

**ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ НА ФОТОСШИВАНИЕ СКЛЕРЫ**М.Е. Швачкина

Научный руководитель: доцент, к.х.н. А.Б. Правдин

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.

Чернышевского,

Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, 410012

E-mail: marevesh@mail.ru

**INFLUENCE OF OPTICAL CLEARING ON COLLAGEN CROSSLINKING OF SCLERA**M.E. Shvachkina

Scientific Supervisor: Associate Professor at the Department of Optics and Biophotonics A.B. Pravdin

Saratov State University, Russia, Saratov, Astrakhanskaya str., 83, 410012

E-mail: marevesh@mail.ru

***Abstract.** This work is devoted to the study of the influence of optical clearing of sclera by hyperosmotic agents on formation of collagen crosslinks in the thickness of the sclera induced by 0,1% riboflavin solution and ultraviolet radiation at 370 nm wavelength. Using optical coherence tomography (OCT), the cross-section area of porcine sclera specimens during optical clearing were determined. Based on the obtained data, the optimal time intervals between the application of the immersion agent and UV-irradiation during photo-crosslinking were defined. The estimate of collagen photo-crosslinks distribution in the cross section of the specimen in non-clearing and optically clearing sclera samples ex vivo was performed using a multiphoton tomograph MPTflex.*

**Введение.** В наше время одним из основных заболеваний, приводящих к нарушению зрения, является близорукость, серьезной формой которой является прогрессирующая миопия, характеризующаяся растяжением склеры [1]. Перспективным методом лечения прогрессирующей миопии, не предполагающим внедрение инородных тел в организм, является коррекция механических свойств склеры задней поверхности глазного яблока посредством фотовоздействия, приводящего к образованию дополнительных ковалентных связей между молекулами коллагена внутри склеры (фотосшивание коллагена), с использованием рибофлавина в качестве сенсibilизатора и ультрафиолетового излучения. Ультрафиолетовое фотосшивание склерального коллагена повышает жесткость склеры и улучшает ее механические свойства, способствуя стабилизации патологического процесса (замедляя или даже останавливая патологические изменения) при прогрессирующей миопии, что доказано в экспериментах на мелких лабораторных животных [2]. В то же время, в литературе [3] отмечается недостаточная эффективность существующих методик кросслинкинга коллагена для склеры человека, что можно связать с сильным рассеянием ультрафиолетового излучения биотканью, ослабляющим эффективность фотовоздействия в толще ткани. Увеличить глубину проникновения ультрафиолетового излучения в биоткань позволяет метод иммерсионного оптического просветления [4-7]. Нанесение иммерсионных агентов на склеру перед процедурой фотосшивания может увеличить эффективность данного метода и уменьшить дозу ультрафиолетового облучения, делая процедуру более безопасной. Ранее было показано [8], что сенсibilизированное фотовоздействие в условиях оптического

иммерсионного просветления приводит к большему увеличению жесткости образцов склеры *ex vivo*. В литературе, в частности в [7], было отмечено уменьшение площади образца соединительной ткани (образованной сеткой пересекающихся коллагеновых пучков) при действии иммерсионных просветляющих агентов. В работе [9] показано, что модифицированные в результате действия гипертонического иммерсионного агента оптические свойства дермы сохраняются после регидратации образца, если последний был подвергнут в просветленном состоянии химическому сшиванию коллагена. В свете этого ожидается, что иммерсионное воздействие просветляющих агентов на заднюю поверхность склеры приведет к сокращению поверхности склеры, то есть к купированию растяжения склеры при развитии миопии, а фиксация такого сжатого состояния путем образования сшивок позволит не только замедлить развитие миопии, но и уменьшить уже развившиеся к моменту воздействия растяжение (изменение формы) задней стенки, и тем самым осуществить не только стабилизирующий, но и терапевтический эффект. Целью настоящего исследования было определение оптимального времени воздействия иммерсионным агентом для достижения максимального сокращения склеры и изучение с помощью многофотонной томографии распределения по глубине склеры коллагеновых УФ-фотосшивок в непросветленных и оптически просветленных образцах склеры *ex vivo*.

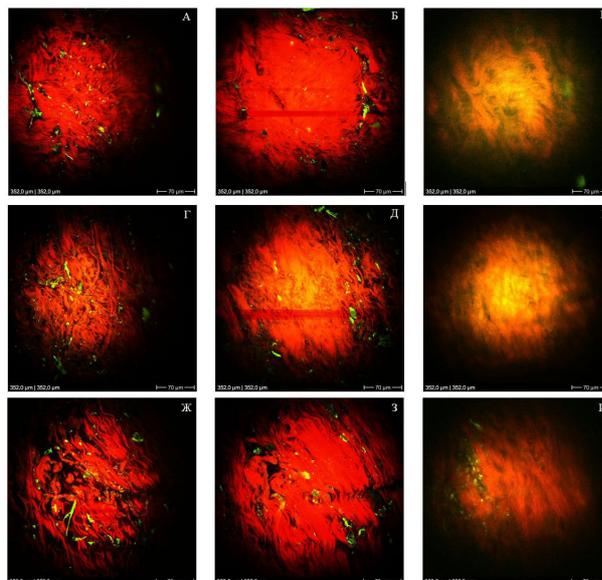
**Материалы и методы.** В работе действие иммерсионного агента на геометрические размеры образцов свиной склеры оценивалось по изменению поперечного сечения образца в процессе просветления, которое контролировалось с помощью оптического когерентного томографа ThorLabs GANYMEDE-II. В качестве просветляющего иммерсионного агента использовался 88% водный раствор глицерина. По полученным данным было определено, что наибольшее уменьшение поперечного сечения ткани происходит за 20 минут с момента погружения образцов в иммерсионную жидкость.

Для изучения влияния оптического просветления на эффективность методики образования сшивок, описанной в работах [2,3] были сравнены изображения сигналов двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции и второй гармоники, полученные с помощью многофотонного томографа MPTflex, образца свиной склеры, обработанного 0,1% раствором рибофлавина в течение 20 минут и ультрафиолетовым излучением длиной волны 370 нм в течение 30 минут и образца склеры (обработанного 0,1% раствором рибофлавина), просветленного 88% раствором глицерина 20 минут, а затем подвергнувшегося УФ облучению.

**Результаты.** На рисунке 1 представлены изображения сигналов двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции и второй гармоники образцов склеры в нативном состоянии, после фотосшивания и образца, предварительно просветленного перед фотосшиванием на глубине 5, 15 и 50 мкм. Основываясь на том, что эластин и поперечные связи между фибриллами коллагена являются основными источниками автофлуоресценции, по полученным данным были сделаны выводы о том, что при предварительном просветлении коллагеновые фотосшивки образуются на большей глубине.

**Заключение.** Было определено оптимальное время воздействия 88% водным раствором глицерина на образцы свиной склеры для достижения максимального сжатия и получены изображения сигналов двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции и второй гармоники в непросветленных и оптически просветленных образцах склеры *ex vivo* на разной глубине с помощью многофотонной томографии.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-32-50190).



*Рис. 1. Изображения образцов склеры свиной на разной глубине, полученные с помощью мультифотонного томографа А-В – в нативном состоянии, Г-Е – после воздействия раствором рибофлавина и ультрафиолета, Ж-И – после воздействия раствором рибофлавина, просветления раствором глицерина и облучения ультрафиолетом. Красным изображен сигнал второй гармоники, зеленым – сигнал двухфотонно возбуждаемой автофлюоресценции*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morgan, I. G., Ohno-Matsui, K., Saw, S. M. (2012). Myopia. The Lancet, no. 9827, pp. 1739-1748.
2. Wollensak, G., Iomdina, E. (2009). Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). Acta ophthalmologica, no. 2, pp. 193-198.
3. Zhang, Y., Li, Z., Liu, L., Han, X., Zhao, X., Mu, G. (2014). Comparison of Riboflavin/Ultraviolet-A Cross-Linking in Porcine, Rabbit, and Human Sclera. BioMed Research International, no. 2014, pp. 1-5.
4. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Оптическое просветление склеры глаза in vivo под действием глюкозы // Квантовая электроника. – 2006. – Т. 36. – №. 12. – С. 1119-1124.
5. Tuchin, V.V. (2006). Optical clearing of tissues and blood. Bellingham: Spie Press. J. of Biomedical Photonics & Eng., no. 1(1), pp. 22-58.
6. Zhu, D., Larin, K.V., Luo, Q., Tuchin, V.V. (2013). Recent progress in tissue optical clearing. Laser & photonics reviews, no.5, pp. 732-757.
7. Тучина Д. К., Генин В.Д., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление тканей кожи ex vivo под действием полиэтиленгликоля // Оптика и спектроскопия. – 2016. – Т.120. – №.1. – С. 36-45.
8. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2015. – Т. 15. – №. 4. – С. 37-41
9. Tanaka, Y., Shi, D., Kubota, A., Takano, Y., Fuse, N., Yamato, M., Okano, T., Nishida, K. (2011). Irreversible optical clearing of rabbit dermis for autogenic corneal stroma transplantation. Biomaterials, no.28, pp. 6764-6772.