



## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

УДК 577.344.3:53.06:617.7

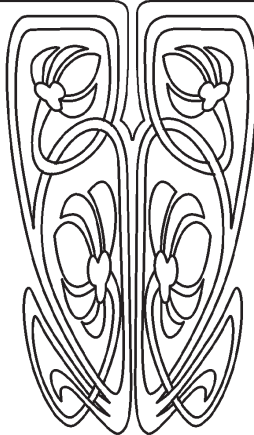
### О возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани

М. Е. Швачкина

Швачкина Марина Евгеньевна, аспирант кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, marevesh@mail.ru



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ



Метод рибофлавин/УФ кросслинкинга коллагена представляет значительный интерес как возможный способ укрепления склеры при лечении миопии. Одной из проблем применения этого метода является быстрое уменьшение интенсивности УФ-излучения по мере его распространения в ткань из-за сильного рассеяния. Эффективным способом увеличения глубины проникновения оптического излучения в склеру является метод иммерсионного оптического просветления ткани. Под действием иммерсионных жидкостей, применяемых для оптического просветления, обычно происходит частичная дегидратация ткани. Известно, что химический кросслинлинг ткани в дегидратированном состоянии способен приводить к существенному уменьшению объема ткани после ее регидратации до насыщенного состояния по сравнению с исходным, т. е. к фиксации контрактированного состояния ткани (КСТ). В этом случае в насыщенном регидратированном состоянии ткань, подвергнутая кросслинкингу, содержит меньшее количество воды, чем в исходном состоянии. В настоящей работе исследуется возможность фиксирования КСТ при осуществлении рибофлавин/УФ кросслинкинга ткани в частично дегидратированном состоянии. Исследования проводились *in vitro* на образцах вторичных сухожильных пучков из хвоста крысы. Оценка геометрии сухожильных пучков и содержания воды в ткани осуществлялась методом оптической когерентной томографии. Содержание воды определялось по измеренным значениям среднего группового показателя преломления ткани. Установлено, что фиксирование КСТ может происходить, если фотосшивание осуществляется при уровнях объемной гидратации ткани меньше 0.8. Наблюдалась тенденция к увеличению вероятности фиксирования КСТ и степени результирующей контракции ткани с уменьшением степени гидратации ткани во время фотосшивания. Когда фотосшивание ткани осуществлялось при уровнях объемной гидратации меньше 0.5, фиксирование КСТ наблюдалось во всех случаях (9 образцов), при этом результирующая контракция ткани составляла 8–15%.

**Ключевые слова:** рибофлавин/УФ кросслинлинг, кросслинлинг коллагена, гидратация ткани.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2019-19-3-210-222>

#### Введение

В последнее время метод кросслинкинга коллагена (CXL), заключающийся в целенаправленном увеличении количества поперечных связей (сшивок) между высокомолекулярными составляющими ткани, широко изучается с целью определения возможностей его



применения в офтальмологии [1–7]. Данные исследований показывают, что этот метод может значительно улучшить механическую прочность коллагенсодержащих тканей [8–11], и это может быть использовано для остановки деструктивных изменений в корнеосклеральной (фиброзной) оболочке глаза, в частности для укрепления роговицы при кератэктазии [6–8] и склеры при прогрессирующей миопии [9–15]. Также изучается возможность применения СХЛ для лечения воспалительных заболеваний, таких как вирусный и бактериальный кератоконъюнктивит [16], и патологии эндотелия роговицы, приводящей к хроническому отеку роговицы (буллезная кератопатия) [17]. Развиваются разные варианты кросслинкинга, в которых образование поперечных сшивок происходит либо под действием химических веществ, наносимых на поверхность [13, 18–20], либо в ходе фотоокислительной реакции с участием фотосенсибилизирующего красителя и возбуждающего излучения (бенгальский розовый и зеленый свет [21, 22], рибофлавин и ультрафиолет [6–13, 17], рибофлавин и синий свет [23, 24]). Особое внимание привлекает к себе вариант фотосшивания, в котором для формирования сшивок используются рибофлавин как сенсибилизатор и ультрафиолетовое излучение с длиной волны 370 нм. Стандартный протокол этого метода [7], который уже широко применяется в медицинской практике для лечения кератоконуса, включает следующие основные этапы: 1) удаление эпителиального слоя с обрабатываемой области роговицы; 2) пропитывание стромы роговицы водным раствором рибофлавина (0.1%) и декстрана (20%) в течение 30 мин; 3) облучение ультрафиолетовым излучением мощностью 3 мВт/см<sup>2</sup> в течение 30 мин с одновременными инстилляциями раствора рибофлавина.

Считается, что структурные изменения роговицы под действием ультрафиолетового излучения и рибофлавина происходят в основном в верхних слоях роговицы на глубине до 200 мкм. Опытным путем было показано, что на этой глубине происходит поглощение 65% энергии излучения, а на глубине от 200 до 400 мкм – лишь 25–30% [25].

Предположительные химические механизмы образования поперечных связей обсуждаются в работах [4, 26–28]. Какие именно аминокислоты участвуют в этом процессе и где именно возникают сшивки, пока точно не известно [4, 6, 29]. В работе [30] было показано, что при

рибофлавин/УФ кросслинкинге поперечные связи могут образовываться между молекулами коллагена, а также между молекулами коллагена и сердцевинными (core-) белками протеогликанов – мимеканом и декорином. Для определения локализации поперечных сшивок проводились эксперименты по наблюдению набухания ткани после процедуры кросслинкинга [6, 31]. То, что поперечные связи способны влиять на свойства набухания ткани, было показано ранее на примере искусственных коллагеновых мембран [32]. В этой работе сшивки создавались химически, без фотовоздействия. Было показано, что кросслинкинг приводит к снижению степени набухания коллагеновых пленок. Пониженная степень набухания образцов после процедуры кросслинкинга говорит о возможности образования прямых межфибриллярных поперечных связей [6, 32]. В работе [6] на основе анализа экспериментальных данных было высказано предположение, что связи между сердцевинными белками протеогликанов и молекулами коллагена, образующиеся в результате фотосшивания, также могут влиять на свойства набухания ткани, предотвращая отрыв протеогликанов от фибрилл. В экспериментах по набуханию образцов роговицы после воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения [6] не было замечено различий в степени набухания между нативными образцами роговицы и образцами, подвергнутыми фотосшиванию. Эти данные находятся в противоречии с выводами работы [31], где утверждается, что степень набухания роговицы во влажной камере уменьшается после рибофлавин/УФ кросслинкинга. В статье [6] высказано предположение, что это отличие связано с присутствием в образцах, подвергнутых набуханию [31], значительного количества рибофлавина и декстрана – рибофлавин и декстран не вымывались из образцов перед экспериментами по набуханию или в ходе этих экспериментов. В экспериментах, описанных в [6], набухание образцов проходило в физиологическом растворе, который периодически заменялся, что приводило к постепенному вымыванию рибофлавина и декстрана из образцов. Основываясь на результатах своих экспериментов по изучению рассеяния рентгеновских лучей и набуханию, авторы работы [6] пришли к заключению, что поперечные связи в ходе фотосшивания вероятнее всего возникают: 1) внутри молекул коллагена и между молекулами коллагена у поверхности фибрилл (только в



приповерхностной области фибриллы); 2) между сердцевинными белками протеогликанов, прикрепленных к одной и той же фибрилле или к соседним фибриллам; 3) между сердцевинными белками протеогликанов и фибриллярным и нефибриллярным коллагеном (нефибриллярный коллаген присутствует в межфибриллярном веществе). Увеличением количества сшивок такого рода можно объяснить повышение жесткости ткани и ее устойчивости к воздействию протеолитических ферментов после фотосшивания [1–3, 6].

Данные электронно-микроскопического анализа [33, 34] указывают на то, что после процедуры фотосшивания происходит увеличение диаметра коллагеновых фибрилл, тогда как данные рентгеноструктурного анализа [6] – на отсутствие такого изменения. Авторы работы [6] высказали предположение, что различие в среднем диаметре фибрилл на электронно-микроскопических изображениях для сшитых и несшитых образцов связано с дегидратацией ткани при подготовке срезов для электронно-микроскопических исследований и отражает разную степень гидратации фибрилл и их протеогликановых оболочек в приготовленных для электронной микроскопии срезах сшитых и несшитых образцов.

Как отмечено выше, рибофлавин/УФ кросслинкинг уже широко используется в медицинской практике для лечения болезней, связанных с патологией роговицы глаза. В настоящее время проводятся многочисленные исследования, направленные на изучение возможностей использования рибофлавин/УФ кросслинкинга для модификации свойств склеры, в частности при лечении миопии [3, 9–13]. Одной из основных проблем применения этой техники к склере является сильное рассеяние УФ-излучения в ткани, которое приводит к быстрому уменьшению интенсивности излучения по мере его распространения в глубь ткани. Среди возможных способов увеличения глубины проникновения оптического излучения в ткань при фотосшивании склеры рассматривается метод иммерсионного оптического просветления ткани [35]. Как известно [36–41], иммерсионное оптическое просветление позволяет значительно увеличить прозрачность склеры. Оптическое просветление тканей, как правило, осуществляется с использованием осмотически активных агентов, таких как тразограф [38], глюкоза [39, 40], глицерин [41], пропиленгликоль [37], полиэтиленгликоль

(PEG) [42]. Использование таких иммерсионных агентов сопровождается частичным обезвоживанием ткани. Выход воды из ткани (дегидратация) в значительной степени способствует увеличению ее прозрачности. При применении такого иммерсионного просветления процедура кросслинкинга будет осуществляться в условиях, когда в ткани содержится значительно меньшее количество воды, чем в нативном состоянии. Заметим, что стандартные процедуры кросслинкинга предполагают сшивание ткани в условиях гидратации, близких к естественным. Дегидратация ткани приводит к уменьшению расстояния между коллагеновыми фибриллами, что может увеличить вероятность образования прямых или опосредованных (через протеогликаны) межфибриллярных связей. При больших степенях дегидратации и диаметр коллагеновых фибрилл может оказаться меньшим, чем в нативном состоянии [43]. Фотосшивание фибриллы в таком дегидратированном состоянии может привести к тому, что после регидратации ее диаметр будет меньше, чем в нативном состоянии. И то, и другое, по всей видимости, должно проявиться в том, что фотосшитая ткань после ее регидратации будет иметь меньший объем, чем в исходном состоянии, т. е. после фотосшивания и регидратации образовавшиеся сшивки будут удерживать ткань в контрактированном состоянии. Вопрос о том, возможно или нет удержание (фиксирование) контрактированного состояния ткани в конкретных условиях, несомненно, является очень важным. Оценка возможности фиксации контрактированного состояния ткани после рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженных уровнях гидратации ткани и является основной целью настоящей работы.

### Материалы и методы

В качестве образцов использовались вторичные сухожильные пучки из хвоста крысы диаметром от 300 до 450 мкм. По взаимному расположению фибрилл в пучках и распределению диаметров фибрилл сухожилия схожи со склерой. Диаметр подавляющей части коллагеновых фибрилл в сухожилиях лежит в диапазоне от 20 до 300 нм [44–46], в склере – от 20 до 230 нм [46]. Выбор сухожилий в качестве образцов обусловлен их более простой структурой и возможностью легко и в достаточно полном объеме контролировать геометрию и оптические свойства образцов с помощью оптической когерентной томографии [47, 48]. До момента измерений



образцы хранились в физиологическом растворе (0.9%-ный водный раствор хлорида натрия) не более 7 дней. Никаких статистически значимых изменений площади сечения пучков и их оптических характеристик, в том числе среднего группового показателя преломления, в течение данного срока хранения зафиксировано не было.

Для измерений использовался томограф ThorLabs-ОСР930SR (ThorLabs, США) с центральной длиной волны зондирующего излучения  $\lambda_0 = 930$  нм и шириной полосы 100 нм.

Перед измерениями исследуемый сухожильный пучок закреплялся зажимами на предметном стекле в слегка натянутом состоянии. Затем пучок окружался физиологическим раствором, накрывался покровным стеклом и устанавливался в ОКТ-систему так, чтобы направление пучка было перпендикулярно направлению В-сканирования. Для того чтобы покровное стекло не надавливало на образец, между предметным и покровным стеклами размещались спейсеры толщиной 1 мм. Затем фиксировались ОКТ-изображения поперечного сечения образца в нативном состоянии в двух областях, одна из которых впоследствии подвергалась УФ-облучению, а вторая – нет. После этого физиологический раствор заменялся на 0.1%-ный раствор рибофлавина в физиологическом растворе, и образец выдерживался в нем в течение 20 мин. Затем раствор рибофлавина удалялся с предметного стекла, образец окружался большим количеством иммерсионного агента и снова накрывался покровным стеклом. После этого регистрировались ОКТ-изображения образ-

ца в двух рассматриваемых областях. В качестве иммерсионных агентов использовались 37, 58.5, 87%-ные водные растворы полиэтиленгликоля PEG-300, содержащие 0.1% рибофлавина. Время выдерживания образцов в просветляющих агентах выбиралось, основываясь на результатах предыдущих исследований [47], так, чтобы этого времени было достаточно для достижения образцом минимального объема. Для 58.5 и 87%-ных растворов PEG время выдерживания составляло 10 мин, для 37%-ных PEG – 15 мин. После иммерсионной дегидратации иммерсионный раствор удалялся с помощью фильтровальной бумаги, и участок образца длиной 4.5 мм подвергался облучению ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм в течение 10 мин. Плотность ультрафиолетового излучения на поверхности образца составляла 33.1 мВт/см<sup>2</sup>. После облучения образец окружался большим количеством физиологического раствора для регидратации ткани. В течение 2 ч регидратации через определенные промежутки времени регистрировались ОКТ-изображения пучка в обеих областях. Пример трансформации ОКТ-изображений сухожильного пучка на этапе дегидратации и регидратации показан на рис. 1. По истечении 2 ч заметных изменений параметров образца не происходило. На основании этого был сделан вывод, что за 2 ч образец достигает насыщенного регидратированного состояния, т. е. состояния, при котором дальнейшего увеличения содержания воды в образце не происходит.

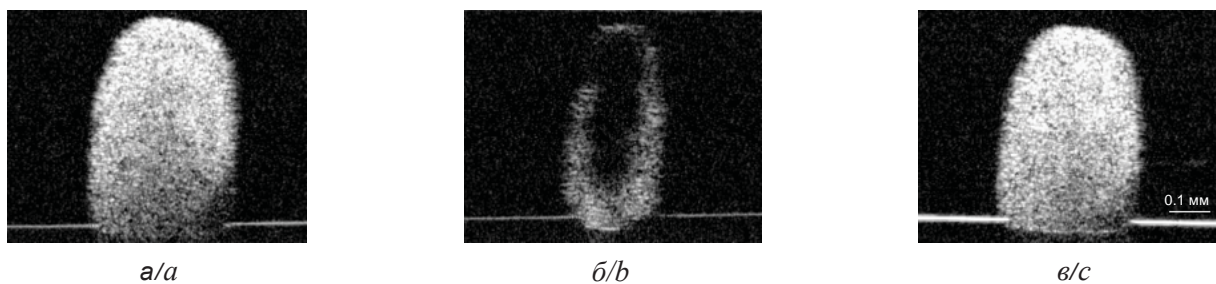


Рис. 1. ОКТ-сканы образца сухожильного пучка в нативном состоянии (а), после дегидратации в 37%-ном растворе PEG (б) и после облучения и регидратации в физиологическом растворе (в). Масштаб на всех сканах одинаков  
 Fig. 1. OCT-images of a transverse cross-section of a rat tail tendon fascicle in native state (a), after dehydration in 37% PEG (b) and after irradiation and rehydration in normal saline solution (c). The scale on all images is the same

Групповой показатель преломления ткани  $n_t$  оценивался по смещению изображения верхней поверхности предметного стекла под образцом по методике, представленной в работах [47, 48], и рассчитывался посредством

усреднения значений, полученных для 3 линий А-сканирования. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета прикладных программ «STATISTICA 10».



Для оценки содержания воды в ткани  $c_w$  нами использовалась следующая аппроксимационная формула [47, 48]:

$$n_t = (1 - c_w) n'_{dry} + n_w c_w \quad (1)$$

с  $n_w = 1.3416$  и  $n'_{dry} = 1.594$ , где  $n_t$  – средний групповой показатель преломления образца,  $n'_{dry}$  – экстраполяционное значение среднего группового показателя преломления ткани в сухом состоянии,  $n_w$  – групповой показатель преломления воды [47, 48].

Объемная степень гидратации образца  $H_v = V_w / V_{dry}$ , определяемая как отношение объема воды в образце  $V_w$  к сухому объему образца  $V_{dry}$ , рассчитывалась по полученным значениям объемной доли воды  $c_w = V_w / (V_w + V_{dry})$  по формуле:

$$H_v = \frac{c_w}{1 - c_w}. \quad (2)$$

Для оценки зависимости степени контракции ткани после фотосшивания с предварительным просветлением от степени гидратации ткани после воздействия иммерсионного агента

(степень гидратации в дегидратированном состоянии  $H_{V-deh}$ ), при которой осуществлялось фотосшивание, рассчитывался коэффициент фотоиндуцированной контракции ( $K$ ), определяемый как отношение объемов в исходном состоянии равновеликих областей в облученной ( $V_{cl}$ ) и необлученной ( $V_{ncl}$ ) частях образца по формуле:

$$K = \frac{V_{cl}}{V_{ncl}} = \frac{1 + H_{V-cl}}{1 + H_{V-ncl}}. \quad (3)$$

### Результаты и их обсуждение

Среднее по всем образцам значение показателя преломления ткани в нативном состоянии составило  $1.413 \pm 0.006$  ( $\pm$ SD). Согласно этой оценке, средняя степени гидратации  $H_v$  образцов в нативном состоянии составляла  $2.53 \pm 0.28$ .

Средние значения показателя преломления ткани в облученной и необлученной областях образца в регидратированном состоянии после просветления в рассматриваемых иммерсионных агентах представлены в таблице.

**Средние значения показателя преломления образцов сухожильных пучков после их дегидратации в растворе PEG ( $n_{in-PEG}$ ) и последующей регидратации в физиологическом растворе в течение 2 ч ( $n_{regid}$ ) в облученной и необлученной областях. Все значения представлены в виде: среднее  $\pm$  стандартное отклонение**

**Average values of the refractive index of the tendon fascicles after their dehydration in PEG solution ( $n_{in-PEG}$ ) and subsequent rehydration in physiological solution for 2 hours ( $n_{regid}$ ) in the irradiated and non-irradiated regions. All values are presented as mean  $\pm$  standard deviation**

Иммерсионный агент/ Immersion agent	$n_{in-PEG}$	$n_{regid}$	
		Облученная область / Irradiated region	Необлученная область / Non-irradiated region
87% PEG	$1.519 \pm 0.007$	$1.421 \pm 0.002$	$1.413 \pm 0.004$
58.5% PEG	$1.496 \pm 0.006$	$1.422 \pm 0.001$	$1.418 \pm 0.001$
37% PEG	$1.478 \pm 0.004$	$1.422 \pm 0.006$	$1.420 \pm 0.003$

Для образцов, дегидратированных перед процедурой фотосшивания в 87%-ном растворе PEG, среднее значение показателя преломления образцов в облученной области в регидратированном состоянии составило  $1.421 \pm 0.002$ , что заметно выше, чем среднее значение показателя преломления образцов в нативном состоянии ( $1.413 \pm 0.006$ ). Анализ данных с помощью  $t$ -критерия Стьюдента ( $t$ ) – проверялась гипотеза о равенстве средних значений у двух выборок с использованием двухвыборочного  $t$ -критерия для независимых выборок – показал, что различие средних значений указанных показателей преломления можно считать статистически значимым ( $t = 4.34$  при  $p = 0.00009$ ). При сравнении

полученных значений показателей преломления образцов в исходном состоянии и в необлученной области в регидратированном состоянии статистически значимого различия между ними выявлено не было ( $t = 0.13$  при  $p = 0.89$ ). В то же время анализ показал, что различие средних значений показателей преломления в облученной и необлученной областях образцов в регидратированном состоянии можно считать статистически значимым ( $t = 5.59$  при  $p = 0.00003$ ). Это свидетельствует о том, что содержание воды в облученной области образцов после регидратации было меньше, чем в необлученной области, т. е. в результате фотосшивания произошла стабилизация контрактированного состояния ткани.



Статистическая обработка данных для образцов, дегидратированных в 37%-ном PEG перед процедурой фотосшивания, показала, что значения среднего показателя преломления ткани как в облученной, так и необлученной области образцов в регидратированном состоянии являются в среднем бóльшими, чем в нативном состоянии ( $t = 2.94$  при  $p = 0.0057$  и  $t = 2.53$  при  $p = 0.0158$  соответственно). Статистически значимого различия между средними значениями показателя преломления в облученной и необлученной областях образцов в регидратированном состоянии обнаружено не было ( $t = 0.46$  при  $p = 0.66$ ). Увеличение среднего показателя преломления ткани в регидратированном состоянии в необлученной области по сравнению с нативным состоянием в данном случае, вероятно, связано с диффузией молекул PEG в приповерхностные области образца и сохранением их внутри образца при регидратации. С уменьшением концентрации PEG в иммерсионном растворе скорость диффузии молекул PEG в коллагенсодержащие ткани увеличивается, и вполне возможно, что при малых концентрациях PEG за время иммерсионной дегидратации внутрь образца проникает значительное количество этого вещества. В пользу этого предположения говорит монотонный характер изменения показателя преломления в необлученной области образцов в регидратированном состоянии при изменении концентрации PEG (см. таблицу).

Для разных образцов, дегидратированных в растворах с одной и той же концентрацией PEG, наблюдался большой разброс значений показателя преломления ткани в достигнутом состоянии дегидратации. Это говорит о том, что степень гидратации разных образцов в дегидратированном состоянии была существенно различной. Для того чтобы проанализировать данные на предмет наличия корреляции между содержанием воды в ткани во время ее облучения и содержанием воды в ткани в регидратированном состоянии, мы сравнили зависимости разности показателей преломления образца после регидратации ( $n_{regid}$ ) и в нативном состоянии ( $n_{native}$ )  $n_{regid} - n_{native}$  от значения показателя преломления образца после воздействия иммерсионного агента ( $n_{in-PEG}$ ) для облученной и необлученной областей. Экспериментальные точки представлены на рис. 2. Также на этом рисунке представлены результаты линейной аппроксимации экспериментальных данных (метод наименьших квадратов) и значения коэффициентов корреляции Пирсона. Как видно из представленных графиков, для облученной области существует тенденция к увеличению различия между  $n_{regid}$  и  $n_{native}$  с увеличением  $n_{in-PEG}$ . Для необлученной области такой тенденции не было выявлено. Для оценки влияния фотосшивания на величину показателя преломления образца в регидратированном состоянии на рис. 3 представлена зависимость разности показателей преломления образцов

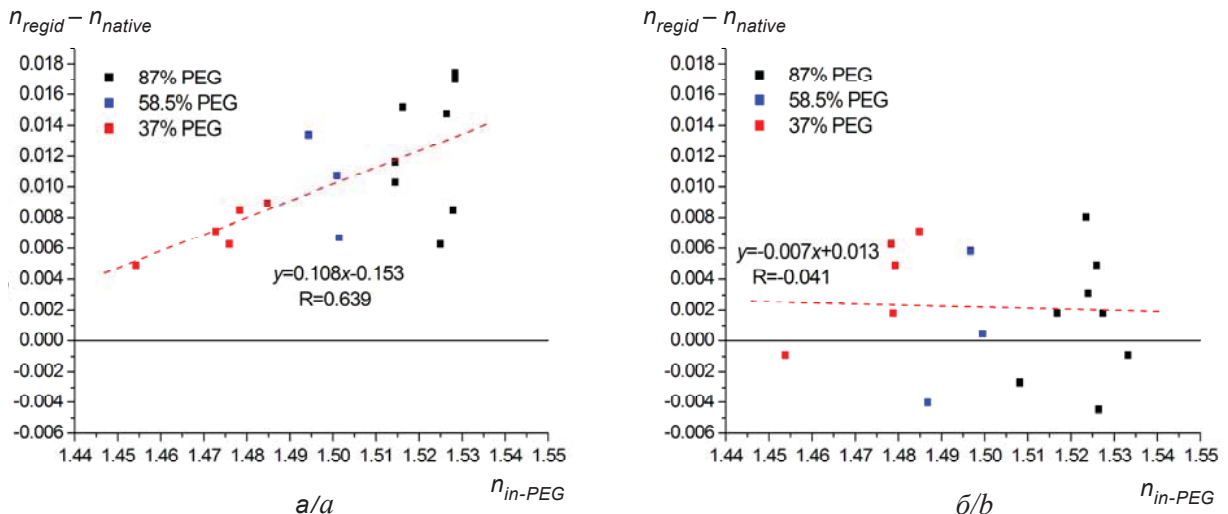


Рис.2. Зависимость разности показателя преломления сухожильного пучка после регидратации ( $n_{regid}$ ) и его показателя преломления в нативном состоянии ( $n_{native}$ ) от показателя преломления образца в дегидратированном состоянии ( $n_{in-PEG}$ ) в облученной (а) и необлученной (б) области

Fig.2. Difference of the refractive index of the tendon fascicle after rehydration ( $n_{regid}$ ) and its refractive index in the native state ( $n_{native}$ ) vs the refractive index of the sample during UV exposure ( $n_{in-PEG}$ ) for the irradiated region (a) and non-irradiated region (b)

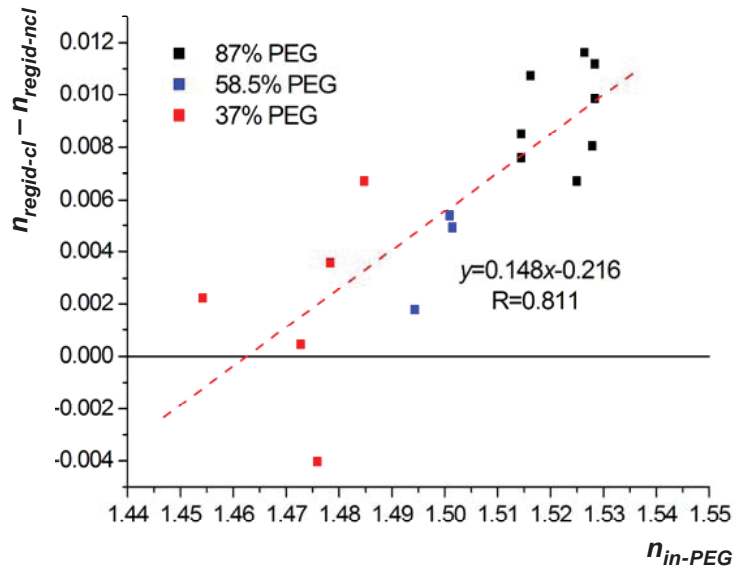


Рис. 3. Зависимость разности показателей преломления сухожильного пучка в облученной и необлученной области после регидратации ( $n_{regid-cl} - n_{regid-ncl}$ ) от значения показателя преломления образца в дегидратированном состоянии ( $n_{in-PEG}$ )

Fig. 3. Difference of the refractive index of the tendon fascicle in the irradiated region and that in the non-irradiated region after rehydration ( $n_{regid-cl} - n_{regid-ncl}$ ) vs the refractive index of the sample during UV exposure ( $n_{in-PEG}$ )

в облученной и необлученной областях ( $n_{regid-cl} - n_{regid-ncl}$ ) от показателя преломления образца в дегидратированном состоянии ( $n_{in-PEG}$ ).

По данным, представленным на рис. 2, 3, в соответствии с формулами (2) и (3) были рас-

считаны значения коэффициента фотоиндуцированной контракции  $K$ .

На рис. 4 представлены зависимости этого коэффициента от степени гидратации образца во время процедуры фотосшивания ( $H_{V-deh}$ ).

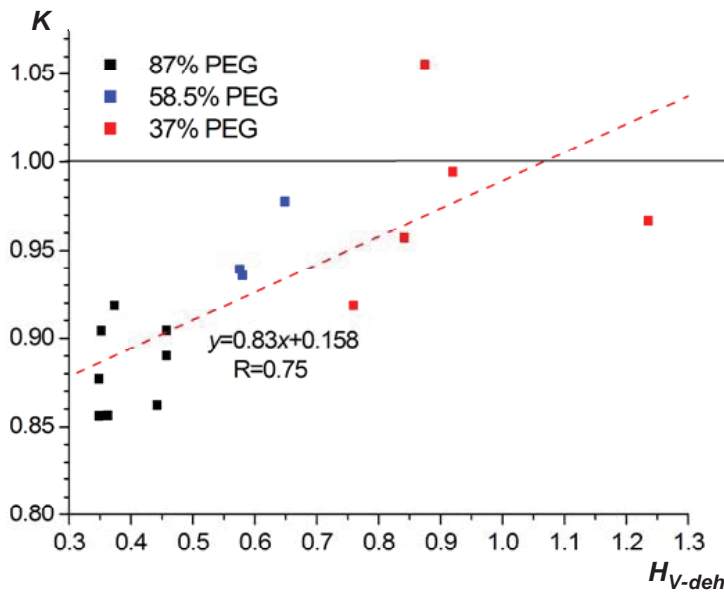


Рис. 4. Зависимость коэффициента фотоиндуцированной контракции ( $K$ ) от степени гидратации ткани во время УФ облучения ( $H_{V-deh}$ )

Fig. 4. Coefficient of photoinduced contraction ( $K$ ) vs the volume hydration of the tissue during UV exposure ( $H_{V-deh}$ )



Из этого рисунка видно, что воздействие 87%-ного раствора PEG приводило к уменьшению уровня гидратации образцов до  $H_{V-deh} = 0.345-0.455$ , а после фотосшивания в этом состоянии и регидратации относительное уменьшение объема облученной области составляло 8–15% ( $K = 0.85-0.92$ ). Для образцов, просветлявшихся в растворах с меньшей концентрации PEG (58.5% и 37%), значения  $K$  оказались близкими 1. В случае 58.5%-ного раствора PEG средний уровень гидратации  $H_{V-deh}$  составил 0.6, а среднее значение  $K - 0.95$  ( $n = 3$ ). В случае 38%-ного раствора PEG эти величины составили соответственно 0.93 и 0.98 ( $n = 5$ ). Представленные данные позволяют сделать вывод, что при осуществлении рибофлавин/УФ кросслинkinга при пониженном уровне гидратации ткани может происходить фиксирование контрактированного состояния ткани. Большая степень контракции (8–15%) может наблюдаться, если фотосшивание ткани проводится при уровне ее гидратации  $H_{V-deh} < 0.5$ . Если фотосшивание осуществляется при уровнях гидратации  $H_{V-deh} > 0.8$ , фиксирования контрактированного состояния ткани не происходит, т. е. после регидратации ткань принимает объем близкий к исходному.

Фиксирование контрактированного состояния при рассматриваемом способе обработки ткани можно объяснить образованием новых связей между молекулами коллагена у поверхности дегидратированных фибрилл, которые не позволяют фибриллам восстановить свой первоначальный объем при регидратации. Напомним, что согласно анализу, проведенному в работе [6], связи между молекулами коллагена у поверхности фибрилл – это один из основных типов швов, возникающих в результате фотосшивания. Не исключена возможность образования и прямых межфибриллярных швов (связей между молекулами коллагена соседних фибрилл). При малых степенях гидратации ткани соседние коллагеновые фибриллы могут соприкоснуться друг с другом, что увеличивает вероятность образования прямых межфибриллярных связей. Шивки этого типа также способствуют стабилизации контрактированного состояния. Возможность образования прямых межфибриллярных швов продемонстрирована в работе [49], где сильно обезвоженные ткани подвергались химическому кросслинkinгу.

### Заключение

В данной работе экспериментально показано, что рибофлавин/УФ кросслинkinг ткани в дегидратированном состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным. Установлен предельный уровень гидратации ткани при фотосшивании, при котором происходит фиксирование контрактированного состояния ткани после рибофлавин/УФ кросслинkinга, и оценена степень результирующей контракции ткани как функция степени гидратации ткани во время фотосшивания.

### Благодарности

Автор выражает благодарность Д. А. Яковлеву и А. Б. Правдину за постановку задачи и полезные обсуждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-00-00275 (17-00-00272)) и Министерства образования и науки РФ (проект № 3.1586.2017/4.6).

### Список литературы

1. Бикбов М. М., Халимов А. Р., Усубов Э. Л. Ультрафиолетовый кросслинkinг роговицы // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2016. Т. 71, № 3. С. 224–232. DOI: 10.15690/vramn562
2. Иомдина Е. Н. Биомеханические аспекты кераторефракционной хирургии и корнеального кросслинkinга // Рос. педиатрическая офтальмология. 2015. Т. 10, № 4. С. 32–37.
3. Бикбов М. М., Суркова В. К., Усубов Э. Л., Астрелин М. Н. Кросслинkinг склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA). Обзор литературы // Офтальмология. 2016. Т. 12, №. 4. С. 4–8. DOI: 10.18008/1816-5095-2015-4-4-8
4. Meek K. M., Hayes S. Corneal cross-linking—a review // Ophthalmic and Physiological Optics. 2013. Vol. 33, № 2. P. 78–93. DOI: 10.1111/opo.12032
5. Гамидов Г. А., Мушкова И. А., Костенев С. В. Модификации кросслинkinга роговичного коллагена в лечении кератоконуса. Обзор литературы // Практическая медицина. 2018. Т. 3, № 114. С. 52–56.
6. Hayes S., Kamma-Lorger C. S., Boote C., Young R. D., Quantock A. J., Rost A., Khatib Y., Harris J., Yagi N., Terrill N., Meek K. 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. Vol. 8, № 1. P. e52860. DOI:10.1371/journal.pone.0052860





7. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *American journal of ophthalmology*. 2003. Vol. 135, № 5. P. 620–627. DOI: 10.1016/S0002-9394(02)02220-1
8. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2003. Vol. 29, № 9. P. 1780–1785. DOI: 10.1016/S0886-3350(03)00407-3
9. Wollensak G., Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2004. Vol. 30, № 3. P. 689–695. DOI: 10.1016/j.jcrs.2003.11.032
10. Wollensak G., Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA) // *Acta Ophthalmologica*. 2009. Vol. 87, № 2. P. 193–198. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01229.x
11. Zhang Y., Li Z., Liu L., Han X., Zhao X., Mu G. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera // *BioMed research international*. 2014. Vol. 2014. P. 1–5. DOI: 10.1155/2014/194204
12. Dotan A., Kremer I., Gal-Or O., Livnat T., Zigler A., Bourla D., Bourla D., Weinberger D. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of axial myopia in a rabbit model // *J. Vis. Exp.* 2016. № 110. P. e53201. DOI: 10.3791/53201
13. Иомдина Е. Н., Тарутта Е. П., Семчишен В. А., Коригодский А. Р., Захаров И. Д., Хорошилова-Маслова И. П., Игнатъева Н. Ю., Киселева Т. Н., Суаноян А. А., Милаш С. В. Экспериментальная реализация малоинвазивных технологий кросслинкинга склеры // *Вестн. офтальмологии*. 2016. Т. 132, № 6. С. 49–58. DOI: 10.17116/oftalma2016132649-56
14. Spaide R. F., Ohno-Matsui K., Yannuzzi L. A. *Pathologic Myopia*. N. Y. : Springer, 2014. 376 p.
15. Morgan I. G., Ohno-Matsui K., Saw S. M. Myopia // *The Lancet*. 2012. Vol. 379, № 9827. P. 1739–1748. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60272-4
16. Чечнева А. В., Сотникова Л. Ф., Иомдина Е. Н. Использование кросслинкинга роговичного коллагена для лечения у кошек осложнений инфекционного кератоконъюнктивита // *Изв. Междунар. академии аграр. образования*. 2018. Т. 2, вып. 42. С. 117–121.
17. Wollensak G., Aurich H., Wirbelauer C., Pham D. T. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy // *Ophthalmic Research*. 2009. Vol. 41, № 2. P. 114–117. DOI: 10.1159/000187630
18. Wollensak G., Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glycerinaldehyde // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2008. Vol. 34, № 4. P. 651–656. DOI: 10.1016/j.jcrs.2007.12.030
19. Tanaka Y., Shi D., Kubota A., Takano Y., Fuse N., Yamato M., Okano T., Nishida K. Irreversible optical clearing of rabbit dermis for autogenic corneal stroma transplantation // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32, № 28. P. 6764–6772. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.081
20. Иомдина Е. Н., Назаренко Л. А., Киселева О. А. Изучение связи биомеханических свойств склеры и гидродинамики глаза в эксперименте // *Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского*. 2011. Т. 2, № 4. С. 445–447.
21. Cherfan D., Verter E. E., Melki S., Gisel T. E., Doyle F. J., Scarcelli G., Yun S. H., Redmond R. W., Kochevar I. E. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness // *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013. Vol. 54, № 5. P. 3426–3433. DOI: 10.1167/iovs.12-11509
22. Zhu H., Alt C., Webb R. H., Melki S., Kochevar I. E. Corneal crosslinking with rose bengal and green light : efficacy and safety evaluation // *Cornea*. 2016. Vol. 35, № 9. P. 1234–1241. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000916
23. Iseli H. P., Körber N., Koch C., Karl A., Penk A., Huster D., Reichenbach A., Wiedemann P., Francke M. Scleral cross-linking by riboflavin and blue light application in young rabbits : damage threshold and eye growth inhibition // *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2016. Vol. 254, № 1. P. 109–122. DOI: 10.1007/s00417-015-3213-x
24. Karl A., Makarov F. N., Koch C., Körber N., Schuldt C., Krüger M., Reichenbach A., Wiedemann P., Bringmann A., Iseli H. P., Francke M. The ultrastructure of rabbit sclera after scleral crosslinking with riboflavin and blue light of different intensities // *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2016. Vol. 254, № 8. P. 1567–1577. DOI: 10.1007/s00417-016-3393-z
25. Schilde T., Kohlhaas M., Spoerl E., Pillunat L. E. Enzymatic evidence of the depth dependence of stiffening on riboflavin/UVA treated corneas // *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 2008. Bd. 105, № 2. S. 165–169. DOI: 10.1007/s00347-007-1587-9
26. Kamaev P., Friedman M. D., Sherr E., Muller D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin // *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012. Vol. 53, № 4. P. 2360–2367. DOI: 10.1167/iovs.11-9385
27. Raiskup F., Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet AI Principles // *The Ocular Surface*. 2013. Vol. 11, № 2. P. 65–74. DOI: 10.1016/j.jtos.2013.01.002
28. McCall A. S., Kraft S., Edelhauser H. F., Kidder G. W., Lundquist R. R., Bradshaw H. E., Dedeic Z., Dionne M. J. C., 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) // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010. Vol. 51, № 1. P. 129–138. DOI: 10.1167/iovs.09-3738
29. Wang C., Fomovsky M., Miao G., Zyablitskaya M., Vukelic S. Femtosecond laser crosslinking of the cornea for non-invasive vision correction // *Nature Photonics*. 2018. Vol. 12, № 7. P. 416–422. DOI: 10.1038/s41566-018-0174-8
  30. Zhang Y., Conrad A. H., Conrad G. W. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286, № 15. P. 13011–13022. DOI: 10.1074/jbc.M110.169813
  31. Wollensak G., Aurich H., Pham D. T., Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A // *Journal of cataract & refractive surgery*. 2007. Vol. 33, № 3. P. 516–521. DOI: 10.1016/j.jcrs.2006.11.015
  32. Charulatha V., Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes // *Biomaterials*. 2003. Vol. 24, № 5. P. 759–767. DOI:10.1016/S0142-9612(02)00412-X
  33. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA // *Cornea*. 2004. Vol. 23, № 5. P. 503–507. DOI: 10.1097/01.icc.0000105827.85025.7f
  34. Choi S., Lee S. C., Lee H. J., Cheong Y., Jung G. B., Jin K. H., Park H. K. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light // *Lasers in medical science*. 2013. Vol. 28, № 5. P. 1289–1296. DOI:10.1007/s10103-012-1237-6
  35. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры методом фотосшивания коллагена // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2015. Т. 15, вып. 4. С. 37–41. DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-4-37-41
  36. Тучин В. В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. М. : Физматлит, 2012. 812 с.
  37. Zhu D., Larin K. V., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing // *Laser & photonics reviews*. 2013. Vol. 7, № 5. P. 732–757. DOI: 10.1002/lpor.201200056
  38. Максимова И. Л., Зимняков Д. А., Тучин В. В. Управление оптическими свойствами биотканей // *Опт. и Спектр*. 2000. Т. 89, № 1. С. 86–95.
  39. Tuchin V. V., Bashkatov A. N., Genina E. A., Sinichkin Y. P. Scleral tissue clearing effects // *Proceedings of SPIE*. 2002. Vol. 4611. P. 54–58.
  40. Башкатов А. Н., Генина Э. А., Кочубей В. И., Каменских Т. Г., Тучин В. В. Оптическое просветление склеры глаза человека водным 30%-ным раствором глюкозы // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2015. Т. 15, вып. 3. С. 18–24. DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-3-18-24
  41. Zaman R. T., Rajaram N., Nichols B. S., Rylander H. G., Wang T., Tunnell J. W., Welch A. J. Changes in morphology and optical properties of sclera and choroidal layers due to hyperosmotic agent // *Journal of Biomedical Optics*. 2011. Vol. 16, № 7. P. 077008-1–077008-14. DOI: 10.1117/1.3599985
  42. Tuchina D. K., Genin V. D., Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Optical clearing of skin tissue *ex vivo* with polyethylene glycol // *Opt. Spectrosc.* 2016. Vol. 120, № 1. P. 28–37. DOI: 10.1134/S0030400X16010215
  43. Meek K. M., Fullwood N. J., Cooke P. H., Elliott G. F., Maurice D. M., Quantock A. J., Wall R. S., Worthington C. R. Synchrotron x-ray diffraction studies of the cornea, with implications for stromal hydration // *Biophysical Journal*. 1991. Vol. 60, № 2. P. 467–474. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82073-2
  44. Rowe R. W. D. The structure of rat tail tendon // *Connective Tissue Research*. 1985. Vol. 14, № 1. P. 9–20. DOI: 10.3109/03008208509089839
  45. Svensson L., Aszodi A., Reinholt F. P., Fassler R., Heinegard D., Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, № 14. P. 9636–9647. DOI: 10.1074/jbc.274.14.9636
  46. Fratzl P. *Collagen : structure and mechanics, an introduction*. N.Y. : Springer Science+Business Media, LLC, 2008. 506 p.
  47. Швачкина М. Е., Яковлев Д. Д., Лазарева Е. Н., Правдин А. Б., Яковлев Д. А. Мониторинг процесса иммерсионного оптического просветления коллагеновых волокон с помощью оптической когерентной томографии // *Опт. и Спектр*. 2019. Т. 127, вып. 2. С. 337–346. DOI: 10.21883/OS.2019.08.48052.302-18
  48. Shvachkina M. E., Yakovlev D. D., Pravdin A. B., Yakovlev D. A. Average refractive index of tendon as a function of water content // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. 2018. Vol. 4, № 1. P. 010302-1–010302-7. DOI: 10.18287/JBPE18.04.010302
  49. Tanaka Y., Kubota A., Yamato M., Okano T., Nishida K. Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32, № 4. P. 1080–1090. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.002

#### Образец для цитирования:

Швачкина М. Е. О возможности стабилизации контрактированного состояния коллагеносодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинkinга при пониженном уровне гидратации ткани // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2019. Т. 19, вып. 3. С. 210–222. DOI: <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2019-19-3-210-222>



## On the Possibility of Stabilization of a Contracted State after Riboflavin/UV Cross-Linking of Collagenous Tissue in a Partially Dehydrated State

M. E. Shvachkina

Marina E. Shvachkina, <https://orcid.org/0000-0002-5643-6431>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, marevsh@mail.ru

**Background and Objectives:** The method of riboflavin/UV collagen cross-linking is widely used to strengthen the corneal stroma in the treatment of keratoconus and is of considerable interest as a possible method to improve the biomechanical property of the sclera in the treatment of myopia. Regarding the application of this method to the sclera, one of the important problems is the rapid decrease in the intensity of UV radiation due to scattering as it propagates into the tissue. The depth of penetration of optical radiation into the sclera can be significantly increased using immersion optical clearing of the tissue. Under the action of immersion liquids used for optical clearing, partial dehydration of the tissue occurs. It is known that chemical cross-linking of tissue in a dehydrated state can lead to a significant decrease in the volume of tissue after its rehydration to a saturated state compared to the initial state, that is, it can lead to stabilization of a contracted state. In this case, the cross-linked tissue in the saturated rehydrated state contains less water than in the initial state. In this paper, we investigate the possibility of stabilizing a contracted state of the tissue after its riboflavin/UV cross-linking in a partially dehydrated state. **Materials and Methods:** Experiments were performed *in vitro* on samples of rat tail tendon fascicles. Before riboflavin/UV cross-linking, the sample was incubated in a 0.1% solution of riboflavin in normal saline solution for 20 minutes. Then the sample was dehydrated in a riboflavin-doped immersion liquid (37%, 58.5%, or 87% aqueous solution of polyethylene glycol PEG-300 containing 0.1% riboflavin) for 10 minutes (58.5% and 87% PEG solutions) or 15 minutes (37% PEG solution). After, a 4.5 mm-long section of the sample was exposed to UV radiation with a wavelength of 365 nm for 10 minutes. Finally, the sample was rehydrated in normal saline solution for 2 hours. At each stage of the treatment, the average group refractive index and geometry of the sample in UV-irradiated and non-irradiated sections of the sample were monitored using optical coherence tomography (OCT). The water content in the tissue was calculated from the measured values of its average group refractive index. **Results:** It was experimentally established that the retention of the contracted state of the tissue can occur, provided that the cross-linking is carried out at a volume hydration of the tissue less than 0.8. When the volume hydration of samples was less than 0.5 during UV exposure, the resulting contraction of the fascicle was found to be 8–15%. **Conclusion:** In this work, it was experimentally shown that riboflavin/UV cross-linking of collagenous tissue in a dehydrated state can lead to a decrease in tissue volume after its rehydration compared to the native one. The top level of hydration of the tissue during UV exposure at which the contracted state can be stabilized was found and the degree of resulting tissue contraction as a function of the degree of tissue hydration during UV exposure was estimated.

**Keywords:** riboflavin/UV cross-linking, collagen cross-linking, myopia, tissue hydration.

**Acknowledgements:** The author is grateful to Dmitry A. Yakovlev and Alexander B. Pravdin for setting up the problem and helpful discussion.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 17-00-00275 (17-00-00272)) and by the Russian Ministry of Education and Science (project No. 3.1586.2017/4.6).

## References

1. Bikbov M. M., Khalimov A. R., Usubov E. L. Ultraviolet Corneal Crosslinking. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*, 2016, vol. 71, no. 3, pp. 224–232 (in Russian). DOI: 10.15690/vramn562
2. Iomdina E. N. Biomechanical aspects of keratorefractive surgery and corneal crosslinking. *Rossijskaja pediatričeskaja oftalmologija* [Russian Pediatric Ophthalmology], 2015, vol. 10, no. 4, pp. 32–37 (in Russian).
3. Bikbov M. M., Surkova V. K., Usubov E. L., Astrelin M. N. Scleral crosslinking with riboflavin and ultraviolet A (UVA). A review. *Oftalmologija* [Ophthalmology], 2016, vol. 12, no. 4, pp. 4–8 (in Russian). DOI: 10.18008/1816-5095-2015-4-4-8
4. Meek K. M., Hayes S. Corneal cross-linking – a review. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 2013, vol. 33, no. 2, pp. 78–93. DOI: 10.1111/opo.12032
5. Gamidov G. A., Mushkova I. A., Kostenev S. V. Modifications of corneal collagen cross-linking in keratoconus treatment. Literature review. *Praktičeskaja medicina* [Practical Medicine], 2018, vol. 3, no. 114, pp. 52–56 (in Russian).
6. Hayes S., Kamma-Lorger C. S., Boote C., Young R. D., Quantock A. J., Rost A., Khatib Y., Harris J., Yagi N., Terrill N., Meek K. 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, vol. 8, no. 1, pp. e52860. DOI: 10.1371/journal.pone.0052860
7. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, 2003, vol. 135, no. 5, pp. 620–627. DOI: 10.1016/S0002-9394(02)02220-1
8. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 2003, vol. 29, no. 9, pp. 1780–1785. DOI: 10.1016/S0886-3350(03)00407-3
9. Wollensak G., Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 2004, vol. 30, no. 3, pp. 689–695. DOI: 10.1016/j.jcrs.2003.11.032
10. Wollensak G., Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Oph-*



- thalmologica*, 2009, vol. 87, no. 2, pp. 193–198. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01229.x
11. Zhang Y., Li Z., Liu L., Han X., Zhao X., Mu G. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera. *BioMed Research International*, 2014, vol. 2014, pp. 1–5. DOI: 10.1155/2014/194204
  12. Dotan A., Kremer I., Gal-Or O., Livnat T., Zigler A., Bourla D., Bourla D., Weinberger D. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of axial myopia in a rabbit model. *J. Vis. Exp.*, 2016, no. 110, pp. e53201. DOI: 10.3791/53201
  13. Iomdina E. N., Tarutta E. P., Semchishen V. A., Korigodskiy A. R., Zakharov I. D., Khoroshilova-Maslova I. P., Ignat'eva N. Yu., Kiseleva T. N., Sianosyan A. A., Milash S. V. Experimental realization of minimally invasive techniques of scleral collagen cross-linking. *Vestnik Oftalmologii* [Bulletin of Ophthalmology], 2016, vol. 132, no. 6, pp. 49–58 (in Russian). DOI: 10.17116/oftalma2016132649-56
  14. Spaide R. F., Ohno-Matsui K., Yannuzzi L. A. *Pathologic Myopia*. New York, Springer, 2014. 376 p.
  15. Morgan I. G., Ohno-Matsui K., Saw S. M. Myopia. *The Lancet*, 2012, vol. 379, no. 9827, pp. 1739–1748. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60272-4
  16. Chechneva A. V., Sotnikova L. F., Iomdina E. N. Corneal Collagen crosslinking to treatment complications of infectious keratoconjunctivitis in cats. *Izvestia mezhdunarodnoji akademii agrarnogo obrazovania* [News of the International Academy of Agrarian Education], 2018, vol. 2, iss. 42, pp. 117–121 (in Russian).
  17. Wollensak G., Aurich H., Wirbelauer C., Pham D. T. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Research*, 2009, vol. 41, no. 2, pp. 114–117. DOI: 10.1159/000187630
  18. Wollensak G., Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glyceraldehydes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 2008, vol. 34, no. 4, pp. 651–656. DOI: 10.1016/j.jcrs.2007.12.030
  19. Tanaka Y., Shi D., Kubota A., Takano Y., Fuse N., Yamato M., Okano T., Nishida K. Irreversible optical clearing of rabbit dermis for autogenic corneal stroma transplantation. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 28, pp. 6764–6772. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.081
  20. Iomdina E. N., Nazarenko L. A., Kiseleva O. A. Are biomechanical properties of the sclera and eye hydrodynamics related an experimental study. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo* [Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod], 2011, vol. 2, no. 4, pp. 445–447 (in Russian).
  21. Cherfan D., Verter E. E., Melki S., Gisel T. E., Doyle F. J., Scarcelli G., Yun S. H., Redmond R. W., Kochevar I. E. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2013, vol. 54, no. 5, pp. 3426–3433. DOI: 10.1167/iovs.12-11509
  22. Zhu H., Alt C., Webb R. H., Melki S., Kochevar I. E. Corneal crosslinking with rose bengal and green light: efficacy and safety evaluation. *Cornea*, 2016, vol. 35, no. 9, pp. 1234–1241. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000916
  23. Iseli H. P., Körber N., Koch C., Karl A., Penk A., Huster D., Reichenbach A., Wiedemann P., Francke M. Scleral cross-linking by riboflavin and blue light application in young rabbits: damage threshold and eye growth inhibition. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2016, vol. 254, no. 1, pp. 109–122. DOI: 10.1007/s00417-015-3213-x
  24. Karl A., Makarov F. N., Koch C., Körber N., Schuldt C., Krüger M., Reichenbach A., Wiedemann P., Bringmann A., Iseli H. P., Francke M. The ultrastructure of rabbit sclera after scleral crosslinking with riboflavin and blue light of different intensities. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2016, vol. 254, no. 8, pp. 1567–1577. DOI: 10.1007/s00417-016-3393-z
  25. Schilde T., Kohlhaas M., Spoerl E., Pillunat L. E. Enzymatic evidence of the depth dependence of stiffening on riboflavin/UVA treated corneas. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 2008, Bd. 105, no. 2, S. 165–169. DOI: 10.1007/s00347-007-1587-9
  26. Kamaev P., Friedman M. D., Sherr E., Muller D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012, vol. 53, no. 4, pp. 2360–2367. DOI: 10.1167/iovs.11-9385
  27. Raiskup F., Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet AI Principles. *The Ocular Surface*, 2013, vol. 11, no. 2, pp. 65–74. DOI: 10.1016/j.jtos.2013.01.002
  28. McCall A. S., Kraft S., Edelhauser H. F., Kidder G. W., Lundquist R. R., Bradshaw H. E., Dedeic Z., Dionne M. J. C., 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). *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2010, vol. 51, no. 1, pp. 129–138. DOI: 10.1167/iovs.09-3738
  29. Wang C., Fomovsky M., Miao G., Zyablitskaya M., Vukelic S. Femtosecond laser crosslinking of the cornea for non-invasive vision correction. *Nature Photonics*, 2018, vol. 12, no. 7, pp. 416–422. DOI: 10.1038/s41566-018-0174-8
  30. Zhang Y., Conrad A. H., Conrad G. W. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, no. 15, pp. 13011–13022. DOI: 10.1074/jbc.M110.169813
  31. Wollensak G., Aurich H., Pham D. T., Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 2007, vol. 33, no. 3, pp. 516–521. DOI: 10.1016/j.jcrs.2006.11.015



32. Charulatha V., Rajaram A. Influence of different cross-linking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, no. 5, pp. 759–767. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00412-X
33. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*, 2004, vol. 23, no. 5, pp. 503–507. DOI: 10.1097/01.icc.0000105827.85025.7f
34. Choi S., Lee S. C., Lee H. J., Cheong Y., Jung G. B., Jin K. H., Park H. K. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light. *Lasers in Medical Science*, 2013, vol. 28, no. 5, pp. 1289–1296. DOI: 10.1007/s10103-012-1237-6
35. Shvachkina M. E., Pravdin A. B. On the Use of Optical Clearing in Strengthening the Sclera by Collagen Photocrosslinking. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Physics*, 2015, vol. 15, iss. 4, pp. 37–41 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-4-37-41
36. Tuchin V. V. *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*. Bellingham, Washington, SPIE Press, 2015. 812 p.
37. Zhu D., Larin K. V., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, vol. 7, no. 5, pp. 732–757. DOI: 10.1002/lpor.201200056
38. Maksimova I. L., Zimnyakov D. A., Tuchin V. V. Control of biotissue optical properties. *Opt. Spektrosk.*, 2000, vol. 89, no. 1, pp. 86–95 (in Russian).
39. Tuchin V. V., Bashkatov A. N., Genina E. A., Sinichkin Y. P. Scleral tissue clearing effects. *Proceedings of SPIE*, 2002, vol. 4611, pp. 54–58.
40. Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Kamenskikh T. G., Tuchin V. V. Optical Clearing of Human Eye Sclera by Aqueous 30%-Glucose Solution. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Physics*, 2015, vol. 15, iss. 3, pp. 18–24 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-3-18-24
41. Zaman R. T., Rajaram N., Nichols B. S., Rylander H. G., Wang T., Tunnell J. W., Welch A. J. Changes in morphology and optical properties of sclera and choroidal layers due to hyperosmotic agent. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, vol. 16, no. 7, pp. 077008-1–077008-14. DOI: 10.1117/1.3599985
42. Tuchina D. K., Genin V. D., Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Optical clearing of skin tissue ex vivo with polyethylene glycol. *Opt. Spectrosc.*, 2016, vol. 120, no. 1, pp. 28–37. DOI: 10.1134/S0030400X16010215
43. Meek K. M., Fullwood N. J., Cooke P. H., Elliott G. F., Maurice D. M., Quantock A. J., Wall R. S. Worthington C. R. Synchrotron x-ray diffraction studies of the cornea, with implications for stromal hydration. *Biophysical Journal*, 1991, vol. 60, no. 2, pp. 467–474. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82073-2
44. Rowe R. W. D. The structure of rat tail tendon. *Connective Tissue Research*, 1985, vol. 14, no. 1, pp. 9–20. DOI: 10.3109/03008208509089839
45. Svensson L., Aszodi A., Reinholt F. P., Fassler R., Heinegard D., Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, no. 14, pp. 9636–9647. DOI: 10.1074/jbc.274.14.9636
46. Fratzl P. *Collagen: structure and mechanics, an introduction*. New York, USA, Springer Science+Business Media, LLC, 2008. 506 p.
47. Shvachkina M. E., Yakovlev D. D., Lazareva E. N., Pravdin A. B., Yakovlev D. A. Monitoring of immersion optical clearing of collagen fibers using optical coherence tomography. *Opt. Spektrosk.*, 2019, vol. 127, iss. 2, pp. 337–346 (in Russian). DOI: 10.21883/OS.2019.08.48052.302-18
48. Shvachkina M. E., Yakovlev D. D., Pravdin A. B., Yakovlev D. A. Average refractive index of tendon as a function of water content. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 010302-1–010302-7. DOI: 10.18287/JBPE18.04.010302
49. Tanaka Y., Kubota A., Yamato M., Okano T., Nishida K. Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 4, pp. 1080–1090. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.002

**Cite this article as:**

Shvachkina M. E. On the Possibility of Stabilization of a Contracted State after Riboflavin/UV Cross-Linking of Collagenous Tissue in a Partially Dehydrated State. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Physics*, 2019, vol. 19, iss. 3, pp. 210–222 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2019-19-3-210-222>