

Экспериментальное изучение состава для медикаментозного кросслинкинга роговицы как перспективного средства лечения кератоконуса

Е.Н. Иомдина — д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела патологии рефракции, бинокулярного зрения и офтальмоэргономики¹

А.Р. Коригодский — канд. хим. наук, заместитель генерального директора по научной работе²

И.П. Хорошилова-Маслова — д-р мед. наук, профессор, начальник отдела патологической анатомии и гистологии¹

Л.Д. Андреева — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела патологической анатомии и гистологии¹

Н.Ю. Игнатъева — д-р хим. наук, доцент кафедры физической химии химического факультета³

¹ ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19

² ООО «ХайБиТек», 129110, Москва, проспект Мира, д. 44, стр. 1

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

Нарушение каркасной функции роговицы при кератоконусе во многом является следствием дистрофического процесса и снижения уровня поперечной связанности (кросслинкинга) ее коллагеновых структур. **Цель работы** — доклиническое плацебо-контролируемое изучение безопасности и эффективности применения инстилляций состава Корнетекс для медикаментозного укрепления (кросслинкинга) роговицы. **Материал и методы.** В работе использованы 37 кроликов (74 глаза) породы шиншилла, из них 33 кроликам в один глаз 2 раза в день ежедневно закапывали (в первой серии эксперимента — в течение месяца, во второй серии эксперимента — в течение 3 мес) состав Корнетекс, который содержит в качестве активных компонентов комплекс аминокислот, участвующих в формировании поперечных сшивок коллагена, в виде сукцинатов (остатков янтарной кислоты). В парный глаз инстиллировали плацебо (раствор, содержащий неактивные компоненты корнетекса — гидроксиэтилцеллюлозу, бензалкония хлорид и воду для инъекций). Группу независимого контроля составили 4 полностью интактных кролика (8 глаз). Методы исследования *in vivo* включали биомикроскопию и исследование с помощью шаймплюг-камеры Galilei G2. Через 1 мес и 3 мес после окончания курса инстилляций глаза энуклеировали для морфологического изучения, а также биомеханического тестирования образцов роговицы на деформационной машине Autograph AGS-H и определения поперечной связанности роговичного коллагена методом дифференциальной сканирующей калориметрии с помощью калориметра Phoenix DSC 204. **Результаты.** Биомикроскопические и морфологические исследования не выявили патологических изменений сред и тканей глаза, в то же время уровень поперечных связей в коллагене роговицы через месяц после курса инстилляций повысился на 18–20 %, а модуль ее упругости увеличился в 1,8 раза, что свидетельствует о безопасности и высоком корнеукрепляющем эффекте воздействия корнетекса. **Заключение.** Полученные результаты позволяют рекомендовать состав для инстилляций Корнетекс для дальнейшего изучения в качестве перспективного средства медикаментозного лечения кератоконуса.

Ключевые слова: роговица, поперечные сшивки, основные аминокислоты, сукцинаты, модуль упругости, кератоконус.

Для цитирования: Иомдина Е.Н., Коригодский А.Р., Хорошилова-Маслова И.П., Андреева Л.Д., Игнатъева Н.Ю. Экспериментальное изучение состава для медикаментозного кросслинкинга роговицы как перспективного средства лечения кератоконуса. Российский офтальмологический журнал. 2017; 10 (4): 54–61. doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-4-54-61.

Как известно, кератоконус — это прогрессирующее дистрофическое заболевание роговицы, характеризующееся ее истончением, растяжением и конусовидным выпячиванием, а при далеко зашедшем процессе — помутнением и рубцеванием, приводящим к значительному снижению остроты зрения и даже к инвалидности по зрению. Проблема кератоконуса становится в последние годы все более актуальной, поскольку его частота растет, составляя в настоящее время в зависимости от региона от 0,0003 до 2,3 % [1–5]. При кератоконусе активируются процессы деградации стромы роговицы, что выражается в уменьшении ее толщины, числа коллагеновых пластинок и кератиноцитов [6]. Кроме того, изменяется состав и ориентация коллагеновых фибрилл, уменьшается содержание коллагенов I, III, V и XII типов [7, 8], а также снижается уровень поперечной связанности (кросслинкинга) коллагеновых структур [9–11]. Поскольку именно поперечные связи (сшивки) в основном ответственны за механическую стабильность данного типа биологических тканей [12], их разрушение при кератоконусе приводит к нарушению каркасной функции роговицы. Генетические исследования показали полиморфизм гена лизилоксидазы: в частности, исследование экспрессии генов в эпителии глаз с кератоконусом, обнаружило активацию гена LOX (lysyl oxidase, locus 5q23.2) по сравнению с нормой [13, 14]. Ген LOX кодирует лизилоксидазу, участвующую в сшивании волокон коллагена и эластина роговицы, катализируя окислительное дезаминирование epsilon-аминогруппы лизина [15]. Лимитирующей стадией в процессе сшивания является образование из остатков аминокислоты лизина, содержащих реакционные аминогруппы, так называемого аль-лизина (альдегидного производного лизина) под действием фермента лизилоксидазы, активность которой снижена при кератоконусе [16]. Далее спонтанно, без участия ферментов, образуется основание Шиффа с пространственно сближенной аминогруппой остатка лизина, находящегося в другой полипептидной цепи, в результате чего образуется прочная сшивка.

По-видимому, именно недостаточно сшитый коллаген — основной морфологический признак тканевой аномалии, приводящей к постепенному пластическому течению стромы роговицы и, как следствие, — к кератэктазии. Целенаправленные биомеханические исследования *in vitro* показали, что упруго-прочностные параметры и, в частности, модуль упругости в центральной зоне роговицы при кератоконусе существенно ниже, чем в здоровых глазах [17–19].

Эти результаты подтверждаются данными биомеханических исследований пациентов с кератоконусом с помощью анализатора глазного ответа (ORA, Reichert, USA). Так, у пациентов с этим заболеванием, подтвержденным данными кератотопографии, биомеханические показатели роговицы —

корнеальный гистерезис и фактор резистентности роговицы — оказались достоверно ниже, чем у здоровых лиц [20–25].

Для оптической коррекции сниженной при кератоконусе остроты зрения используют жесткие контактные линзы, которые в большинстве случаев не останавливают прогрессирование заболевания. Существуют различные методы хирургического лечения кератоконуса, которые имеют свои преимущества и недостатки [26–29]. В последнее время для хирургической коррекции и остановки прогрессирования кератоконуса применяют имплантацию интрастромальных роговичных сегментов, которые уплощают оптический центр роговицы, центрируют вершину конуса, уменьшают степень миопии и астигматизма [30, 31].

На современном этапе одним из наиболее эффективных методов профилактики прогрессирования кератоконуса на начальных стадиях его развития считают кросслинкинг роговицы, при котором в результате воздействия ультрафиолетового облучения и рибофлавина в стромальном коллагене формируются дополнительные поперечные связи [10, 22, 32]. Многочисленными клиническими исследованиями показано, что данная малоинвазивная методика эффективно останавливает развитие кератоконуса за счет увеличения биомеханической устойчивости роговицы [25, 33, 34]. Оценка отдаленных результатов (10 лет наблюдения) подтвердила стабилизацию патологического процесса на фоне улучшенных корнеотопографических параметров и скорректированной остроты зрения, побочных эффектов (в частности, патологии эндотелия) выявлено не было [33]. Результаты других отдаленных наблюдений (730 глаз, срок наблюдения — до 15 лет) выявили ослабление эффекта проведенного кросслинкинга лишь в 2,5 % случаев [34].

Однако эффективного медикаментозного лечения кератоконуса в настоящее время не существует. В связи с этим разработка лекарственных средств, способных при инстиляции в конъюнктивальную полость повысить кросслинкинг роговицы и ее биомеханическую устойчивость при кератоконусе, представляется важной научно-практической задачей.

Как известно, одним из наиболее эффективных и физиологичных способов стимулирования синтеза коллагена I и III типа является аминокислотная заместительная терапия. Предварительные исследования позволили установить, что эффективное сшивание коллагеновых комплексов может быть достигнуто за счет использования полиаминов (соединений, содержащих две основные аминогруппы и более). Такими свойствами обладают в том числе соединения эндогенной природы — основные аминокислоты [35]. При этом представилось целесообразным для перевода этих оснований в солевую форму (pH 7,4) использовать янтарную кислоту. Янтарную кислоту (в виде солей — сукцинатов), как эндогенное

вещество, участвующее в окислительном цикле Кребса и восполняющее основные энергетические потребности организма, в последние годы часто применяют для активации процессов регенерации и метаболизма белков. Сукцинаты обладают антиоксидантным, цитопротекторным и антитоксическим действием. Их введение существенно усиливает протекание тканевого метаболизма — клеточное дыхание, ионный транспорт, синтез белков, т. е., по сути, регенеративные процессы, что было показано в экспериментальных и клинических исследованиях [36]. Сукцинаты в различных формах входят в состав некоторых офтальмологических препаратов, в том числе в глазные капли Катахром [37], содержащие натрия сукцинат и улучшающие энергетические процессы в тканях хрусталика, а также в капли Пиротоник и Мексидол [38, 39].

В связи с этим был разработан состав (раствор) для корнеоукрепляющих инстилляций Корнетекс, содержащий в качестве активного компонента аминокислотный комплекс в виде сукцинатов (170 мг), а также неактивные добавки: гидроксиэтилцеллюлозу (35 мг), бензалкония хлорид (1,0 мг) и воду для инъекций (до 5 мл).

ЦЕЛЬ работы — провести доклиническое плацебо-контролируемое изучение безопасности и эффективности применения опытной серии Корнетекса — инстилляционного состава для укрепления роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы 37 кроликов (74 глаза) породы шиншилла весом 2–2,5 кг. Корнетекс и плацебо (раствор, содержащий неактивные компоненты Корнетекса — гидроксиэтилцеллюлозу 35 мг, бензалкония хлорид 1,0 мг и воду для инъекций до 5 мл) закапывали в конъюнктивальную полость глаза ежедневно 2 раза в день, в первой серии эксперимента 17 кроликам — в течение месяца, во второй серии эксперимента 16 кроликам — в течение 3 мес. Группа независимого контроля — 8 глаз 4 полностью интактных кроликов. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н) и «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [40].

Для оценки местнораздражающего и повреждающего действия все кролики были обследованы до и после курса инстилляций методом биомикроскопии и методом объективного контроля прозрачности оптических сред переднего отдела глаза с помощью шаймпфлюг-камеры Galilei G2 (Ziemer Ophthalmic Systems AG 6.0.2). Исследования безопасности местного применения и хронической токсичности проводились путем патогистологического изучения всех

структур глазного яблока с использованием световой микроскопии. Материал для морфологического исследования — 18 энуклеированных глаз 9 кроликов (опытные глаза и плацебо), а также 4 глаза интактных кроликов (независимый контроль) фиксировали в 10 % формалине, проводили по спиртам, заливали в парафин. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Оценка корнеоукрепляющего эффекта с помощью биомеханического тестирования и определения уровня поперечной связанности коллагена склеры через 1 мес и 3 мес после окончания курса инстилляций проведена на 26 кроликах (52 глаза). Для биомеханического тестирования образцов склеры использовали деформационную машину Autograph AGS-H, (SHIMADZU, Япония). Уровень поперечной связанности образцов склеры оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью калориметра Phoenix DSC 204 (Netzsch, Германия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ XL и Statistica 6.0. Исследуемые выборки были подвергнуты тесту на нормальность распределения. Показатели с нормальным распределением представлялись в виде среднего значения (М) и стандартного отклонения (SD), а также средней квадратичной ошибки (m); достоверность различий между группами, с уровнем значимости не менее 95 %, оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биомикроскопическое изучение опытных глаз кроликов в процессе курса инстилляций корнеоукрепляющего состава Корнетекс в течение месяца и в течение 3 мес, а также после окончания соответствующих курсов инстилляций не выявило различий в состоянии всех глазных структур по сравнению с группой контроля. Среды (роговица, хрусталик, стекловидное тело) оставались прозрачными на протяжении всего периода динамического наблюдения, как в опытной группе, так и в группе плацебо. По окончании длительных (в течение 3 мес) инстилляций как опытного (Корнетекс), так и контрольного (плацебо) состава отмечалась небольшая десквамация эпителия роговицы (неравномерность прокрашивания поверхности роговицы), вызванная, очевидно, длительным воздействием консерванта (бензалкония хлорида), входящего в состав как изучаемого состава, так и плацебо.

Для объективного контроля состояния роговицы и оптических сред переднего отдела глаза при применении Корнетекса в течение месяца и в течение 3 месяцев, а также после окончания соответствующих курсов инстилляций проводили *in vivo* денситометрию стромы в центральной оптической зоне роговицы и измеряли анатомо-оптические показатели переднего отдела. Результаты исследования не выявили различий в оптической плотности роговицы:

этот показатель составил исходно $14,25 \pm 0,44$ у. е., а его колебания в течение курса инстилляций изучаемого состава и плацебо находились в пределах статистической нормы. Другие анатомо-оптические параметры переднего отдела глаз кроликов опытной и контрольной групп также значимо не изменялись по сравнению с исходными значениями во все сроки наблюдения, что свидетельствует о сохранении полной прозрачности, как роговицы, так и других структур переднего отдела, и сохранении их нормальной анатомии после применения изучаемого состава.

При гистологическом исследовании глаз кроликов, энуклеированных через месяц после курса инстилляций Корнетекса (опытные глаза) и раствора плацебо (контрольные глаза), различий в строении оболочек и других глазных структур не выявлено. Роговица не изменена, эпителий сохранен, параллельность роговичных пластин стромы не нарушена. Десцеметова оболочка хорошо выражена на всем протяжении, слой эндотелия — без патологических изменений. Угол передней камеры открыт, трабекула не изменена. Хрусталик прозрачен, его капсула, субкапсулярный эпителий и хрусталиковое вещество — без патологических изменений. В радужной оболочке патологии не определяется, ширина зрачка опытных и контрольных глаз одинакова. В цилиарном теле, хориоидее, сетчатке и зрительном нерве отклонений от нормы не выявлено. В одном опытном глазу данной группы обнаружено очаговое (1–2 очага) разрастание роговичного эпителия, под ним — нарушение наружных волокнистых слоев стромы роговицы, их набухание, отек конъюнктивы. Аналогичные изменения выявлены в одном интактном глазу контрольной группы (плацебо). В связи с этим данные нарушения можно расценить как индивидуальные особенности глаза экспериментальных животных, не связанные с проведением доклинических испытаний.

В целом морфологическое изучение экспериментальных глаз кроликов, проведенное непосредственно после курсовых инстилляций Корнетекса в течение месяца, не выявило каких-либо патологических изменений сред и тканей глаза, что свидетельствует о безопасности применения данного состава в течение указанного срока. Именно такая длительность инстилляций предусматривается для дальнейшего клинического применения.

Дальнейшее изучение безопасности корнеоукрепляющего состава включало оценку его хронической токсичности, т. е. воздействия на ткани глаза при длительных инстилляциях, в течение времени, в 3 раза превышающем целевой курс применения. При гистологическом исследовании глаз кроликов, энуклеированных непосредственно после курса длительных инстилляций Корнетекса (опытные глаза) и раствора плацебо (контрольные глаза), осуществлявшихся в течение 3 мес, различий в строении оболочек и других глазных структур не

выявлено, что свидетельствует об отсутствии хронической токсичности.

Для оценки эффективности корнеоукрепляющего воздействия инстилляций Корнетекса через месяц после окончания курса проведено параллельное изучение уровня поперечной связанности (поперечных сшивок), стабилизирующих коллагеновое волокно роговицы (кросслинкинга), в образцах опытных и интактных глаз, а также глаз из группы плацебо и биомеханическое тестирование этих же образцов роговицы.

ДСК-анализ образцов роговицы опытных глаз показал, что после курса инстилляций уровень поперечных сшивок в них существенно повысился (рис. 1).

В то время как температура денатурации интактной роговицы составила $62,7 \pm 0,4$ °C, после инстилляций Корнетекса в течение месяца она выросла до $65,4 \pm 0,9$ °C ($p < 0,05$), оставаясь после 3-месячных инстилляций практически на том же уровне, что свидетельствует о стабильном повышении уровня кросслинкинга роговицы в опытной группе глаз.

О повышении уровня поперечных сшивок в роговице после курса инстилляций Корнетекса говорит также динамика показателя Δ , соответствующего разнице между температурой начала процесса денатурации образца и его окончания (рис. 1). В группе интактного контроля и в группе плацебо этот показатель был практически одинаковым и составлял в среднем $5,08 \pm 0,20$ °C, а в опытной группе он оказался достоверно выше — $6,0 \pm 0,2$ °C ($p < 0,01$), что позволяет оценить увеличение кросслинкинга коллагена роговицы примерно в 18–20 %.

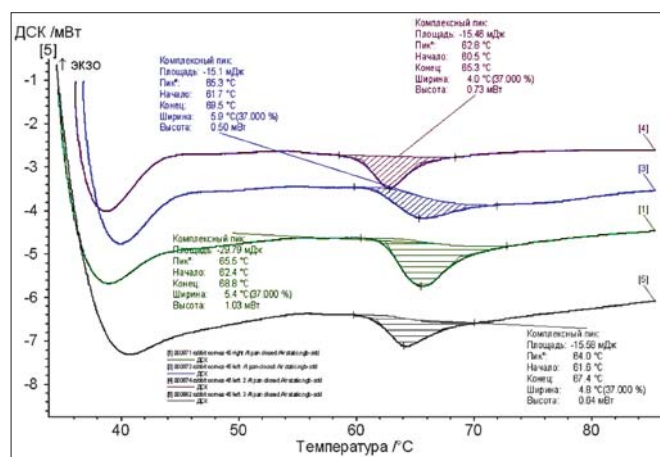


Рис. 1. ДСК образцов роговицы опытного (правого) и контрольного (левого) глаза. Опыт: спустя месяц после курса инстилляций состава Корнетекс в течение месяца температура денатурации (пик) — $65,3$ °C, $\Delta = 69,5 - 61,7 = 7,8$ °C. Контроль: спустя месяц после курса инстилляций плацебо в течение месяца температура денатурации (пик) — $62,8$ °C, $\Delta = 65,3 - 60,5 = 4,8$ °C.

Fig. 1. DSC of experimental (right) and control (left) eyes cornea samples. Experimental eyes: 1 month after Cornetex 1 month instillations course: T_d °C = $65,3$ °C, $\Delta = 69,5 - 61,7 = 7,8$ °C. Control eyes: 1 month after placebo 1 month instillations course. T_d °C = $62,8$ °C, $\Delta = 65,3 - 60,5 = 4,8$ °C.

Повышение уровня поперечной связанности коллагена роговицы после месячного курса инстилляций Корнетекса отразилось на ее биомеханических характеристиках. Через месяц после его окончания модуль упругости роговицы в группе контроля (плацебо) составил $11,6 \pm 1,3$ МПа, а в группе, где проводились инстиллянии Корнетекса, он оказался выше в среднем в 1,8 раза и составлял $20,8 \pm 1,8$ МПа ($p < 0,02$) (рис. 2).

После инстилляций Корнетекса в течение 3 мес этот показатель остался на прежнем уровне — $20,6 \pm 1,8$ МПа, превышая в 1,6 раза модуль упругости роговицы глаз, вошедших в группу плацебо, который составлял $12,6 \pm 1,1$ МПа ($p < 0,02$).

Полученные результаты свидетельствуют о существенном биомеханическом (корнеоукрепляющем) эффекте, вызванном воздействием Корнетекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное доклиническое плацебо-контролируемое изучение безопасности и эффективности применения опытной серии инстилляционного раствора для укрепления роговицы Корнетекс показало, что ежедневные инстиллянии в течение месяца не оказывают клинически фиксируемого местнораздражающего, повреждающего или токсического действия. Отсутствуют какие-либо патогистологические изменения сред и тканей глаза, что также свидетельствует о безопасности применения данного состава в течение указанного срока. Изучение хронической

токсичности при инстилляциях Корнетекса в течение 3 мес подтвердило безопасность его применения, поскольку не выявило каких-либо патологических изменений сред и тканей глаза, за исключением десквамации эпителия роговицы различной степени выраженности, обнаруженной также и в контрольных глазах (плацебо), что вызвано длительным воздействием консерванта — бензалкония хлорида. Применение Корнетекса позволяет существенно повысить структурную и биомеханическую стабильность ткани роговицы: уровень стабилизирующих коллагеновые структуры роговицы поперечных связей (кросслинкинг) повышается на 18–20 %, а модуль упругости роговицы увеличивается в 1,8 раза, что свидетельствует об эффективном корнеоукрепляющем воздействии препарата. Полученные результаты позволяют рекомендовать состав для укрепления роговицы Корнетекс для дальнейшего клинического изучения.

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-29-03874.

Литература

1. Подтынных Е.В., Басинская Л.А., Комаровских Е.Н. Современные представления об этиопатогенезе и методах диагностики кератоконуса (обзор литературы). Вестник Оренбургского государственного университета. 2015; 187 (12): 188–96.

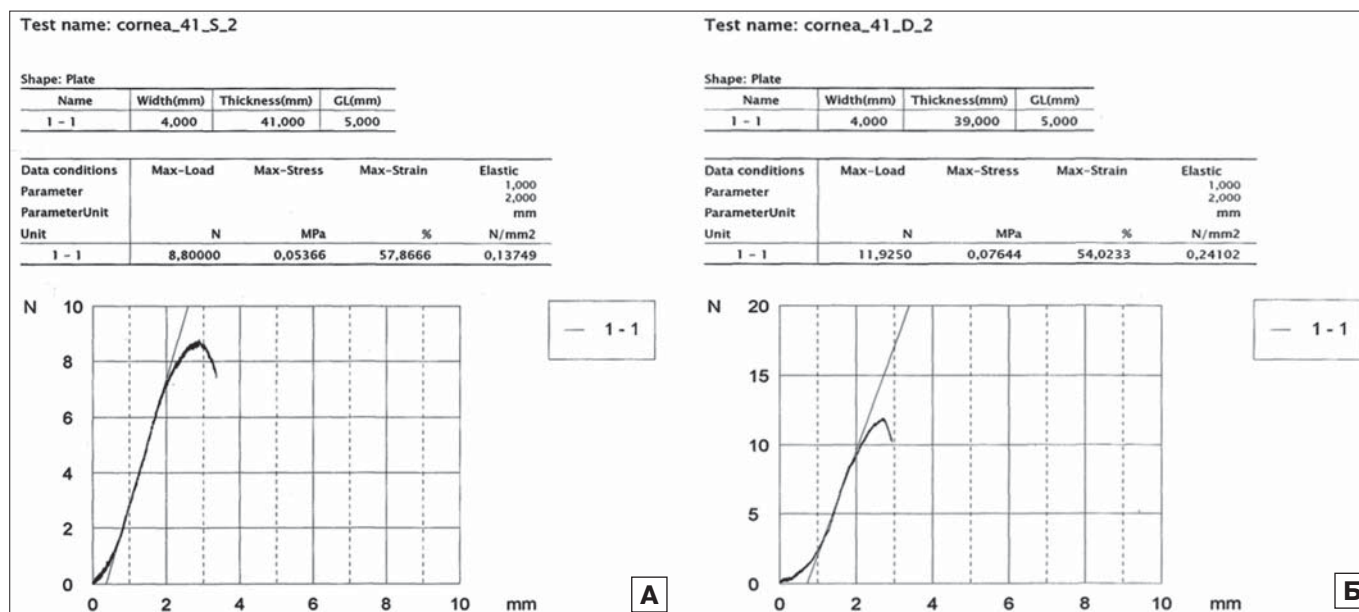


Рис. 2. А — зависимость «напряжение — деформация», полученная при биомеханическом тестировании образца роговицы контрольного глаза спустя месяц после курса инстилляций плацебо в течение месяца: модуль упругости — 13,7 МПа. Б — зависимость «напряжение — деформация», полученная при биомеханическом тестировании образца роговицы опытного глаза спустя месяц после курса инстилляций корнетекса в течение месяца: модуль упругости — 24,1 МПа.

Fig. 2. А — stress-strain dependency obtained by biomechanical testing of the control eye cornea sample after 1 month placebo instillations during 1 month: elasticity modulus is equal to 13,7 MPa. Б — stress-strain dependency obtained by biomechanical testing of the experimental eye cornea sample after 1 month Cornetex instillations during 1 month: elasticity modulus is equal to 24,1 MPa.

2. Клас Фейнбаум. Современные аспекты этиопатогенеза и лечения кератоконуса. Офтальмохирургия. 2011; 3: 80–5.
3. Горскова Е.Н., Севостьянов Е.Н. Эпидемиология кератоконуса на Урале. Вестник офтальмологии. 1998; 4: 38–40.
4. Семенова А.Л., Колединцев М.Н. Кератоконус. Распространенность, заболеваемость, этиология, патогенез, классификация. Рефракционная хирургия и офтальмология. 2004; 4 (4): 4–7.
5. Jonas J.B., Nangia V., Matin A., Kulkarni M., Bhojwani K. Prevalence and associations of keratoconus in rural Maharashtra in central India: the central India Eye Medical Study. Am J Ophthalmol. 2009; 148: 760–5. doi: 10.1016/j.ajo.2009.06.024.
6. Takahashi A., Nakayasu K., Okisaka S., Kanai A. Quantitative analysis of collagen fiber in keratoconus. Nihon Ganka Gakkai Zasshi. 1990; 94: 1068–73.
7. Chaerkady R., Shao H., Scott S.G., et al. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. J Proteomics 2013; 87: 122–31. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.023.
8. Akhtar S., Bron A.J., Salvi S.M., et al. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. Acta Ophthalmol 2008; 86: 764–72. doi: 10.1111/j.1755-3768.2007.01142.x.
9. Galatic A., Blazej A., Kubena K. Obsah pricnych vazeb v kolagenu ocní belimy a rohovky. Ceskoslovenska oftalmol. 1983; 39 (6): 424–9.
10. Harding J.J., Crabbe M.J.C. Cross-linking sites of corneal and sclera collagens and their relationship to keratoconus and degenerative myopia. Ophthalmic Res. 1980; 12: 139–42.
11. Meek K.M., Hayes S. Corneal cross-linking – a review. Ophthalmic Physiol Opt. 2013; 33: 78–93. doi: 10.1111/opo.12032.
12. Bailey A.J. Intermediate labile intermolecular cross-links in collagen fibrils. Biochim. Biophys. Acta. 1968; 160: 447–53.
13. Куликов А.Н., Чурашов С.В., Камилова Т.А., Рейтузов В.А. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза кератоконуса. Офтальмологические ведомости. 2017; 10 (2): 62–71. doi: 10.17816/OV10262-71.
14. Hasanian-Langroudi F., Saravani R., Validad M.H., et al. Association of lysyl oxidase (LOX) polymorphisms with the risk of keratoconus in an Iranian population. Ophthalmic Genet. 2014. doi: 10.3109/13816810.2014.881507.
15. Bykhovskaya Y., Li X., Epifantseva I., et al. Variation in the lysyl oxidase (LOX) gene is associated with keratoconus in family based and case-control studies. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53(7):4152-7. doi: 10.1167/iops.11-9268.
16. Dudakova L., Liskova P., Trojek T., et al. Changes in lysyl oxidase (LOX) distribution and its decreased activity in keratoconus corneas. Exp. Eye Res. 2012; 104: 74–81. doi: 10.1016/j.exer.2012.09.005.
17. Andreassen T.T., Simonsen A.H., Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. Exp. Eye Res. 1980; 31: 435–41.
18. Edmund C. Corneal elasticity and ocular rigidity in normal and keratoconic eyes. Acta Ophthalmol. 1988; 66: 134–40.
19. Nash S.R., Green P.R., Foster C.S. Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. Exp. Eye Res. 1982; 35: 413–23.
20. Аветисов С.Э., Бубнова И.А., Новиков И.А., Антонов А.А., Сиплиев В.И. Биометрические параметры фиброзной оболочки и биомеханические показатели. Сообщение 2. Влияние топографических особенностей кератоконуса. Вестник офтальмологии. 2011; 127 (3): 7–10.
21. Roy A.S., Shetty R., Kummel M.K. Keratoconus: a biomechanical perspective on loss of corneal stiffness. Indian J Ophthalmol. 2013; 61 (8 Aug): 392–3. doi: 10.4103/0301-4738.116057.
22. Нероев В.В., Ханджян А.Т., Зайцева О.В. Кросслинкинг роговичного коллагена — новый способ лечения кератоконуса. Обзор литературы. Рефракционная хирургия и офтальмология. 2007; 7 (3): 4–8.
23. Shah S., Laiquzzaman M. Comparison of corneal biomechanics in pre and post-refractive surgery and keratoconic eyes by Ocular Response Analyser. Cont. Lens Anterior Eye. 2009; 32 (3): 129–32. doi: 10.1016/j.clae.2008.12.009.
24. Piñero D.P., Alio J.L., Barraquer R.I., Michael R., Jiménez R. Corneal biomechanics, refraction, and corneal aberrometry in keratoconus: an integrated study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 1948–55. doi: 10.1167/iops.09-4177.
25. Иомдина Е.Н., Бауэр С.М., Котляр К.Е. Биомеханика глаза: теоретические аспекты и клинические приложения. Москва: Реал Тайм; 2015.
26. Каспаров А.А., Каспарова Е.А. Принципы эксимер-лазерного и хирургического лечения кератоконуса. Рефракционная хирургия и офтальмология. 2002; 2 (3): 21–4.
27. Слонимский Ю.Б. Кератоконус. Контактные линзы или кератопластика? Глаз. 1998; 4: 28–9.
28. Слонимский Ю.Б., Слонимский А.Ю. Кератоконус. Современные представления о болезни, тактика ведения больных, радикальная хирургия. Available at: <http://www.sfe.ru/information/articles/keratokonus.html>
29. Colin J., Velou S. Current surgical options for keratoconus. J. Cataract Refract. Surg. 2003; 29 (2): 379–86.
30. Kymionis G.D., Syganos C.S., Tsiklis N.S. Long-term follow-up of intacs in keratoconus. Am J Ophthalmol. 2007; 143 (2): 236–44. doi.org/10.1016/j.ajo.2006.10.041.
31. Пенкина А.В., Нероев В.В., Ханджян А.Т., Оганесян О.Г., Склярова А.С. Фемтолазерная имплантация интрастромальных роговичных сегментов в сочетании с кросслинкингом роговичного коллагена в лечении кератоконуса. Практическая медицина. Офтальмология. 2012; 1 (4): 111–4.
32. Нероев В.В., Ханджян А.Т., Пенкина А.В., Склярова А.С. Применение кросслинкинга роговичного коллагена в лечении кератоконуса I–II стадии. Российский офтальмологический журнал. 2012; 5 (1): 62–4.
33. Theuring A., Spoerl E., Pillunat L.E., Raiskup F. Hornhautkollagenvernetzung mit Riboflavin und UVA-Licht bei Patienten mit progressive Keratokonus. 10-Jahres-Ergebnisse (Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus. Results after 10-year follow-up). Ophthalmologie. 2014; 112 (2): 1–4. doi: 10.1007/s00347-014-3114-0 (Article in German).
34. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. Curr Opin Ophthalmol. 2006; 17: 356–60.
35. Степанов В.М. Молекулярная биология. Москва: Высшая школа; 1996.
36. Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Голубев Р.В. Янтарная кислота и ее применение в медицине. Часть II. Применение янтарной кислоты в медицине. Нефрология. 2014; 4: 12–24.
37. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Москва: Медицина; 1984: 67.
38. Борзенко С.А., Мороз З.И., Шемакин С.Ю., Кондрашова М.Н. Глазные капли Пиротоник. Патент РФ № 2127100; 1999.
39. Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Павленко Т.А., Забозлаев А.А., Павлова М.В. Антиоксидантные свойства глазных капель Мексидол и влияние их местного применения на заживление эпителиальной раны роговицы в эксперименте. Российский офтальмологический журнал. 2012; 5 (1): 88–92.
40. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва: Гриф и К. 2012.

Поступила: 09.01.2017

An experimental study of the composition for medicament corneal crosslinking as a promising means for keratoconus treatment

E.N. Iomdina — Dr. Biol. Sci., professor, principal researcher, department of refraction pathology, binocular vision and ophthalmoergonomics¹

A.R. Korigodsky — Cand. Chem. Sci., deputy director for research²

I.P. Khoroshilova-Maslova — MD, Dr. Med. Sci., professor, head of the department of pathologic anatomy and histology of the eye¹

L.D. Andreeva — Cand. Biol. Sci., senior researcher, department of pathologic anatomy and histology of the eye¹

N.Yu. Ignatieva — Dr. Chem. Sci., assistant professor, chair of physical chemistry³

¹Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

²HighBeTech Ltd, 44, Bldg. 1, Prospect Mira, Moscow, 129110, Russia

³Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia
iomdina@mail.ru

*The deterioration of the corneal framing function in keratoconus is largely due to the dystrophic process and the decrease of collagen structures crosslinking level. The **purpose** of the study is to perform a preclinical placebo controlled study of the safeness and effectiveness of Cornetex compound instillations for medicament corneal crosslinking. **Material and methods.** The study included 37 Chinchilla rabbits (74 eyes). 33 rabbits received Cornetex solution instillations into one eye twice a day for 1 month (17 rabbits, 1st series) and for 3 months (16 rabbits, 2nd series). The active constituents of Cornetex include a complex of the basic amino acid salts in the form of succinates (residues of succinate acid) participating in collagen crosslinking formation. The placebo solution containing nonactive Cornetex constituents (Hydroxyethyl cellulose, benzalkonium chloride and water for injections) was instilled into fellow eyes. 4 fully intact rabbits (8 eyes) served as an independent control group. In vivo methods included biomicroscopy and examination with a Scheimpflug camera Galilei G2. 1 and 3 months after the instillation course, the eyes were enucleated and subjected to a morphological study, biomechanical testing of corneal samples (on the testing machine Autograph AGS-H). Corneal collagen crosslinking level was determined by differential scanning calorimetry using a Phoenix DSC 204 calorimeter. **Results.** Biomicroscopic and morphological studies revealed no pathological changes of ocular media and tissues. One month after the instillation course, the collagen crosslinking level of the cornea showed a 18 to 20 % increase, while its elasticity modulus showed a 1.8-fold increase with respect to the fellow eye, which is an evidence of the safety and high corneal reinforcement effect of the instillations. **Conclusions.** The outcome of the experimental study of Cornetex implies that it can be recommended for further clinical studies as a promising means for keratoconus treatment.*

Keywords: cornea, crosslinking, basic amino acids, succinates, elasticity modulus, keratoconus.

For citations: Iomdina E.N., Korigodsky A.R., Khoroshilova-Maslova I.P., Andreeva L.D., Ignatieva N.Yu. An experimental study of the composition for medicament corneal crosslinking as a promising means for keratoconus treatment. Russian ophthalmological journal. 2017; 10 (4): 54–61. doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-4-54-61 (In Russian).

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) with a grant No. 15-29-03874.

References

- Podtynnykh E.V., Basinskaya L.A., Komarovskikh E.N. Modern conception on the etiology, pathogenesis and diagnostics of keratoconus (literature review). Vestnik Orenburgskogo universiteta. 2015; 187 (12): 188–96 (In Russian).
- Claes Feinbaum. Current Aspects of Keratoconus Etiopathogenesis and Treatment. Ophthalmosurgery. 2011; 3: 80–5. (In Russian).
- Gorskova E.N., Sevostianov E.N. Epidemiology of keratoconus in Ural region. Vestnik oftal'mologii. 1998; 4: 38–40 (In Russian).
- Semenova A.L., Koledintsev M.N. Keratoconus. Prevalence, morbidity, etiology, pathogenesis, classification. Refraktsionnaya khirurgiya i oftal'mologiya. 2004; 4 (4): 4–7 (In Russian).
- Jonas J.B., Nangia V., Matin A., Kulkarni M., Bhojwani K. Prevalence and associations of keratoconus in rural Maharashtra in central India: the central India Eye Medical Study. Am J Ophthalmol. 2009; 148: 760–5. doi: 10.1016/j.ajo.2009.06.024.
- Takahashi A., Nakayasu K., Okisaka S., Kanai A. Quantitative analysis of collagen fiber in keratoconus. Nihon Ganka Gakkai Zasshi. 1990; 94: 1068–73.
- Chaerkady R., Shao H., Scott S.G., et al. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. J Proteomics 2013; 87: 122–31. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.023.
- Akhtar S., Bron A.J., Salvi S.M., et al. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. Acta Ophthalmol 2008; 86: 764–72. doi: 10.1111/j.1755-3768.2007.01142.x.
- Galatic A., Blazej A., Kubena K. Obsah pricnych vazeb v kolagenu očni belimy a rohovky. Ceskoslovenska oftalmol. 1983; 39 (6): 424–9.
- Harding J.J., Crabbe M.J.C. Cross-linking sites of corneal and sclera collagens and their relationship to keratoconus and degenerative myopia. Ophthalmic Res. 1980; 12: 139–42.
- Meek K.M., Hayes S. Corneal cross-linking—a review. Ophthalmic Physiol Opt. 2013; 33: 78–93. doi: 10.1111/opo.12032.
- Bailey A.J. Intermediate labile intermolecular cross-links in collagen fibrils. Biochim. Biophys. Acta. 1968; 160: 447–53.
- Kulikov A.N., Churashov S.V., Kamilova T.A., Reitzov V.A. Molecular genetic aspects of keratoconus pathogenesis. Oftal'mologicheskie vedomosti. 2017; 10 (2): 62–71. doi: 10.17816/OV10262-71 (In Russian).
- Hasanian-Langroudi F., Saravani R., Validad M.H., et al. Association of lysyl oxidase (LOX) polymorphisms with the risk of keratoconus in an Iranian population. Ophthalmic Genet. 2014. doi: 10.3109/13816810.2014.881507.
- Bykhovskaya Y., Li X., Epifantseva I., et al. Variation in the lysyl oxidase (LOX) gene is associated with keratoconus in family based and case-control studies. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53 (7): 4152–7. doi: 10.1167/iops.11-9268.
- Dudakova L., Liskova P., Trojek T., et al. Changes in lysyl oxidase (LOX) distribution and its decreased activity in keratoconus corneas. Exp. Eye Res. 2012; 104: 74–81. doi: 10.1016/j.exer.2012.09.005.
- Andreassen T.T., Simonsen A.H., Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. Exp. Eye Res. 1980; 31: 435–41.
- Edmund C. Corneal elasticity and ocular rigidity in normal and keratoconic eyes. Acta Ophthalmol. 1988; 66: 134–40.
- Nash S.R., Green P.R., Foster C.S. Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. Exp. Eye Res. 1982; 35: 413–23.
- Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., Sipliviy V.I. Biometric parameters of the fibrous coat and biomechanical properties. Part 2. The significance of keratoconus topographic peculiarities. Vestnik oftal'mologii. 2011; 127 (3): 7–10 (In Russian).
- Roy A.S., Shetty R., Kummelil M.K. Keratoconus: a biomechanical perspective on loss of corneal stiffness. Indian J Ophthalmol. 2013; 61 (8 Aug): 392–3. doi: 10.4103/0301-4738.116057.
- Neroev V.V., Khandjan A.T., Zaitseva O.V. Corneal crosslinking—a new technique for the treatment of keratoconus. Literature review. Refraktsionnaya khirurgiya i oftal'mologiya. 2007; 7 (3): 4–8 (In Russian).
- Shah S., Laiquzzaman M. Comparison of corneal biomechanics in pre and post-refractive surgery and keratoconic eyes by Ocular Response Analyser. Cont. Lens Anterior Eye. 2009; 32 (3): 129–32. doi: 10.1016/j.clae.2008.12.009.
- Piñero D.P., Alio J.L., Barraquer R.I., Michael R., Jiménez R. Corneal biomechanics, refraction, and corneal aberrometry in keratoconus: an integrated study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 1948–55. doi: 10.1167/iops.09-4177.
- Iomdina E.N., Bauer S.M., Kotliar K.E. Eye Biomechanics: Theoretical aspects and Clinical Applications. Moscow: Real Time, 2015 (In Russian).
- Kasparov A.A., Kasparova E.A. Principles of the eximer laser and surgical treatment of keratoconus. Refraktsionnaya khirurgiya i oftal'mologiya. 2002; 2 (3): 21–4 (In Russian).
- Slonimsky Yu.B. Keratoconus. Contact lenses or keratoplasty? Glaz. 1998; 4:28–9 (In Russian).
- Slonimsky Yu.B., Slonimsky A.Yu. Keratoconus. Modern conceptions on the diseases, patients control, radical surgery. Available at: <http://www.sfe.ru/information/articles/keratokonus.html> (In Russian).
- Colin J., Velou S. Current surgical options for keratoconus. J. Cataract Refract. Surg. 2003; 29 (2): 379–86.
- Kymionis G.D., Syganos C.S., Tsiklis N.S. Long-term follow-up of intacs in keratoconus. Am J Ophthalmol. 2007; 143 (2): 236–44. doi.org/10.1016/j.ajo.2006.10.041.
- Penkina A.V., Neroev V.V., Khandjan A.T., Oganessian O.G., Sklyarova A.S. Femtolaser implantation of intrastromal corneal ring segment in combined corneal collagen crosslinking in treatment of keratoconus. Prakticheskaya meditsina. Oftal'mologiya. 2012; 1 (4): 111–4 (In Russian).
- Neroev V.V., Khandzhan A.T., Penkina A.V., Sklyarova A.S. Using corneal collagen crosslinking in the treatment of keratoconus stages I and II. Russian ophthalmological journal. 2012; 5 (1): 62–4 (In Russian).
- Theuring A., Spoerl E., Pillunat L.E., Raiskup F. Hornhautkollagenvernetzung mit Riboflavin und UVA-Licht bei Patienten mit progressive Keratokonus. 10-Jahres-Ergebnisse (Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus. Results after 10-year follow-up). Ophthalmologe. 2014; 112 (2): 1–4. doi: 10.1007/s00347-014-3114-0 (Article in German).
- Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. Curr Opin Ophthalmol. 2006; 17: 356–60.
- Stepanov V.M. Molecular biology. Moscow: Vysshaya shkola; 1996 (In Russian).
- Smirnov A.V., Nesterova O.B., Golubev R.V. Succinic acid and its use in medicine. Part II. Nefrologiya. 2014; 4: 12–24 (In Russian).
- Mashkovsky M.D. Drugs and medicinal preparations: physician's handbook. Moscow: Meditsina. 1984: 67 (In Russian).
- Borzenok S.A., Moroz Z.I., Shemakin S.Yu., Kondrashova M.N. Eye drops “Pirotonik”. Russian patent #2127100; 1999 (In Russian).
- Chesnokova N.B., Beznos O.V., Pavlenko T.A., Zabozaev A.A., Pavlova M.V. Antioxidant properties of Mexidol eye drops and the effect of its topical use on corneal epithelial wound healing in the experiment. Russian ophthalmological journal. 2012; 5 (1): 88–92 (In Russian).
- Guidelines for preclinical studies of medicines. Part 1. Moscow: Grif I K. 2012 (In Russian).

Для контактов: Иомдина Елена Наумовна
E-mail: iomdina@mail.ru