

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**  
**Oční klinika**

**Přednosta: prof. MUDr. Pavel Rozsival, CSc.**

**CROSS-LINKING KOLAGÉNU POMOCÍ RIBOFLAVÍNU A UVA  
ZÁŘENÍ PŘI KERATOKONU**

**MUDr. Frederik Raiskup**

**Disertační práce**

**Hradec Králové 2008**

## **Podakovanie:**

**Ďakujem Pánu Bohu za schopnosť abstraktne myslieť a mojej mame, že mi dala narodiť sa.**

**Ďakujem prednostovi Očnej kliniky Univerzity Karlovej v Prahe, Lekárskej fakulty v Hradci Králové, Prof. MUDr. Pavlu Rozsivalovi - môjmu školiteľovi, za možnosť absolvovať doktorský študijný program, jeho kolegiálny prístup počas môjho štúdia a podporu pri realizácii dizertačnej práce.**

**Ďakujem školiteľovi - konzultantovi Doc. MUDr. Jiřímu Řehákovi, CSc. za jeho povzbudenie k začatiu doktorského štúdia.**

**Ďakujem Prof. Dr. rer. nat. Eberhardovi Spörlovi za cenné rady pri spracovávaní súboru a interpretácii výsledkov mojej dizertačnej práce.**

**V Hradci Králové, 2008**

**Frederik Raiskup**

## Zoznam použitých skratiek:

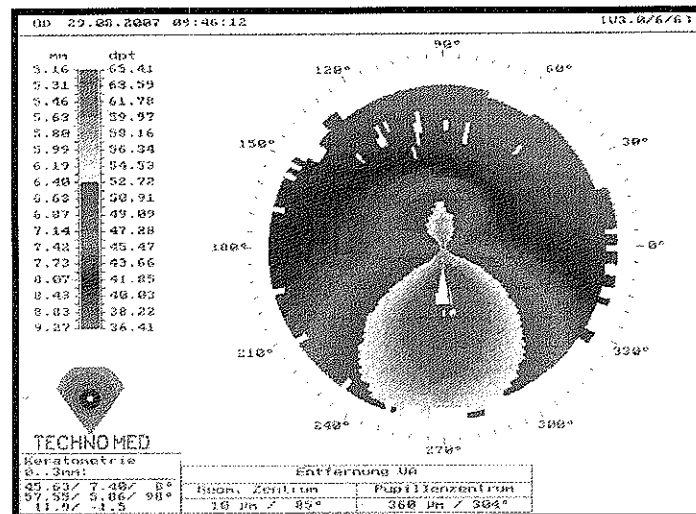
<b>AMT</b>	<b>transplantácia amniovej membrány</b>
<b>ast</b>	<b>astigmatizmus</b>
<b>CLEK Study</b>	<b>Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus Study</b>
<b>CXL</b>	<b>Cross-linking</b>
<b>Dptr.</b>	<b>dioptrie</b>
<b>EK</b>	<b>Ethische Kommission</b>
<b>IL</b>	<b>interleukín</b>
<b>KŠ</b>	<b>kontaktná šošovka</b>
<b>K-hodnoty</b>	<b>keratometrické hodnoty</b>
<b>Kmax</b>	<b>maximálna hodnota keratometrie v 3 mm zóne</b>
<b>Kapex</b>	<b>hodnota keratometrie na vrchole keratokónu</b>
<b>LASIK</b>	<b>laser assisted in situ keratomileusis</b>
<b>logMAR</b>	<b>logaritmus of minimal angle resolution</b>
<b>n</b>	<b>počet očí súboru</b>
<b>NKZO</b>	<b>najlepšie korigovaná zraková ostrosť</b>
<b>OP</b>	<b>operácia</b>
<b>UV</b>	<b>ultraviolet</b>

## OBSAH

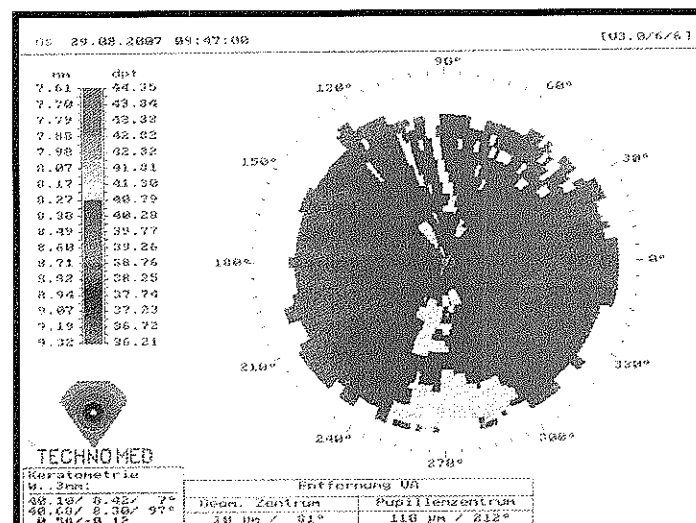
1	Úvod	5
1.1	Epidemiológia	6
1.2	Klinické znaky	7
1.2.1	Klasifikácia	9
1.2.2	Topografická diagnostika	10
1.3	Histopatológia	11
1.4	Etiopatogenéza a biochémia keratokónu	11
1.4.1	Genetika	12
1.5	Biomechanické zmeny pri keratokóne	13
1.6	Diferenciálna diagnóza	13
1.7	Terapia	15
2	Experimentálne základy cross-linkingu.	18
2.1	Cross-linking v medicíne.	18
2.2	Pokusy na laboratórnych zvieratách. Druhy cross-linkingu.	18
2.3	Experimenty na humánnom tkanive.	21
2.4	Bezpečnosť cross-linkingu.	24
3	Cieľ práce	26
4	Pacienti a metodika	27
4.1	Pacienti	27
4.2	Metodika	28
5	Výsledky	33
5.1	Pacienti bez efektu po CXL	38
6	Komplikácie po CXL	47
6.1	Haze strómy rohovky	47
6.2	Prolongovaná epitelizácia rohovky, infekcia rohovky po CXL – kazuistika	50
7	Kazuistiky	53
7.1	Kazuistika 1	53
7.2	Kazuistika 2	56
7.3	Kazuistika 3	59
8	Odpovede na ciele práce	61
9	Diskusie	62
10	Záver	68
11	Literatúra	70

# 1 Úvod

Keratokónus patrí ku nezápalovým ektatickým ochoreniam rohovky, charakterizovaný kónickou formou tohoto tkaniva oka na základe progresívneho stenčovania. Toto progredujúce stenčovanie vedie postupne ku vzniku nepravidelného astigmatizmu a myopie, ktorých následkom je rôzny stupeň zníženia zrakovej ostrosti. Ide väčšinou o obojstranné ochorenie, len veľmi zriedkavo sa diagnostikuje jednostranne a pri jeho obojstrannom výskyte je jeho intraindividuálna manifestácia v čase asymetrická. (obr. 1A, B)



Obr. 1A, B: Topografia keratokónu - asymetria nálezu u jedného pacienta v rovnakom čase



Prvý-krát v histórii vôbec sa s týmto pojmom stretávame v správach Maucharta (r. 1748) a Taylora (r. 1766) a na tamojší čas tento nález podrobne popísal a od iných rohovkových ektázií odlíšil v r. 1854 Nottingham – v čase, keď liečba tohoto ochorenia spočívala v kauterizácii kónusu nitritom strieborným a aplikáciou miotík.<sup>11</sup> V r. 1862 charakterizoval túto patologickú entitu vo svojej monografii Friedrich August von Ammon, profesor Lekárskej akadémie v Drážďanoch (Illustrierte pathologische Anatomie der menschlichen Kornea, Sklera, Choroidea und des optischen Nerven (hrsg. Von Warnatz, Leipzig 1862)) a v r. 1888 prišiel francúzsky oftalmológ Eugene Kalt s myšlienkou korigovať toto ochorenie kompresiou strmého apexu rohovky pomocou skla – kontaktnou šošovkou.<sup>11</sup>

## **1.1 Epidemiológia**

Začiatok manifestácie tohoto ochorenia spadá do obdobia puberty a dĺžka jeho aktivity a progresie je individuálne rôzna – do tretej až štvrtej dekády života. Väčšinou ide o ochorenie izolované, ale boli zaznamenané aj asociácie keratokónu s inými ochoreniami, ako sú: Down sy, Leberova kongenitálna amauroza, ochorenia spojivového tkaniva, prolaps mitrálnej chlopne. Častá je asociácia tohoto ochorenia s atopiou, manuálnym mechanickým dráždením povrchu oka a nosením tvrdých kontaktných šošoviek. Približne 6 až 14 % postihnutých má pozitívnu familiárnu anamnézu, resp. familiárna transmisia tohoto ochorenia je evidentná.

Incidencia keratokónu varíruje medzi 50 až 230 ochorení na 100 000 obyv. (ca 1 na 2000) a jeho prevalencia je 54,5 na 100 000 obyv.<sup>36,54,71</sup>

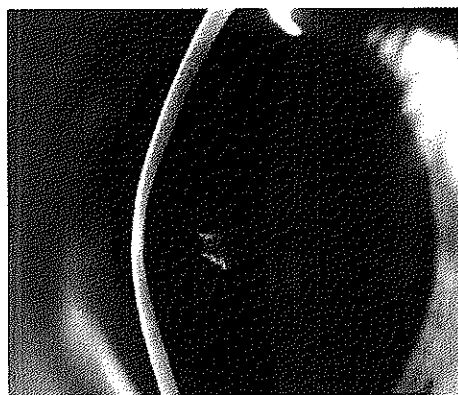
Vzhľadom na rozsiahle diagnostické možnosti, ktoré dnes v oftalmológii, v oblasti predného segmentu máme, je možné diagnostikovať keratokónus vo veľmi včasných, klinicky nemanifestných štádiách, a preto i jeho incidencia je dnes zrejme vyššia, a to 1:600 – 1:420.<sup>12</sup>

## 1.2 Klinické znaky

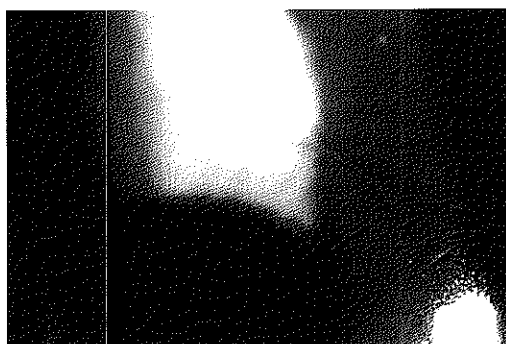
Klinické znaky keratokónu závisia od stupňa jeho progresie, v stredne pokročilom a pokročilom štádiu možno v biomikroskopickom obraze nájsť niektoré z nasledujúcich znakov a ich kombinácie: kónický tvar rohovky (obr. 2), stenčenie strómy rohovky (obr. 3), depozity železa v oblasti bázy kónusu rohovky - Fleischerov prstenec (obr. 4), jemné vertikálne línie v hlbokých vrstvách rohovky - Vogtove línie (obr. 5) jazvy v predných vrstvách strómy rohovky (obr. 6) a prominujúce nervové zakončenia (obr. 7).



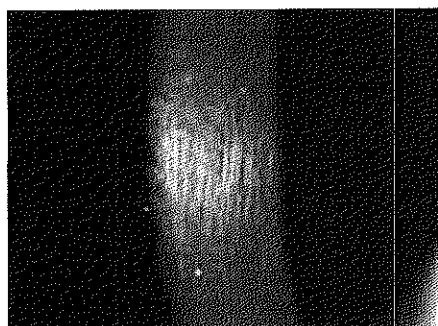
Obr. 2: Kónický tvar rohovky pri keratokóne



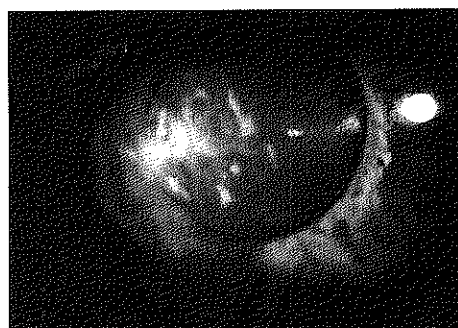
Obr. 3: Stenčenie rohovky



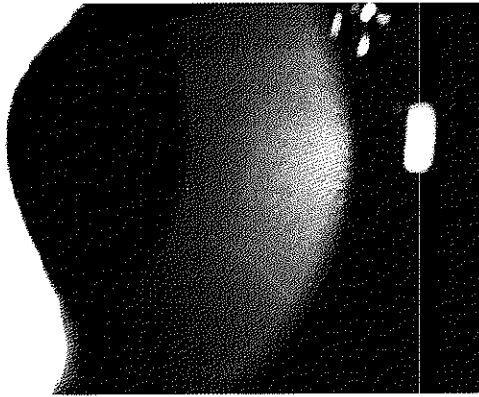
Obr. 4: Fleischerov prstenec



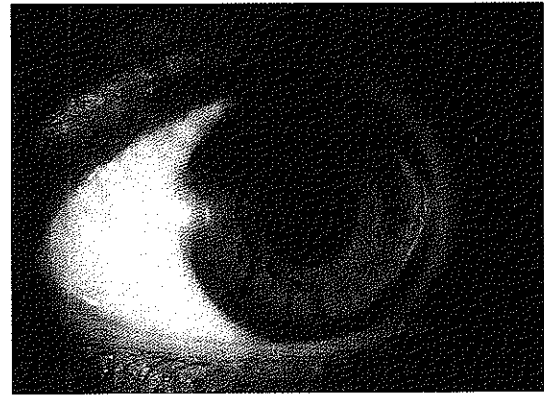
Obr. 5: Vogtove línie



Obr. 6: Opacity v stróme rohovky



Obr. 7: Prominujúce nervové zakončenia



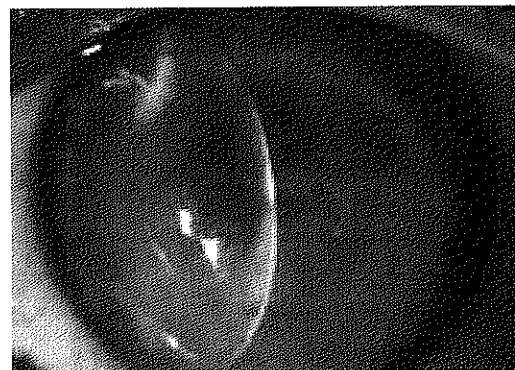
Obr. 8: Rizzuttiho príznak

Vo včasných štádiách ochorenia je biomikroskopický obraz normálny a klinicky možno toto ochorenie odhaliť napr. v dilatovanej zrenici sledovaním distorzie retinoskopického reflexu, tzv. scissoring. Ku včasným znakom patrí taktiež tzv. Rizzuttiho príznak (obr. 8) – kónický reflex svetla na nazálnej strane rohovky pri osvietení oka z temporálnej strany a v neskorých štádiách je patognomický nález tzv. Munsonov príznak (obr. 9) – vyklenutie dolného viečka pri pohľade nadol. Pri spontánnej ruptúre Descemetovej membrány v pokročilom štádiu keratokónu dochádza ku akútnemu hydropsu rohovky, a tým aj ku náhlemu poklesu zrakovkej ostrosti (obr. 10).

Pachymetriou možno sledovať progredujúce stenčovanie rohovky, hoci tento parameter pomerne široko varíruje aj u normálnej populácie.



Obr. 9: Munsonov príznak



Obr. 10: Hydrops rohovky



### 1.2.1 Klasifikácia

V závislosti od času nástupu manifestácie keratokónu možno tento klasifikovať do troch typov, a to:

- začínajúci v puberte (*puberty-onset keratoconus*), najčastejší typ, väčšinou obojstranný, so stranovou asymetriou a rýchlou progresiou
- začínajúci v druhej až tretej dekáde života (*late-onset keratoconus*), s obojstrannou, menej asymetrickou manifestáciou a pomalou progresiou
- frustný keratokónus (*form fruste*), prvýkrát popísaný v r. 1937 Amslerom, veľmi mierna forma ochorenia, manifestujúca sa v ktoromkoľvek veku života pacienta, charakterizovaná nepravidelným astigmatizmom, bez progresie.<sup>11</sup>

V 50-tych rokoch 20. storočia Amsler publikoval prvú klasifikáciu keratokónu, v ktorej rozdeľuje toto ochorenie do jednotlivých stupňov podľa polomeru rohovky, korigovanej zrakovej ostrosti okuliarmi a kontaktnými šošovkami, transparentnosti rohovky a jej hrúbky (graf 1).<sup>2,3</sup>

Štádium	Rádus rohovky (mm)	Vízus (okul.)	Vízus (KŠ)	Čírosť rohovky	Hrúbka rohovky (mm)
1	> 7,5	1,0-0,8	≥1,0	číra	0,5
2	6,5-7,5	0,2-0,8	0,8-1,0	číra	0,3-0,5
3	5,8-6,5	0,1-0,2	0,4-0,8	jemné opacity	0,3-0,5
4	<5,8	<0,1	0,2-0,4	sýta centr. jazva	<0,2

Graf 1: Klasifikácia keratokónu podľa Amslera

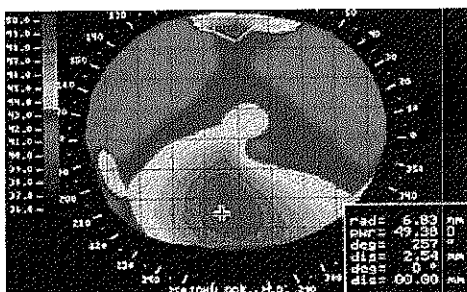
V súčasnosti sa v klinickej praxi osvedčila klasifikácia keratokónu podľa Krumeicha (graf 2).<sup>37</sup>

Štádium	Charakteristika
1	Myopia a/alebo astigmatizmus < 5 Dptr., roh. rádius <= 48 Dptr., Vogtove striae, bez opacít
2	Myopia a/alebo astigmatizmus >5 Dptr. <8 Dptr., roh. rádius <= 53 Dptr., bez opacít, hrúbka roh. >= 400 $\mu$ m
3	Myopia a/alebo astigmatizmus >8 Dptr. <10 Dptr., roh. rádius > 53 Dptr., bez opacít, hrúbka roh. medzi 200 $\mu$ m až 400 $\mu$ m
4	Nemerateľná refrakcia, roh. rádius > 55 Dptr., centrálne opacity, hrúbka roh. pod 200 $\mu$ m

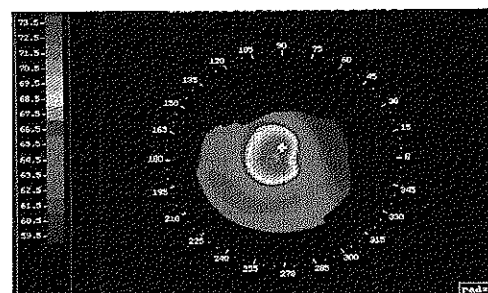
Graf 2: Klasifikácia keratokónu podľa Krumeicha

### 1.2.2 Topografická diagnostika

Počítačová topografia rohovky je v súčasnosti najcitlivejšou metódou diagnostiky tohoto ochorenia aj v subklinických štádiách. Niekoľko štúdií charakterizovalo topografické znaky keratokónu, ktoré sa prezentujú v dvoch formách: a) väčšina pacientov má periférne kónické preformovanie rohovky, so zvyšujúcimi sa keratometrickými hodnotami smerom do periférie (obr. 11), b) menšia časť pacientov sa prezentuje centrálnymi topografickými zmenami (obr. 12).<sup>55,86</sup> Topografické alterácie rohovky v zmysle keratokónu možno sledovať často u príbuzných pacienta s keratokónom, ktorí sú ale bez klinickej manifestácie, resp. na druhom oku postihnutého pacienta, ktoré nemá žiadnu symptomatológiu.



Obr. 11: „oválny“-inferiórny keratokónus



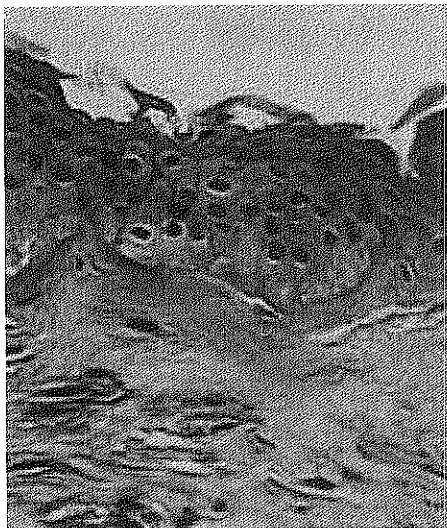
Obr. 12: „nipple“ keratokónus

### **1.3 Histopatológia**

Histopatologické črty keratokónu sú charakterizované stenčením strómy rohovky, trhlinami Bowmanovej membrány a depozitmi železa- hemosiderínu na úrovni bazálnej membrány epitelu. V závislosti od štádia ochorenia, môžeme nachádzať patologické zmeny vo všetkých vrstvách rohovky. Vo fázovom kontrastnom mikroskope sa sleduje vlnovité usporiadanie degenerovaných kolagénových vlákien v Bowmanovej membráne, v oblasti trhlín membrány sa nachádzajú epitelové bunky a spojivé tkanivo (obr. 13).<sup>101</sup>

Ku stenčeniu rohovky dochádza na základe zníženia počtu a hrúbky kolagénových lamiel strómy rohovky.<sup>52</sup> Descemetova membrána je len zriedkavo postihnutá, a to v prípadoch akútneho hydropsu, kde možno detekovať trhliny membrány. Bunky endotelu môžu byť pleomorfné a smerom ku osi kónusu predĺžené.

Histologické nálezy trepanovaných rohoviek pri transplantácii pre keratokónus potvrdzujú dve morfológické formy keratokónu: „nipple-type“ keratokónus, lokalizovaný centrálné a „oval-type“ keratokónus, lokalizovaný inferiórne alebo inferotemporálne.



Obr. 13: Histologický rez rohovkou s keratokónom

### **1.4 Etiopatogenéza a biochémia keratokónu**

Ku stenčovaniu rohovky dochádza v dôsledku straty štrukturálnych komponentov, ale ako k tomuto procesu dochádza, nie je úplne jasné. Teoreticky môže ku tomuto

javu dôjsť: znížením počtu kolagénových vrstiev, znížením počtu kolagénových vlákien v jednotlivých vrstvách, tesným zhlukovaním sa kolagénových vlákien, resp. vzájomnou kombináciou týchto javov na základe defektu v produkcii extracelulárnej matrix rohovkového tkaniva, deštrukciou tohoto tkaniva, zvýšenou distenzibilitou strómy rohovky s posunom vlákien kolagénu a vzájomnou kombináciou týchto mechanizmov.<sup>34</sup> Biochemické a imunohistologické štúdie predpokladajú stratu stromálneho tkaniva rohovky na základe zvýšenej aktivity proteolytických enzýmov pri zvýšenej hladine proteáz, resp. zníženej hladine inhibítorov proteínázy.<sup>21,66</sup>

Pri tejto patológii je znížený obsah keratánsulfátu, a tým aj pomer ku obsahu dermatánsulfátu v rohovke.<sup>23</sup> Takisto sa dokázalo, že dĺžka keratánsulfátového reťazca je skrátaná.<sup>100</sup>

Iné štúdie poukazujú na možnosť straty keratocytov v predných vrstvách strómy rohovky v dôsledku apoptózy: Epitel a endotel rohovky produkujú interleukín-1 (IL-1), keratocyty strómy obsahujú receptory pre IL-1, a práve IL-1 je modulátorom interakcií medzi epitelom a strómou rohovky, reguluje proliferáciu, diferenciáciu a smrť buniek rohovky. Táto hypotéza by bola logickou pri vysvetlení vzájomnej kauzality medzi keratokónom a mechanickým dráždením povrchu oka, nosením kontaktných šošoviek resp. atopiou, vzhľadom k tomu, že v týchto situáciách dochádza ku mikrotraumám povrchu oka, ktoré by mohli viesť ku zvýšenému uvoľňovaniu IL-1 epitelom.<sup>87</sup>

### 1.4.1 Genetika

Rohovkové dystrofie, pri ktorých má dedičný prenos evidentnú úlohu, sa manifestujú bilaterálne. Keratokónus, hoci sa sprvu môže manifestovať len unilaterálne, v priebehu času je evidentná manifestácia aj na druhom oku, hoci táto môže byť len subklinická. Viac než 90% pacientov s keratokónusom majú evidentné známky bilaterálneho postihnutia detekovateľné topografiou, a práve táto bilateralita výskytu naznačuje, podobne ako je tomu pri dystrofiách rohovky, že aj pri tomto ochorení hrá dedičnosť určitú úlohu.<sup>29,56</sup> V literatúre je popisovaný familiárny výskyt tohoto ochorenia v rozmedzí 6%-23,5%.<sup>22,30</sup> „Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study – multicentrická longitudinálna štúdia- zaznamenala familiárny výskyt u 14% svojich probandov. Táto štúdia zahrnuje veľmi diverzné etnické spektrum pacientov, a preto sa dá predpokladať, že u kohorty pacientov,

ktorá je viac homogénna, ako napr. vo Fínsku, Novom Zélande, Tazmánii, je incidencia familiarity tejto entity oveľa vyššia, a to 19% až 23%.<sup>6,15,22,30</sup>

Väčšina štúdií potvrdzuje autozomálne-dominantnú transmisiu tohoto ochorenia s variabilnou expresivitou<sup>20</sup>, avšak doteraz sa nepodarilo identifikovať na žiadnom z chromozomálnych lokusov konkrétny gén zodpovedný za patogenézu *keratokónu*.<sup>57,82</sup>

## **1.5 Biomechanické zmeny pri keratokóne**

Biomechanické vlastnosti rohovky závisia od stavu kolagénovej kostry, obsahu proteoglykánov a ich vzájomného spojenia s kolagénovými vláknami. Trojdimenzionálne usporiadanie kolagénových lamiel určuje vo veľkej miere mechanickú „odolnosť“ rohovky. U rohoviek s keratokónom sa zistili zmeny elasticity rohovky v reakcii na ťahovú, tlakovú a posuvnú silu.<sup>50</sup>

Keratokónom postihnutá rohovka má zvýšenú rozťažiteľnosť tkaniva, čo vedie ku zníženiu jej pevnosti.<sup>4</sup> Experimenty Hjortdala ukazujú, že samotná „tuhosť“ rohovky zostáva nezmenená, ale menia sa visko-elastické vlastnosti rohovky, v závislosti od stavu interfibrilárnej matrix.<sup>28</sup>

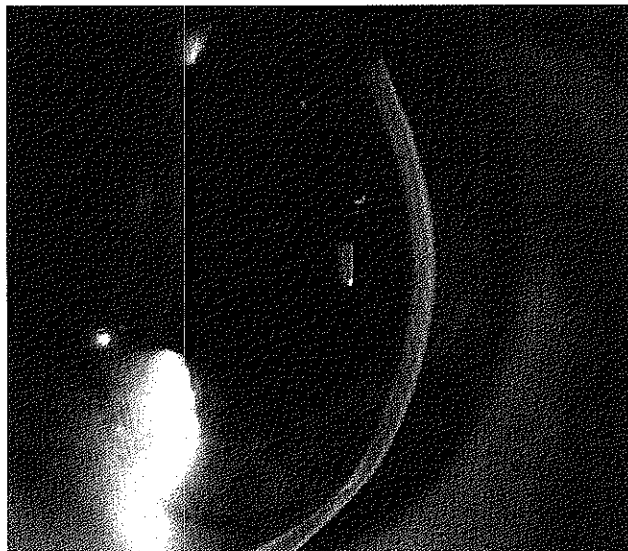
Meek a spol. predpokladajú, že ku zmene hrúbky a zakrivenia rohovky dochádza na základe interlamelárneho a intralamelárneho posunu kolagénu, čo následne vedie ku negatívnemu ovplyvneniu kohezívnych síl a mechanických vlastností rohovky.<sup>45</sup>

## **1.6 Diferenciálna diagnóza**

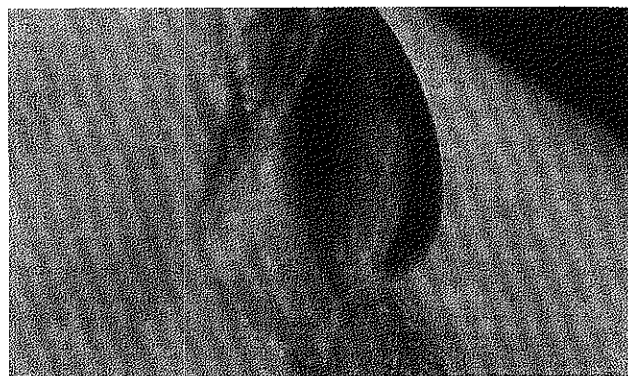
Keratokónus, ako to už bolo vyššie uvedené, patrí do skupiny ektatických ochorení rohovky, kde patria aj ďalšie patologické entity, a to: pellucidná marginálna degenerácia a keratoglóbus.

Pellucidná marginálna degenerácia je ochorenia zriedkavejšie ako keratokónus, manifestuje sa bilaterálne, vo vyššom veku ako keratokónus a je charakteristická stenčením strómy rohovky v periférii rohovky, paralimbálne inferiórne (obr. 14, 15, 16).

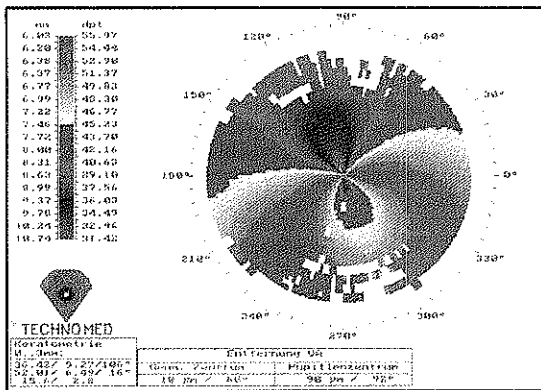
Výskyt keratoglóbu je veľmi zriedkavý, možno ho diagnostikovať už vo včasnom detstve, periféria rohovky je v celej cirkumferencii stenčená a tu možno sledovať protrúziu takmer celej plochy rohovky (obr. 17).<sup>38</sup>



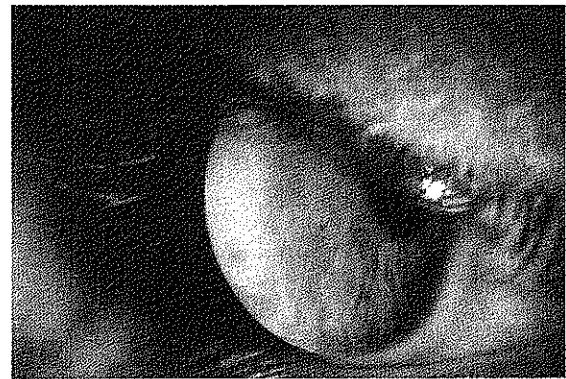
Obr. 14: Pellucidná marginálna degenerácia



Obr. 15: Pellucidná marginálna degenerácia



Obr. 16: Typický topografický nález pri pellucidnej marginálnej degenerácii



Obr. 17: Keratoglóbus

## 1.7 Terapia

Algoritmus manažmentu liečby, resp. korekcie keratokónu plne závisí od stupňa jeho progresie. Vo včasných štádiách je keratokónus korigovateľný okuliarmi, avšak väčšinou je najlepšie korigovaný vízus dosiahnuteľný kontaktnými šošovkami vzhľadom k tomu, že okuliarová korekcia nie je schopná ideálne kompenzovať osobitý tvar iregulárneho astigmatizmu. Touto najčastejšou optimálnou modalitou korekcie keratokónu - kontaktnými šošovkami, je možné korigovať asi 90% pacientov.<sup>58</sup> Typ kontaktných šošoviek závisí taktiež od štádia progresie ochorenia, sprvu sú aplikovateľné aj mäkké tórické kontaktné šošovky, s progresiou ochorenia sa stávajú optimom tvrdé alebo hybridné kontaktné šošovky rôzneho druhu.

V prípade zlyhania týchto konzervatívnych terapeutických metód prichádzajú na rad chirurgické možnosti korekcie ako implantácia intrakorneálnych prstencov, mini ARK, lamelárna alebo perforujúca keratoplastika.

V závislosti od preferencií jednotlivých chirurgických pracovísk a ich indikačných kritérií, ku **transplantácii** rohovky je indikovaných od 21% až 45% všetkých prípadov keratokónu.<sup>25,79</sup>

Vzhľadom na anatomické a imunologické osobitosti rohovkového tkaniva pri tomto ochorení je úspešnosť transplantácie pri tejto diagnóze v rozmedzí 93%-96%.<sup>53,70</sup> Pred érou laserovej chirurgie rohovky bola pomerne častá modalita korekcie keratokónu **radiálnymi a astigmatickými incíziami** v snahe zmeniť nepravidelný tvar rohovky. Napriek pomerne jednoduchšej technike týchto procedúr, nevýhodou

týchto zákrokov bola nemožnosť prediktability a reproducibility ich výsledkov, a o čo viac, mnohokrát viedli tieto výkony ku instabilite rohovky, ktorá len urýchlila nevyhnutnosť transplantácie.<sup>7,17</sup>

**Ablatívna chirurgia excimerovým laserom** môže byť indikovaná ako terapeutická superficiálna keratektómia u pacientov s intoleranciou na kontaktné šošovky pri liečbe superficiálnych opacít a nodulárnych subepiteliálnych jaziev<sup>47</sup>, resp. môže byť indikovaná ako refrakčná procedúra, v snahe „zaobliť“ kónus a znížiť vysoký astigmatizmus. Mnohé štúdie prezentovali zlepšenie zrakovkej ostrosti a zlepšenie tolerability ku kontaktným šošovkám, bez výskytu nežiadúcich účinkov, avšak tu je dôležitá starostlivá selekcia pacientov, pretože v opačnom prípade môže dôjsť ku destabilizácii keratokónu a jeho progresii.<sup>48</sup>

Procedúrou **LASIK** dochádza ku oslabeniu biomechaniky rohovky s keratokónom, ktorá môže viesť ku vzniku iatrogénnej progresívnej keratektázie už niekoľko mesiacov po zákroku, a preto je tento krok pri sebemenšom podozrení na možnosť výskytu keratokónu absolútne kontraindikovaný.<sup>10</sup>

**Epikeratoplastikou** je možné oploštiť ektatickú rohovku keratokónu pomocou zdravého tkaniva rohovky darcu. Napriek tomu, že v porovnaní s perforujúcou keratoplastikou, je táto procedúra až sekundárna, je možné ju doporučiť u skupín, kde by perforujúca keratoplastika vzhľadom na profesionálne, resp. športové fyzické zaťaženie, alebo chýbajúcu compliance (napr. pac. s Downovým syndrómom) mohla byť zdrojom pooperačných komplikácií.<sup>84</sup>

**Fakické vnútročné šošovky** sú vhodnou alternatívou riešenia refrakčných chýb pacientov s keratokónom s intoleranciou ku kontaktným šošovkám, resp. u pac. ktorí z iných dôvodov nekorigujú ich keratokónus kontaktnými šošovkami.<sup>14</sup>

**Intrakorneálne prstence** vedú k oplošteniu centra rohovky, a tým ku redukcii nepravidelného astigmatizmu a myopie pri keratokóne. Vhodnými kandidátmi sú pacienti s intoleranciou na kontaktné šošovky a transparentným centrom rohovky. Táto procedúra je vhodnou alternatívou u pacientov so zníženým compliance (napr. Down sy). Reziduálnu sférickú a cylindrickú refrakčnú chybu po implantácii prstencov možno korigovať kontaktnými šošovkami.<sup>14</sup>

Všetky tieto modalities terapie predstavujú v prípade progresie ektatických zmien len dočasnú možnosť optimálnej korekcie, a v konečnom dôsledku i životnosť rohovkového transplantátu ako posledná možnosť korekcie pokročilého štádia



keratokónu je obmedzená, a preto je stále aktuálna otázka hľadania inej, novej, podľa možnosti kauzálnej liečby progredujúcich ektatických degenerácií rohovky.

Spevnenie rohovky, tzv. cross-linking kolagénových lamiel rohovky pomocou riboflavínu a ultrafialového žiarenia je v súčasnosti najnovšou a možno povedať zatiaľ prvou kauzálnou terapiou progredujúcej ektázie rohovky, ktorej začiatky v oblasti experimentálnej oftalmológie datujeme do konca 90-tych rokov, kedy sa v tejto oblasti začali prvé pokusy na králičích a prasačích očiach na očnej klinike univerzitnej nemocnice v Drážďanoch.

Vzhľadom k tomu, že keratokónus je najfrekvencovanejšou formou progredujúcej ektatickej degenerácie rohovky, na tomto ochorení boli neskôr uskutočnené aj klinické štúdie sledujúce efekt a vedľajšie účinky tejto novej formy liečby.

## **2 Experimentálne základy cross-linkingu.**

### **2.1 Cross-linking v medicíne.**

Sledovanie biomechanických vlastností humánnych keratektatických rohoviek odhalilo významné rozdiely v elasticite v porovnaní s normálnymi rohovkami, čo je dôvodom zníženej tuhosti rohoviek s keratokónom.<sup>4</sup> Doteraz ešte stále nebol jednoznačne potvrdený mikroskopický korelát tohoto patologického nálezu, avšak predpokladá sa, že sa na tom podieľa redukcia väzieb medzi kolagénovými vláknami rohovky, a tiež zníženie počtu väzieb medzi molekulami proteoglykánov.<sup>99,100</sup>

Prvé experimenty týkajúce sa cross-linkingu rohovky boli zamerané na hľadanie vhodnej metódy, ktorá by viedla ku efektívnemu zvýšeniu tuhosti rohovky s minimom nežiadúcich účinkov. Indukcia „cross-link“ väzieb je známa z oblasti polymérovej chémie, kde sa využíva na zvýšenie elastických vlastností rôznych biomateriálov.<sup>19,39</sup> Prírodný cross-linking proces v spojivových tkanivách nájdeme počas starnutia<sup>1,5</sup>, alebo je vedľajším účinkom u pacientov s diabetes mellitus.<sup>61,64</sup>

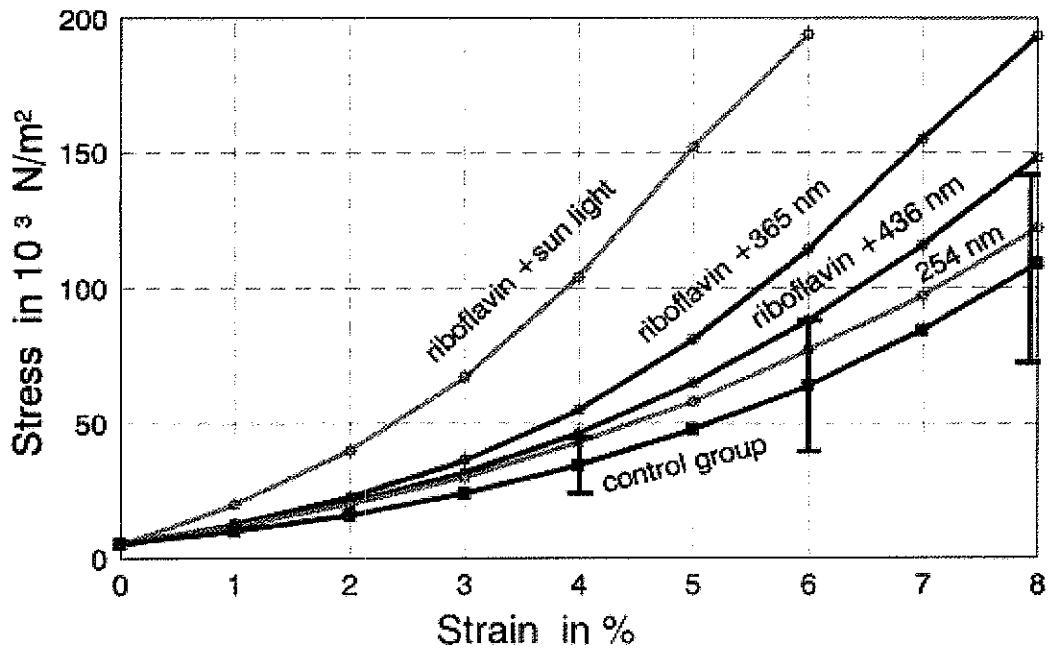
V súčasnosti sa cross-linking proces používa na zvýšenie stability a zníženie biodegradácie biomateriálov na kolagénovom základe ako sú napr. bioprotézy: prasačie srdcové chlopne, cievne protézy, substitúty dury alebo alografty meniskov.<sup>18,51,62,88</sup> V oftalmológii sa prvýkrát metóda cross-linkingu použila pri výrobe kolagénových biomateriálov na syntetickú epikeratoplastiku.<sup>26</sup>

### **2.2 Pokusy na laboratórnych zvieratách. Druhy cross-linkingu.**

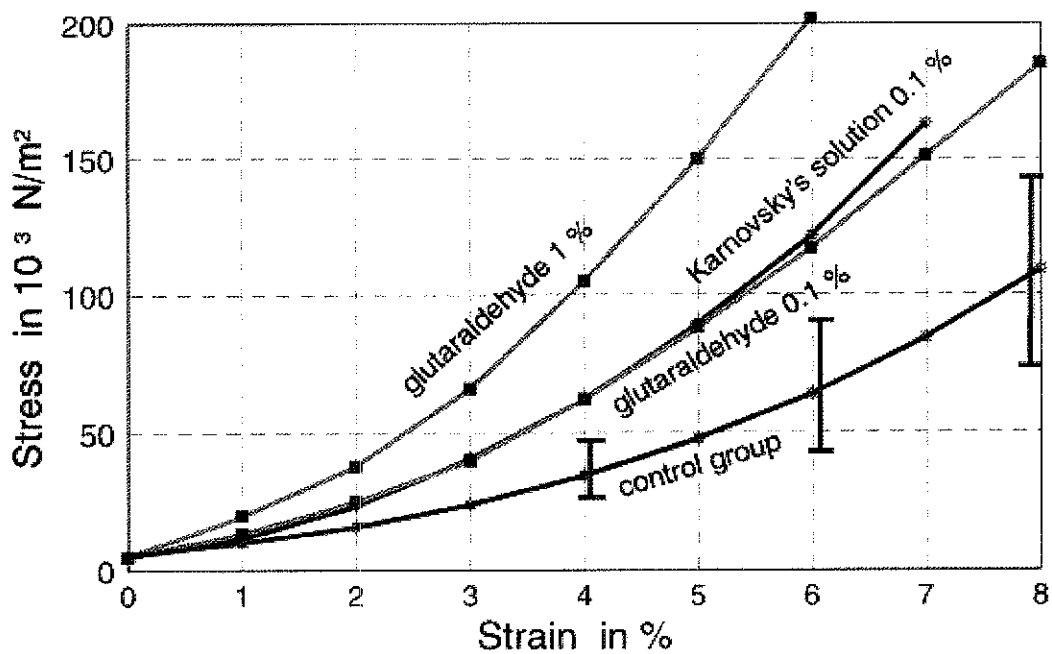
Cross-linking kolagénu môže byť vykonaný niekoľkými spôsobmi: neenzymatickou glykáciou, ultrafialovým žiarením s použitím fotosenzitizérov alebo bez nich, alebo aldehydáciou.<sup>46</sup>

Prvé zvieracie pokusy na drážďanskej očnej klinike sledovali účinok cross-linkingu na zmenu tuhosti prasačích rohoviek uskutočneného pomocou UV-žiarenia samotného, UV-žiarenia rôznych vlnových dĺžok spolu s riboflavínom, slnečného žiarenia spolu s riboflavínom, riboflavínu samotného, rôznych koncentrácií glutaraldehydu a Karnovského roztoku (glutaraldehyd + paraformaldehyd) v porovnaní s kontrolnou skupinou, kde nebola použitá žiadna zo spomenutých metód.<sup>72</sup>

Biomechanické vlastnosti boli merané počítačom riadeným materiálovým testerom „Minimat“. Ku zvýšeniu tuhosti rohovky došlo u všetkých skupín, okrem skupín, kde boli použité UV-žiarenie samotné a riboflavín samotný (graf 3, 4).

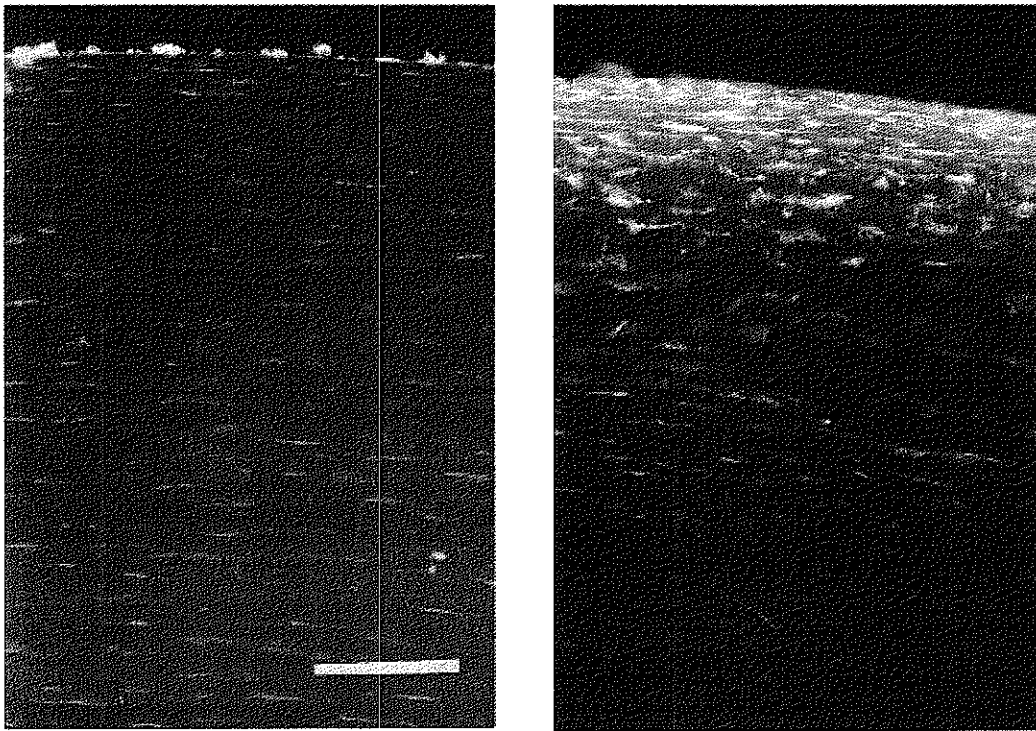


Graf 3: Zvýšenie tuhosti rohovky po aplikácii riboflavínu a UV-žiarenia (Spörl E. Exp Eye Res 1998)



Graf 4: Zvýšenie tuhosti rohovky aldehydáciou (Spörl E. Exp Eye Res 1998)

Fluoresceínovou mikroskopiou bolo možné vizualizovať efekt cross-linkingu po použití Karnovského roztoku (obr. 18).

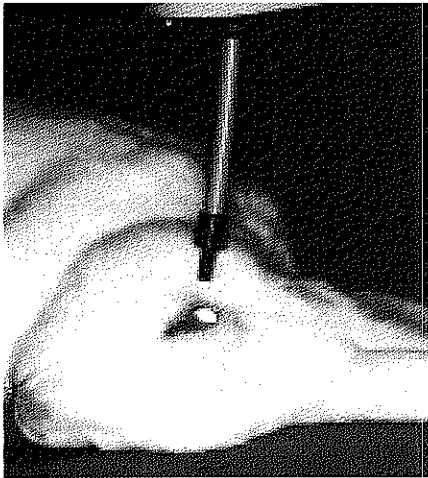


Obr.18: vľavo- pred aldehydáciou, vpravo- po aldehydácií (Spörl E. Exp Eye Res 1998)

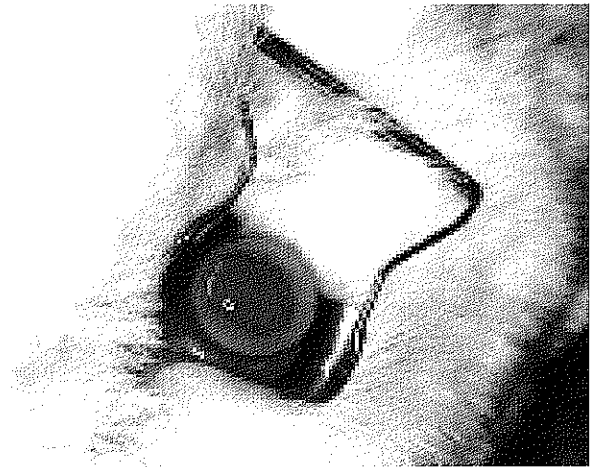
Ďalšie pokusy boli zamerané na hľadanie najvhodnejšej metódy s dostatočným efektom na kolagénové vlákna a minimom nežiadúcich účinkov na rohovku. Tento efekt sa sledoval na rohovkách kráľika bieleho, kde u 28 kráľikov bolo jedno oko podrobené terapii a druhé oko slúžilo ako kontrola.<sup>73</sup>

V sledovanej skupine sa u 19 očí aplikoval riboflavín s UV-žiarením (obr. 19) a u 9 očí sa cross-linking vykonal pomocou glutaraldehydu (obr. 20).

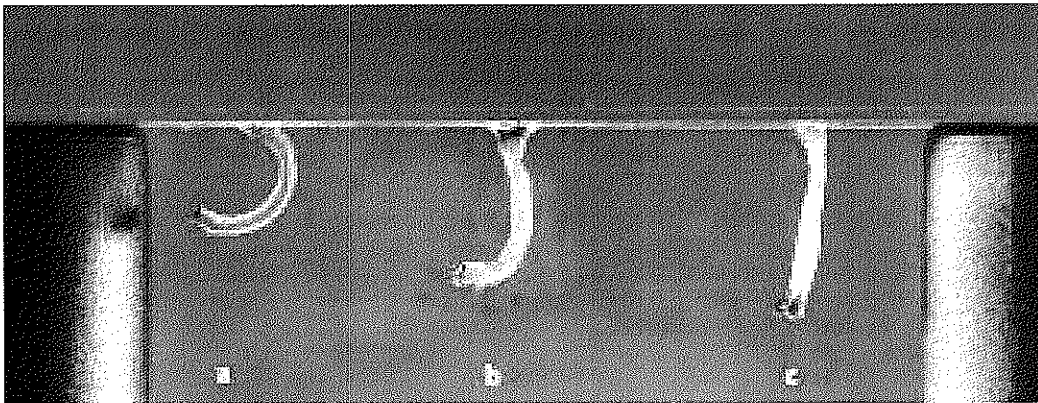
U skupiny s glutaraldehydom došlo ku kompletnej epitelizácii rohovky kráľika o jeden deň neskôr ako u skupiny s riboflavínom a UV-žiarením. U tejto skupiny došlo aj ku opacifikácii subepiteliálnej strómy rohovky, avšak na 4-tý týždeň po výkone boli u oboch skupín rohovky transparentné. Tuhosť rohovky sa merala už spomenutým materiálovým testerom. U oboch skupín došlo ku zvýšeniu tuhosti rohovky (obr. 21) v porovnaní s kontrolnou skupinou, avšak u skupiny, kde bol použitý glutaraldehyd bol stupeň zvýšenia štatisticky nesignifikantný, preto sa v ďalších pokusoch od tohoto spôsobu cross-linkingu upustilo a koncentrovalo sa na sledovanie účinku cross-linkingu pomocou riboflavínu a UV-žiarenia.



Obr. 19: Aplikácia UV-žiarenia



Obr. 20: Aplikácia glutaraldehydu

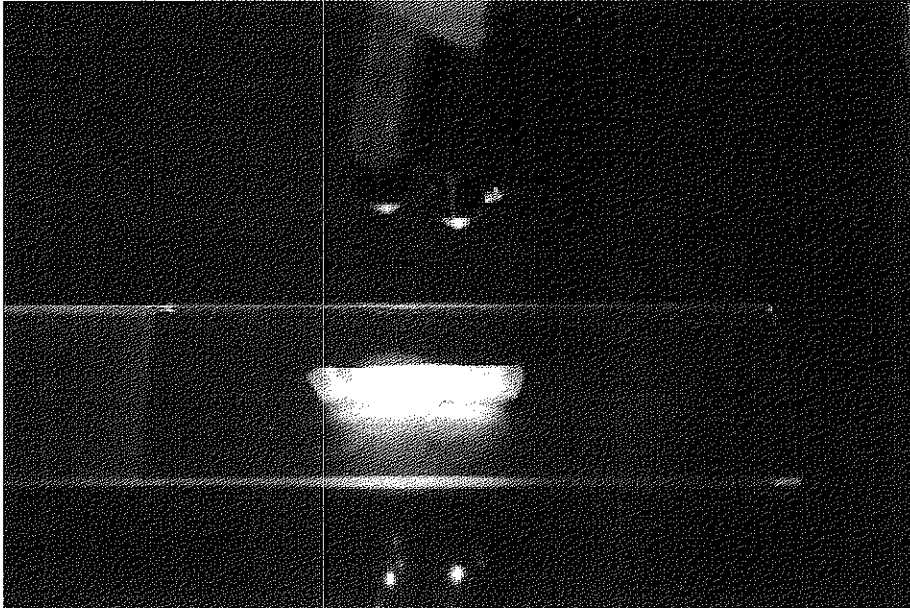


Obr. 21: rohovka kráľika po aplikácii a) glutaraldehydu b) riboflavínu a UV-žiarenia c) kontrolná skupina (Spörl E. Der Ophthalmologe 2000)

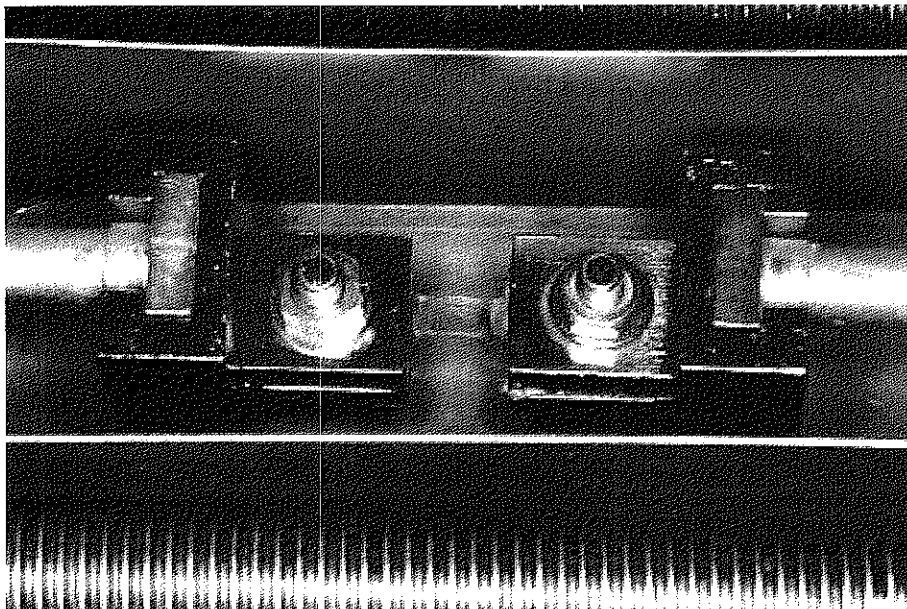
### **2.3 Experimenty na humánnom tkanive.**

Od zvieracích experimentov sa postupne prešlo ku meraniu biomechanických vlastností ľudskej rohovky *in vitro*. Na pokus boli použité rohovky excidované z enukleovaných bulbov žijúcich pacientov (enukleácia pre endoftalmitídu, chorioidálny melanóm, amotio retinae non sanata). Na excidované pruhy rohoviek o šírke 4mm, dĺžke 14mm spolu s 1mm okrajom skléry a hrúbke 550 $\mu$ m sa aplikoval 0,1% riboflavín vo forme kvapiek, potom nasledovalo UV-žiarenie o vlnovej dĺžke 370nm o výkone 3mW/cm<sup>2</sup> po dobu 30 minút (obr. 22). Následne boli vykonané

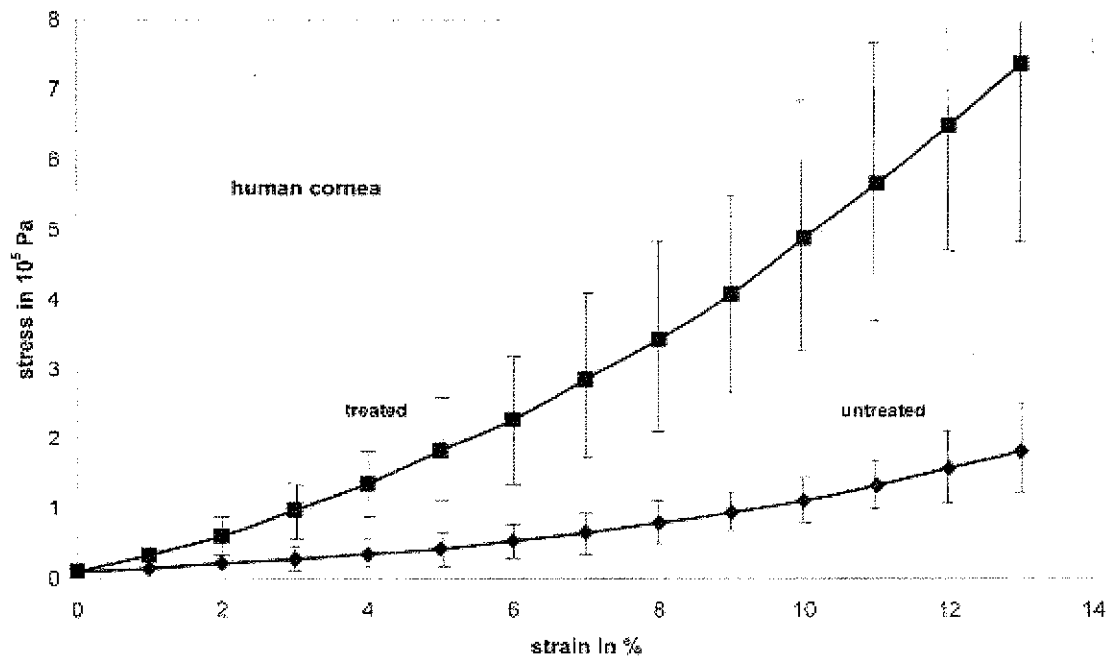
stress-strain merania tuhosti rohoviek sledovanej skupiny s kontrolnou skupinou, kde nebola aplikovaná žiadna procedúra (obr. 23). U sledovanej skupiny došlo ku zvýšeniu tuhosti rohovky o 328% v porovnaní s kontrolnou skupinou, a tento rozdiel bol aj štatisticky významný (graf 5).



Obr. 22: Aplikácia UV-žiarenia



Obr. 23: Testovanie tuhosti rohovky Minimatom



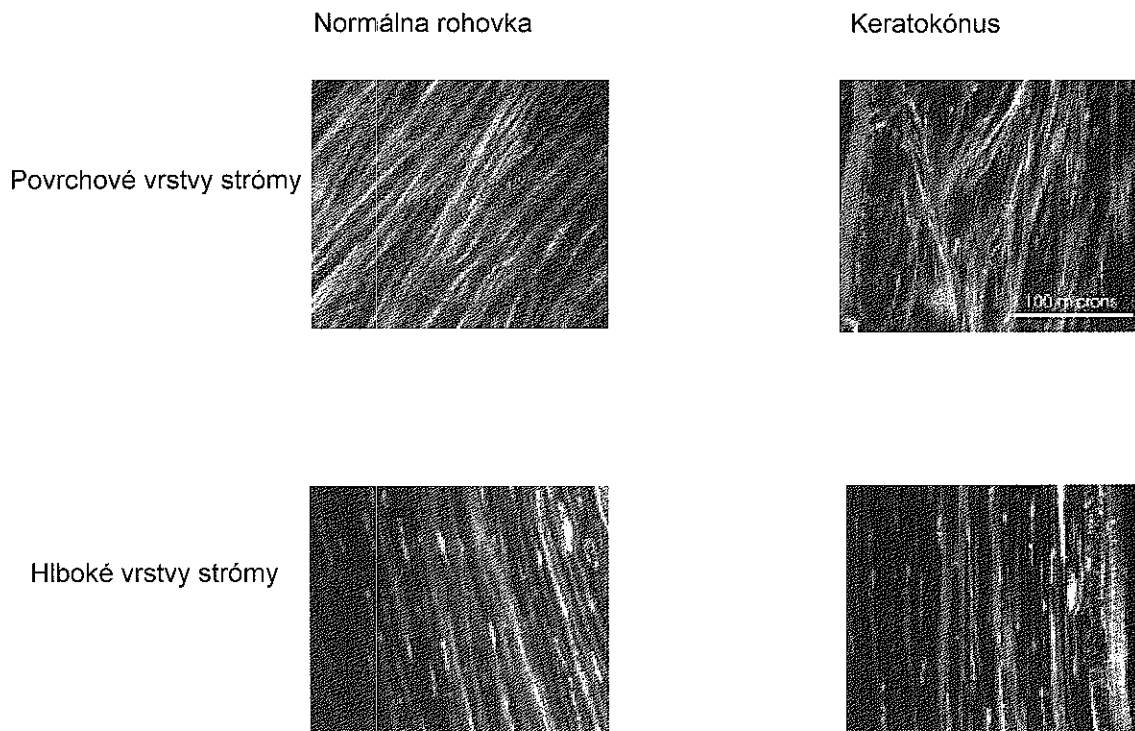
Graf 5: Zvýšenie tuhosti rohovky po cross-linkingu (Wollensak G.. J Cataract Refract Surg 2003)

Na iných experimentoch bolo možné sledovať vplyv riboflavínu a UV-žiarenia na zmenu priemeru kolagénových vlákien<sup>93</sup>, na zvýšenie odolnosti voči lytickým účinkom enzýmov<sup>74</sup>, na apoptózu keratocytov v predných vrstvách rohovky.<sup>94</sup>

Ako bolo možné pozorovať pri meraní biomechanických vlastností rohovky, ku výraznej zmene kvality kolagénových vlákien dochádza v 54% objemu rohovky, a to v rozsahu asi 300µm anteriórnej strómy, čo je v podstate aj žiadaným efektom, vzhľadom k tomu, že sú to práve predné vrstvy rohovky, ktoré determinujú jej rigiditu a zakrivenie.<sup>49</sup>

Logiku nevyhnutnosti ošetrenia práve predných vrstiev strómy rohovky pri keratokóne s cieľom zvýšenia jej tuhosti potvrdzujú aj sledovania nemeckých autorov konfokálnym mikroskopom, ktorých snímky ukazujú nepravidelnosť usporiadania keratocytov v porovnaní s normálnou rohovkou, práve v týchto vrstvách<sup>76</sup> (obr. 24).

Na základe experimentov z 80-tych rokov je zrejmé, že pri keratokóne je tuhosť rohovky znížená asi o 50% v porovnaní s normálnou rohovkou<sup>4</sup>, a preto boli prvé klinické štúdie vykonané práve na pacientoch s keratokómom.<sup>89,90</sup> Ďalšou indikáciou k tejto terapii bol perzistujúci nehojaci sa ulkus rohovky a iatrogénna keratektázia po refrakčných výkonoch excimerovým laserom.<sup>35,67</sup>



Obr. 24: Konfokálna mikroskopia strómy rohovky s keratokónom v porovnaní s normálnou rohovkou (Stachs O. Der Ophthalmologie 2004)

## 2.4 Bezpečnosť cross-linkingu.

Cieľom terapeutickej metódy cross-linking pri ektatických ochoreniach rohovky je zvýšenie počtu chemických väzieb v stróme rohovky pomocou procesu fotopolymerizácie v predných vrstvách strómy rohovky s minimom expozície okolitých okulárnych štruktúr. Ku prejavom účinku pôsobenia UV-žiarenia dochádza len vtedy, ak dôjde k jeho absorpcii, a preto musí byť zabezpečené, aby sa maximum tohoto žiarenia absorbovalo v stróme rohovky. K uskutočneniu tohoto dochádza výberom vhodnej vlnovej dĺžky UV-žiarenia (370nm), ktorá korešponduje s absorpčným maximom riboflavínu. Riboflavín má 3 absorpčné maximá pre UV-A žiarenie, avšak len vlnová dĺžka 370nm je vhodná pre cross-linking kolagénu, pretože vlnová dĺžka pod 300nm môže spôsobiť poškodenie DNA a vlnová dĺžka 450nm by mohla viesť ku poškodeniu sietnice v modrom spektre. Riboflavín má v procese cross-linkingu úlohu fotosenzitizátora – fotomediátora, pomocou ktorého dochádza ku tvorbe voľných

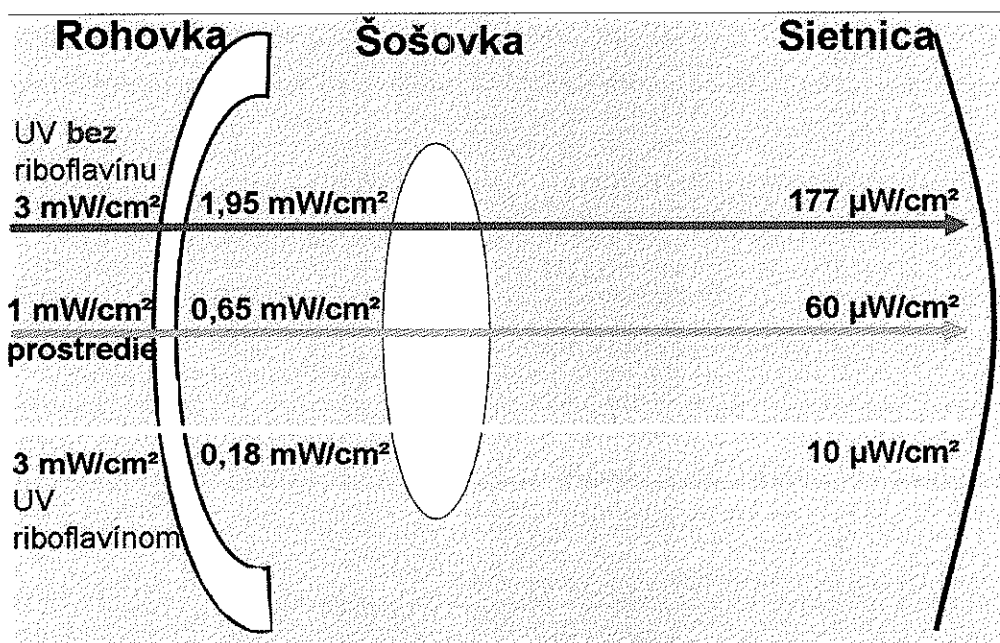


kyslíkových radikálov vedúcich ku novým chemickým väzbám medzi kolagénovými vláknami.

Vzhľadom na možnosť poškodenia intraokulárnych štruktúr UV-žiarením, je nevyhnutné rešpektovať prahové hodnoty zaťaženia UV-žiarením doporučené hygienickými predpismi<sup>40</sup>, a tieto jasne upravujú, že dávka žiarenia nesmie prekročiť hodnotu  $1\text{J}/\text{cm}^2$ . Táto dávka ako taká, je pri aplikácii cross-linkingu prekročená, ale vďaka riboflavínu dochádza k jeho absorpcii v stróme rohovky, a tak do intraokulárnych štruktúr prechádza žiarenie v dávke, ktorá neprekračuje túto hygienicky prípustnú hranicu (obr. 25).

Pôsobením ultrafialového žiarenia na riboflavín dochádza ku vzniku voľných kyslíkových radikálov, ktoré môžu pôsobiť cytotoxicky na keratocyty a endotel rohovky. Štúdie zamerané na sledovanie tohoto cytotoxického efektu procedúry sledoval Wollensak a spol.<sup>91,96,98</sup> Na králičích rohovkách bola 24 hodín po aplikácii riboflavínu a UVA žiarenia pozorovaná apoptóza keratocytov do hĺbky  $300\mu\text{m}$ . Konfokálna mikroskopia talianskych autorov potvrdila sledovania Wollensaka a spol., ktorá vizualizovala apoptotické keratocyty v rozsahu  $270\text{--}350\mu\text{m}$ , a tiež potvrdila ich repopuláciu v rozsahu celej strómy rohovky po 6 mesiacoch od cross-linkingu.<sup>12,41</sup>

V týchto pokusoch, ktoré rešpektovali parametre koncentrácie riboflavínu a dávky UV-žiarenia klinicky aplikované, neboli detekované známky poškodenia endotelu rohovky.<sup>75</sup>



Obr. 25: Dávky UV-žiarenia prechádzajúce intraokulárne za rôznych podmienok

### **3 Cieľ práce**

Zhodnotenie efektivity terapie pomocou CXL-metódy u pacientov s progresívnym keratokónom.

Retrospektívne vyhodnotenie parametrov s výpovednou hodnotou týkajúcich sa vlastností rohovky a funkcie oka s minimálnou pozorovacou dobou 1 rok po aplikácii CXL a ich komparácia s hodnotami pred liečbou.

Sledované parametre:

- keratometrické hodnoty v 3mm zóne odčítané z topografického záznamu
- keratometrické hodnoty na apexe keratokónu
- astigmatizmus
- vízus

Sledovanie výskytu možných nežiadúcich účinkov CXL terapie.

## 4 Pacienti a metodika

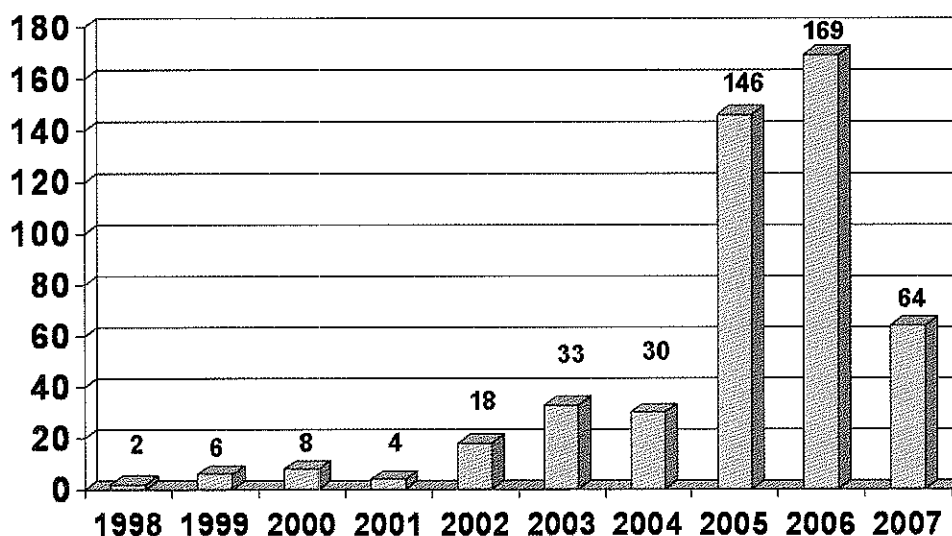
### 4.1 Pacienti

Cross-linking kolagénu rohovky u pacientov s ektatickými ochoreniami rohovky sa na očnej klinike univerzitnej nemocnice v Drážďanoch vykonáva od roku 1998. Začiatky týchto klinických štúdií naväzujú na roky experimentálnych in vitro zvieracích a humánnych a in vivo zvieracích skúseností, ktoré potvrdili efektivitu tejto metódy a absenciu dlhodobých nežiadúcich účinkov. Napriek tomu, bola aplikácia tejto metódy v prvých 3-och - 4-och rokoch len sporadická, a až v roku 2002 bolo za jeden rok vykonaných už 18 ošetrení a od tohoto roku počet výkonov za rok narastá, s maximálnym počtom v roku 2006, kedy bolo na tejto klinike vykonaných 169 procedúr (graf 6). Tento fakt je dôležitým pre interpretáciu validity štatistických výsledkov štúdie z dlhodobého pohľadu.

Do tohoto roku bolo na tunajšej klinike ošetrovaných 574 očí (graf 6), do konečnej štatistickej analýzy boli zahrnutí pacienti s minimálnou pozorovacou dobou 6 mesiacov od výkonu, túto podmienku splnilo 241 očí stotridsiatich pacientov. Ide o longitudinálnu retrospektívnu štúdiu, s konzekutívnou rekrutizáciou pacientov s progredujúcim keratokónom starších ako 18 rokov. Štúdia bola preverená a odsúhlasená etickou komisiou tunajšej inštitúcie (pod registračným číslom EK 310 499), každý pacient obdržal pred výkonom písomnú informáciu o charaktere jeho ochorenia a podrobný popis navrhovaného liečebného postupu, bol informovaný o študijnom charaktere tohoto druhu liečby, o jej možných rizikách a svoju informovanosť potvrdil svojim podpisom.

Pri vstupnom vyšetrení bola sledovaná refrakcia pacientov, zraková ostrosť na Snellenových optotypoch pri štatistickom spracovaní pretransformovaná do LogMAR formy, topografia rohovky, na ktorých sa sledovala maximálna keratometria v 3mm zóne, na vrchole keratokónu a astigmatizmus. Každý pacient bol vyšetrený biomikroskopicky, ako predný tak aj zadný segment. Ku CXL procedúre boli indikovaní len tí pacienti, u ktorých sa potvrdili známky progresie ektázie zaznamenané v období posledného roka. Za relevantné známky progresie boli považované: zvýšenie keratometrických hodnôt v topografii rohovky, významné kvalitatívne zmeny v topografickom obraze, zmeny v refrakcii, zhoršenie zrakovej ostrosti. Ak vyšetrujeme pacienta po prvý-krát a nemáme k dispozícii nálezy jeho

predošlých vyšetrení, starostlivá anamnéza môže významne pomôcť pri indikácii procedúry: údaje o zhoršení videnia aj napriek novej okuliarovej alebo šošovkovej korekcii, nástup alebo zhoršenie diplopie, zníženie tolerancie pri nosení kontaktnej šošovky a pod. v poslednom období mali dôležitú výpovednú hodnotu pri rozhodovaní sa ku procedúre.

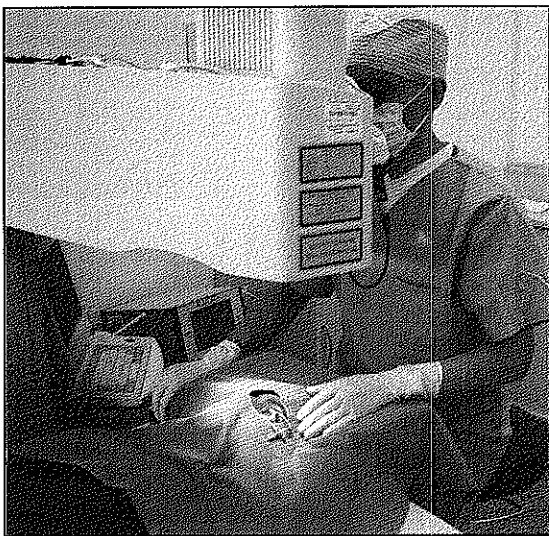


Graf 6: Celkový počet CXL procedúr vykonaných na očnej klinike drážďanskej univerzity

## 4.2 Metodika

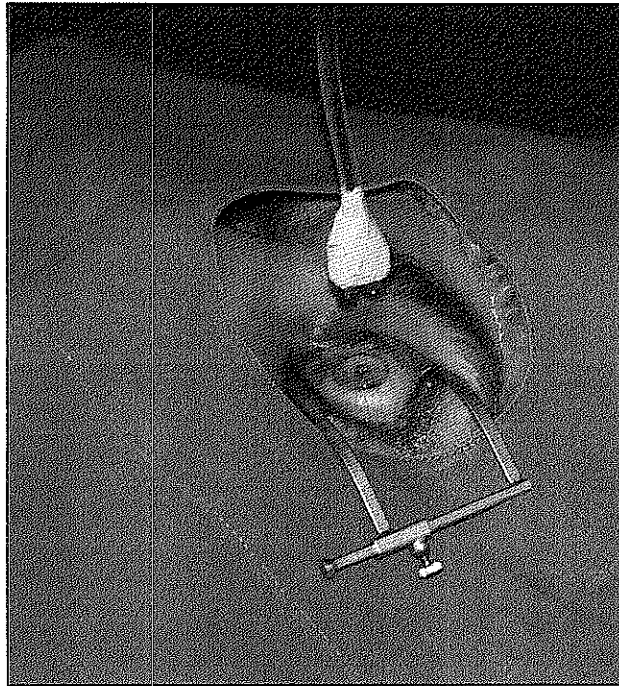
Cross-linking procedúra sa vykonáva na našej klinike v rámci ambulantných operačných výkonov. Ako premedikácia je pacientovi podaná analgéza a trankvilizér v tabletkovej forme (Tbtl. Diazepam 5mg) podobne ako je tomu u pacientov pred refrakčným laserovým výkonom. Pred samotným výkonom ja pacientovi aplikovaná lokálna topická anestéza (Proparacain-POS® 0,5% Augentropfen). Samotná procedúra je vykonaná v settingu refrakčného excimer-laserového operačného sálu (obr. 26), pred aplikáciou roztoku 0,1% riboflavínu vo forme kvapiek sa odstráni epitel rohovky v priemere asi 8mm, aby sa zabezpečila dostatočná penetrácia roztoku

riboflavínu do strómy rohovky. Následne je pacientovi aplikovaný 0,1% riboflavín (magistraliter príprava: **izoosmolárny roztok riboflavínu**: riboflavínfosfát-nátrium 0,127g, Methylhydropropylcelulóza 1,5g, izotonický roztok NaCL 0,9% do 100g; **hypoosmolárny roztok riboflavínu**: riboflavínfosfát-nátrium 0,127g, NaCL 0,7g, H<sub>2</sub>O do 100g; firma Peschke dodáva riboflavín vyrábaný v „Kronen-Apotheke“ Kiel: izoosmolárny roztok: riboflavín 0,1% 3ml, Dextran 500 20%; hypoosmolárny roztok: riboflavín 0,1% 0,5ml) vo forme kvapiek; v závislosti od hrúbky rohovky: nad 400µm – izoosmolárny roztok, pod 400µm - hypoosmolárny roztok (obr. 27, 28), každé 3 minúty po dobu 30 minút, pokiaľ nie je tkanivo rohovky v celej jeho hrúbke dostatočne nasýtené roztokom a pri biomikroskopii nie je zrejماً fluorescencia roztoku v prednej komore.<sup>75</sup> V prípade potvrdenia tohoto fenoménu je možné započat' s ožiaréním rohovky UV-A žiarením. Toto žiarenie má vlnovú dĺžku 370nm±5nm a jeho výkon je 3mW/cm<sup>2</sup> po dobu 30 minút, čo zodpovedá celkovej dávke 3,4 J, resp. totálnej radiačnej expozícii rohovky 5,4 J/cm<sup>2</sup>. Intenzita žiarenia sa sleduje a kalibrácia prístroja sa vykonáva pred jeho každým použitím pomocou merača LaserMate-Q UVA meter (Laser 2000). Rohovka je ožiarená v priemere asi 8mm. (obr. 29). Od r. 1998 do r. 2006 sa ku UV ožiareniu používal prototyp prístroja skonštruovaný Prof. Spörlom a Prof. Seilerom (obr. 30), ktorým boli vykonané aj všetky experimenty v tejto oblasti a od r. 2007 sa používa CE – certifikovaný CXL prístroj firmy Peschke GmbH (obr. 31). Schéma CXL ošetrovania je znázornená stručne na obr. 32.

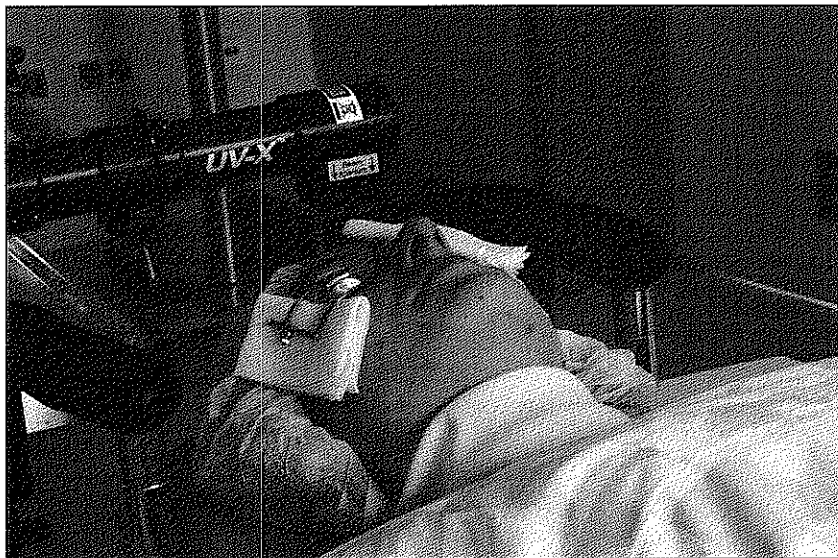


Obr. 26: Príprava pacienta pred CXL v settingu excimer-laserového operačného sálu

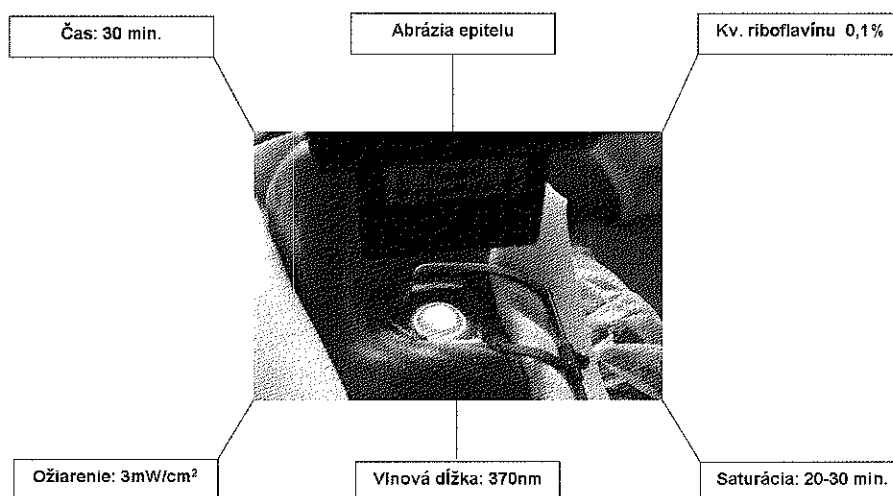




Obr. 30: Prototyp prístroja na UV-ožiarenie používaný od roku 1998



Obr. 31: UV-X – Cross-linker firmy Peschke GmbH používaný od r. 2006



Obr. 32: parametre CXL procedúry

Po ukončení ožiarenia sa rohovka ošetrí antibiotickou masťou (Floxal® Augensalbe, fi. Mann) a masťou podporujúcou epitelizáciu rohovky (VitA-POS® Augensalbe, fi. Ursapharm), tieto sa aplikujú v 2-hodinových intervaloch a pacient sa sleduje denne do ukončenia epitelizácie rohovky. Po epitelizácii sa redukuje antibiotická masť na 1x denne po dobu jedného týždňa, Vit. A 3x po dobu jedného týždňa a kvapky Dexamethason (DexaEDO® Augentropfen, fi Mann) 3x denne po dobu troch týždňov. Nasledujúca kontrola je po 3 mesiacoch od výkonu, kde sa pacient vyšetří biomikroskopicky; po 6 mesiacoch a po jednom roku od výkonu a ďalej vždy 1-krát do roka sa pri každej kontrole pacient podrobí vyšetreniu ako pri vstupnom vyšetrení, t.j. biomikroskopické vyšetrenie predného a zadného segmentu, refrakcia, vízus a topografia rohovky so všetkými horeuvedenými parametrami.

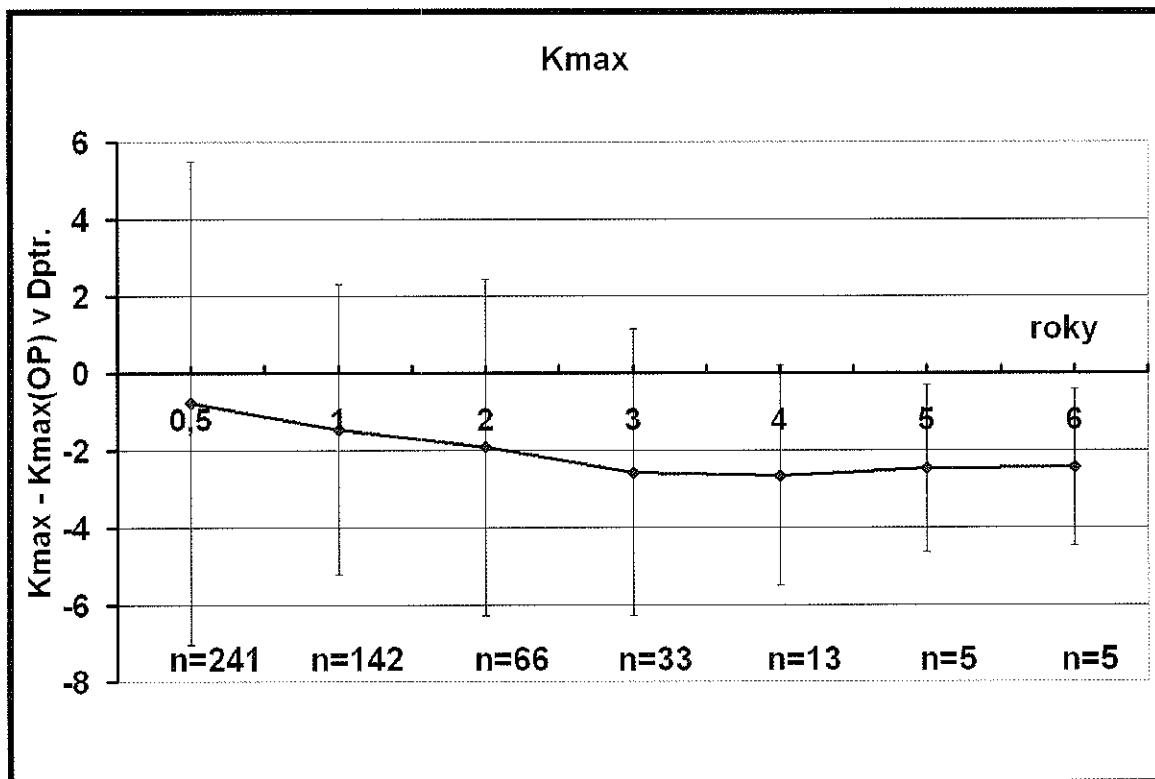
Na kvantifikáciu efektu cross-linkingu sa zaznamenávali horeuvedené parametre pri každej kontrole pacienta, a tieto sa porovnávali s hodnotou parametrov v čase aplikácie cross-linkingu. Na štatistické vyhodnotenie bol použitý SPSS software (version 12.5, SPSS, Inc.), pri hodnotení opakovaných meraní v súbore ako takom sa použila ANOVA metóda, pri analýze skupiny očí s opacifikáciou rohovky po cross-linkingu, ktorá sa rozoberá v kapitole pojednávajúcej o komplikáciách sa použil T-test.



## 5 Výsledky

Priemerný vek sledovanej kohorty bol  $30,04 \pm 10,46$  rokov. Priemerná pozorovacia doba bola  $26,7 \pm 16,2$  mesiacov. Priemerné keratometrické hodnoty pred CXL boli:  $K_{\max} = 53,7 \pm 7,5$  Dptr.,  $K_{\text{apex}} = 62,6 \pm 12,7$  Dptr. Hodnota priemerného astigmatizmu bola  $6,5 \pm 4,4$  Dptr., priemerný najlepšie korigovaný vízus bol  $0,39 \pm 0,31$  logMAR.

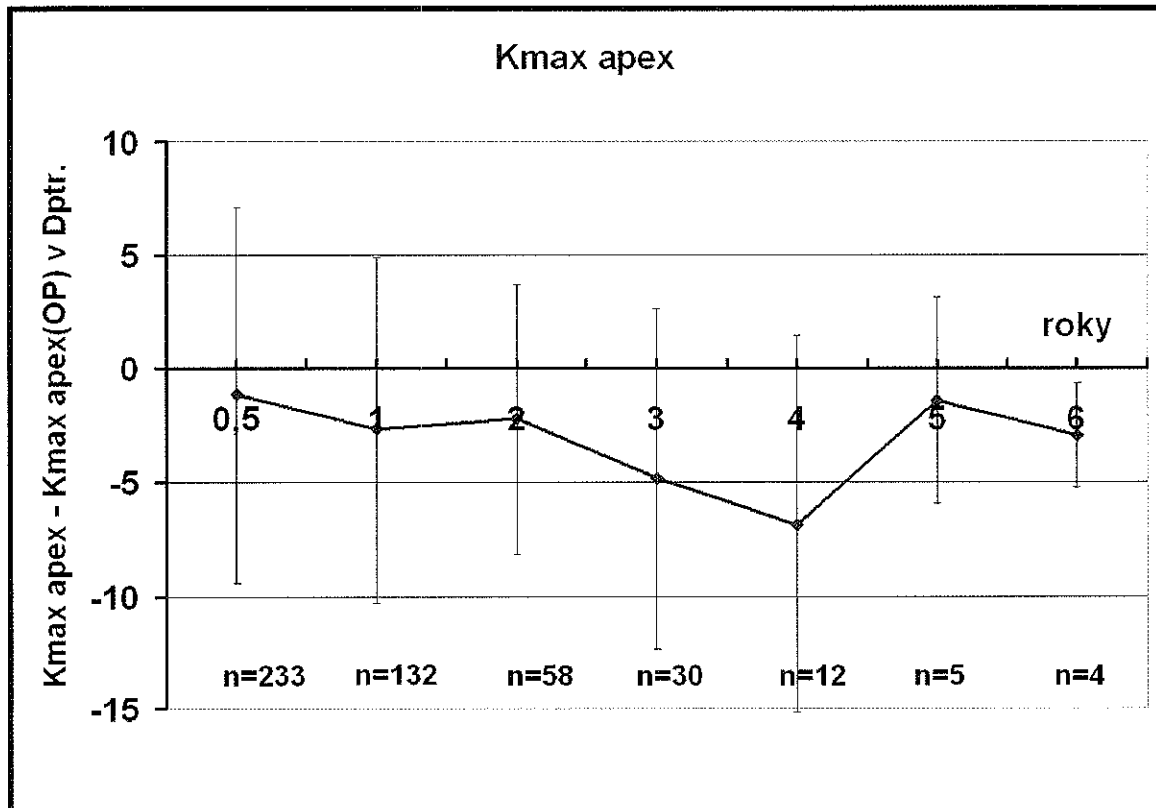
Výsledky sledovaných parametrov retrospektívnej štúdie sú zobrazené v nasledujúcich tabuľkách a grafoch.



Graf 7: Zmena keratometrických hodnôt  $K_{\max}$  v čase ku dňu CXL - (0)

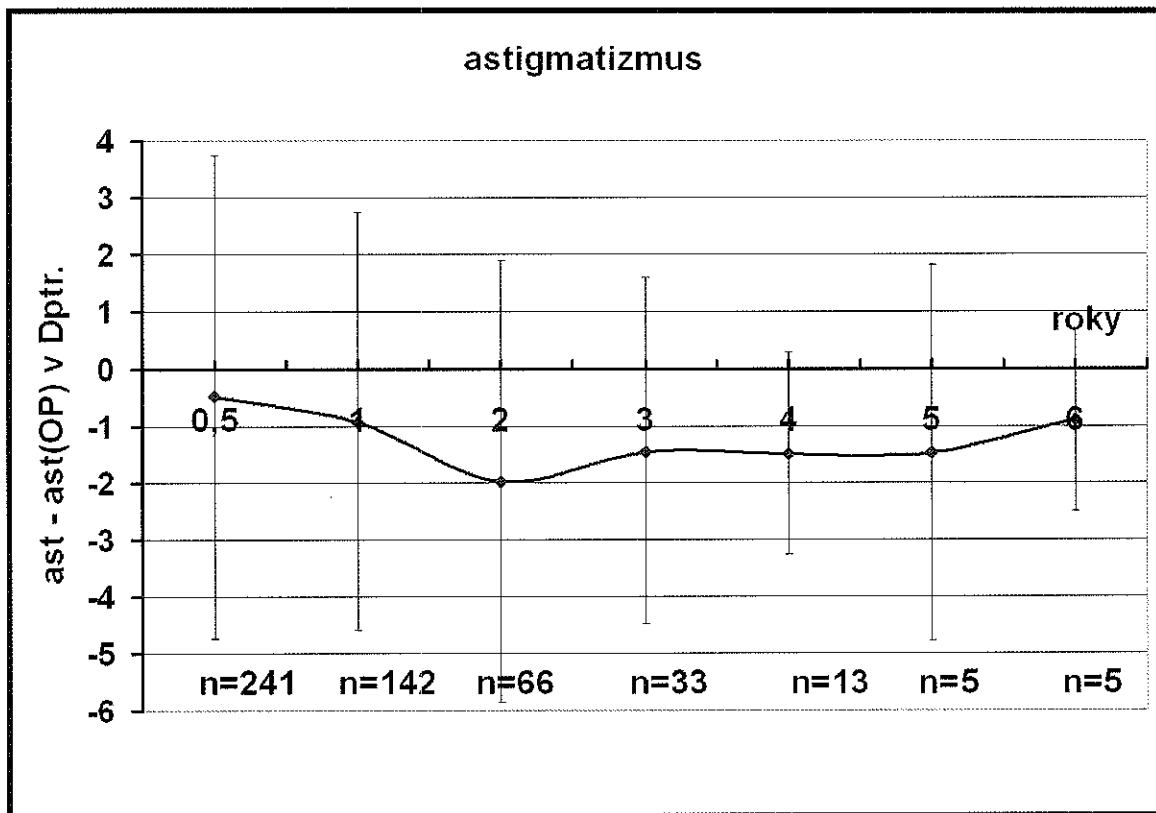
Tento graf (graf 7) znázorňuje zmenu maximálnych keratometrických hodnôt odčítaných v 3mm zóne topografického záznamu v porovnaní ku dňu výkonu – čas 0. V prvom roku po CXL dochádza ku štatisticky významnému poklesu priemernej  $K_{\max}$  hodnoty o 1,46 Dptr. ( $P < 0,01$ ) u 56% očí, pričom 30% očí zostáva stabilných (v rozmedzí  $\pm 0,5$  Dptr.), v druhom roku po CXL je zaznamenaný štatisticky významný pokles priemernej  $K_{\max}$  hodnoty o 1,91 Dptr. ( $P < 0,01$ ) u 54% očí, 35% očí vykazuje výkyv  $K_{\max}$  hodnoty v rozmedzí  $\pm 0,5$  Dptr.

Tri roky po procedúre bol zistený štatisticky významný pokles priemernej  $K_{max}$  hodnoty o 2,57 Dptr. u 58% očí ( $P < 0,01$ ) a v rozmedzí  $\pm 0,5$  Dptr. bolo 9% očí. V ďalších rokoch je z grafu zrejmá taktiež stabilizácia procesu, čo sa však týka validity štatistickej interpretácie, musí byť zohľadnený malý počet očí kohorty v týchto rokoch. Priemerná hodnota poklesu  $K_{max}$  vo všetkých podskupinách spolu za všetky roky v porovnaní s hodnotou pred CXL je 2,41 Dptr.



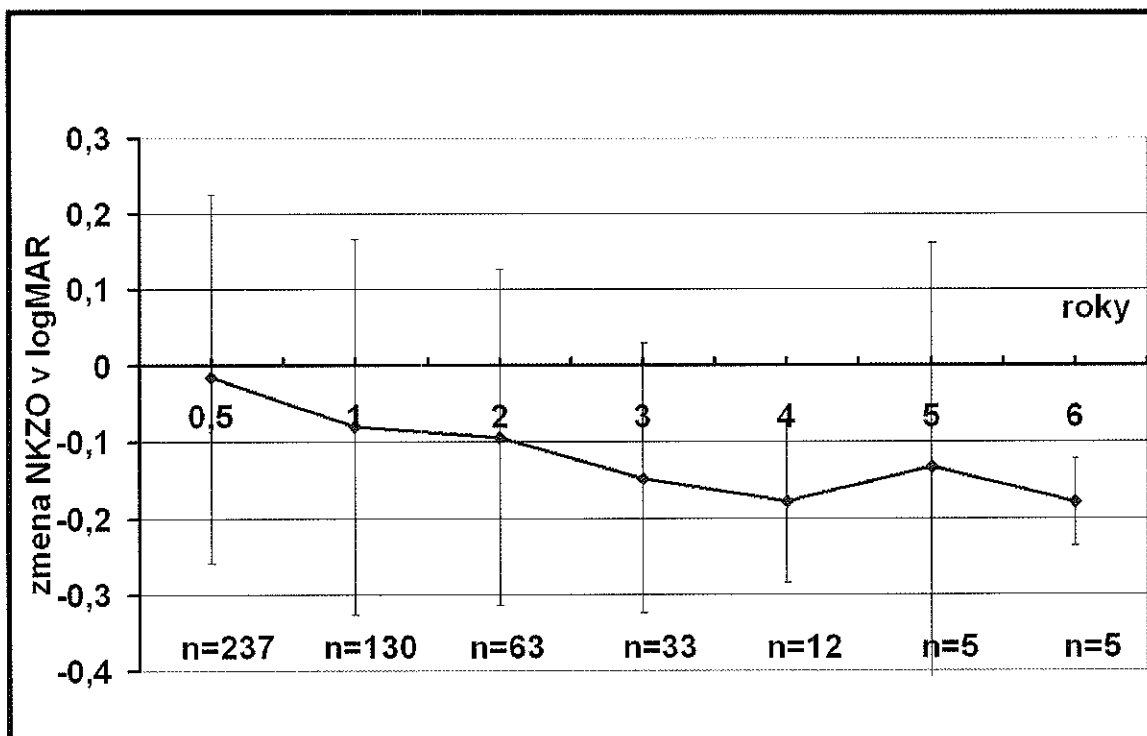
Graf 8: Zmena keratometrických hodnôt na vrchole keratokónu

Pri meraní priemerných  $K$  hodnôt v oblasti apexu keratokónu už v prvom roku dochádza ku štatisticky významnému poklesu o 2,68 Dptr. u 62% očí ( $P < 0,01$ ), u 17% zostáva tento parameter stabilný v rozmedzí  $\pm 0,5$  Dptr. Dva roky po CXL je priemerná  $K_{max\ apex}$  hodnota o 2,21 Dptr. v porovnaní s predoperačnou hodnotou štatisticky významne nižšia u 60% očí ( $P < 0,01$ ), 19 % očí zostalo stabilných v rozmedzí  $\pm 0,5$  Dptr. Pri vyhodnotení pacientov 3 roky po CXL, je pokles  $K_{max\ apex}$  hodnoty o 4,84 Dptr. štatisticky významný u 78% očí, dve percentá očí zostávajú v rozmedzí  $\pm 0,5$  Dptr (graf 8). Priemerný pokles keratometrickej hodnoty v oblasti apexu v celom súbore je o 3,65 Dptr. v porovnaní s predoperačnými hodnotami.



Graf 9: Vývoj zmeny astigmatizmu po CXL

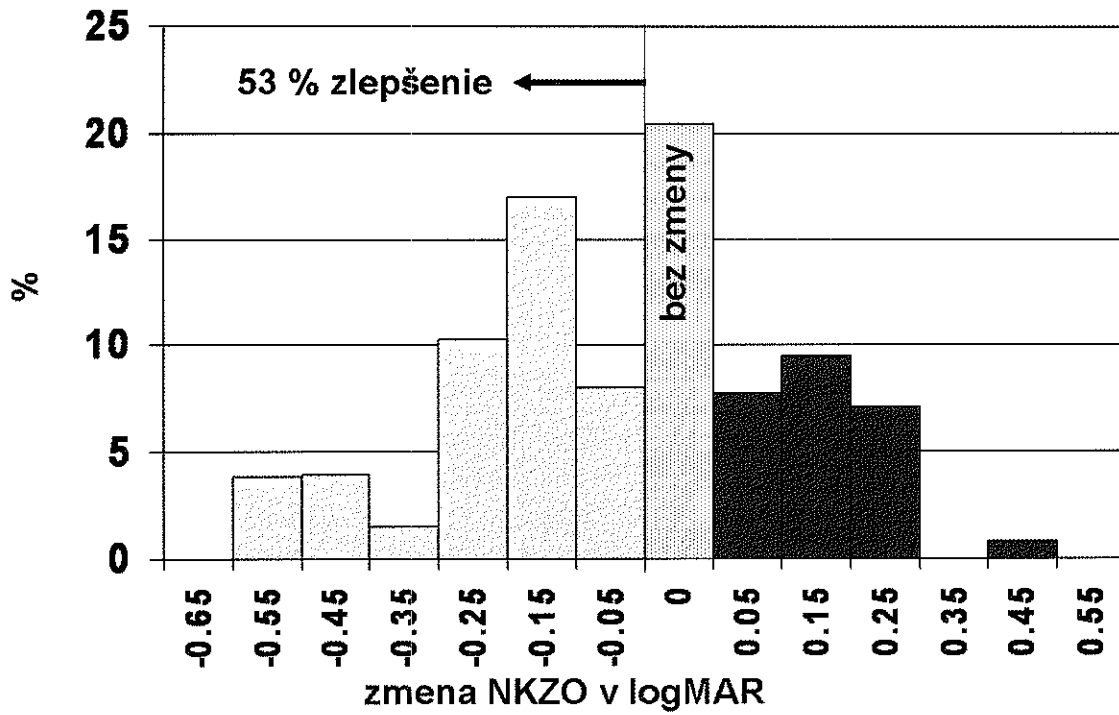
Pri sledovaní astigmatizmu bol zaznamenaný v prvom roku po CXL štatisticky významný pokles jeho priemernej hodnoty o 0,93 Dptr. u 50% očí ( $P < 0,01$ ) a u 36% očí zostal tento parameter stabilný v rozmedzí  $\pm 0,50$  Dptr. Dva roky po terapii je u 43% očí priemerný astigmatizmus nižší o 1,20 Dptr ( $P < 0,01$ ) a u 42% očí zostáva v rozmedzí  $\pm 0,50$  Dptr. Po troch rokoch je astigmatizmus u 54% očí o 1,45 Dptr. nižší než tomu bolo v čase pred CXL ( $P < 0,01$ ) a 14% očí preukázala v tomto časovom intervale po výkone stabilitu v rozmedzí  $\pm 0,50$  Dptr (graf 9). Hodnota astigmatizmu v celom súbore poklesla v priemere o 1,30 Dptr.



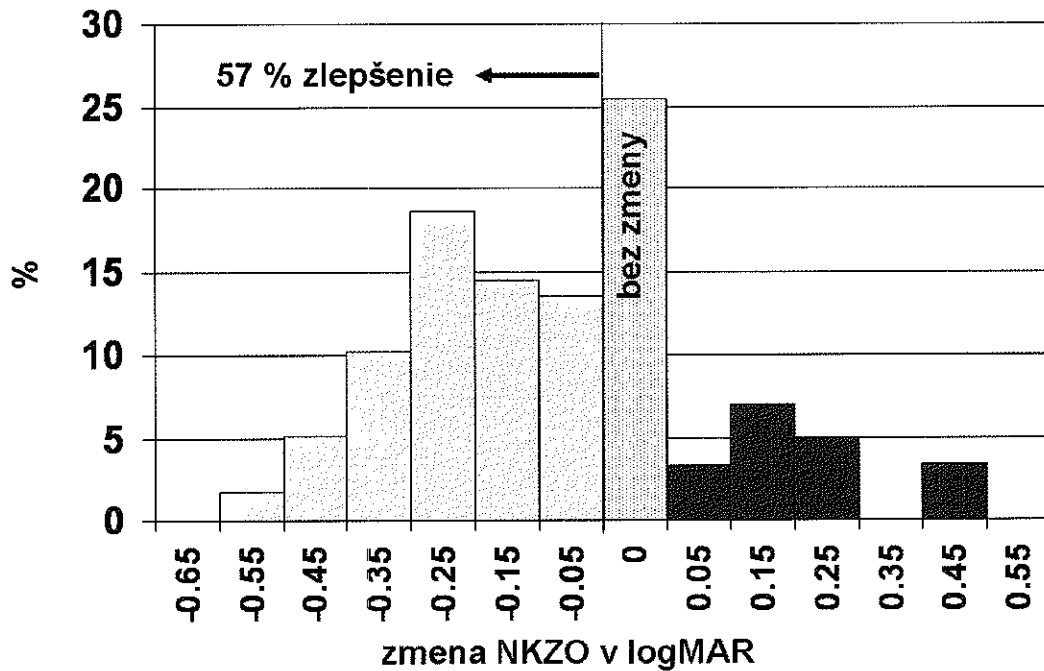
Graf 10: Zmena NKZO po CXL

Pozitívne výsledky boli zaznamenané aj v zrakovej ostrosti pacientov po cross-linkingu. Jeden rok po aplikácii sa významne aspoň o jeden riadok zlepšila najlepšie korigovaná zraková ostrosť u 53% očí a 20% očí si zachovalo NKZO ako mali pred výkonom. Po dvoch rokoch bolo zlepšenie NKZO aspoň o jeden riadok štatisticky významné u 57% očí, pričom 24% očí zostalo na rovnakej úrovni ako tomu bolo pred CXL a tretí rok to bolo 58% očí, u ktorých bola zaznamenané štatisticky významné zlepšenie NKZO aspoň o jeden riadok Snellenových optotypov a 29% očí zostalo na predoperačnej hodnote NKZO (graf 10).

Vzhľadom na veľkosť vyhodnotenej kohorty po prvom a druhom roku, kde je počet očí najväčší a štatistická výpovedná hodnota tejto časti súboru má vysokú validitu, je zaujímavé vyhodnotiť tieto skupiny zvlášť ako také, kde možno jednoznačne vizualizovať markantné zlepšenie NKZO u viac ako 50% očí (grafy 11, 12).



Graf 11: Percentuálne vyjadrenie zlepšenia a stability NKZO po CXL v kohorte po 1 roku

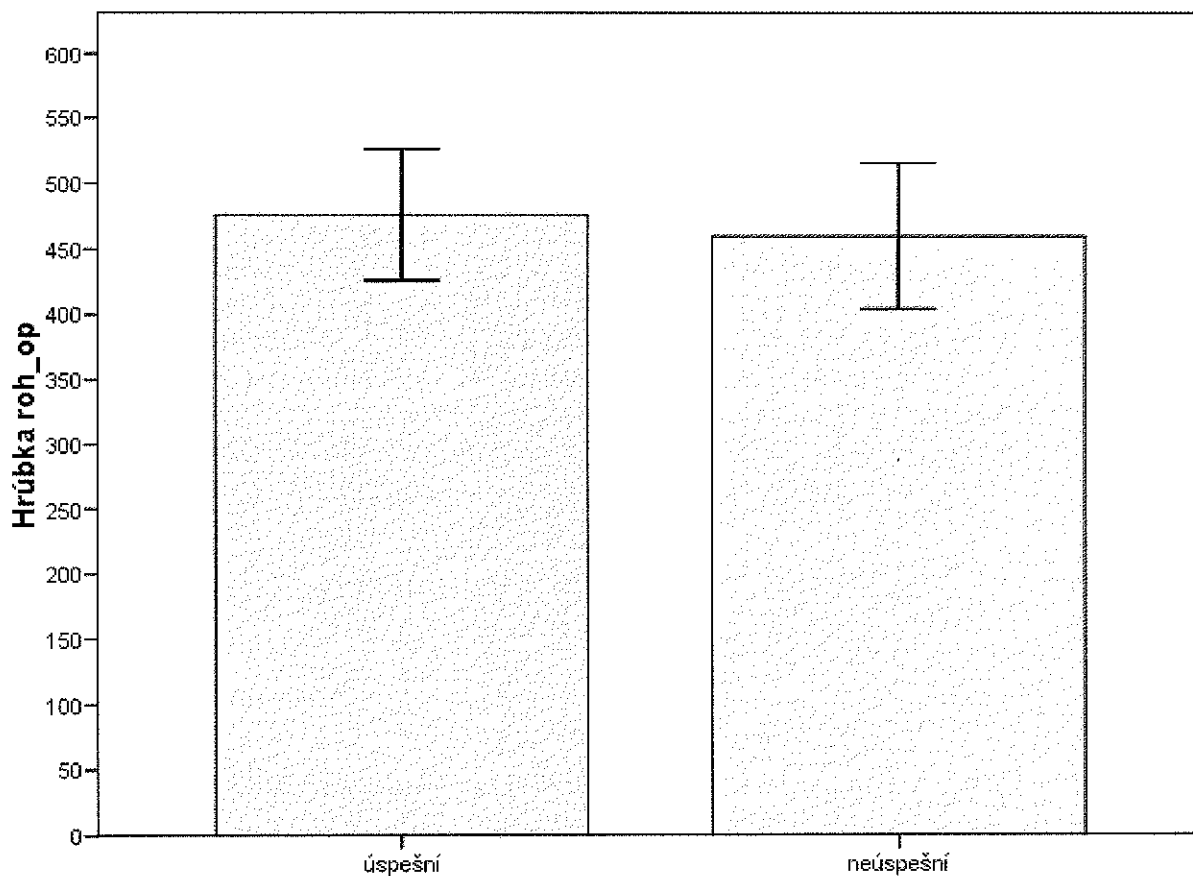


Graf 12: Percentuálne vyjadrenie zlepšenia a stability NKZO po CXL v kohorte po 2 rokoch

## **5.1 Pacienti bez efektu po CXL**

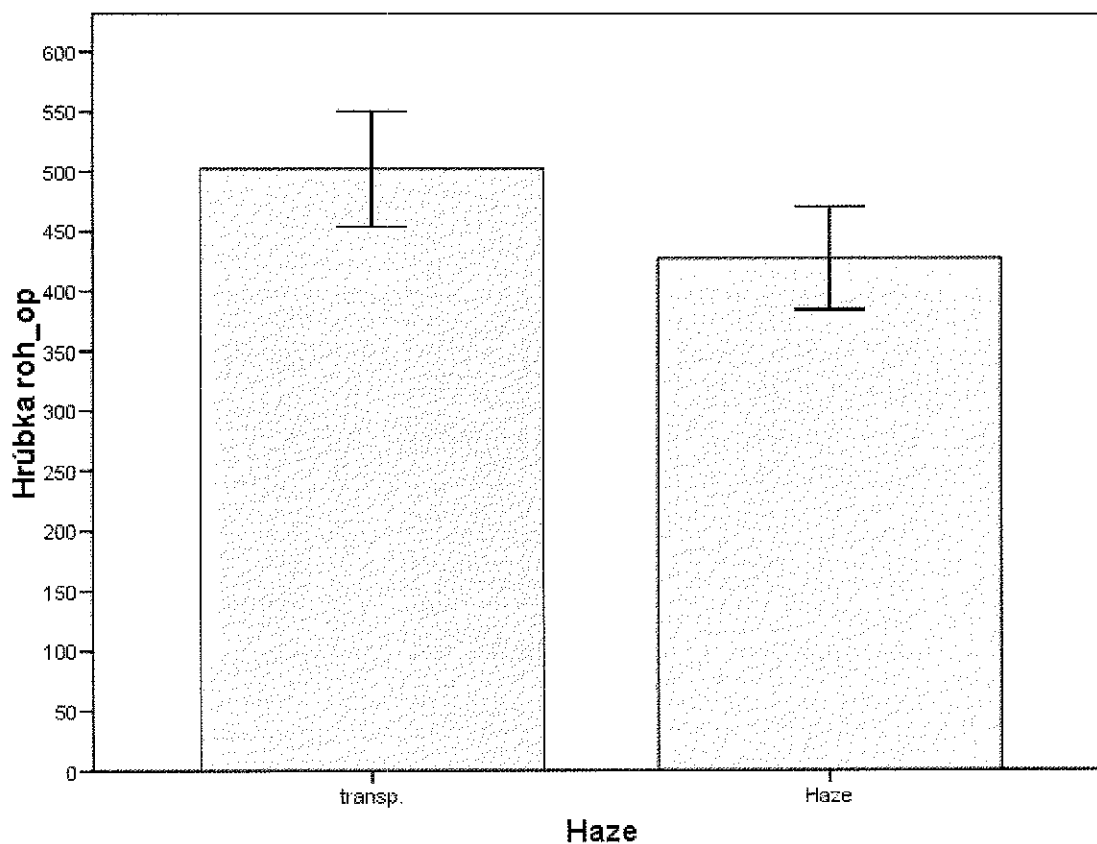
Z horeuvedených výsledkov a ich grafického znázornenia je zrejmé, že nie všetci pacienti profitujú z aplikácie riboflavínu a UV-A žiarenia na rohovku pri progredujúcom keratokóne. Do tejto skupiny „neúspešných pacientov“ boli zaradení pacienti u ktorých došlo ku zvýšeniu keratometrických hodnôt, výskytu stromálnych opacít rohovky alebo ku zhoršeniu NKZO po CXL. V snahe nájsť určitú závislosť, konkrétnu premennú, ktorá by priamo rozhodovala, resp. dávala bližšiu informáciu o prediktabilite úspešnosti alebo neúspešnosti liečby, sa dali do komparácie jednotlivé, už horeuvedené premenné a skúmal sa ich výskyt v skupine „neúspešných pacientov“.

Pre homogenitu a štatistickú validitu výsledkov bola vykonaná táto komparácia na časti súboru s najväčším počtom očí - po jednom roku. V tomto časovom intervale po CXL bola preukázaná stabilita nálezu, či už pozitívneho alebo negatívneho, u všetkých očí súboru. Celkový počet očí tejto skupiny bol 142, z čoho bolo bez pozitívneho efektu na liečbu 27 očí, t.j. 19%. Premenné: K-hodnoty v 3mm zóne, K-hodnoty na apexe keratokónu, astigmatizmus, vek pacienta a hrúbka rohovky sa sledovali a porovnávala sa signifikantnosť ich výskytu v skupine s pozitívnym a negatívnym efektom liečby. Žiadna z týchto premenných pri štatistickom vyhodnotení nepreukázala signifikantnosť vplyvu na pozitívny, resp. negatívny efekt liečby ( $P=0,55$ ). Jediná premenná, a to hrúbka rohovky, hoci takisto ako ostatné premenné bez štatistickej signifikantnosti, pri hodnote  $P=0,139$ , mala tendenciu negatívne ovplyvniť efekt cross-linkingu (graf 13), a vzhľadom k tomu, že pri osobnom spracovávaní údajov ku jednotlivým pacientom súboru, bol nápadný výlučný výskyt nízkej hrúbky rohovky ( $< 420\mu\text{m}$ ) u pacientov s negatívnym výsledkom, konkrétne stromálnymi opacitami – haze (obr. 34A,B; 35A,B), sa podrobila analýze aj táto malá podskupina očí.



Graf 13: Efekt CXL v závislosti od hrúbky rohovky. (P= 0,139)

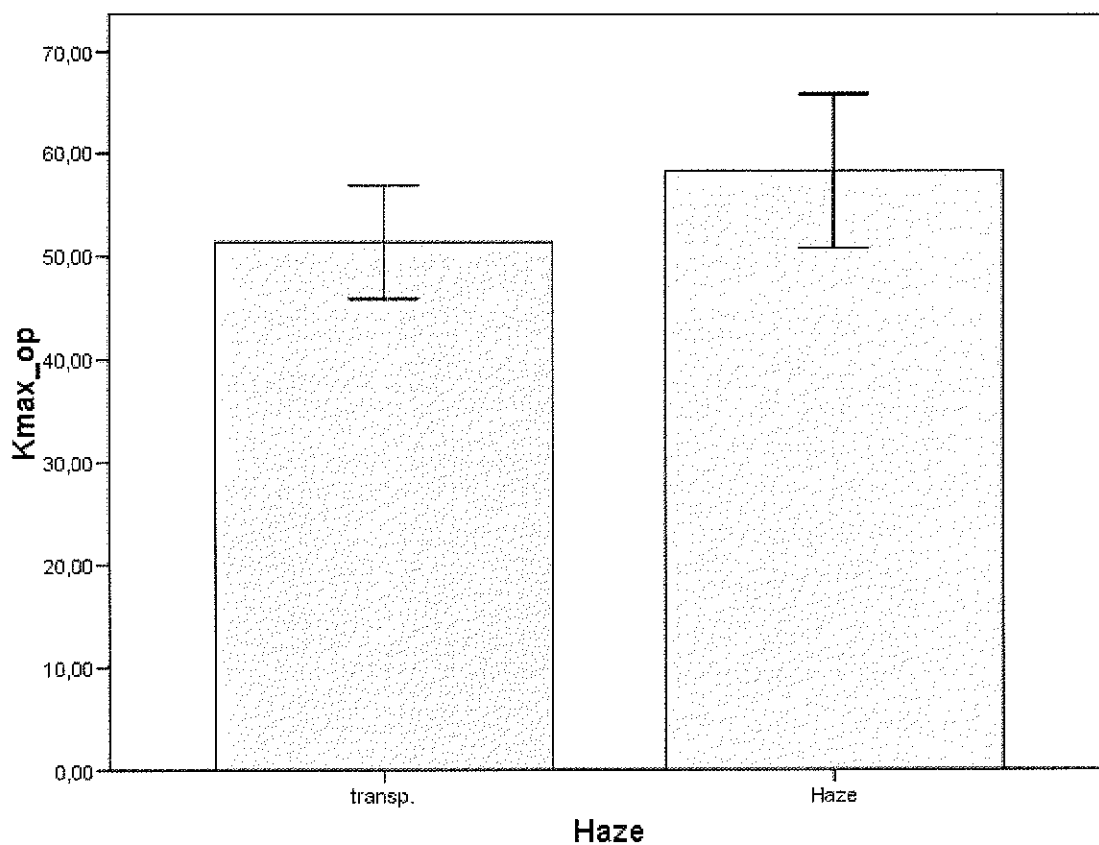
Pri analýze výsledkov a ich závislosti od jednotlivých premenných v podskupine pacientov bez pozitívneho efektu na liečbu sa ukazuje jednoznačná kauzalita výskytu stromálnych opacít rohovky po CXL. U pacientov, u ktorých došlo ku vzniku perzistujúcich opacít rohovky bola preukázaná pri vstupnom vyšetrení nižšia hrúbka rohovky, vyššie keratometrické hodnoty a vyšší astigmatizmus. Tieto parametre boli aj štatisticky významné.



Graf 14: Hrúbka rohovky a tendencia ku vzniku haze rohovky. (P= 0,001)

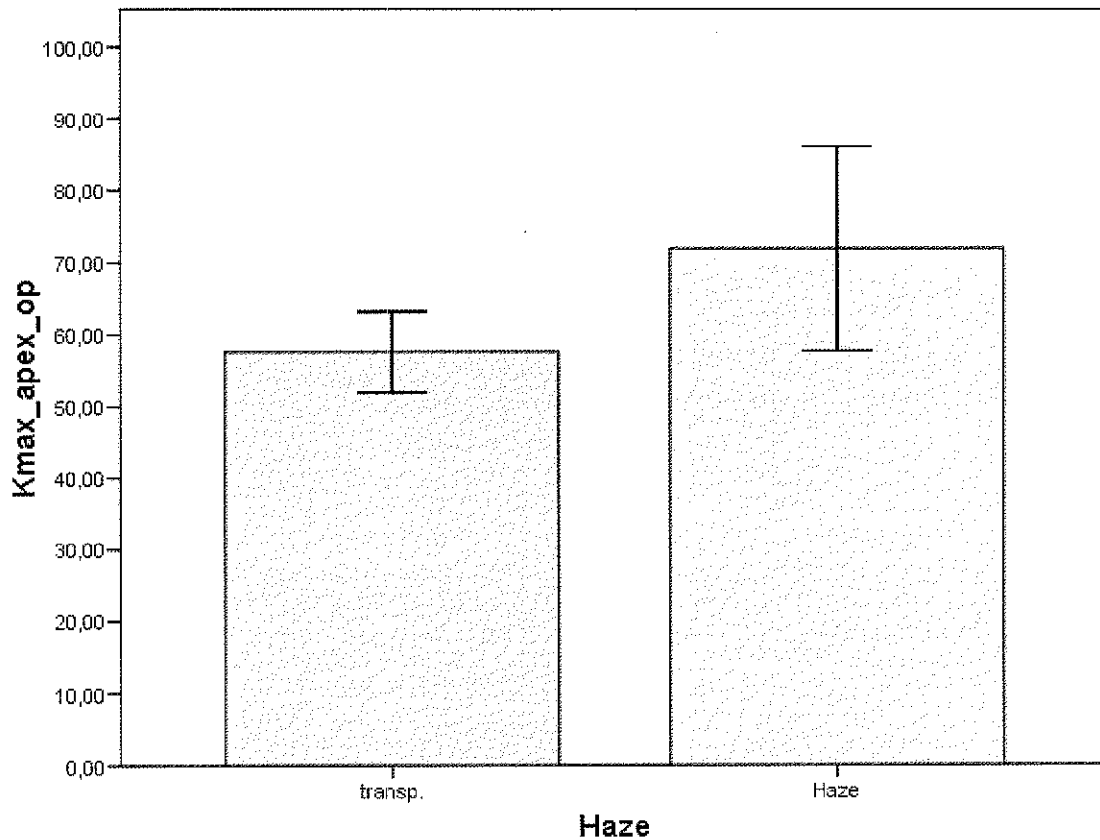
Graf 14 znázorňuje štatisticky signifikantný rozdiel v hrúbke rohovky pred aplikáciou CXL na očiach pacientov v skupine bez efektu na liečbu, kde došlo ku vzniku trvalého haze strómy rohovky. Číre rohovky mali hrúbku  $502,08 \pm 48,44 \mu\text{m}$ , rohovky s haze mali hrúbku len  $425,80 \pm 33,57 \mu\text{m}$ ,  $P= 0,001$ .





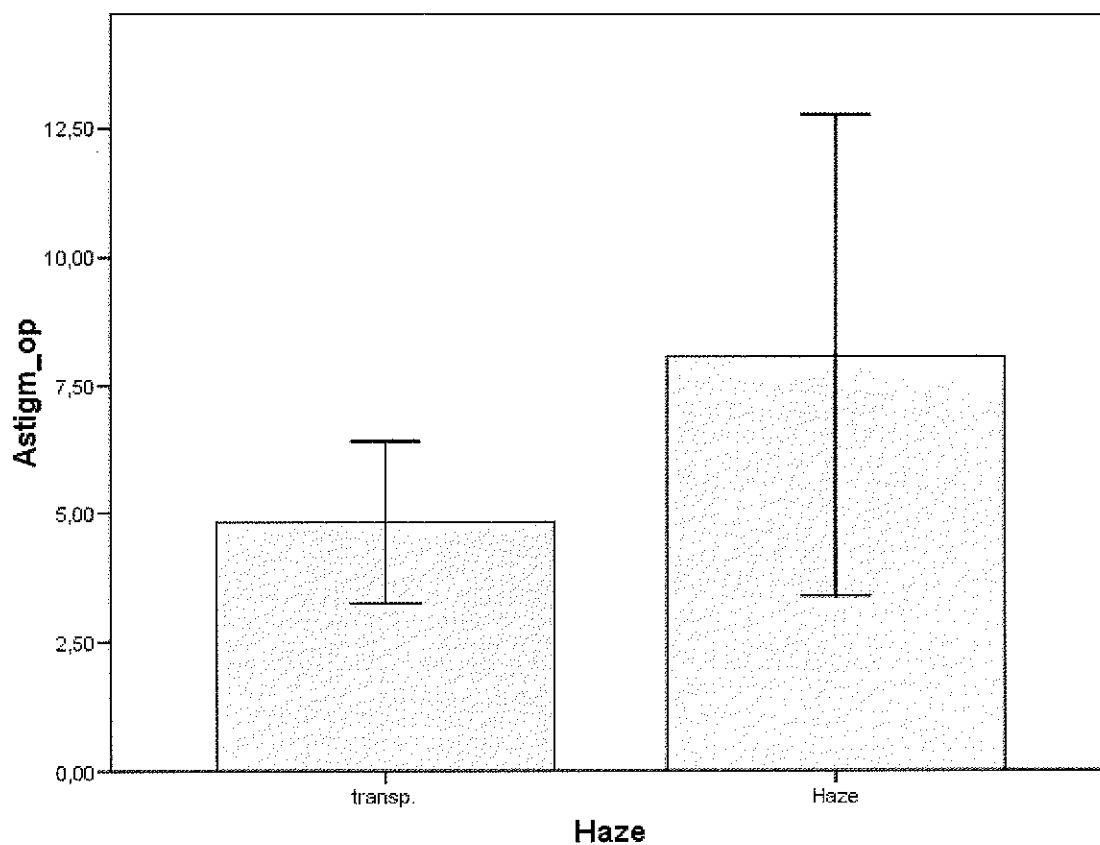
Graf 15: Maximálne keratometrické hodnoty v 3mm zóne

Graf 15 prezentuje štatisticky signifikantný rozdiel v maximálnych keratometrických hodnotách v 3 mm zóne u pacientov u ktorých došlo ku vzniku stromálnych opacifikácii po CXL. Ich keratometrické hodnoty boli  $58,74 \pm 6,99$  Dptr. narozdiel od pacientov bez opacít, ktorých keratometrické hodnoty boli  $51,37 \pm 5,46$  Dptr. Tento rozdiel bol štatisticky signifikantný,  $P=0,004$ .



Graf 16: Keratometrické hodnoty na apexe keratokónu

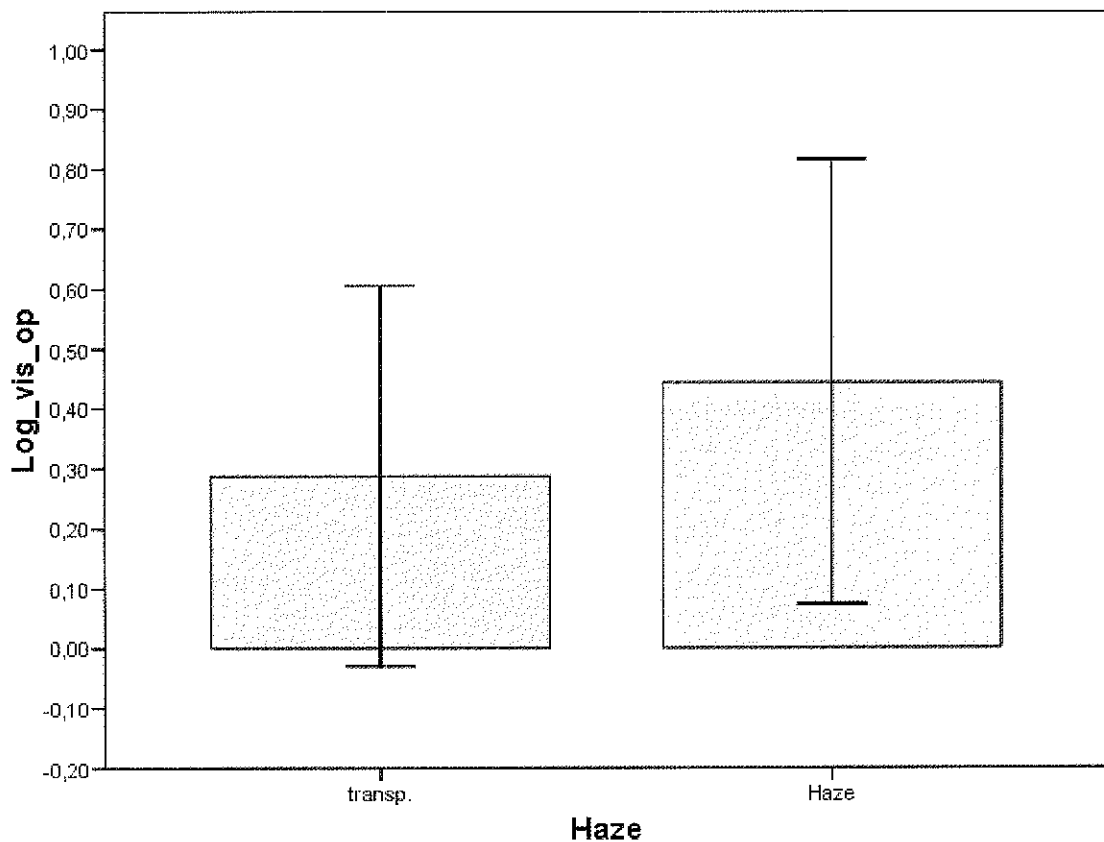
Keratometrické hodnoty na vrchole keratokónu sú v podskupine rohoviek s haze signifikantne vyššie, ako sú tieto hodnoty u čírych rohoviek tejto skupiny. Číre rohovky majú priemernú hodnotu  $57,60 \pm 5,59$  Dptr., opákne rohovky majú hodnoty  $71,36 \pm 12,87$  Dptr. ( $P=0,001$ )- graf 16.



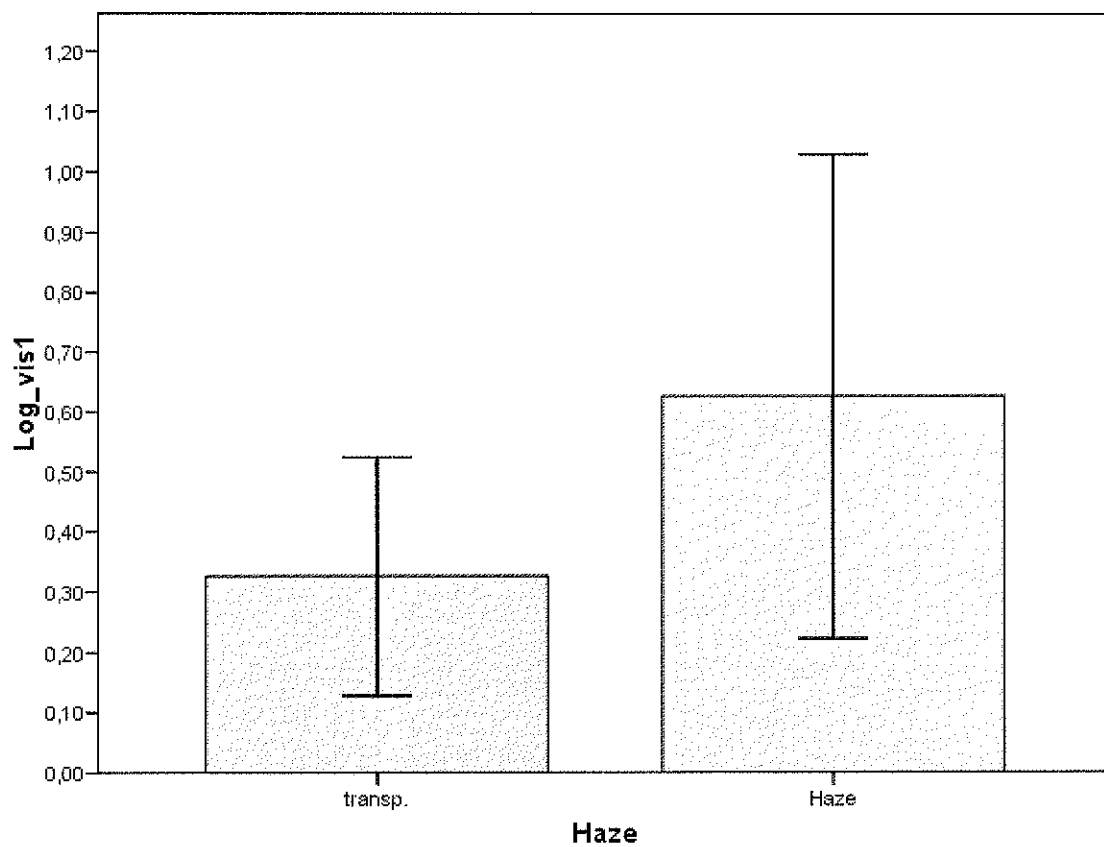
Graf 17: Astigmatizmus pred CXL je u pacientov s haze vyšší

U pacientov s haze je astigmatizmus pred CXL signifikantne vyšší ako u pacientov s čírou rohovkou ( $P=0,016$ ). Hodnota astigmatizmu u pacientov s haze bola  $7,76 \pm 3,98$  Dptr., u pacientov s čírou rohovkou bola táto hodnota pred CXL  $4,82 \pm 1,58$  Dptr. – graf 17.

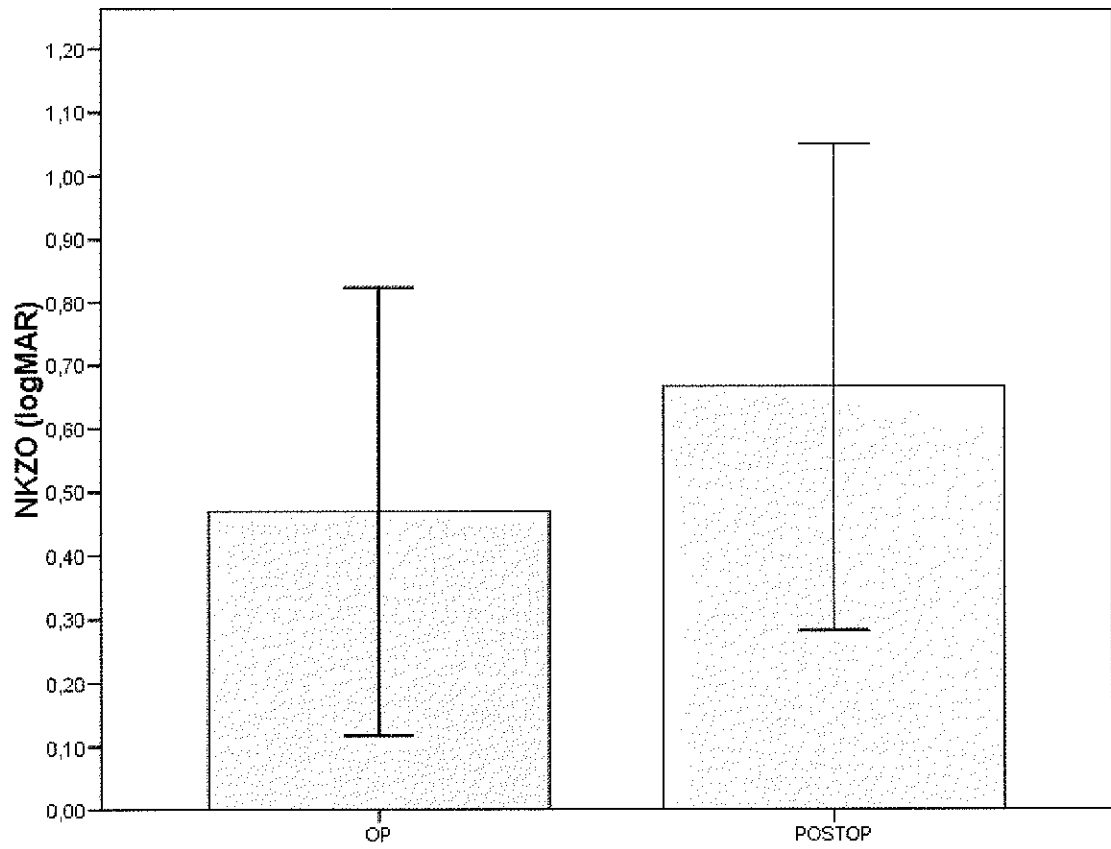
Pri sledovaní zrakovej ostrosti pacientov pred CXL, nebol zistený v skupine „neúspešných“ pacientov signifikantný rozdiel medzi pacientmi s transparentnou rohovkou a rohovkou so stromálnymi opacitami (graf 18). Priemerná úroveň NKZO v podskupine s transparentnou rohovkou bola (v logMAR)  $0,29 \pm 0,32$ , v podskupine s haze  $0,44 \pm 0,33$  ( $P=0,21$ ). Tento pomer sa mení po absolvovaní liečby, kde je rozdiel medzi týmito dvomi podskupinami signifikantný v neprospech pacientov s haze (graf 19). Vízus podskupiny s transparentnou rohovkou je  $0,33 \pm 0,19$ , pacienti s haze majú vízus  $0,66 \pm 0,38$  ( $P=0,012$ ). Logicky je signifikantný aj rozdiel – pokles zrakovej ostrosti v samotnej haze-podskupine po CXL v porovnaní s hodnotami pred liečbou ( $P=0,016$ ), graf 20.



Graf 18: NKZO skupiny „neúspešných“ pacientov pred CXL



Graf 19: NKZO skupiny „neúspěšných“ pacientov 1 rok po CXL

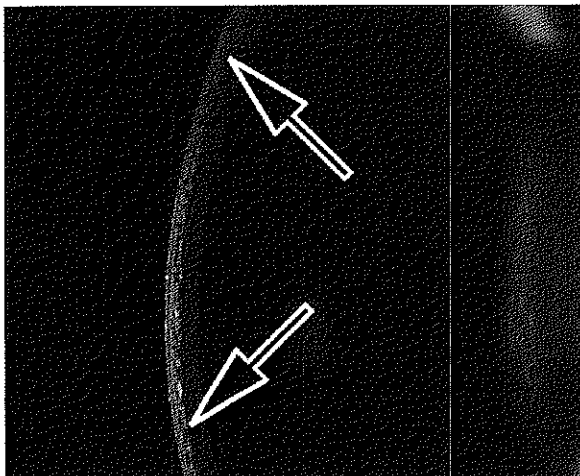


Graf 20: NKZO podskupiny pacientov s haze pred a 1 rok po CXL

## 6 Komplikácie po CXL

### 6.1 Haze strómy rohovky

Klinicky je možné efektivitu liečby ektázie rohovky metódou cross-linkingu sledovať nepriamo na základe topografie rohovky alebo konfokálnou mikroskopiou. Seiler a spol. detekovali tzv. demarkačnú líniu – tranzitórnu zónu medzi prednými vrstvami strómy rohovky, kde došlo ku cross-linkingu kolagénu a zadnými vrstvami strómy rohovky, kde ku cross-linkingu nedošlo. Túto demarkačnú líniu – opáknú časť predných vrstiev strómy rohovky je možné biomikroskopicky sledovať približne od druhého týždňa po terapii v hĺbke asi 60% strómy rohovky (obr. 33). Demarkačná línia je prvým priamym klinickým znakom, ktorým je možné sledovať efekt a hĺbku pôsobenia UV-žiarenia na strómu rohovky.<sup>68</sup>

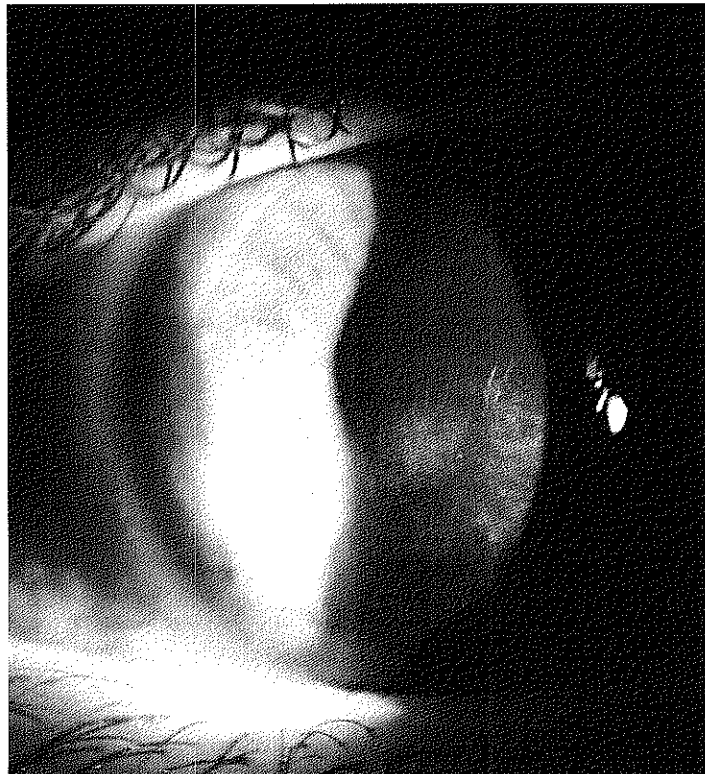


Obr. 33: Demarkačná línia 3 týždne po cross-linkingu (Seiler T. Cornea 2006)

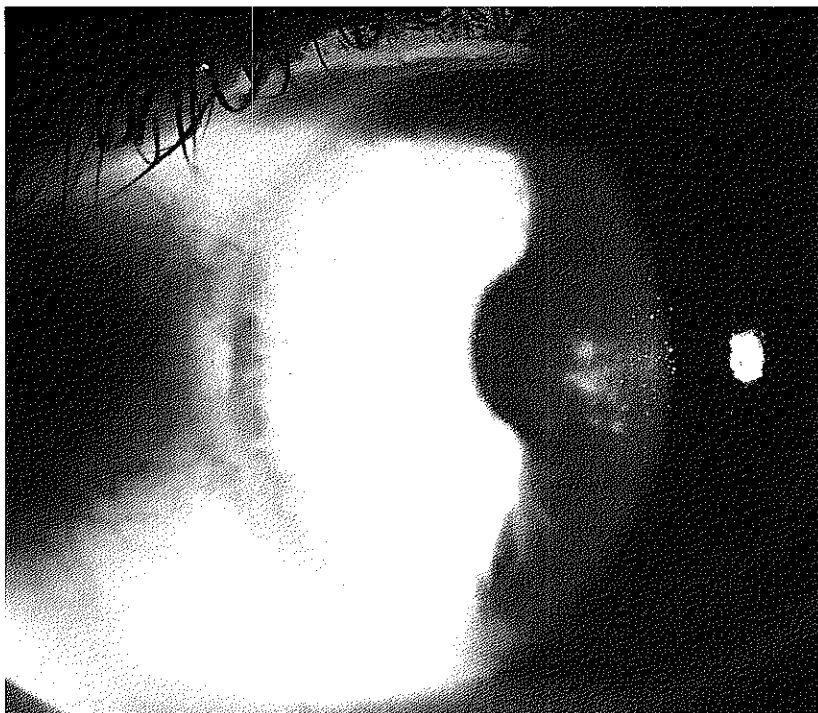
Stabilizácia nálezu na rohovke po cross-linkingu trvá približne 6-8 mesiacov. V tomto období, predovšetkým 2-3 mesiace bezprostredne po výkone môžeme sledovať na topografickom obraze dokonca zvýšenie keratometrických hodnôt, ktoré sa neskôr stabilizujú k pôvodným hodnotám, resp. sa až redukujú. Zníženie vízu môže byť spôsobené aj stromálnou opacifikáciou rohovky, ktorá je niekoľko týždňov po výkone najvýraznejšia a do pol roka ustupuje, u časti pacientov táto opacifikácia - „haze“ nachádzajúci sa v predných častiach strómy zostáva natrvalo a je dôvodom trvalého zníženia korigovaného vízu oproti stavu pred procedúrou (obr. 34A,B; 35A,B). Táto komplikácia bola graficky znázornená a štatisticky analyzovaná v predchádzajúcej kapitole v rámci popisu výsledkov sledovaného súboru.



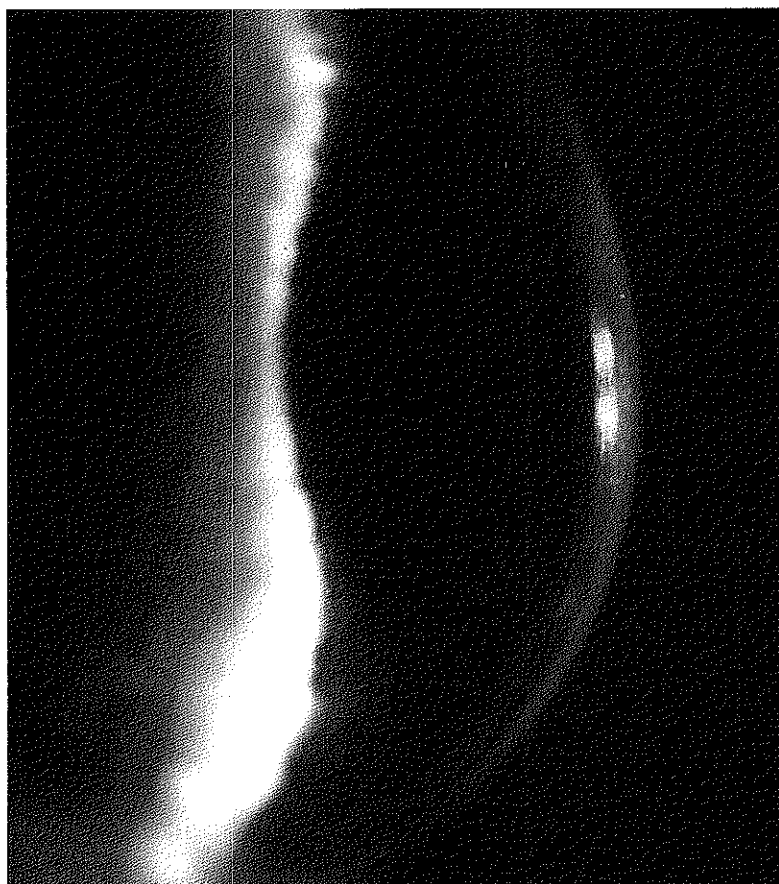
Obr. 34A,B: Haze strómy rohovky po CXL





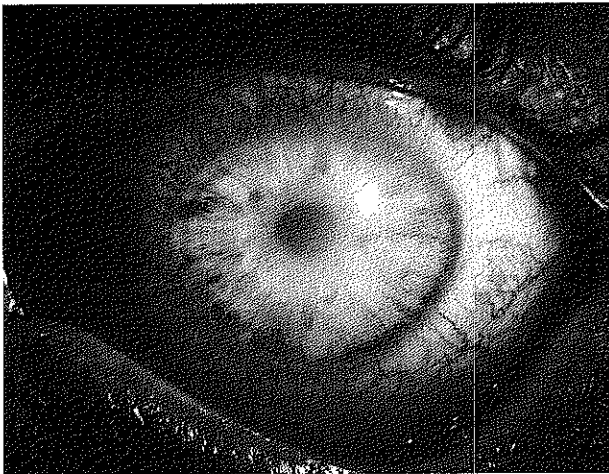


Obr. 35A,B: Haze v hlbokých vrstvách strómy rohovky po CXL

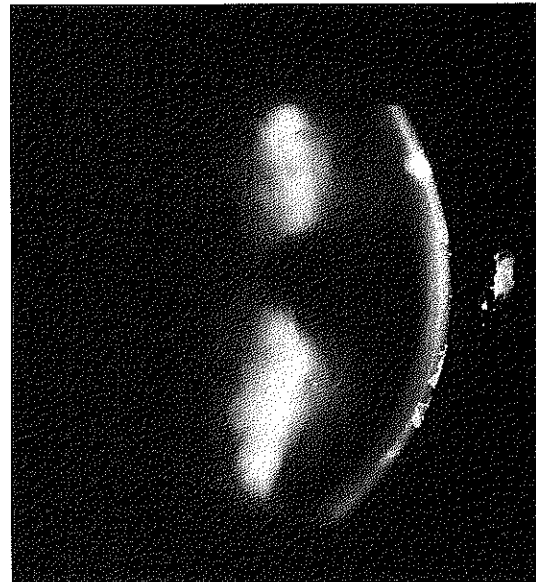


## **6.2 Prolongovaná epitelizácia rohovky, infekcia rohovky po CXL – kazuistika**

V novembri roku 2006 bol vykonaný nekomplikovaný cross-linking rohovky ľavého oka s progredujúcim keratokónom u 26-ročného pacienta – atopika, s neurodermatitídou. Na 6-ty deň po procedúre pretrvával defekt epitelu rohovky takmer v celom rozsahu (obr. 36), ktorý sa infikoval (obr. 37). Pacient bol liečený intenzívnou lokálnou aplikáciou širokospektrálnych antibiotík, výsledok mikrobiologického vyšetrenia bol negatívny. V priebehu 2 týždňov došlo ku rezorpcii infiltrátu rohovky, avšak ešte stále pretrvával epiteliálny defekt v centre rohovky (obr. 38), čo bolo indikáciou k našitiu amniovej membrány na podporu epitelizácie. Po 6-tich týždňoch od tohoto výkonu došlo ku epitelizácii rohovky (obr. 39). Deväť mesiacov po CXL je predný segment oka pacienta kludný, rohovka je kompletne epitelializovaná, predné vrstvy strómy sú opákne (obr. 40), pacient má NKZO 0,6 a topograficky vykazuje keratokónus stabilitu (obr. 41, 42).



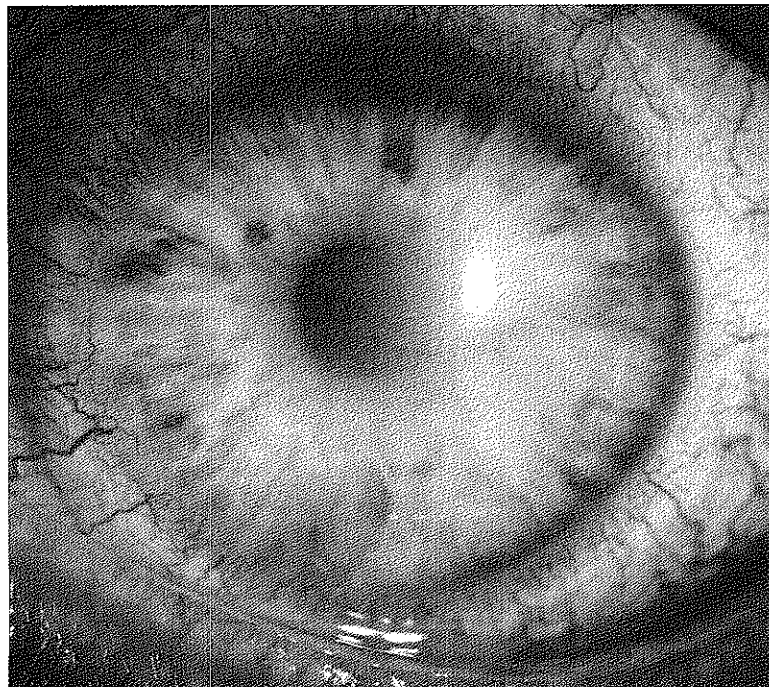
Obr. 36: Perzistujúci defekt epitelu rohovky po CXL



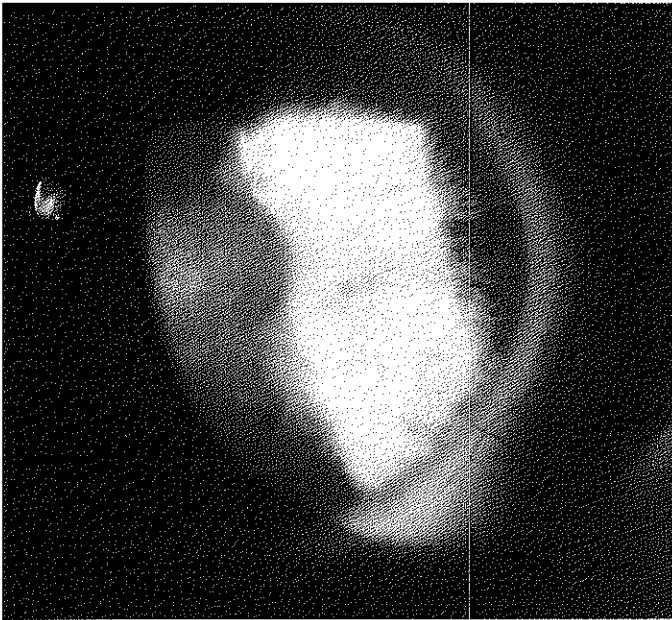
Obr. 37: Infekcia rohovky po CXL



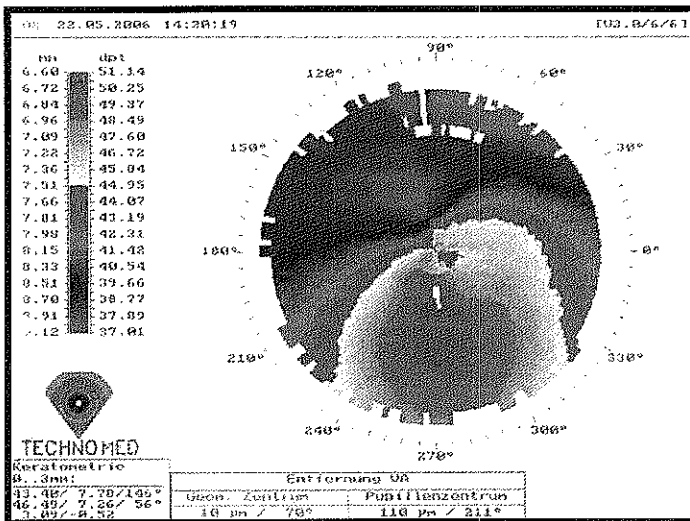
Obr. 38: Perzistujúci defekt epitelu rohovky 3 týždne po CXL



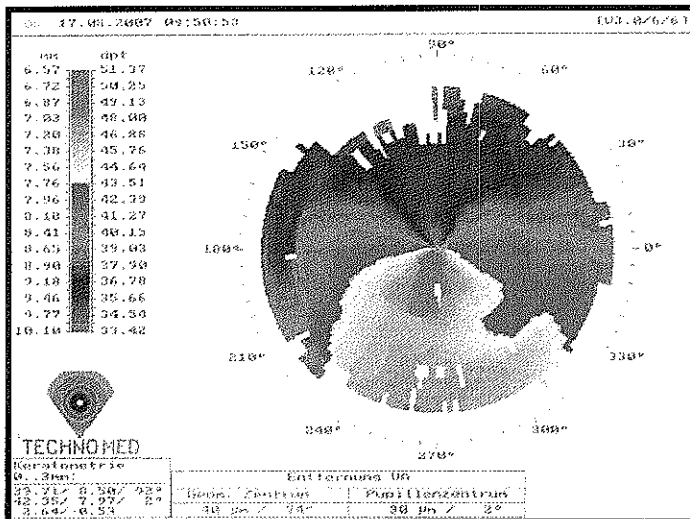
Obr. 39: Epitelizácia rohovky 6 týždňov po AMT



Obr. 40: Haze strómy rohovky 9 mesiacov po CXL



Obr. 41: Topografia rohovky pacienta pred CXL

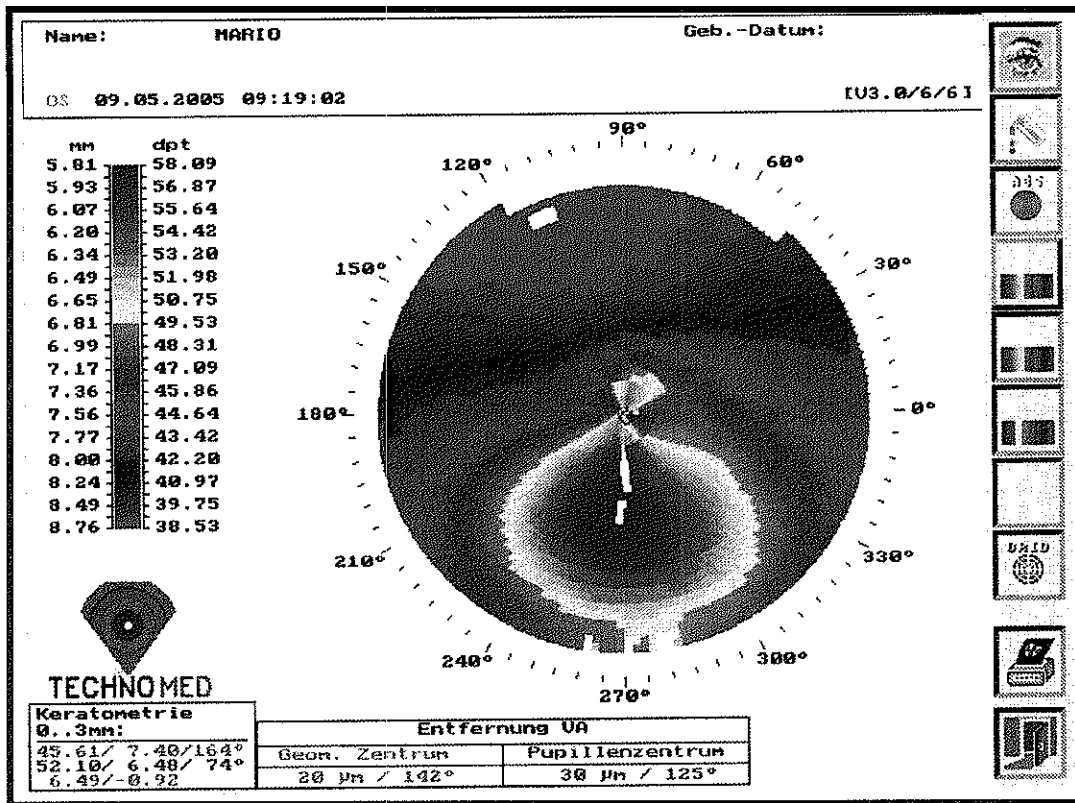


Obr. 42: Topografia rohovky pacienta 9 mesiacov po CXL

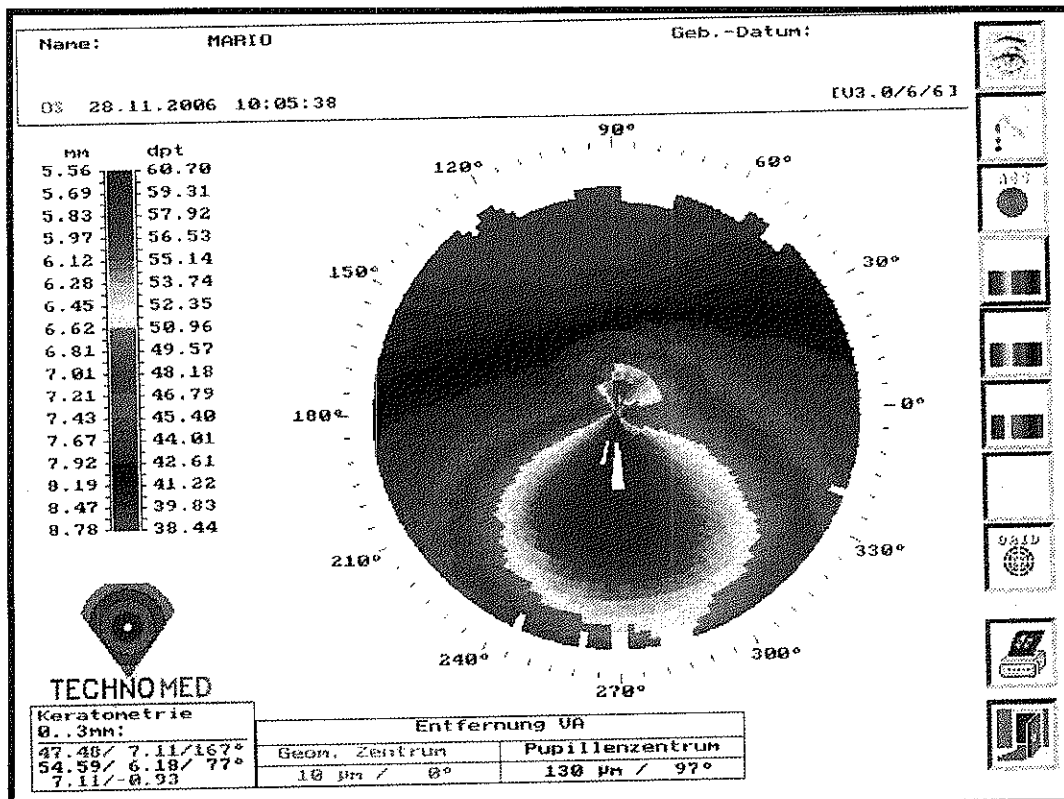
## 7 Kazuistiky

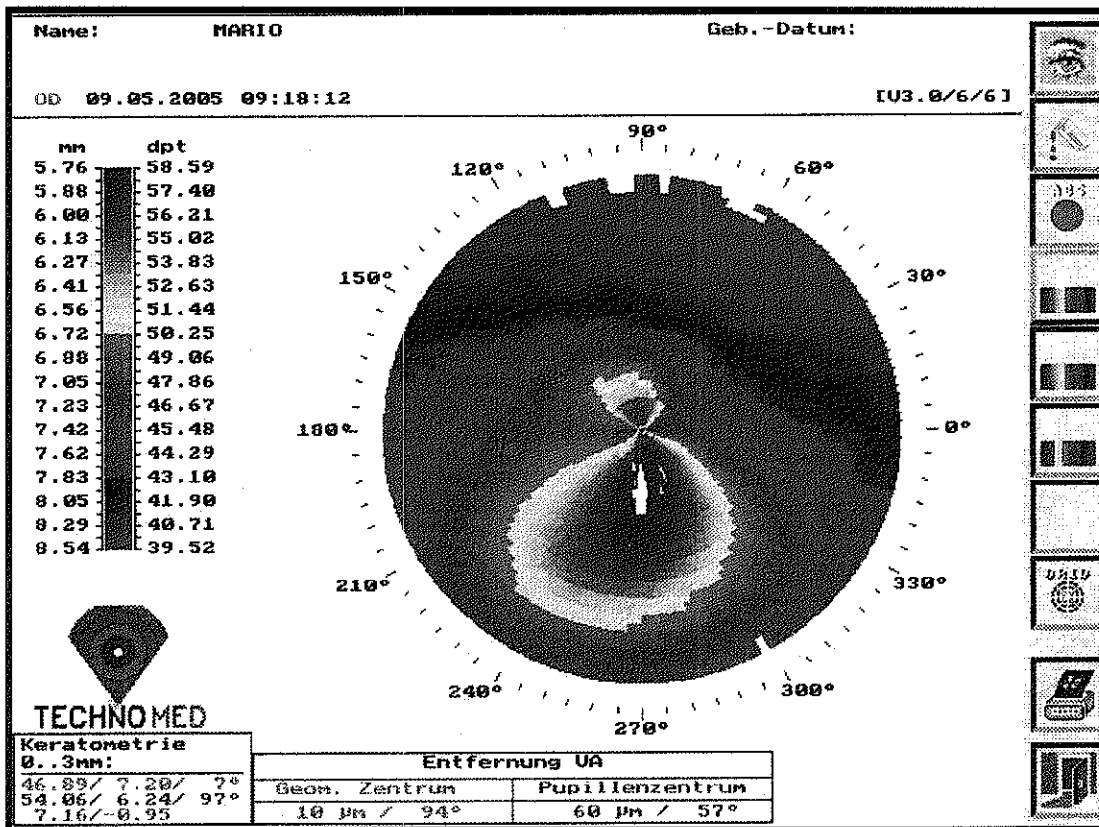
### 7.1 Kazuistika 1

V máji 2005 bol odoslaný do špecializovanej keratokónus - ambulancie očnej kliniky univerzitnej nemocnice v Drážďanoch 30-ročný muž z anamnézou zhoršeného videnia obojstranne pri známej diagnóze keratokónu v poslednom období. Z jeho zdravotnej dokumentácie bol zrejmý pokles NKZO vpravo z 1,0 na 0,5 a vľavo z 1,0 na 0,8 za posledné dva roky. Z jeho zdravotnej dokumentácie bola zrejmé zvýšenia astigmatizmu obojstranne, čo nasvedčovalo progresii keratokónu obojstranne. Vzhľadom na anmnézu, klinický a topografický nález bol indikovaný cross-linking, najprv vpravo a konzekutívne vľavo. Po procedúre na pravom oku bol sledovaný pacient rajónnym oftalmológom a napriek plánovanej kontrole na našom pracovisku sa ku ďalším kontrolám nedostavil, a až o 18 mesiacov po prvom výkone sa dostavil na vyšetrenie kvôli zhošenému videniu na ľavom, neošetrenom oku, ktoré bolo aj objektívne potvrdené, s poklesom NKZO na 0,5 a topografickým zvýšením keratometrických hodnôt (obr. 43), pričom keratometrické hodnoty pravého oka po cross-linkingu boli stabilné (obr. 44). U pacienta bol vykonaný pri náleze na ľavom oku cross-linking.

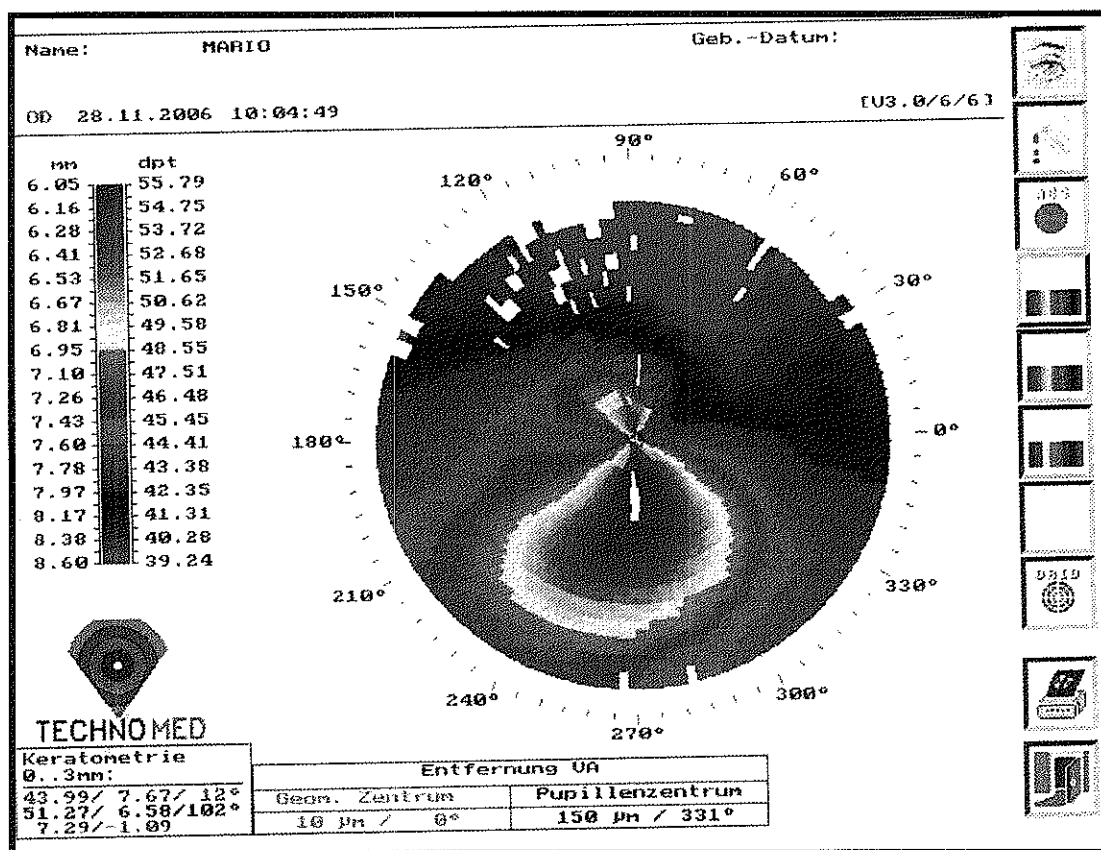


Obr. 43 A,B: Progresia keratokónu na ľavom oku v priebehu 18-tich mesiacov bez ošetrovania CXL





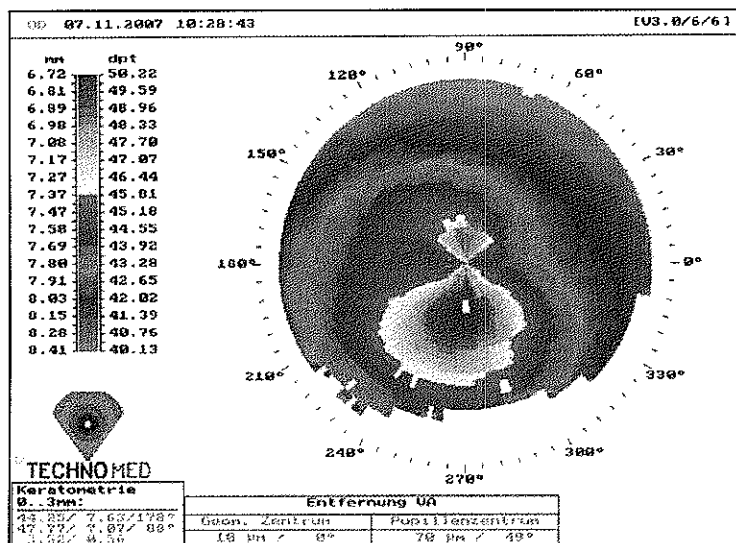
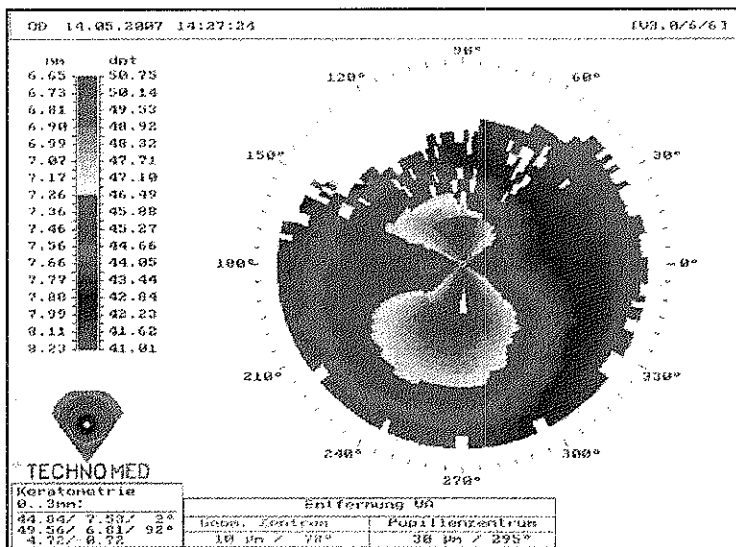
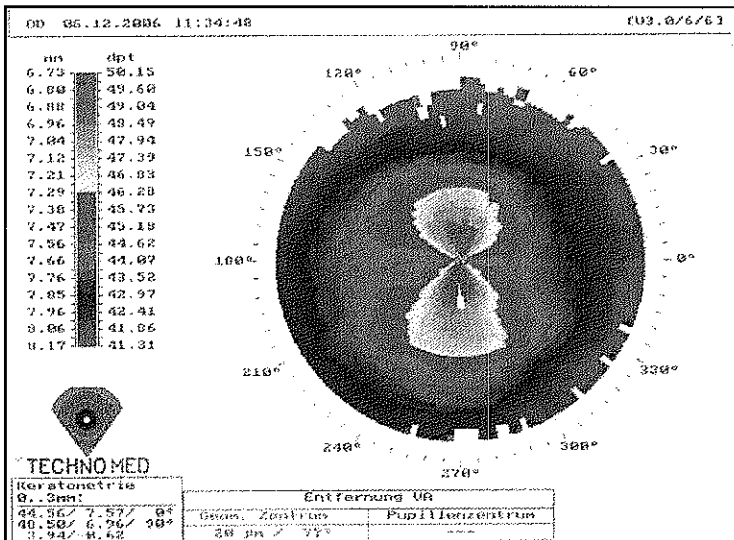
Obr. 44 A,B: Topografia rohovky pravého oka pacienta pred a 18 mesiacov po CXL-stabilizácia nálezu



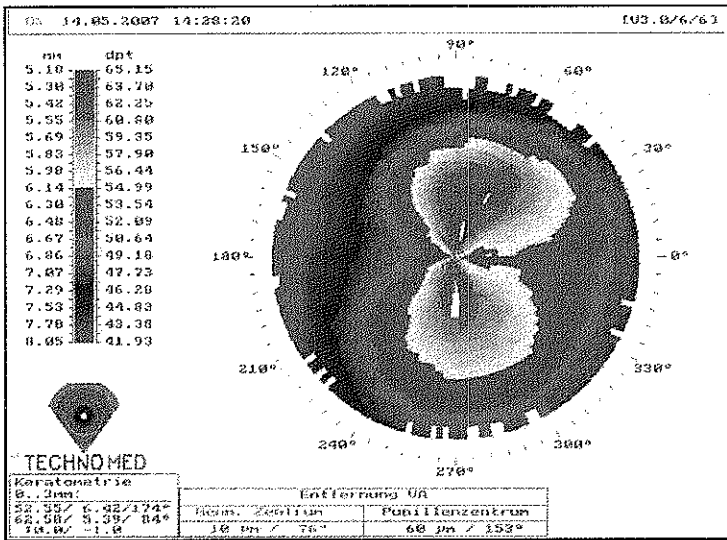
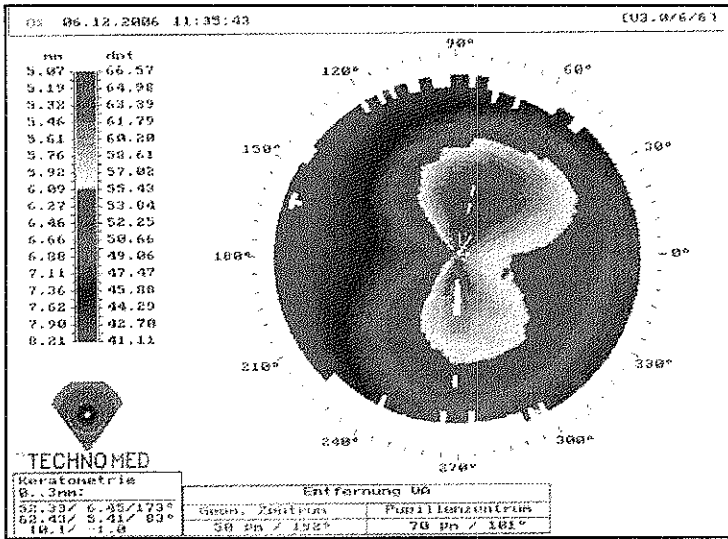
## 7.2 Kazuistika 2

12-ročný chlapec bol doporučený na ošetrovanie metódou cross-linking vzhľadom na rýchlo progredujúci keratokónus obojstranne. Pri vstupnom vyšetrení bol jeho naturálny vízus vpravo 0,5; vľavo 0,05. Topografický nález ukazoval pokročilý keratokónus obojstranne, vľavo viac ako vpravo, preto bola procedúra najprv indikovaná na horšom ľavom oku. Pri kontrole o 5 mesiacov neskôr (pacient dochádzal zo zahraničia) bola konštatovaná stabilizácia nálezu na ľavom oku (regresia K-hodnôt, stabilný astigmatizmus, stabilný vízus) a progresia nálezu na pravom oku (kvalitatívna zmeny topografického záznamu, zvýšený astigmatizmus, znížený naturálny vízus 0,25), pri tejto kontrole bol vykonaný aj cross-linking pravého oka. O ďalších 6 mesiacov bol nález na pravom oku stabilný (stabilizácia K-hodnôt, zlepšenie vízu 0,6) a nález ľavého oka pretrvával stabilný, vízus s novou kontaktnou šošovkou bol 1,0. Dokumentáciu topografických náleзов dokumentujú obrázky obr. 45 a 46.

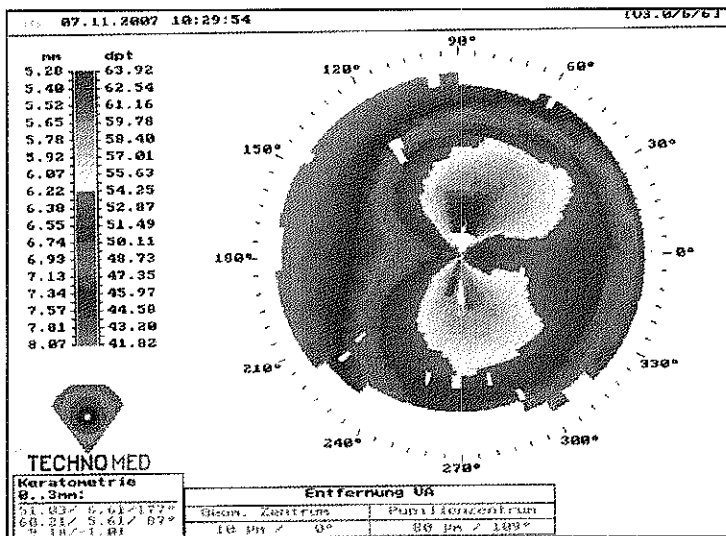




Obr. 45: Právě oko: A. Nález pri prvom vyšetrení, B. Progresia nálezu po 5-tich mesiacoch, C. 6 mesiacov po CXL- stabilizácia nálezu

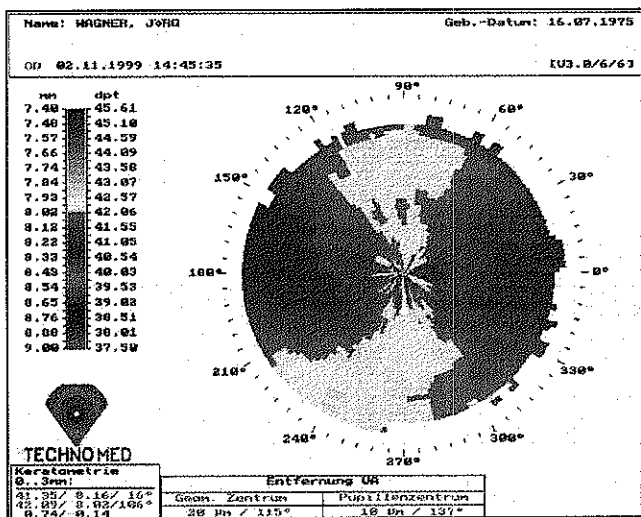


Obr. 46: Ľavé oko: A. Nález pri prvom vyšetrení, B. 5 mesiacov po CXL- stabilizácia nálezu, C. 11 mesiacov po CXL- stabilný nález

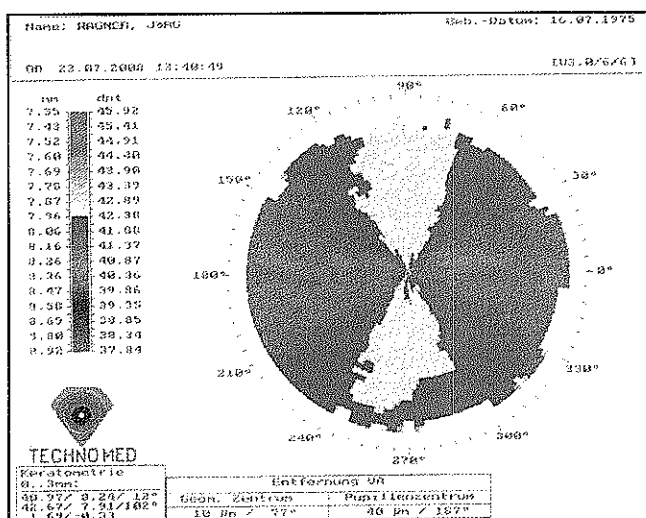


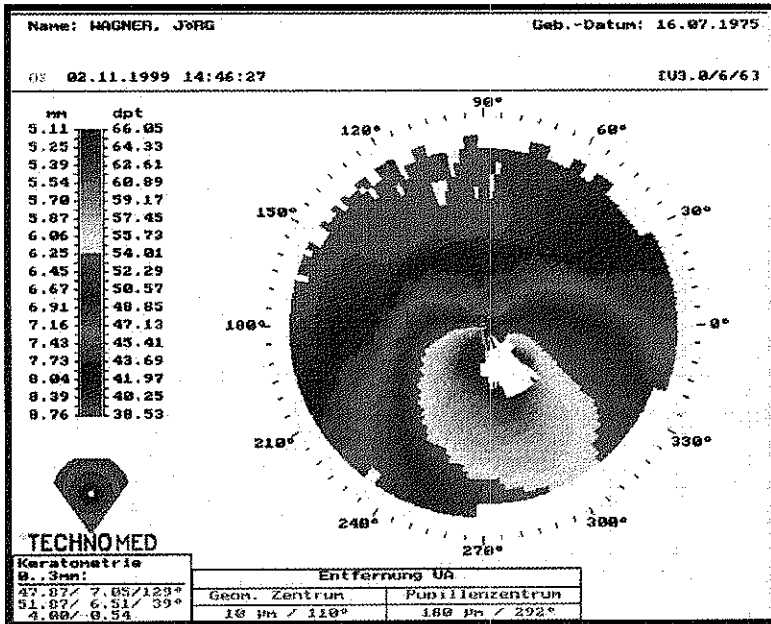
### 7.3 Kazuistika 3

V novembri 1999 bol do špecializovanej keratónus - ambulancie očnej kliniky v Drážďanoch odoslaný 24-ročný muž s jednostranným progredujúcim keratokónom na ľavom oku, pravé oko nepreukazovalo žiadne topografické ani klinické sekundárne známky keratokónu (obr. 47). NKZO na pravom oku bola 1,0; na ľavom, postihnutom oku 0,3. Vzhľadom na anamnézu zhoršujúceho sa videnia na ľavom oku v poslednom roku bolo toto oku už pri tomto vyšetrení indikované na cross-linking. Pri kontrole po 8-mich rokoch pretrváva na pravom oku normálny nález na rohovke, bez akýchkoľvek známk keratokónu, na ľavom oku je stav stabilizovaný, keratometrické hodnoty regredovali, vizus sa zlepšil na 0,6 (obr. 48).

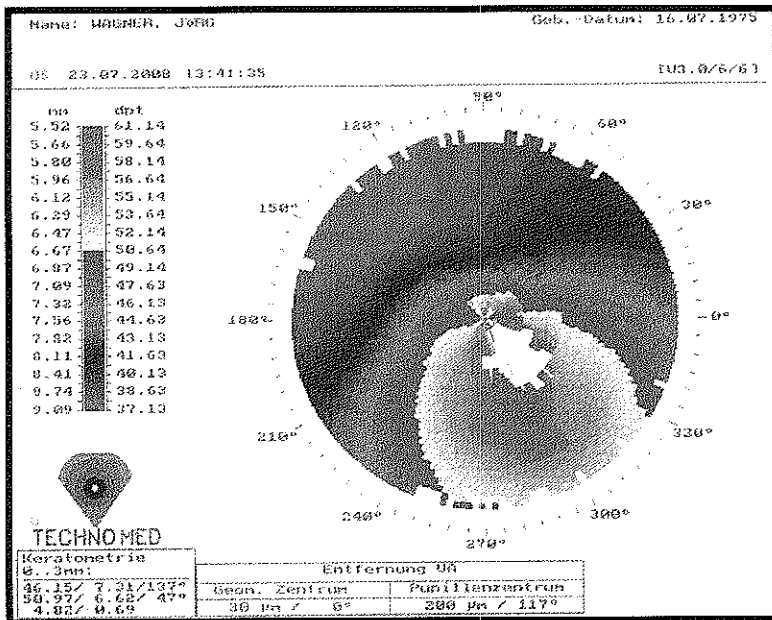


Obr. 47: Pravé oko: A. Nález pri prvom vyšetrení, B. Po 8-mich rokoch – bez progresie





Obr. 48: Ľavé oko: A. Nález pred CXL B. 8 rokov po CXL – stabilný nález



## 8 Odpovede na ciele práce

V doteraz publikovanej literatúre týkajúcej sa CXL terapie a jej účinkov na humánne rohovkové tkanivo sa analyzovali súbory s maximálnym počtom 23 očí v krátkej pozorovacej dobe<sup>12,89</sup>, ktoré napriek pozitívnym výsledkom, bez zaznamenania nepriaznivých vedľajších účinkov, majú limitovanú štatistickú výpovednú hodnotu.

Naša práca podáva výsledky doteraz najväčšieho súboru vôbec, s najdlhšou pozorovacou dobou popísanou doposiaľ zaoberajúca sa touto metódou liečby keratokónu, čo zvyšuje štatistickú validitu výsledkov a je pozitívom pri hodnotení efektivity tejto liečby a jej nežiadúcich účinkov.<sup>60</sup>

Táto štúdia jednoznačne potvrdila efekt CXL terapie a jej dlhodobý účinok. Na topografickom zázname bolo možné detekovať štatisticky významnú regresiu  $K_{max}$  hodnôt v 3 mm zóne, došlo ku poklesu  $K$  hodnôt na apexe keratokónu a významne sa redukoval aj astigmatizmus.

Čo sa týka vízu pacientov, štúdia preukázala u vyše 70% pacientov stabilitu zrakovej ostrosti po tejto procedúre, z čoho u vyše 50% došlo dokonca ku jej zlepšeniu aspoň o jeden riadok.

Štúdia nám umožnila dokumentovať komplikácie, ktoré sa môžu vyskytnúť pri tomto druhu terapie keratokónu, ako napríklad nehojaci sa defekt epitelu rohovky, infekcia rohovky a ich liečbu, a tiež nežiadúce účinky liečby, ako výskyt dlhodobo pretrvávajúceho haze strómy rohovky, výskyt ktorého v súvislosti s predoperačným nálezom a jeho následky v pooperačnom období sú rozoberané a interpretované v ďalšej kapitole.

## 9 Diskusia

Keratokónus je multifaktoriálne, chronické, nezápalové ochorenie, ktorého presná etiológia nebola dodnes jednoznačne objasnená. Toto ochorenie postihuje centrálnu časť rohovky, ktorá sa postupne stenčuje, čo vedie k jej ektatickým zmenám. Histopatologické štúdie predpokladajú primárne zmeny na úrovni ektodermálnych vrstiev rohovky, ktoré až sekundárne vedú ku zmenám na úrovni mezodermý-strómy rohovky.<sup>78</sup> Iné štúdie potvrdzujú podobnosť histologického nálezu keratokónu s nálezom pri atopii, ktorá často koinciduje s nálezom keratokónusu, a tiež postihuje tkanivo ektodermálneho pôvodu.<sup>63</sup> Esenciálnymi boli pozorovania Sawaguchiho, ktorý potvrdil zvýšené hladiny lyzozomálnych enzýmov v bazálnej vrstve epitelu keratokónickej rohovky v porovnaní s normálnymi rohovkami, a tiež sledoval znížené hladiny inhibítora  $\alpha_1$ proteinázy v epitele rohoviek s keratokónom, čo by teoreticky mohlo viesť ku degradácii pod epitelom nachádzajúceho sa tkaniva strómy rohovky a následne ku patologickým zmenám typickým pre keratokónus.<sup>65,66</sup> Tieto zmeny na úrovni molekulárnej, biochemickej a histologickej sú následne bázou pre vznik zmien na úrovni biomechanickej, čo možno potvrdiť zvýšenou rozťažiteľnosťou keratokónických rohoviek, ktorá je dôležitým parametrom v patogenéze tohoto degeneratívneho ochorenia.<sup>16</sup> Rohovka s keratokónom má vyššiu elasticitu a jej rigidita je nižšia v porovnaní s normálnymi rohovkami. Zmeny v štruktúre a organizácii kolagénu rohovky a intercelulárnej matrix, ako aj apoptóza a nekróza keratocytov, takmer výlučne koncentrované v centrálnej časti predných vrstiev strómy rohovky sú fundamentom štruktúrneho oslabenia rohovkového tkaniva pri keratokóne.<sup>31,33,59,81</sup>

Fotopolymerizáciou dochádza ku zvýšeniu rigidity kolagénu rohovky a zvýšeniu rezistencie voči keratektatickému preformovaniu sa rohovky.<sup>92</sup> Efekt pôsobenia kombinácie riboflavínu a UV-žiarenia na zmenu štruktúry kolagénových vlákien rohovky, na zmenu aktivity lytických účinkov enzýmov epitelu rohovky, na apoptózu keratocytov v predných vrstvách strómy rohovky bolo možné potvrdiť experimentálne in vitro a in vivo na zvieracom, in vitro aj na humánnom tkanive.<sup>74,93,95</sup>

Prvé klinické skúsenosti s touto metódou použitou u pacientov s progredujúcim keratokónom boli publikované autormi z drážďanskej očnej kliniky. Išlo o prospektívnu nerandomizovanú klinickú pilotnú štúdiu, do ktorej bolo zahrnutých 23 očí 22 pacientov. Cross-linking bol vykonaný horeuvedným spôsobom. Maximálna

doba sledovania jednotlivých pacientov po cross-linkingu bola 4 roky. U všetkých pacientov došlo ku zastaveniu progresie keratokónu, u 70% pacientov bola topograficky preukázaná regresia, s redukciou  $K_{max}$  hodnôt. Nebola zaznamenaná opacifikácia rohovky alebo šošovky, a taktiež neboli zaznamenané patologické zmeny endotelu rohovky ani vnútroočného tlaku. U 65% pacientov došlo ku zlepšeniu korigovanej zrakovej ostrosti.<sup>89</sup> Po pozitívnych výsledkoch tejto pilotnej štúdie, bez zaznamenania žiadnych výrazných vedľajších účinkov liečby došlo ku zvýšeniu počtu pacientov indikovaných ku tomuto zákroku. Počet pacientov, ktorí boli podrobení tejto liečbe sa do dnešného dňa niekoľkokrát zvýšil a cieľom tejto štúdie bolo práve vyhodnotenie výsledkov doteraz najväčšieho súboru pacientov s keratokónom liečených touto procedúrou vôbec, sledovanie efektivity CXL liečby vyhodnotením topografických záznamov, určením NKZO, sledovaním výskytu nežiadúcich účinkov, resp. komplikácií liečby.

Po tejto práci publikovanej v roku 2003, nasledovala až v roku 2006 publikácia talianskych autorov s oveľa nižším počtom sledovaných očí, a to desať, ktoré mali v podstate korelujúce výsledky s výsledkami draždanskej skupiny: u všetkých očí došlo ku štatisticky signifikantnej redukcii keratometrických hodnôt, zlepšeniu NKZO a nedošlo ku štatisticky významným zmenám v počte endotelových buniek a ku zmene vnútroočného tlaku. Navyše oproti prvej publikovanej štúdii v tejto oblasti, títo autori sledovali aj aberometrický obraz povrchu rohovky a zistili, že po CXL dochádza ku zlepšeniu morfolologickej symetrizácie rohovky a signifikantnej redukcii komatických aberácií.<sup>12</sup>

Na pracovisku draždanskej očnej kliniky univerzitnej nemocnice bolo do dnešného dňa ošetrených CXL metódou 574 očí, na základe klinických skúseností, pri ktorých sa pozorovala stabilizácia nálezu na rohovke najskôr po šiestich mesiacoch, boli do štatistickej analýzy zaradení pacienti s minimálnou pozorovacou dobou od šiestich mesiacov. Veľkosť kohorty študovanej skupiny bola 241 očí u stotridsiatich pacientov.

Vzhľadom na vysoké počty očí ktoré boli k dispozícii ku analýze po jednom, dvoch a troch rokoch (142, 66 a 33 očí), z ktorých sa predpokladala aj štatistická validita výsledkov, tieto sú komentované aj v texte štúdie, výsledky CXL na úplne prvých očiach po štyroch, piatich a šiestich (13, 5 a 5 očí) rokoch boli popísané v prvej pilotnej štúdii publikovanej Wollensakom, popísanej už vyššie.

Čo sa týka keratometrickej hodnoty  $K_{max}$  v 3mm zóne od centra rohovky odčítanej z topografického záznamu, táto zostáva stabilná, resp. dochádza ku jej regresii v priebehu troch rokov u 67-89% očí. Keratometrické hodnoty v oblasti apexu keratokónu zostávajú stabilné, resp. signifikantne regredujú u 79% očí, astigmatizmus signifikantne regreduje, resp. zostáva stabilný u 68-86% očí podrobených terapii.

Mnohí pacienti profitovali z tejto terapie aj v zmysle zlepšenia zrakovkej ostrosti, je však nutné poznamenať, že tento parameter nie je primárnym cieľom tejto terapeutickkej metódy a na to sú upozorňovaní aj pacienti pred podstúpením tohoto zákroku. Cieľom výkonu je na základe už popísaného fotochemického procesu stabilizácia procesu, „zmrazenie“, tzv. „freezing“ rohovky v takej forme akej pred CXL je a úspech procedúry je klasifikovaný ak nedochádza k ďalšej progresii keratokónu, a to že dochádza u časti pacientov aj ku zlepšeniu NKZO, možno klasifikovať ako „pozitívny“ vedľajší účinok liečby. V priebehu troch rokov po CXL dochádza ku signifikantnému zlepšeniu NKZO, resp. pretrvávajú jej stabilné hodnoty u 73-87% očí.

Na druhej strane, bola aj časť pacientov, u ktorých boli keratometrické hodnoty po CXL nezmenené, ale zraková ostrosť u nich poklesla vzhľadom ku hodnotám pred výkonom, a ďalšia časť pacientov u ktorých došlo aj ku progresii keratometrických hodnôt, teda pacienti, kde tento spôsob liečby nedosiahol žiaden efekt. V tejto skupine „neúspešných“ pacientov sa hľadala variabilná veličina, ktorá by bola, v porovnaní s „úspešnou“ skupinou, možným determinantom rozhodujúcim o úspešnosti, alebo neúspešnosti liečby CXL, resp. potenciálnym indikátorom určujúcim aspoň tendenciu ku pozitívnemu efektu, resp. jeho neúspechu. Pri sledovaní istého pravidelného výskytu jednotlivých premenných v tejto skupine, ako:  $K_{max}$  hodnota, K hodnota na vrchole keratokónu, astigmatizmus, vek pacienta a hrúbka rohovky, ani pri jednej z týchto veličín nebola zaznamenaná štatistická signifikantnosť ich výskytu. Jediný variabilný parameter, a to hrúbka rohovky, signalizovala s hodnotou  $P=0,139$  možnú tendenciu ku pravidelnejšiemu výskytu. Tento štatistický údaj spolu s nálezom tenkých rohoviek (pod  $420\ \mu\text{m}$ ) výlučne v skupine „neúspešných“ očí podnietil ešte ku dodatočnej analýze tejto podskupiny, ktorá odhalila signifikantnú závislosť výskytu takého významného v tejto skupine ako je zvýšená tendencia ku vzniku trvalých rohovkových stromálnych opacít – haze. Tenké rohovky, rohovky s vyššími keratometrickými hodnotami a vyšším



astigmatizmom pred CXL terapiou preukázali signifikantne vyššiu pohotovosť ku vzniku trvalého haze po procedúre. Pri porovnaní s faktami publikovanými v odbornej literatúre, je jediná experimentálne podložená zmienka, korelujúca s nálezom v našej štúdii v práci talianskych autorov popisujúca ultraštruktúrálnu analýzu sledovanú Heidelberg retinálnym tomografom II, ktorým sa porovnávali nálezy in vivo v humánných rohovkách po CXL konfokálnou mikroskopiou. Po 2-3-och mesiacoch od CXL pozorovali títo autori u očí s mikroskopicky detekovateľným haze v hĺbke 170 až 180µm hyperreflektujúce oválne a elongované jadrá keratocytov so zvýšeným zahustením extracelulárnej matrix. Tento konfokálny mikroskopický nález bol častejší a intenzívnejší u pacientov s pokročilým keratokónom s Vogtovými striami. Tento nález sa nedetekoval u pacientov v skorých štádiách keratokónu.<sup>43</sup>

V ďalšej práci tých istých autorov sa jednoznačne potvrdzuje, že predoperačný konfokálny mikroskopický nález hyperaktivovaných, hyperdenzných jadier keratocytov v predných vrstvách strómy rohovky, retikulárny priebeh tmavých mikrostrií v stróme rohovky a biomikroskopický nález Vogtových línií sú pomerne spoľahlivým prediktabilným rizikovým faktorom pre vznik trvalého haze strómy rohovky po CXL.<sup>42</sup> Vlastnosti premenných u pacientov s haze v tejto práci analyzovanej podskupiny ako : tenké rohovky, vysoké keratometrické hodnoty, vysoký astigmatizmus charakterizujúce pokročilý keratokónus, zapadajú do mikroskopického nálezu popisovaného Mazzottom a spol. a má veľký význam pri konzultácii pacienta a možnej predpovedi výsledku CXL procedúry, resp. pri rozhodovaní sa, či vôbec pristúpiť k tejto modalite terapie pri morfológicky pokročilom náleze.

Posledná práca, ktorá sa zaoberá problémom pretrvávajúceho haze po CXL , bola publikácia nemeckých autorov<sup>27</sup>, ktorí popisujú kazuistiku jedného pacienta po CXL s pretrvávajúcim stromálnym haze 5 mesiacov po procedúre. V tomto prípade je nutné komentovať, že pri analýze protokolu procedúry pri tomto pacientovi, autori nedodržali jeho zásady: pred aplikáciou UV-žiarenia aplikovali riboflavín len 5 minút, čo nezabezpečuje dostatočnú saturáciu strómy rohovky fotosenzitizátorom, a tiež počas žiarenia aplikovali riboflavín len každých 5 minút, v texte autori nespomínajú aká je presná hrúbka rohovky tohoto konkrétneho pacienta. Je pravdepodobné, že presným dodržaním všetkých detailov protokolu CXL procedúry, sa mohlo tomuto prípadu nežiadúceho účinku vyhnúť.<sup>75</sup>

Najnovší prehľad indikácií ku perforujúcej keratoplastike v USA za posledných 25 rokov ukazuje, že keratokónus je po pseudofakickej bulóznej keratopatii a retransplantácii treťou najčastejšou indikáciou. Pri retransplantáciach je keratokónus taktiež treťou najčastejšou diagnózou, pre ktorú bola pôvodná transplantácia vykonaná.<sup>24</sup>

Technika perforujúcej keratoplastiky bola dlhé roky štandardom definitívnej liečby pokročilého keratokónu. Napriek tomu, že mnohé štúdie preukázali veľmi dobre dlhodobé výsledky po perforujúcej keratoplastike v zmysle dobrej zrakovej ostrosti<sup>80</sup>, je jednoznačným faktom, že dlhodobá optická rehabilitácia po tomto výkone, vysoký astigmatizmus, so stehmi súvisiace problémy a možnosť rejekčnej reakcie aj po rokoch od operácie sú nevýhodou tejto operačnej metódy. Pri analýze veľkých súborov pacientov po perforujúcej keratoplastike došlo ku rejekčnej reakcii u 20% pacientov, z čoho 85% boli endotelové rejekčné reakcie, z ktorých 2,5% viedlo ku zlyhaniu transplantátu.<sup>9,85</sup> Práve z týchto dôvodov je lamelárna technika keratoplastiky pri keratokóne ako rovnocenná alternatíva liečby veľkým prínosom, vzhľadom k tomu, že eliminuje možnosť endotelovej rejekčnej reakcie a minimalizuje redukciu počtu endotelových buniek príjemcu. Technika tejto metódy je však technicky a časovo náročná a v priebehu learning curve operátora spojená s množstvom intra- a perioperačných problémov, no napriek týmto úskaliam dochádza ku etablovaniu sa lamelárnej techniky keratoplastiky pri keratokóne v oftalmológii, pretože z nej môžu benefitovať predovšetkým pacienti s vysokým rizikom vzniku rejekčnej reakcie, ako napr. pacienti s atopickým očným ochorením, nevyhnutnosťou transplantácie veľkého rohovkového štepu, koexistujúcim herpetickým ochorením oka, atď.

Transplantácia rohovky je považovaná za najúspešnejšiu transplantáciu v humánnej medicíne vôbec.<sup>69,70,83</sup> Kritériá úspešnosti transplantácie z hľadiska pacienta majú však iné parametre, pretože pacient od operácie očakáva zlepšenie kvality života cez zlepšenú zrakovú ostrosť, ktorá vykompenzuje a prevýši všetky negatívne zážitky a skúsenosti spojené s operáciou a pooperačnou starostlivosťou, nevynímajúc aj finančnú záťaž, ktorá bola s týmto spojená. Číry transplantát je totiž len predpokladom dobrej zrakovej ostrosti, ale samotný nestačí, vzhľadom k tomu, že mnohokrát je rušivým faktorom pri takomto náleze vysoký pooperačný astigmatizmus, ktorý nie je možné kompenzovať okuliarmi a jeho korekcia kontaktnými šošovkami nie je u každého akceptovateľná, resp. praktizovateľná, čo je

ale aj v prípade pozitívneho efektu spojené napr. s ďalšími finančnými nákladmi zo strany pacienta (honorár za vyšetrenie, vyhotovenie kontaktnej šošovky, transport na vyšetrenie, atď). A to nie sú len finančné náklady pacienta, ktoré limitujú kvalitu jeho života po transplantácii rohovky, ale aj psychická záťaž, napr. stály alebo intermitentný pocit cudzieho telieska v oku, strach z prenosného ochorenia z tkaniva transplantátu, strach z rejekčnej reakcie, atď.<sup>8</sup>

Práve všetkým týmito úskaliami transplantácie rohovky, vykonanej akoukoľvek technikou, je možné sa v prípade správnej indikácie cross-linkingu kolagénu rohovky pomocou riboflavínu a UVA-žiarenia u pacientov s keratokónom vyhnúť, pretože zlepšením biomechanických vlastností rohovky stabilizujeme stav tkaniva rohovky v stave, v ktorom umožňuje pacientovi mať s optimálnou korekciou užitočný vízus. Okrem klinických výhod prináša táto modalita aj mnoho ekonomických a psychosociálnych pozitív: cross-linking je možné praktizovať ako ambulantný výkon, ktorý je minimálne invazívny, ekonomicky únosný, s malou záťažou pre samotného pacienta. Na rozdiel od transplantácie, ktorá je technicky náročná, finančne zaťažujúca, a ako hore už uvedené spojená s mnohými možnými intraoperačnými a postoperačnými komplikáciami, a napriek dobrým dlhodobým výsledkom mnohokrát spojená s krátkodobým alebo aj dlhodobým obmedzením pracovných a súkromných aktivít pacienta.

## 10 Záver

Môže jednoduchá „nechirurgická“, neinvazívna technika viesť ku zvýšeniu rezistencie rohovky voči ektázii pri keratokóne? Pôvodná hypotéza v 90-tych rokoch 20. storočia, pri úvodných experimentoch v tejto oblasti, bola postavená na potvrdení, resp. vyvrátení pravdivosti tvrdenia, že cross-linking kolagénu rohovky pomocou riboflavínu a UVA žiarenia vedie ku zvýšeniu tuhosti rohovky a zvýšeniu odolnosti voči lytickým enzymatickým procesom. Pravdivosť tejto hypotézy na základe mnohých in vitro a in vivo experimentov na zvieratách a aj in vitro experimentov na ľudskom tkanive, citovaných vyššie v tejto práci bola potvrdená. Prvá pilotná štúdia s malým počtom očí, ktorej výsledky boli v roku 2003 publikované potvrdila pozitívny účinok tejto modality liečby aj za in vivo podmienok na ľudskom rohovkovom tkanive, bez výskytu komplikácií, resp. ireverzibilných nežiadúcich účinkov, čo bolo akýmsi „spúšťacím motorom“ k tomu, aby sa mohlo pokračovať v tejto štúdii nielen na očnej klinike drážďanskej univerzity, v ktorej sa medzičasom nachádza 574 očí ale aj na mnohých oftalmologických pracoviskách v Nemecku, v Európe a v súčasnosti započala aj FDA-štúdia na zavedenie tejto terapeutickej metódy v USA (Cataract & Refractive Surgery Today, marec 2008).

V tejto práci boli analyzované dlhodobé výsledky účinku CXL na doteraz najväčšom počte pacientov vôbec, ktoré boli medzičasom aj publikované.<sup>60</sup> Štatistický rozbor nášho súboru potvrdil predbežné výsledky drážďanských autorov z pilotnej štúdie, ktoré boli nezávisle od tohoto súboru potvrdené aj inými autormi prezentujúce účinnosť CXL pri stabilizácii progredujúceho keratokónu bez zaznamenania závažných nežiadúcich účinkov.<sup>12</sup> Iní autori dokonca, v presvedčení o efekte tejto metódy a v snahe zlepšiť kvalitu videnia pacienta kombinujú CXL s inými refrakčnými terapeutickými postupmi, ako napríklad s limitovanou „topo-guided surface excimer ablation“<sup>32</sup> alebo s implantáciou intrakorneálnych prstencov.<sup>13</sup> Pri kombinácii týchto procedúr je cieľom symetrizácia centra rohovky a zlepšenie prírodnej zrakovéj ostrosti a zlepšenie možnosti aplikácie kontaktných šošoviek, a tým aj zlepšenie korigovaného vízu.

Úskalím pri štatistickom hodnotení nášho súboru by mohla byť absencia kontrolnej skupiny očí pacientov, pri ktorej by sa hodnotil nález keratokónu a jeho event. progresia bez akejkoľvek intervencie. Vzhľadom na presvedčivé výsledky pilotnej štúdie<sup>89</sup> etická komisia našej inštitúcie zamietla pokračovanie v štúdii za prítomnosti

kontrolnej skupiny bez liečby. Tento názor sa zhoduje aj v neskôr publikovaných prácach skupiny „Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus Study“, ktoré jednoznačne zaznamenávajú signifikantný pokles zrakovej ostrosti v priebehu ôsmich rokov, zvýšenie astigmatizmu a keratometrických hodnôt, opacifikáciu subepiteliálnej strómy a postupné stenčovanie rohovky pri keratokóne ponechanom jeho prirodzenému vývinu.<sup>6,15,44,77</sup>

Túto podmienku pre štatistickú dokonalosť potvrdenia účinnosti metódy spĺňajú európske klinické štúdie započaté v roku 2006 na pracoviskách v Zürichu, Bruseli a Miláne; randomizovaná, placebom kontrolovaná, dvojito-slepá, multicentrická štúdia započatá v roku 2007 vo Freiburgu v Nemecku, austrálska randomizovaná kontrolovaná štúdia, ktorej 12-mesačné výsledky sú signifikantne priaznivé pre skupinu CXL liečených očí (Referát Dr. C. Wittig, 3<sup>rd</sup> International CCL Congress in Zürich, December 2007), a tiež niekoľko klinických štúdií v rámci FDA-procedúry iniciovaných v roku 2008 pod vedením Dr. R.D. Stultinga z Emory University z Atlanty, na ktorých priebežné predbežné výsledky bude nevyhnutné aspoň jeden rok počkať.

## 11 Literatúra

1. Albon J, Karwatowski WS, Avery N, Easty DL, Duance V. Changes in the collagenous matrix of the aging human lamina cribrosa. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 368-375
2. Amsler, M: Quelques donne du problème du k ratoc ne. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1961 ; 129: 331-354
3. Amsler, M: K ratoc ne classique et k ratoc ne fruste ; arguments unitaires. *Ophthalmologica* 1946; 111: 96-101
4. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1980; 31: 435-441
5. Balisky L, Lee CH, Greenwald DP, Rowsey JJ. Tensile strength as a function of age in human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: S3201
6. Barr JT, Wilson BS, Gordon MO et al. Estimation of the incidence and factors predictive of corneal scarring in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study; the CLEK Study Group. *Cornea* 2005; 25: 16-25
7. Bowman CB, Thompson KP, Stulting RD. Refractive keratotomy in keratoconus suspects. *J Refract Surg* 1995;11: 200-206
8. B hringer D, Schindler A, Reinhard T. Zufriedenheit nach perforierender Keratoplastik. Ergebnisse eines Fragebogenzensus. *Ophthalmologe* 2006; 103: 677-681
9. Brierly S, Izquierdo LJ, Mannis MJ. Penetrating keratoplasty for keratoconus. *Cornea* 2000; 19: 329-32
10. Buzard KA, Tuengler A, Febraro. J-L. Treatment of mild to moderate keratoconus with laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 1600-1609
11. Caroline P, Andre M, Kinoshita B, Choo J: Etiology, Diagnosis, and Management of Keratoconus: New Thoughts and New Understandings; <http://www.opt.pacificu.edu/ce/catalog/15167-AS/Keratoconus.html>
12. Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C et al. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 837-845
13. Chan CCK, Sharma M, Wachler BSB. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract refract Surg* 2007; 33: 75-80

14. Colin J, Velou S. Current surgical options for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2003;29: 379-386
15. Davis LJ, Schechtman KB, Wilson BS et al. Longitudinal changes in visual acuity in keratoconus; the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 489-500
16. Edmund C. Assessment of an elastic model in the pathogenesis of keratoconus. *Acta Ophthalmol* 1987; 65: 545-550
17. Ellis W. Radial keratotomy in a patient with keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 1992; 18: 406-409
18. Ersek RA, Derlerm AG. Processed irradiated bovine cartilage for nasal reconstruction. *Annals Plastic Surgery* 1988; 20: 540-546
19. Eyre DR. Cross-linking in collagen and elastin. *Ann Rev Biochem* 1984; 53: 717-748
20. Falls HF, Allen AW. Dominantly inherited keratoconus. *J Genet Hum* 1969;17:317-324
21. Fukuchi T, Yue B, Sugar J et al. Lysosomal enzyme activities in tissues of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol* 1994;112: 1368-1374
22. Fullerton J, Paprocki P, Foote S et al. Identity-by-descent approach to gene localisation in eight individuals affected by keratoconus from north-west Tasmania, Australia. *Hum Genet* 2002;110:462-470
23. Fundenburgh JL, Panjwani N, Conrad GW, Baum J. Altered keratan sulfate epitopes in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 2278-2281
24. Ghosheh FR, Cremona FA, Rapuano CJ et al. Trends in penetrating keratoplasty in the United States 1980-2005. *Int Ophthalmol* 2008; 28: 147-153
25. Graupner M et al. Interim results from prospective „Erlangen non-high-risk penetrating keratoplasty study“. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2000 Sept; 217(3): 167-170
26. Harner CH, McCarey BE, Rao PR, Chow AA. In vivo evaluation of biomaterials for synthetic epikeratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: S68
27. Herman CIA, Hammer T, Duncker GIW. Haze-Bildung nach Vernetzungstherapie bei Keratokonus. *Ophthalmologe* 2008; 105: 485-487

28. Hjortdal JØ, Møller-Pedersen T, Ivarsen A, Ehlers N. Corneal power, thickness, and stiffness: results of a prospective randomized controlled trial of PRK and LASIK for myopia. *J Cataract Refract Surg.* 2005; 31: 21-29
29. Holland DR, Maeda N, Hannush SB et al. Unilateral keratoconus. Incidence and quantitative topographic analysis. *Ophthalmology* 1997; 104: 1409-1413
30. Inhalainen A. Clinical and epidemiological features of keratoconus: genetic and external factors in the pathogenesis of the disease. *Acta Ophthalmol* 1986; 178: 1-64
31. Kaldawy RM, Wagner J, Ching S. et al. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. *Cornea* 2002; 21: 206-209
32. Kanellopoulos AJ, Binder PS. Collagen cross-linking with sequential topography-guided PRK. A temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea* 2007; 26: 891-895
33. Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE et al. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea* 1997; 16: 345-351
34. Klintworth GK, Damms T. Corneal dystrophies and keratoconus. *Curr Opin Ophthalmol Curr Sci* 1995; 6: 44-56
35. Kohlhaas M, Spoerl E, Speck A, Schilde T, Sandner D, Pillunat LE. Eine neue Behandlung der Keratektasie nach LASIK durch Kollagenvernetzung mit Riboflavin/UVA-Licht. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005; 222: 430-436
36. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol* 1994; 28: 293-322
37. Krumeich JH, Daniel J, Knülle A. Live-epikeratophakia for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 456-463
38. Liesegang TJ, Skuta GL, Cantor LB. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Science Course 2006: External Disease and Cornea; Page334
39. Mark HS. Cross-linking with radiation. *Encyclopedia of polymer science and engineering* 2nd Ed. ;Vol. 4, Pp. 418-449. Academic Press: London
40. Matthes R. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys.* 2004; 87: 171-186



41. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S et al. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uva-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation. *Eur J Ophthalmol* 2006; 16: 530-535
42. Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S. et al. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007; 35: 580-2
43. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C. et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen. Ultrastructural analysis by Heidelberg retinal tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea* 2007; 26: 390-397
44. McMahon TT, Edrington T; Szczotka-Flynn L et al. Longitudinal changes in corneal curvature in keratoconus. *Cornea* 2006; 25: 295-306
45. Meek KM, Tuft SJ, Huang . Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 1948-1956
46. Milne PJ, Zika RG. Cross-linking of collagen gels: photo-chemical measurement. *SPIE Ophthalmic technologies* 1992; 1644:115-124
47. Moodaley L, Lin C, Woodward EG et al. Excimer laser superficial keratectomy for proud nebulae in keratoconus. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 454-457
48. Mortensen J, Carlsson K, Öhrström A. Excimer laser surgery for keratoconus. *J Cataract refract Surg* 1998; 24: 893-898
49. Müller LJ. Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 437-443
50. Nash IS, Greene PR, Foster CS: Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1982; 35: 413-423
51. Pietrucha K. New collagen implant as dural substitute. *Biomaterials* 1991; 12: 320-323
52. Pouliquen Y: Keratoconus. Doyne Lecture. *Eye* 1987; 1: 1-15
53. Price FW, Whitson WE, Marks RG. Graft survival in four common groups of patients undergoing penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1991; 98: 322-328
54. Rabinowitz YS. Keratoconus: update and new advances. *Surv Ophthalmol* 1998; 42: 297-319

55. Rabinowitz YS, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in keratoconus. *Refract Corneal Surg* 1989; 56: 400-406
56. Rabinowitz YS, Nesburn AB, McDonnell PJ. Videokeratography of the fellow eye in unilateral keratoconus. *Ophthalmology* 1993;100: 181-186
57. Rabinowitz YS, Zhu H, Yang H et al. Keratoconus. Nonparametric linkage analysis suggests a gene near the centromere of chromosome 21. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2975
58. Rabinowitz YS, Garbus JJ, Garbus C. et al. Contact lens selection for keratoconus using a computer-assisted videophotokeratoscope. *CLAO J* 1991; 17: 88-93
59. Radner W, Zehetmayer M, Skorpik C et al. Altered organization of collagen in the apex of keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 1998; 30: 327-332
60. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E. et al. Collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: Long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 796-801
61. Reiser KM. Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 196: 17-2
62. Remacle M. Treatment of vocal fold immobility by glutaraldehyde-cross-linked collagen injection: long-term results. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 437-444
63. Sabiston DW. The association of keratoconus, dermatitis, and asthma. *Trans Ophthalmol Soc NZ* 18: 66-72, 1966
64. Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and cross-linking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 793-797
65. Sawaguchi S, Yue B, Sugar J et al. Lysosomal abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol* 1989;107: 1507-1510
66. Sawaguchi S et al. Alpha-1 proteinase inhibitor levels in keratoconus. *Exp Eye Res* 1990; 50: 549-554
67. Schnitzler E, Spoerl E, Seiler T. Bestrahlung der Hornhaut mit UV-Licht und Riboflavingabe als neuer Behandlungsversuch bei einschmelzenden Hornhautprozessen, erste Ergebnisse bei vier Patienten. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2000; 217: 190-193

68. Seiler T, Hafezi F. Corneal Cross-Linking-Induced Stromal Demarcation Line. *Cornea* 2006; 25: 1057-1059
69. Seitz B, Langenbucher A, Naumann GOH. Die perforierende Keratoplastik. Eine 100-jährige Erfolgsgeschichte. *Ophthalmologe* 2005; 102: 1128-1139
70. Sharif KW, Casey TA. Penetrating keratoplasty for keratoconus: complications and long term success. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 142-146
71. Smolin G. Dystrophies and degenerations. In: Smolin G, Thoft RA, eds. *The cornea scientific foundations and clinical practice*. Boston: Little, Brown, 1987: 448
72. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998; 66: 97-103
73. Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, Seiler T, Knuschke P. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologe* 2000; 97: 203-206
74. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increase resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004; 1: 35-40
75. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D et al. Safety of UVA-Riboflavin Cross-linking of the Cornea. *Cornea* 2007; 26: 385-389
76. Stachs O, Bochert A, Gerber T et al. The extracellular matrix structure in keratoconus. *Ophthalmologe* 2004; 101: 384-9
77. Suzuki M, Amano S, Honda N et al. Longitudinal changes in corneal irregular astigmatism and visual acuity in eyes with keratoconus. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51: 265-269
78. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: part 1, *Am J Ophthalmol* 1963;55: 18-47
79. The Australian Corneal Graft Registry. 1990-1992 Report. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1993 May; 21(2Suppl): 1-48
80. Troutman RC, Lawless MA. Penetrating keratoplasty for keratoconus. *Cornea* 1987; 6: 298-305
81. Tuori AJ, Virtanen I, Aine E et al. The immunohistochemical composition of corneal basement membrane in keratoconus. *Curr Eye Res* 1997; 16: 792-801
82. Tynismaa H, Sistonen P, Tuupanen S et al. A locus for autosomal dominant keratoconus: linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3160-3164

83. Vail A, Gore SM, Bradley BA et al. Corneal graft survival and visual outcome. A multicenter Study. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Ophthalmology* 1994; 101: 120-127
84. Wagoner MD, Smith SD, Rademaker WJ, Mahmood MA. Penetrating keratoplasty vs epikeratoplasty for the surgical treatment of keratoconus. *J Refract Surg* 2001; 17: 138-146
85. Watson SL, Ramsay A, Dart JKG et al. Comparison of deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. *Ophthalmology* 2004; 111: 1676-1682
86. Wilson SE, Lin DTC, Klyce SD. The topography of keratoconus. *Cornea* 1991; 10: 2-8
87. Wilson SE, HE YG, Weng J et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis; hypothesized role for the interleukin 1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996; 62: 325-337
88. Wisnewsky PJ, Power DL, Kennedy JM. Glutaraldehyde-cross-linked meniscal allografts: mechanical properties. *J Invest Surg* 1988; 1: 259-266
89. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen cross-linking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135: 620- 627
90. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Behandlung von Keratokonus durch Kollagenvernetzung. *Ophthalmologe* 2003;100: 44-49
91. Wollensak G, Spoerl E, Reber F et al. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res* 2003; 35: 324-328
92. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1780-1785
93. Wollensak G, Seiler T, Wilsch M, Spoerl E. Collagen fiber-diameter after riboflavin/UVA induced collagen-cross-linking in the rabbit cornea. *Cornea* 2004; 23: 503-507
94. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye* 2004; 18:718-722
95. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M et al. Keratocyte apoptosis after collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* 2004; 23: 43-49

96. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye* 2004; 18:718-722
97. Wollensak G, Seiler T, Wilsch M et al. Collagen fiber-diameter after riboflavin/UVA induced collagen-cross-linking in the rabbit cornea. *Cornea* 2004; 23: 503-507
98. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M et al. Keratocyte apoptosis after collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* 2004; 23: 43-49
99. Wollensak J, Ihme A, Seiler T. Neue Befunde bei Keratokonus. *Fortschr. Ophthalmol* 1987; 84: 28-32
100. Wollensak J, Buddecke E. Biomechanical studies on human corneal proteoglycans-a comparison of normal and keratoconic eyes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990;228: 517-523
101. Zimmermann D, Fischer R, Winterhalter K, Witmer R, Vaughan L:Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. *Exp Eye Res* 1988; 46: 431-442