

UOT: 617.713-007.64:615.356

Novruzlu Ş.F.\*, Türkçü Ü.Ö.\*\*, Kıvrak İ.\*\*, Kıvrak Ş.\*\*, Bilgihan K.\*

## BUYNUZ QIŞANIN TAMLIĞINI POZMADAN RİBOFLAVİNİN STROMAYA YERİDİLMƏSİNİN EKSPERİMENTAL ÖYRƏNİLMƏSİ

Gazi Üniversitesi Tıbb Fakültesi, Oftalmolojiya Kafedrası, Ankara, Türkiyə \*

**Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Gıda Analizləri Tətbiqi və Tədqiqat Mərkəzi, Gıda Analiz Laboratoriyası, Muğla, Türkiyə \*\***

**Açar sözlər:** *iontoforez, kross-linkinq, riboflavin*

Keratokonus – buynuz qişanın incəlməsi ilə xarakterizə olunan və progressivləşən birincili buynuz qişasıdır. Buynuz qişası stromasının progressivləşən incəlməsi ilə protruziya, irrequlyar astigmatizm və miopiya yaranır, bununla əlaqədar görmə itiliyi və keyfiyyəti azalır [1]. Keratokonusun progressivləşməsinin qarşısını almaq üçün alternativ müalicə olan kollagen kross-linkinq 2003-cü ildə Vollensak tərəfindən təklif edilmişdir [2]. Hazırda klassik və ya standart buynuz qişası kross-linkinq kimi tanınan bu üsul 400µ-dan incə stromalarda endotelə zərər verir [3, 4]. Baxmayaraq ki, standart buynuz qişası kross-linkinqi effektiv sayılır, lakin çox nazik buynuz qişalara tətbiq edilə bilmir, ağrıya səbəb olur, görmə itiliyini azaldır, 1-12 ay müddətinə buynuz qişanın bulanmasına, infeksiyaya səbəb olur və uşaqlara tətbiqi çətinlik törədir [5-9]. Bu çatışmayan cəhətləri aradan qaldırmaq üçün transepitelial buynuz qişası kollagen kross-linkinqi təklif edilmişdir [10, 11]. Bu metod geniş tətbiq edilir, lakin uşaqlarda effektiv olmadığını və standart metodla müqayisədə xəstəliyin progressivləşməsinin qarşısının alınmasında effektivin daha zəif olduğunu göstərən tədqiqatlar da vardır [12-15]. Müalicənin nəticələri fərqlidir çünki, epitel riboflavinin stromaya keçməsinin qarşısını alır, riboflavin stromada homogen şəkildə yayıla bilmir və epitel ultrabənövşəyi şüaları blok edir [16-20]. Riboflavinin transepitelial yolla stromaya keçməsinə artırmaq üçün iontoforez köməyi ilə buynuz qişası kross-linkinqi istifadə olunmağa başlanmışdır. İontoforez, elektrik cərəyanı vasitəsilə toxumaya müxtəlif ion axını təmin edən noninvaziv bir üsuldür. Bu üsul bir əsrdən çoxdur ki dərmanların buynuz qişası və konyuktivadan tətbiqi üçün istifadə olunur [21]. İontoforezlə buynuz qişası kross-linkinqi effektiv və pasientlər üçün komfortlu bir üsuldür [22].

**Məqsəd** – dovşan gözlərində kross-linkinqdən öncə standart, transepitelial və buynuz qişası tamlığını pozmadan iontoforez vasitəsilə buynuz qişaya riboflavin yeridildikdən sonra buynuz qişada riboflavinin miqdarını təyin etməkdir.

**Material və metodlar** - Qazi Üniversitesi heyvanlar üzərində təcrübələrlə bağlı Etik Komitə tərəfindən razılıq alındıqdan sonra oftalmoloji tədqiqatlarda heyvanlardan istifadə edilməsiylə bağlı akta müvafiq şəkildə təcrübələr aparılmışdır.

2,5-3 kq çəkiyə malik on iki Yeni Zelandiya dovşanı (24 göz) istifadə edilmişdir. Təcrübə əzələdaxili yolla yeridilmiş ketamin və ksilazinin köməyi ilə ümumi anesteziya altında aparılmışdır. Epitelin mexaniki qaldırmadan öncə topikal proparakain HCL 0,5%-li (Alcaine, Alcon laboratoriyası, Fort Worth, TX) tükülmüşdür. Nümunələr hazır olduqdan sonra dovşanlar evtanaziya olunmuşdur. Dovşan gözləri hər birində 6 ədəd göz olmaqla 4 qrupa ayrılmışdır:

Birinci qrupda standart üsulda olduğu kimi 9 mm-lik bir sahədə epitel mexaniki yolla qaldırıldıqdan sonra 30 dəqiqə ərzində 3 dəqiqəlik fasilələrlə 0,1%-li riboflavin 20%-li dekstran T500 (Merribo Iso-Osmolar; Meran Tip, İstanbul, Türkiyə) tükülmüşdür.

İkinci qrupda transepitelial üsula müvafiq olaraq 0,2%-li riboflavin və BAX, HPMS, TRIS, NaCl və EDTS qarışığı 6 dəqiqə ərzində 2 dəqiqə fasilə ilə sonra isə 0,2%-li riboflavin və NaCl qarışığı 6 dəqiqə ərzində 2 dəqiqə fasilə ilə tükülmüşdür.

Üçüncü və dördüncü qruplarda riboflavin iontoforez vasitəsilə yeridilmişdir. Riboflavin mənfi yüklü olduğu üçün mənfi elektrod 9 mm hovuzda elektrodla buynuz qişası arasında riboflavin məhlulu olacaq şəkildə buynuz qişaya vakumla fiksasiya edildi. Müsbət elektrod isə həmin göz tərəfdə boyun nahiyəsinə fiksə edildi. Hovuz 3-cü qrupda 0,1%-li, 4-cü qrupda isə 0,2%-li riboflavinlə dolduqdan sonra yüksək həssaslıqlı cihaz vasitəsi ilə (Netes DC Power Supply 3306D, İstanbul, Turkey) 10 dəqiqə müddətində 1mA fasiləsiz elektrik cərəyanı verilmişdir. Prosedur ərzində cərəyan multimetr vasitəsilə ölçülmüşdür və gərginliyi dəyişməklə (2.7–6.6 V) 1mA cərəyanının fasiləsizliyi təmin edilmişdir. Elektrik cərəyanı verildikdən sonra mənfi elektrod qovucular yaranır. Cərəyanın fasiləsizliyini təmin edilərək prosedurun 5-ci dəqiqəsində hovuz içindəki riboflavin yenilənmişdir.

Bütün gözlərdə 360 dərəcə keratotomiya olundu. Buynuz qışa nümunələri maye azotda (və ya  $-80^{\circ}$  dərəcədə) dondurularaq ölçümlər aparılana kimi qaranlıq bir yerdə saxlandı. Nümunələrdə riboflavinin konsentrasiyası Elektrospray Tandem Mass Spektrometriya və Ultraperformans Maye Xromatoqrafiya (UPLC-ESI-MS/MS) vasitəsilə təyin edilmişdir.

#### Statistik analizlər

Nəticələr IBM SPSS20 vasitəsi ilə analiz edildi. Normal qruplaşdırılmış nəticələr  $\pm SE$  vasitəsilə ifadə edilir, qeyri-normal qruplaşdırılmış olanlar isə orta dəyərli olaraq ifadə edilir. Anormal qruplardakı variantlar tək yönlü fərq analizləri ilə müqayisə edilmiş və növbəti analizlər Tukey Test vasitəsilə həyata keçirilmişdir. Anormallıq müşahidə edilməyən qruplarda variantlar Kruskal-Üallis Test vasitəsilə analiz edilmiş və fərq cütləri Maun-Ühitney U Test vasitəsilə analiz edilmişdir. Statistik olaraq  $P < 0,05$  əhəmiyyətli qəbul edilmişdir (cədvəl 1).

Cədvəl 1

#### Buynuz qışada riboflavin konsentrasiyası

Buynuz qışada riboflavinin konsentrasiyası	Qrup 1	Qrup 2	Qrup 3	Qrup 4
	Buynuz qışa $\mu\text{g/g}$	Buynuz qışa $\mu\text{g/g}$	Buynuz qışa $\mu\text{g/g}$	Buynuz qışa $\mu\text{g/g}$
1	36,0	23,5	31,8	32,2
2	37,6	25,5	25,6	25,0
3	44,2	25,7	14,0	34,5
4	51,3	24,3	22,4	30,4
5	42,0	24,9	27,0	43,1
6	43,4	22,5	21,0	40,1

#### Nəticələr və onların müzakirəsi

Təcrübə qruplarında buynuz qışada riboflavinin miqdarı Cədvəl 1-də göstərilmişdir. Buynuz qışada riboflavinin miqdarı birinci qrupda digər qruplara nəzərən daha yüksəkdir. İkinci və üçüncü qruplardakı riboflavinin miqdarı bir-birindən fərqlənmir ( $p=0.937$ ). İontoforez vasitəsilə 0,2% riboflavin yeridilmiş 4-cü qrupda buynuz qışada riboflavin miqdarı həm transepitelial metoddan ( $p=0.009$ ), həm də iontoforez vasitəsilə 0,1% riboflavin yeridilmiş qrupdan ( $p=0.026$ ) statistik əhəmiyyətli olaraq yüksək ölçülmüşdür (Cədvəl 2).

Cədvəl 2

#### Qruplar üzrə buynuz qışada riboflavin konsentrasiyası

Riboflavin konsentrasiyası	Qrup 1	Qrup 2	Qrup 3	Qrup 4
Buynuz qışa $\mu\text{g/g}$	42,4 $\pm$ 5,4	24,4 $\pm$ 1,2*	23,6 $\pm$ 6,1*	34,2 $\pm$ 6,6 † ‡
Nəticələr $\pm SE$ və ya min-max ilə ifadə edilir				
* $P < 0,05$ qrup 1 ilə müqayisədə statistik əhəmiyyətli				
† $P < 0,05$ qrup 2 ilə müqayisədə statistik əhəmiyyətli				
‡ $P < 0,05$ qrup 3 ilə müqayisədə statistik əhəmiyyətli				

Müəyyən edilmişdir ki, transepitelial buynuz qışa kross-linkinqindən sonra epitelin tökülməsi baş verir və bu standart müalicədən sonra müşahidə olunan yan təsirlərin ortaya çıxmasına səbəb olur. Buna səbəb müalicə zamanı epitelin tamlığını pozan maddələrdən istifadə edilməsidir. Bir təcrübə zamanı məlum olmuşdur ki, transepitelial kross-linkinq zamanı epitelin tamlığı pozulmur [23], digər bir təcrübədə isə deyilir ki, epitel əməliyyatdan bir gün sonra tam sağalır [24]. Başqa bir təcrübədə isə göstərilmişdir ki, epitel əməliyyatın yalnız üçüncü günün sağalmışdır və bu müddət ərzində xəstənin kontakt linza ehtiyacı olmuşdur [25]. Transepitelial kross-linkinqdən sonra epitelin tamlığını qiymətləndirmək üçün aparılan tədqiqatda isə aydın olmuşdur ki, epitelin tamlığını pozmadan stromaya riboflavinin kifayət qədər keçməsinə təmin etmək mümkün deyildir, epitel defekti və ağrının yaranma intensivliyi uyğun olaraq 0%-dən 63%-ə və 0%-dən 83%-ə kimi yüksəlmişdir [26]. Tədqiqatımızın əsas məqsədi epitelin tamlığını pozmadan iontoforez vasitəsilə stromada kifayət qədər riboflavin miqdarına nail olmaqdır.

İontoforez vasitəsilə stromaya riboflavinin keçməsindəki artışı əsas səbəbi riboflavinin mənfi yükü və aşağı molekulyar çəkisinə malik olmasıdır. Məlumdur ki, 20 dəqiqə ərzində 0-3 mA və 40 dəqiqə ərzində 1,5 mA elektrik cərəyanı axını göz strukturları üçün təhlükəsizdir [27]. Bu səbəbdən bizim təcrübədə riboflavin iontoforez vasitəsilə yeridildiyi müddətdə 1 mA elektrik cərəyanı istifadə edilmişdir.

İnsanlarda, meylərin buynuz qışası üzərində aparılan təcrübələr zamanı transepitelial yol ilə müqayisədə iontoforez vasitəsilə riboflavinin daha yüksək konsentrasiyasına nail olunduğu aşkar edilmişdir [28]. Dovşanlar üzərində aparılan digər bir təcrübədə iontoforez vasitəsilə riboflavin yeridilməsi sonrasında standart metoda

nəzərən buynuz qişaya 45% daha az riboflavin keçmişdir [29]. Haqqında əvvəlcə danışdığımız hər iki təcrübədə 10 dəqiqə 1 mA elektrik cərəyanı altında 0,1%-li riboflavin məhlulu istifadə edilmişdir. Bizim təcrübə zamanı isə 10 dəqiqə müddətində 1 mA elektrik cərəyanı altında 0,1 və 0,2%-li riboflavin məhlulu istifadə edilmişdir. Bu üsul təcrübədə ilk dəfə istifadə edilirdi. İontofarez vasitəsilə 0,1%-li riboflavin məhlulu yeridilərkən əldə edilən konsentrasiya transeptelial üsuldakı qədər, 0,2%-li riboflavin məhlulu istifadə edildikdə isə daha yüksək miqdar əldə edilmişdir. İontofarez vasitəsilə yeridilmiş 0,2%-li riboflavin məhlulunun buynuz qişadakı miqdarı standart üsulla əldə edilən miqdarla müqayisədə 19,2% aşağıdır. Göz mayesində ionofarez vasitəsilə yeridilmiş 0,2%-li riboflavinin buynuz qişadakı miqdarı standart üsulla əldə edilən miqdarla müqayisədə 81,4% aşağı, lakin transeptelial üsulla müqayisədə 80% daha yüksəkdir. Bu onu göstərir ki, ionofarez vasitəsilə buynuz qişanın dərin qatlarına çatan riboflavinin miqdarı standart üsula nəzərən az, transeptelial üsula nəzərən isə daha yüksəkdir.

Əvvəlki təcrübələrdəki nümunələrdə riboflavinin miqdarı Yüksək Performans Maye Xromatoqrafiya (HPCL) vasitəsilə ölçülmüşdür. Maddənin UPLC-ESI-MS/MS vasitəsilə aşkar edilməsi və ölçülməsi çıxma müddəti və kütlə keçmə faizinə əsaslanır. Lakin Yüksək Performans Maye Xromatoqrafiya (HPCL) vasitəsilə analizlər yalnız çıxma müddətinə əsaslanır, bu isə yalançı müsbət və yalançı mənfi nəticələr verə bilər. Bu təcrübə zamanı istifadə edilən ekstraksiya texnikası asan əldə edilən, istifadəsi rahat, sadə və etibarlı üsul olub riboflavinin konsentrasiyasını yüksək həssaslıqla təyin etmək imkanı verir.

Transeptilyal cross-linkinq adətən nazik buynuz qişaya malik xəstələrdə geniş tətbiq olunur, lakin onun effektivliyi olub-olmaması hələ də müzakirə mövzudur. Məlumdur ki, buynuz qişa stromasının 40%-lik ön hissəsinin gərilmə qüvvəsi digər hissələrə nəzərən daha (50%) yüksəkdir [30]. Transeptelial cross-linkinqdə müalicənin effektivliyi ön stromanın kollagen fibrillərinin kovalent əlaqələrinin möhkəmləndirilməsi ilə əlaqədardır. Dovşanlar üzərində aparılan bir təcrübədən məlum olub ki, transeptelial metodun biomexaniki sıxlaşdırma təsiri standart üsulla müqayisədə daha yüksəkdir [31]. Bundan əlavə, transeptelial cross-linkinq bir sıra yan təsirlərə malikdir və bu yan təsirlərin müşahidə olunmaması üçün epitelin tamlığı mümkün qədər qorunmalıdır.

#### Yekun

Bu təcrübə buynuz qişada riboflavin konsentrasiyasının Elektrospray İonizasiya Tandem Mass Spektrometriya və Ultraperformans Maye Xromatoqrafiya (UPLC-ESI-MS/MS) vasitəsilə ölçüldüyü ilk təcrübədir. Tədqiqatımız göstərir ki, iontoforez vasitəsilə epitelin tamlığını pozmadan buynuz qişada riboflavinin yüksək konsentrasiyasına nail oluna bilər. İontoforezlə riboflavin yeridilən gözlərdə BAX, TRİS, ETDA və riboflavin qarışığı istifadə olunanlarla müqayisədə buynuz qişada riboflavinin daha da yüksək miqdarına nail olunur. İontoforezlə cross-linkinq həm xəstə komfortu həm də yan təsirlər baxımından standart üsulun analoqu kimi istifadə edilə bilər. Lakin, 0,1%-li və 0,2%-li riboflavin məhlulları ilə iontoforezin effektivliyini aydınlaşdırmaq üçün histopatologiya və in vivo (canlılar üzərində) tədqiqatlara ehtiyac vardır.

## ƏDƏBİYYAT

1. Holland D.R., Maeda N., Hannush S.B. et al. Unilateral keratoconus: incidence and quantitative topographic analysis // *Ophthalmology*, 1997, v.104, p.1409-1413.
2. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *Am. J. Ophthalmol.*, 2003, v.135, p.620-627.
3. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M. et al. Endothelial cell damage after riboflavin/ultraviolet-A treatment in the rabbit // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2003, v.29, p.1786-1790.
4. Wollensak G., Spoerl E., Reber F. et al. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro // *Ophthalmic Res.*, 2003, v.35, p.324-328.
5. Mazzotta C., Balestrazzi S., Baiocchi S. et al. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocalmicroscopic evaluation // *Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2007, v.35, p.580-582.
6. Greenstein S., Fry K., Bhatt J. et al. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: scheinpluf and biomicroscopic analysis // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2010, v.36, p.2105-2114.
7. Rama P., Di Matteo F., Matuska S. et al. Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2009, v.35, p.788-791.
8. Pollhammer M., Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2009, v.35, p.588-589.

9. Sharma N., Maharana P., Singh G. et al. Pseudomonas keratitis after collagen crosslinking for keratoconus: case report and review of literature // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2010, v.36, p.517-520.
10. Boxer Wachler B. Corneal crosslinking with riboflavin // *Cataract. Refract. Surg. Today.*, 2005, v.01, p.73-74.
11. Pinelli R., Mometto C. Corneal epithelium: should it stay or should it go? // *Ophthalmol. Times Europe*, 2007, p.3.
12. Buzzonetti L., Petrocelli G. Transepithelial corneal cross-linking in pediatric patients: early results // *J. Refract. Surg.*, 2012, v.28, p.763-767.
13. Caporossi A., Mazzotta C., Paradiso A.L. et al. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus: 24-month clinical results // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2013, v.39, p.1157-1163.
14. Koppen C., Wouters K., Mathysen D. et al. Refractive and topographic results of benzalkonium chloride-assisted transepithelial crosslinking // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2012, v.38, p.1000-1005.
15. Leccisotti A., Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus // *J. Refract. Surg.*, 2010, v.26, p.942-948.
16. Baiocchi S., Mazzotta C., Cerretani D. et al. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium // *J. Cataract. Refract. Surg.*, 2009, v.35, p.893-899.
17. Bottós K.M., Dreyfuss J.L., Regatieri C.V. et al. Immunofluorescence confocal microscopy of porcine corneas following collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A // *J. Refract. Surg.*, 2008, v.24, p.715-719.
18. Kolozsvári L., Nográdi A., Hopp B. et al. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, v.43, p.2165-2168.
19. Podskochoy A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage // *Acta. Ophthalmol. Scand.*, 2004, v.82, p.717-727.
20. Bottós K.M., Schor P., Dreyfuss J.L. et al. Effect of corneal epithelium on ultraviolet-A and riboflavin absorption // *Arq. Bras. Oftalmol.*, 2011, v.74, p.348-351.
21. Wirtz R. Die ionentherapie in der augenheilkunde [in German] // *Klinische Monatsblätter Fur Augenheilkunde*, 1908, v.46, p.543-579.
22. Bikbova G., Bikbov M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin // *Acta. Ophthalmol.*, 2014, v.92, p.30-34.
23. Touboul D., Efron N., Smadja D. et al. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial, and accelerated corneal collagen cross-linking procedures for keratoconus // *J. Refract. Surg.*, 2012, v.28, p.769-776.
24. Spadea L., Mencucci R. Transepithelial corneal collagen cross-linking in ultrathin keratoconic corneas // *Clin. Ophthalmol.*, 2012, v.6, p.1785-1792.
25. Magli A., Forte R., Tortori A. et al. Epithelium-off corneal collagen crosslinking versus transepithelial cross-linking for pediatric keratoconus // *Cornea*, 2013, v.32, p.597-601.
26. Taneri S., Oehler S., Lytle G. et al. Evaluation of epithelial integrity with various transepithelial corneal cross-linking protocols for treatment of keratoconus // *J. Ophthalmol.*, 2014, 2014, p.614380.
27. Parkinson T.M., Ferguson E., Febraro S. et al. Tolerance of ocular iontophoresis in healthy volunteers // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2003, v.19, p.145-151. Mastropasqua L,
28. Nubile M., Calienno R. et al. Corneal cross-linking: intrastromal riboflavin concentration in iontophoresis-assisted imbibition versus traditional and transepithelial techniques // *Am. J. Ophthalmol.*, 2014, v.157, p.623-630.
29. Cassagne M., Laurent C., Rodrigues M. et al. Iontophoresis transcorneal delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking with riboflavin in a rabbit model // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2014, v.03, doi: 10.1167/iavs.
30. Randleman J.B., Dawson D.G., Grossniklaus H.E. et al. Depth-dependent cohesive tensile strength in human donor corneas: implications for refractive surgery // *J. Refract. Surg.*, 2008, v.24, p.85-89.
31. Torricelli A.A., Ford M.R., Singh V. et al. BAC-EDTA transepithelial riboflavin-UVA crosslinking has greater biomechanical stiffening effect than standard epithelium-off in rabbit corneas // *Exp. Eye Res.*, 2014, v.125, p.114-117.

Новрузлу Ш.Ф.\*, Тюркчу У.О.\*\*., Кыврак И.\*\*., Кыврак Ш.\*\*., Билгихан К.\*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВВЕДЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В СТРОМУ, НЕ НАРУШАЯ ЦЕЛОСТНОСТИ РОГОВИЦЫ

*Медицинский Факультет Университета Кази, Кафедра Офтальмологии, Анкара, Турция \**  
*Университет Мугла Сыкты Кочман, внедрение анализов и Центр Исследования пищи,*  
*Лаборатория анализа пищи\*\**

**Ключевые слова:** *ионтофорез, кросс-линкинг, рибофлавин*

### РЕЗЮМЕ

**Цель** – определить содержание рибофлавина в роговице после его введения путем стандартного, трансэпителиального и ионтофореза (не нарушая целостность роговицы) у кроликов до кросс-линкинга.

#### **Материал и методы**

В эксперименте было использовано 12 зрелых (24 глаз) новозеландских кроликов. Они были разделены на 4 группы, каждая группа состояла из 6-ти глаз. В I группе после дезэпителизации использовалось стандартное введение 0,1% рибофлавина. Во II группе применялся трансэпителиальный метод введения 0,2% раствора рибофлавина, в состав которого входил бензалконий хлорид (БХ), этилэндиаминтетра кислота (ЭДТК), трометамол (ТММ) и гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) с интервалом 1,5 мин 3 раза. В III группе использовался метод введения 0,1% рибофлавина путем ионтофареза без применения субстратов, разрушающих целостность эпителия роговицы, в течение 10 мин с подачей 1 mA электрического тока. В IV группе использовался метод аналогичный III группе с использованием 0,2% раствора рибофлавина. На основании этих методов путем Электроспрей Ионизации Tandem Mass Spektrometriya и Ultraperformans Хроматографии Жидкости(UPLC-ESI-MS/MS) определялось содержание рибофлавина в роговице и во влаге передней камеры.

#### **Результаты**

Содержание рибофлавина в роговице I группы по сравнению с другими было более высоким ( $42,4 \pm 5,4$   $\mu\text{g/g}$ ); в IV группе ( $34,2 \pm 6,6$   $\mu\text{g/g}$ ) по сравнению с I и III группой было сравнительно выше и составила соответственно  $24,4 \pm 1,2$   $\mu\text{g/g}$  ( $P = 0,009$ ) и  $23,6 \pm 6,1$   $\mu\text{g/g}$  ( $P = 0,026$ ). Во II и III группе содержание рибофлавина в роговице было незначительным ( $P = 0,937$ ).

#### **Заключение**

После введения 0,2% раствора путем ионтофареза, не разрушающих целостность эпителия роговицы, интрастромальное содержание рибофлавина по сравнению со стандартной методикой было низким, а по сравнению с трансэпителиальным методом введения было высоким. При определении высокой чувствительности концентрации рибофлавина путем ионтофореза без использования веществ, разрушающих целостность эпителия роговицы, было обнаружено повышение проницаемости молекул рибофлавина в роговицу.

Novruzlu Sh.F.\*, Turkchu U.O.\*\*., Kivrak I.\*\*., Kivrak Sh.\*\*., Bilgihan K.\*

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE RIBOFLAVIN PENETRATE STROMA WITHOUT DISRUPTING INTEGRITY CORNEA

*Department of Ophthalmology, Gazi University School of Medicine, Ankara, Turkey*  
*Mugla Vocational School, Mugla Sitki Koçman University, Mugla, Turkey; Muğla Sitki Koçman*

**Key words:** *iontophoresis, cross-linking, riboflavin*

### SUMMARY

**Aim** – to examine riboflavin concentrations in corneas from rabbits with standard and transepithelial methods and iontophoresis without disrupting the integrity of the corneal epithelium before corneal collagen cross-linking.

**Material and methods**

Twenty-four eyes of 12 adult New Zealand rabbits were used. They were assigned to 4 groups, each including 6 eyes. Group 1 was exposed to the standard method and given riboflavin 0.1% after epithelial debridement. Group 2 was exposed to the transepithelial method and given benzalkonium chloride (BAC), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trometamol (TRIS), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), and riboflavin 0.2% 3 times at 1.5-minute intervals followed

by riboflavin 0.2%. Group 3 was given riboflavin 0.1% by using 1-mA electric current for 10 minutes with the help of iontophoresis without using substances disrupting the integrity of the corneal epithelium. Group 4 received the same treatment as did group 3, except that it was given riboflavin 0.2%. Following these treatments, riboflavin concentrations in corneas were measured with ultraperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS).

**Results**

Riboflavin concentrations in the cornea were higher in group 1 (42.4 6 5.4 mg/g) than in the other groups. They were significantly higher in group 4 (34.2 6 6.6 mg/g) than in group 2 (24.4 6 1.2 mg/g) ( $P = 0.009$ ) and group 3 (23.6 6 6.1 mg/g) ( $P = 0.026$ ). There was not a significant difference in corneal riboflavin concentrations between group 2 and group 3 ( $P = 0.937$ ).

**Conclusions**

Intrastromal and aqueous riboflavin concentrations after administration of riboflavin 0.2% through iontophoresis without disrupting the integrity of the corneal epithelium were lower than those after the standard method, but higher than those after the transepithelial method. In this study in which riboflavin concentrations were measured with a very sensitive method iontophoresis was observed to increase the transmission of riboflavin molecules into the cornea without using substances disrupting epithelial integrity.

**Korrespondensiya üçün:**

*Novruzlu Şahin Fərman oğlu, həkim-oftalmoloq Gazi Üniversitesi Tıbb Fakültesi, Oftalmologiya Kafedrası, Ankara, Türkiyə*

*Tel.: +99412555-73-73*

*Email: dr\_novruzlu@hotmail.com*