., O'Brart D., Dunsby C., Allan B.D. Two-photon fluorescence microscopy of corneal riboflavin absorption // *IOVS*. 2014. V. 55(4). P. 2476–2481.
37. Schumacher S., Mrochen M., Wernli J., Bueeler M., Seiler T. Optimization model for UV-riboflavin corneal cross-linking // *IOVS*. 2012. V. 53(2). P. 762–769.
38. O'Brart N.A.L., O'Brart D.P.S., Aldahlawi N.H., Hayes S., Meek K.M. An investigation of the effects of riboflavin concentration on the efficacy of corneal cross-linking using an enzymatic resistance model in porcine corneas // *IOVS*. 2018. V. 59. P. 1058–1065.
39. Lin J.-T. Resolving the controversial Issues and optimal new protocols for accelerated corneal cross-linking (CXL) // *Med Surg Ophthalmol Res*. 2018. V. 2(3). P. 1–6.
40. Kamaev P., Friedman M.D., Sherr E., Muller D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin // *IOVS*. 2012. V. 53(4). P. 2360–2367.
41. Lin J.-T. A critical review on the kinetics, efficacy, safety, nonlinear law and optimal protocols of corneal crosslinking // *Ophthalmol Vis Neurosci*. 2018. V. 3(1). P. 017–1–10.
42. Criado S., Garcia N.A. Vitamin B2-sensitized photooxidation of the ophthalmic drugs Timolol and Pindolol: kinetics and mechanism // *Redox Report*. 2004. V. 9(5). P. 291–297.
43. Raskup F., Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles // *Ocular Surface*. 2013. V. 11(2). P. 65–74.
44. McCall A.S., Kraft S., Edelhauser H.F., Kidder G.W., Lundquist R.R., Bradshaw H.E., Dedeic Z., Dionne M.J., Clement E.M., Conrad G.W. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA) // *IOVS*. 2010. V. 51. P. 129–138.
45. Hayes S., White T., Boote C., Kamma-Lorger C.S., Bell J., Sorenson T., Terrill N., Shebanova O., Meek K.M. The structural response of the cornea to changes in stromal hydration // *J. R. Soc. Interface*. 2017. V. 14. 0062. P. 1–9.
46. Meek K.M., Hayes S. Corneal crosslinking — a review // *Ophthalmic Physiol Opt*. 2013. V. 33. P. 78–93.
47. Beránek M., Nováková D., Rozsival P., Drsata J., Palicka V. Glycation and advanced glycation end-products in laboratory experiments *in vivo* and *in vitro* // *Actamedica (Hradec Kralove)*. 2006. V. 49(1). P. 35–39.
48. Chirila T., Harkin D.(eds.) Biomaterials and regenerative medicine in Ophthalmology // Woodhead Publishing Series in Biomaterials Book. 2016. P. 159–160.
49. Zholobko O., Tarnavchyk I., Voronov A., Budishevska O., Kohut A., Vornov S. Covalent bond formation in the reaction of glucosamine as monomer unit of chitosan macromolecules and poly(ethylene glycol) disuccinate at elevated temperature // *J. Chitin Chitosan Sci*. 2014. V. 2. P. 299–305.
50. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA // *Cornea*. 2004. V. 23(5). P. 503–507.
51. Spoerl E., Terai N., Raskup F., Pillunat L. Amylase reduces the biomechanical stiffness of the cornea // *IOVS*. 2012. V. 53(14). P. 1531.
52. Kao W.W.-Y., Liu C.-Y. Roles of lumican and keratocan on corneal transparency // *Glycoconjugate*. 2003. V. 19. P. 275–285.
53. Raspanti M., Viola M., Forlino A., Tenni R., Gruppi C., Tira M.E. Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils // *Structural Biology*. 2008. V. 1164. P. 134–139.

54. Scott J.E. Proteoglycan: collagen interactions and corneal ultrastructure // Biochemical Society transactions. 1991. V. 19. P. 877–54881.
55. Cheng X., Pinsky P.M. Mechanisms of self-organization for the collagen fibril lattice in the human cornea // J R Soc Interface. 2013. V. 10. 0512. P. 1–18.
56. Ionita G., Matei I. Application of riboflavin photochemical properties in hydrogel synthesis // Intech Open. 2019. P. 1–14.
57. Lombardo M., Lombardo G., Carbone G., De Santo M.P., Barberi R., Serrao S. Biomechanics of the anterior human corneal tissue investigated with atomic force microscopy // IOVS. 2012. V. 53(2). P. 1050–1057.
58. Mrochen M., Lemanski N., Cheng M. Laser and light in Ophthalmology // Encyclopedia of Modern Optics II. 2018. V. 5. P. 130–139.
59. Steinberg J., Frings A., Mousli A. et al. New scheimpflug dynamic in vivo curve analyses to characterize biomechanical changes of the cornea after cross-linking for progressive keratoconus // Refract Surg. 2016. V. 32. P. 34–39.
60. Mazzotta C., Baiocchi S., Caporossi T., Caragiuli S., Paradiso A.L., Caporossi A. Riboflavin 0.1% (VibeX) for the treatment of keratoconus // Expert Opinion on Orphan Drugs. 2013. V. 1(3). P. 235–240.
61. Bouheraoua N., Jouve L., Borderie V., Laroche L. Three different protocols of corneal collagen crosslinking in keratoconus: conventional, accelerated and iontophoresis // J. Vis. Exp. 2015. V. 105. e5311955. P. 1–12.
62. Raiskup F., Theuring A., Pillunat L.E., Spoerl E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: ten-year results // Cataract Refract Surg. 2015. V. 41. P. 41–46.
63. O'Brart D.P., Patel P., Lascaratos G. Corneal cross-linking to halt the progression of keratoconus and corneal ectasia: sevenyear follow-up // Am J Ophthalmol. 2015. V. 160. P. 1154–1163.
64. Mastropasqua L. Collagen cross-linking: when and how? A review of the state of the art of the technique and new perspectives // Eye Vis. 2015. V. 2(19). P. 2–10.
65. Vastardis I., Pajic-Eggspuehler B., Nichorlis C., Mueller J., Pajic B. Recent innovations in collagen corneal cross-linking; a mini review // The Open Ophthalmology. 2017. V. 11. P. 217–224.
66. Bunsen R., Roscoe H. III Photochemical researches. Part V. On the measurement of the chemical action of direct and diffuse sunlight // Proc R Soc Lond. 1862. V. 12. P. 306–312.
67. Mazzotta C., Traversi C., Baiocchi S., Caporossi O., Bovone C., Sparano M. C., Balestrazzi A., Caporossi A. 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. V. 146(4). P. 527–5.
68. Schilde T., Kohlhaas M., Spoerl E., Pillunat L.E. Enzymatic evidence of the depth dependence of stiffening on riboflavin/UVA treated corneas // German J. Ophthalmology. 2008. V. 105. P. 165–169.
69. Jiang W., Qiu S.-Y. Conventional vs. pulsed-light accelerated corneal collagen cross-linking for the IANG L treatment of progressive keratoconus: 12-month results from a prospective study // Experimental and therapeutic medicine. 2017. V. 14. P. 4238–4244.
70. Ng A.L., Chan T.C., Cheng A.C. Conventional versus accelerated corneal collagen cross-linking in the treatment of keratoconus // Clin Exp Ophthalmol. 2016. V. 44. P. 8–14.
71. Wen D., Li Q., Song B., Tu R., Wang Q., O'Brart D.P.S., McAlinden C., Huang J. Comparison of standard versus accelerated corneal collagen cross-linking for keratoconus: A meta-analysis // IOVS. 2018. V. 59(10). P. 3920–3930.
72. Sukhorukov V. Photochemolysis sensitized by psoralen: reciprocity law is not fulfilled // Photochem Photobiol. 1991. V. 54. P. 375–379.
73. Leccisotti A., Islam T. Transepithelial corneal collagen crosslinking in keratoconus // Refract Surg. 2010. V. 26. P. 942–948.
74. Bikhova G., Bikhov M. Standard corneal collagen crosslinking versus trans-epithelial iontophoresis-assisted corneal crosslinking, 24 months follow-up: randomized control trial // Acta Ophthalmol. 2016. V. 94. P. e600–e606.
75. Madeira C., Vasques A., Beato J., Godinho G., Torrão L., Falcão M., Falcão-Reis F., Pinheiro-Costa J. Transepithelial accelerated versus conventional corneal collagen crosslinking in patients with keratoconus: a comparative study // Clinical Ophthalmology. 2019. V. 13. P. 445–452.
76. Ihanamaki T., Pelliniemi L.J., Vuorioc E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye // Progress in Retinal and Eye Research. 2004. V. 23. P. 403–434.



77. Nada H., Aldahlawi A.H., Hayes S., O'Brart D.P.S., Meek K.M. Standard versus accelerated riboflavin/ultraviolet corneal cross-linking: resistance against enzymatic digestion // *Cataract Refract Surg.* 2015. V. 41. P. 1989–1996.
78. Kymionis G.D., Grentzelos M.A., Kankariya V.P., Liakopoulos D.A., Portaliou D.M., Tsoulfnaras K.I., Karaviti A.E., Pallikaris A.I. Safety of high-intensity corneal collagen crosslinking // *Cataract Refract Surg.* 2014. V. 40. P. 1337–1340.
79. Semchishen A., Mrochen M., Semchishen V. Model for optimization the UV-A / Riboflavin Strengthening (cross-linking) of the cornea: percolation threshold // *Photochem Photobiol.* 2015. V. 91(6). P. 1403–1411.
80. Caruso C., Epstein R.L., Ostacolo C., Pacente L., Troisi S., Barbaro G. Customized corneal cross-linking-a mathematical model // *Cornea.* 2017. V. 36(5). P. 600–604.
81. Wertheimer C.M., Elhardt C., Kaminsky S.M., Pham L., Pei Q., Mendes B., Afshar S., Kochevar I.E. Enhancing rose bengal-photosensitized protein crosslinking in the cornea // *IOVS.* 2019. V. 60(6). P. 1845–1852.
82. Lin J.-T. Kinetics of enhancement for corneal cross-linking: proposed model for a two-initiator system // *Intern J Ophthalmol Res.* 2019. V. 10(3). OR.49970. P. 1–6.
83. Lin J.-T. Analytic formulas for the clinical issues of a UV-light-activated corneal crosslinking device // *Biomed Eng Med Devic.* 2016. V. 1(1). 104. P. 1–8.
84. Дроздова Г.А., Букбов М.М., Халимов А.Р., Казакбаева Г.М., Харитонов С.В., Халимов Т.А. Новые медицинские изделия в фототерапии заболеваний роговицы // *Вестник РУДН, серия Медицина.* 2015. № 1. С. 94–101.
85. O'Brart D.P.S., O'Brart N.A.L., Aldahlawi N.H., Meek K.M. The author response: role of riboflavin concentration and oxygen in the efficacy and depth of corneal crosslinking // *IOVS.* 2018. V. 59. P. 4451–4452.
86. Aldahlawi N.H., Hayes S., O'Brart D.P.S., Akhbanbetova A., Littlechild S.L., Meek K.M. Enzymatic resistance of corneas crosslinked using riboflavin in conjunction with low energy, high energy, and pulsed UVA irradiation modes // *IOVS.* 2016. V. 57. P. 1547–1552.
87. Kling S., Richoz O., Hammer A., Tabibian D., Jacob S., Agarwal A., Hafezi F. Increased biomechanical efficacy of corneal cross-linking in thin corneas due to higher oxygen availability // *Refract Surg.* 2015. V. 31(12). P. 840–846.
88. Seiler T.G., Batista A., Frueh B.E., Koeni K. Riboflavin concentrations at the endothelium during corneal cross-linking in humans // *IOVS.* 2019. V. 60(6). P. 2140–2146.
89. Halili F., Arboleda A., Durkee H., Taneja M., Miller D., Alawa K.A., Aguilar M.C., Amescua G., Flynn Jr. H.W., Parel J.-M. Rose bengal and riboflavin mediated photodynamic therapy to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis isolates // *Am J Ophthalmol.* 2016. V. 166. P. 194–202.
90. Sinjab M.M., Cummings A.B. (eds). *Corneal collagen cross-linking.* Switzerland: Springer Intern. Publishing. 2017. 296 p.
91. Pricea M.O., Price Jr.F.W. Corneal cross-linking in the treatment of corneal ulcers // *Curr Opin Ophthalmol.* 2016. V. 27(3). P. 250.
92. Martinez J.D., Arboleda A., Naranjo A., Aguilar M.C., Durkee H., Monsalve P., Dubovya S.R., Donaldson K.E., Miller D., Amescua G., Parel J.-M. Long-term outcomes of riboflavin photodynamic antimicrobial therapy as a treatment for infectious keratitis // *Am J Ophthalmol Case Reports.* 2019. V. 15. P. 100481–4.
93. Park C.Y., Chuck R.S. Riboflavin-UVA collagen cross-linking for the treatment of *acanthamoeba* keratitis // *Ann Eye Sci.* 2019. V. 4(7). P. 1–6.
94. Mooren P., Gobin L., Bostan N., Wouters K., Zakaria N., Mathysen D.G., Koppen C. Evaluation of UVA cytotoxicity for human endothelium in an ex vivo corneal cross-linking experimental setting // *Refract Surg.* 2016. V. 32(1). P. 4–46.
95. Whitcup S.M., Azar D.T. (eds.) *Pharmacologic therapy of ocular disease* // *Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer Intern. Publishing Switzerland. 2016. V. 242. P. 153–154.
96. Singh M., Li J., Han Z., Vantipalli S., Liu C.-H., Wu C., Raghunathan R., Aglyamov S.R., Twa M.D., Larin K.V. Evaluating the effects of riboflavin/UV-A and rose-bengal/green light cross-linking of the rabbit cornea by noncontact optical coherence elastography // *IOVS.* 2016. V. 57. P. OCT112–OCT120.
97. Kobashi H., Rong S.S. Corneal collagen cross-linking for keratoconus: systematic review // *Bio Med Research Intern.* 2017. Article ID 8145651. P. 1–7.
98. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem. J.* 2016. V. 473. P. 347–364.