

## **The effect of corneal collagen cross-linking on confocal microscopic findings and tear indices in patients with progressive keratoconus**

**Farajipour H\***

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received April 9, 2014; Accepted September 6, 2015

### **Abstract:**

**Background:** This study was performed to evaluate changes in tear indices and confocal microscopic findings after corneal collagen cross-linking (CXL) in patients with progressive keratoconus in Farabi Hospital in Tehran, Iran, during 2012-2013.

**Materials and Methods:** In this analytical study, 32 consecutive eyes of 23 patients (mean age of 20.91 years) with progressive keratoconus were enrolled. The standard cross-linking surgery was performed for all patients. Visual, refractive and topographic evaluations were done before and 6 months after the surgery. Tear function tests and confocal microscopic examination were performed before and 1 month and 6 months after the procedure using the paired t-test with SPSS software.

**Results:** Using the confocal microscopy, all eyes showed reduced or absent subepithelial nerve plexus. Differences in basal epithelial cell density, epithelial mean cell area and keratocyte density in anterior and middle stroma and endothelial cell pleomorphism were all statistically significant between 1 month and 6 months after CXL ( $P < 0.05$ ). No statistically significant change was noted in the number of the endothelial cells and polymegathism after 6 months follow-up. Significant improvement was noted in uncorrected visual acuity, best corrected visual acuity, flattest corneal meridian and maximum keratometry in pentacam after 6 months of the procedure.

**Conclusion:** Corneal collagen cross-linking can cause a significant reduction in subepithelial nerve plexus and significant alterations in keratocyte density in anterior and middle stroma.

**Keywords:** Keratoconus, Cross-linking, Confocal microscopy

\* **Corresponding Author.**

**Email:** h\_farajypour@yahoo.com

**Tel:** 0098 912 606 3725

**Fax:** 0098 31 553 42025

**Conflict of Interests:** *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2015; Vol. 19, No 4, Pages 319-325*

*Please cite this article as:* Farajipour H. The effect of corneal collagen cross-linking on confocal microscopic findings and tear indices in patients with progressive keratoconus. *Feyz* 2015; 19(4): 319-25.

# تاثیر کراس‌لینکینگ بر یافته‌های میکروسکوپی کونفوکال و شاخص‌های اشکی در بیماران مبتلا به کراتوکونوس پیشرونده

حسن فرجی‌پور \*

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** این مطالعه به منظور ارزیابی تغییرات شاخص‌های اشک و یافته‌های میکروسکوپی کونفوکال بعد از کراس‌لینکینگ قرنیه در بیماران مبتلا به کراتوکونوس پیشرونده در بیمارستان فارابی طی سال ۱۳۹۱ انجام گردیده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تحلیلی، ۳۲ چشم از ۲۳ بیمار با میانگین سنی ۲۰/۹۱ سال مبتلا به کراتوکونوس پیشرونده بررسی شدند. کراس‌لینکینگ استاندارد برای همه بیماران انجام شد. ارزیابی بینایی، انکساری و توپوگرافیک قبل و شش ماه بعد از عمل انجام شد. بررسی عملکرد اشک و میکروسکوپی کونفوکال قبل از عمل، یک ماه بعد و شش ماه بعد از عمل با استفاده از آزمون t زوجی صورت گرفت.

**نتایج:** در بررسی میکروسکوپی کونفوکال تمام چشم‌ها کاهش یا فقدان شبکه عصبی زیر اپی‌تلیال نشان دادند. اختلاف تراکم سلول‌های بازال اپی‌تلیوم، متوسط سطح سلولی اپی‌تلیوم و تراکم کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی و میانی و پلئومورفیسم سلول‌های اندوتلیال یک ماه و شش ماه بعد از کراس‌لینکینگ از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). تغییر در تعداد سلول‌های اندوتلیال و پلی‌مگاتیسم بعد از شش ماه از نظر آماری معنی‌دار نبود. بهبود قابل توجه در حدت بینایی اصلاح نشده و اصلاح شده، مریدین مسطح و کراتومتري ماکسیموم در پنتاکم بعد از شش ماه ایجاد شد.

**نتیجه‌گیری:** کراس‌لینکینگ می‌تواند باعث کاهش قابل توجه در شبکه عصبی زیر اپی‌تلیوم و تغییرات قابل توجه در تراکم کراتوسیت‌های استرومای قدامی و میانی شود.

**واژگان کلیدی:** کراتوکونوس، کراس‌لینکینگ، میکروسکوپ کونفوکال

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۴، صفحات ۳۲۵-۳۱۹

## مقدمه

مطالعات قبلی بهبود بینایی و نتایج انکساری و توپوگرافیک بعد از کراس‌لینکینگ را نشان می‌دهند [۶]. مطالعات محدودی اثر کراس‌لینکینگ را روی آپوپتوز کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی و میانی با استفاده از میکروسکوپی کونفوکال نشان داده است [۷-۱۰]. با توجه به اهمیت تاثیر کراس‌لینکینگ روی قسمت‌های مختلف قرنیه و سطح چشم و فقدان مطالعه مشابه، هدف مطالعه حاضر بررسی تمام شاخص‌های میکروسکوپی کونفوکال در بزرگترین سائزی که تاکنون روی بیماران کراتوکونوس پیشرونده انجام شده است، می‌باشد. علاوه بر این، برای اولین بار در این مطالعه اثر کراس‌لینکینگ بر روی شاخص‌های اشکی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع کوهورت تک گروهی بوده و با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت گرفت. از تمامی بیماران رضایت آگاهانه اخذ شد. تعداد ۳۲ چشم از ۲۳ بیمار ایرانی که معیارهای ورود را داشتند و در طی سال ۱۳۹۱ به بیمارستان فارابی مراجعه نمودند، به روش نمونه‌گیری آسان وارد مطالعه شد. معیارهای ورود شامل سن بالای ۱۳ سال با کراتو-کونوس پیشرونده، ضخامت قرنیه بیش از ۴۰۰ میکرومتر و کراتو-

کراتوکونوس یک بیماری اکتاتیک قرنیه با بیرون زدگی مخروطی و نازک شدگی است [۱]. تغییرات ساختار میکروسکوپی کلاژن و ماتریکس خارج سلولی و نیز آپوپتوز کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی و لایه بومن تا حدودی نازک شدگی بیومکانیکال قرنیه را توجیه می‌کند [۲]. افزایش آنزیم‌های پروتئولیتیک و کاهش غلظت مهارکننده‌های پروتاز، کاهش ضخامت استروما و تغییر ساختار لایه‌های کلاژن به‌عنوان مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک کراس‌لینکینگ مطرح می‌باشند [۳]. کراتوکونوس بیماری پیشرونده‌ای است که در اغلب موارد پیشرفته نیاز به پیوند قرنیه داشته و در سه دهه اخیر شایع‌ترین علت پیوند قرنیه بوده است [۴]. تنها درمان مبتنی بر توقف یا کاهش پیشرفت کراتوکونوس کراس‌لینکینگ با استفاده از ریوفلاوین و اشعه UVA از طریق افزایش سختی قرنیه در استرومای قدامی می‌باشد [۵].

استادیار، گروه چشم پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

## \* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، خیابان امیرکبیر، بیمارستان متینی

تلفن: ۰۹۱۲۶۰۶۳۷۲۵؛ ۰۳۱ ۵۵۳۴۲۰۲۵

پست الکترونیک: h\_farajypour@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۰؛ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۶/۱۵

تلیوم (حدود ۳ تا ۵ روز بعد از عمل) برداشته شد. قطره آنتی-بیوتیک برای دو هفته و استروئید برای چهار هفته ادامه یافت. اطلاعات با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ آنالیز شدند. متغیرها به شکل میانگین و انحراف معیار بیان شدند.  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد. تأثیرات درمان با استفاده از تست  $t$  زوجی بین زمان‌های مختلف بررسی گردید.

#### نتایج

۳۲ چشم (۱۶ چشم راست و ۱۶ چشم چپ) از ۲۳ بیمار شامل ۱۸ مرد و ۵ زن وارد مطالعه شدند. میانگین سن بیماران  $40.91 \pm 4.6$  سال بود. جدول شماره ۱ خلاصه نتایج بینایی رفرکتیو، توپوگرافیک و پاکی‌متریک قبل و شش ماه بعد از کراس‌لینکینگ را نشان می‌دهد.

#### شاخص‌های اشکی:

متوسط BUT قبل از کراس‌لینکینگ، یک ماه بعد و شش ماه بعد به ترتیب  $14.06 \pm 2.23$  ثانیه،  $13.19 \pm 1.67$  ثانیه و  $13.28 \pm 1.49$  ثانیه بود. تغییرات BUT در سه دوره زمانی مورد بررسی معنی‌دار بود. اختلاف قبل و بعد از ۱ ماه و ۶ ماه معنی‌دار بود، اما تغییرات بین ماه نخست تا ماه ششم معنی‌دار نبود. متوسط تست شیرمر ۱ قبل از کراس‌لینکینگ و یک ماه و شش ماه بعد از آن به ترتیب  $15.69 \pm 4.06$  میلی‌متر،  $15.41 \pm 3.74$  میلی‌متر و  $14.91 \pm 2.49$  میلی‌متر بود. هرچند نتایج این تست طی دوره مطالعه کاهش نشان داد، اما تفاوت‌ها معنی‌دار نبود. متوسط اسمولاریته اشک قبل از عمل  $300.7 \pm 16.5$  میلی‌اسمول در لیتر، یک ماه بعد از عمل  $300.3 \pm 12.9$  میلی‌اسمول در لیتر و شش ماه بعد از عمل  $302.09 \pm 10.8$  میلی‌اسمول در لیتر بود. اختلاف مقادیر پایه و بعد از عمل معنی‌دار نبود. (جدول شماره ۲)

متری حداکثر کمتر از ۶۰ دیوپتر در پنتاکم بودند. کراتوکونوس پیش‌رونده شامل یک یا بیشتر از موارد ذیل طی ۱۲ ماه بود: افزایش یک دیوپتر یا بیشتر در meridien محدب‌تر، افزایش یک دیوپتر یا بیشتر در سینلندر یا افزایش نیم دیوپتر یا بیشتر در معادل اسفریک رفراکشن و نیز اظهار بیمار از بدتر شدن دید (به‌جز علل غیر قرنیه-ای مربوط به کاهش دید). معیارهای خروج شامل دیابت، بیماری‌های سیستمیک یا چشمی خود ایمن، کدورت قرنیه، سابقه کراتیت هرپسی، جراحی قبلی چشمی، حاملگی و شیردهی بود. تمام بیماران تحت معاینات کامل چشم پزشکی شامل دید اصلاح نشده و اصلاح شده با استفاده از چارت log MAR. معاینه اسلیت لمپ، تست شیرمر یک بدون قطره بی‌حسی، تست BUT، توپوگرافی پنتاکم، اسمولاریته اشک و میکروسکوپی کونفوکال قرار گرفتند. بیماران قبل از عمل، ۳ تا ۵ روز بعد از عمل و یک و شش ماه بعد از عمل معاینه شدند. بیمارانی که از لنز تماسی سخت استفاده می‌کردند دو هفته قبل از عمل و یک ماه بعد از عمل لنز را برداشتند. هم‌چنین، دو هفته قبل از هر معاینه لنز برداشته می‌شد. کراس‌لینکینگ بر اساس روش شرح داده شده توسط Wollensak و همکاران [۱۱] انجام شد. نخست برای بیماران بی حسی موضعی با قطره تتراکائین ۰/۵ درصد، (سینا دارو، ایران) انجام شد، سپس اپی‌تلیوم قرنیه به‌صورت مکانیکی از ۹ میلی‌متر مرکزی برداشته شد. ریپوفلاوین ۰/۱ درصد در دکستران ۲۰ درصد، (سینادارو، ایران) هر سه دقیقه برای ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس، جذب ریپو-فلاوین به داخل استرومای قرنیه و اتاق قدامی با معاینه اسلیت لمپ تأیید شد. قرنیه برای ۳۰ دقیقه در معرض اشعه UVA با طول موج ۳۶۵ نانومتر و توان ۳ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع قرار گرفت. در طول مواجهه با اشعه، قطره ریپوفلاوین هر سه دقیقه استفاده می‌شد. بعد از عمل قطره آنتی‌بیوتیک و استروئید موضعی ریخته شده و لنز تماسی درمانی گذاشته شد. لنز بعد از ترمیم اپی-

جدول شماره ۱- شاخص‌های بینایی، انکساری، توپوگرافیک و پاکی‌متریک قبل و ۶ ماه بعد از کراس‌لینکینگ در بیماران مورد مطالعه

	UCVA	BSCVA	Sub Ref SE	Cycl Ref SE	K1	K2	Kmax	Thin
قبل از کراس‌لینکینگ	$0.77 \pm 0.18$	$0.71 \pm 0.20$	$-2.68 \pm 2.26$	$-2.78 \pm 2.81$	$50.09 \pm 4.11$	$47.8 \pm 4.47$	$52.02 \pm 4.70$	$450.2 \pm 26.9$
۶ ماه بعد از کراس‌لینکینگ	$0.49 \pm 0.21$	$0.41 \pm 0.21$	$-2.40 \pm 2.42$	$-2.46 \pm 2.68$	$49.8 \pm 4.09$	$46.9 \pm 4.20$	$52.07 \pm 4.50$	$427.3 \pm 36.3$
P	۰/۰۱	۰/۰۰۲	۰/۲۴	۰/۴۰	۰/۳۱	۰/۰۴۶	۰/۰۳۳	۰/۰۳۸

CXL: corneal crosslinking, UCVA: uncorrected distance visual acuity (LogMAR), BSCVA: best spectacle corrected distance visual acuity (LogMAR), Sub Ref SE: subjective refraction spherical equivalent, Cycl Ref SE: cyclorefraction spherical equivalent, K1: corneal steepest meridian in pentacam, K2: flattest meridian in pentacam, Kmax: maximum K in pentacam, Thin: thinnest point pachymetry in pentacam

جدول شماره ۲- شاخص‌های اشکی قبل، یک ماه بعد و ۶ ماه بعد از کراس‌لینکینگ در بیماران مورد مطالعه

	Schirmer (mm)	BUT(seconds)	TO(mOsm/L)
قبل از کراس‌لینکینگ	۱۵/۶۹±۴/۰۶	۱۴/۰۶±۲/۲۳	۳۰۰/۷±۱۶/۵
۱ ماه بعد از کراس‌لینکینگ	۱۵/۴۱±۳/۷۴	۱۳/۱۹±۱/۶۷	۳۰۰/۳±۱۲/۹
۶ ماه بعد از کراس‌لینکینگ	۱۴/۹۱ ±۲/۴۹	۱۳/۲۸±۱/۴۹	۳۰۲/۱±۱۰/۸
<i>P</i>	۰/۲۴*	۰/۰۷ <sup>†</sup>	۰/۰۴۲*
<i>P</i> (قبل و یک ماه بعد)	۰/۶۷**	۰/۰۱۷ <sup>‡</sup>	۰/۱۶**
<i>P</i> (قبل و ۶ ماه بعد)	۰/۲۴**	۰/۰۲۱ <sup>‡</sup>	۰/۱۴**
<i>P</i> (یک ماه و ۶ ماه بعد)	۰/۳۲**	۰/۸۶۵ <sup>‡</sup>	۰/۱۷**

CXL: corneal crosslinking, BUT: break up time, TO: tear osmolarity

\*repeated measure test  
\*\*Paired t test  
†Friedman test  
‡Wilcoxon test

شاخص‌های میکروسکوپ کونفوکال:  
متوسط تراکم سلول‌های پایه اپی‌تلیال قبل از کراس-  
لینکینگ ۶۰۶/۳±۴۱۳/۸ سلول در میلی‌متر مربع، یک ماه بعد از  
عمل ۵۴۶/۰±۷۰۳/۶ سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد  
عمل ۵۴۶/۰±۷۰۳/۶ سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد  
(جدول شماره ۳)

شاخص‌های میکروسکوپ کونفوکال:  
متوسط تراکم سلول‌های پایه اپی‌تلیال قبل از کراس-  
لینکینگ ۶۰۶/۳±۴۱۳/۸ سلول در میلی‌متر مربع، یک ماه بعد از  
عمل ۵۴۶/۰±۷۰۳/۶ سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد  
عمل ۵۴۶/۰±۷۰۳/۶ سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد  
(جدول شماره ۳)

جدول شماره ۳- یافته‌های میکروسکوپ کونفوکال قبل، ۱ ماه بعد و ۶ ماه بعد از کراس‌لینکینگ در بیماران مورد مطالعه

	BECD	MCA	ASKD	MSKD	PSKD	ECD	Poly	Pelo
قبل از کراس‌لینکینگ	۶۰۰۶/۳±۴۱۳/۸	۱۷۱/۵±۱۵/۲	۸۸۰/۱ ±۸۵/۱	۶۴۴/۶ ±۱۱۸/۸	۶۰۲/۱±۹۷/۸	۳۰۰۵/۸ ±۳۰۴/۴	۲۷/۳±۳/۳	۳۱/۵±۸/۵
یک ماه بعد از کراس‌لینکینگ	۵۴۶/۰±۷۰۳/۶	۱۸۵/۴±۲۷/۸	۶/۵±۲۲/۱	۱۳۹/۴±۱۲۷/۲	۷۰۹/۳ ±۲۰۳/۹	۲۹۲۲/۳ ±۳۱۶/۴	۲۷/۱±۳/۶	۳۶/۵±۹/۷
۶ ماه بعد از کراس‌لینکینگ	۵۲۹۵/۱ ±۶۹۰/۱	۱۹۲/۲±۲۵/۸	۴۵/۵±۱۴/۳	۱۳۹/۴±۹۶/۵	۶۵۹/۶ ±۲۲۰/۲	۲۹۱۱/۳ ±۲۷۹/۴	۲۷/۲±۴/۷	۳۷/۸±۸/۷
<i>P</i>	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۰۴
<i>P</i> (قبل و یک ماه بعد)	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۳۲	۰/۳۴	۰/۲۱	۰/۰۴
<i>P</i> (قبل و ۶ ماه بعد)	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۱۶	۰/۲۲	۰/۰۹	۰/۰۴
<i>P</i> (یک ماه بعد و ۶ ماه بعد)	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۲۶	۰/۰۳

BECD: basal epithelial cell density, MCA: epithelial mean cell area, ASKD: anterior stromal keratocyte density, MSKD: middle stromal keratocyte density, PSKD: posterior stromal keratocyte density, ECD: endothelial cell density, Poly: polymegethism, Pleo: pleomorphism

و بعد از عمل قابل توجه بود، اما اختلاف بین یک ماه و شش ماه  
اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول شماره ۳). متوسط تراکم  
کراتوسیت‌ها در استرومای میانی قبل، یک ماه بعد و شش ماه بعد  
از عمل به ترتیب ۶۴۴/۶±۱۱۸/۸، ۱۳۹/۴±۱۲۷/۲ و ۱۳۹/۱±۹۶/۵  
سلول در میلی‌متر مربع بود که اختلاف بین مقادیر قبل و بعد از  
عمل قابل توجه بود، اما بین مقادیر یک ماه و شش ماه بعد از عمل  
اختلافی مشاهده نشد (جدول شماره ۳). متوسط تراکم کراتوسیت-  
ها در استرومای خلفی قرنی قبل از عمل ۶۰۲/۱۳±۹۷/۸ سلول در  
میلی‌متر مربع، یک ماه بعد از عمل ۷۰۹/۳±۲۰۳/۹ سلول در میلی-

متوسط سطح سلولی اپی‌تلیوم قبل از کراس‌لینکینگ ۱۷۱/۵±۱۵/۲  
میکرومتر مربع، یک ماه بعد از عمل ۱۸۵/۴±۲۷/۸ میکرومتر مربع و  
شش ماه بعد از عمل ۱۹۲/۲±۲۵/۸ میکرومتر مربع بود. اختلاف  
بین مقادیر پایه و بعد از عمل قابل توجه بود، اما بین یک ماه و  
شش ماه اختلافی مشاهده نشد (جدول شماره ۳). متوسط تراکم  
کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی قبل از کراس‌لینکینگ  
۸۸۰/۸±۸۵/۴ سلول در میلی‌متر مربع، یک ماه بعد از عمل  
۲۲/۱±۶/۵۳ سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد از عمل  
۱۴/۳۵±۴۵/۵ سلول در میلی‌متر مربع بود. اختلاف بین مقادیر قبل

انکساری و توپوگرافیک بیماران با عوارض ناچیز می‌شود [۱۵، ۱۴]. طبق اطلاعات ما مطالعه حاضر اولین مطالعه در راستای ارزیابی شاخص‌های اشکی و تمامی پارامترهای میکروسکوپ کونفوکال در یک نمونه ۳۲ چشمی با کراتوکونوس پیشرونده تحت درمان با کراس‌لینکینگ می‌باشد. تست‌های ارزیابی اشک شامل تست شیرمر ۱، تست BUT و اسمولاریته اشک اختلاف معنی‌داری را بعد از شش ماه نشان ندادند که علی‌رغم کاهش حساسیت قرنیه بعد از کراس‌لینکینگ در نتیجه آسیب به سلول‌های شبکه عصبی در استرومای قدامی [۱۷، ۱۶]، ناشی از بازگشت سریع حساسیت قرنیه می‌باشد. در افراد نرمال BUT بیش از ۱۰ ثانیه [۱۸] و تست شیرمر ۱ بیش از ۱۰ میلی‌متر می‌باشد [۱۹] و اسمولاریته اشک  $30.3/9.2 \pm 12/52$  میلی‌اسمول در لیتر است [۲۱، ۲۰] که میانگین تمام این پارامترها در بیماران ما قبل از عمل و یک و شش ماه بعد از عمل در محدوده نرمال قرار داشتند. مطالعات میکروسکوپی کونفوکال تغییرات زودرس و تأخیری ساختارهای میکروسکوپی قرنیه بعد از کراس‌لینکینگ را نشان دادند. وجود اعصاب قطع شده در شش ماه نخست و ظهور فیبرهای ارتباطی بعد از شش ماه نشان‌گر بازسازی اولیه و برگشت نسبی حساسیت قرنیه و رفلکس اشکی و به دنبال آن ارتباطات بیشتر عصبی و بهبود حساسیت قرنیه می‌باشد [۲۲]. این مطالعه ناپدید شدن فیبرهای عصبی زیر اپی‌تلیوم و استروما را در منطقه درمان شده و متعاقباً عصب‌گیری مجدد شش ماه بعد از عمل در مقایسه با پیگیری یک ماهه نشان داد. این یافته مطابق با مطالعات مشابه قبلی بود [۲۳، ۲۲، ۲۱]. ارزیابی ساختار میکروسکوپی فیبرهای عصبی توسط Mazzotta و همکاران [۸] نشان داد که رژنراسیون در شبکه عصبی زیر اپی‌تلیوم زودتر شروع شده که از ناحیه اشعه نخورده یک ماه بعد از جراحی رشد می‌کند، درحالی‌که فیبرهای استرومای قدامی از شبکه عصبی عمقی ۲ تا ۳ ماه بعد از کراس‌لینکینگ بازسازی می‌شوند. مطالعه حاضر نشان داد که رژنراسیون فیبرهای عصبی به تدریج بعد از عمل گسترش می‌یابد، با این حال ساختار شبکه عصبی تا شش ماه بعد از عمل قابل تشخیص نبود. در این مطالعه در راستای مطالعه Touboul و همکاران [۹]، نشان داده شد که تراکم کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی و میانی، و نه در استرومای خلفی، به شدت بعد از عمل کاهش یافته و افزایش آنها تا شش ماه بعد کامل نمی‌شود. این کاهش در هفته اول عمل شدیدتر بوده و به تدریج بهبودی پیشرفت می‌کند. در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری در شمار سلول‌های اندوتلیال قرنیه و پلی‌مگاتیسیم آنها در پیگیری یک ماهه و شش ماهه مشاهده شد که مطالعات مشابه قبلی نیز چنین بوده است [۱۱-۱۴، ۹]. به‌رحال افزایش قابل توجهی در

متر مربع و شش ماه بعد از عمل  $659/6 \pm 220/2$  سلول در میلی‌متر مربع بود که اختلاف مقادیر قبل و بعد از عمل و نیز بین یک ماه و شش ماه قابل توجه نبود (جدول شماره ۳). متوسط تعداد سلول‌های اندوتلیال قرنیه قبل از کراس‌لینکینگ  $30.5/8 \pm 3.05/4$  سلول در میلی‌متر مربع، یک ماه بعد از عمل  $2922/3 \pm 319/4$  سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد از عمل  $2911/3 \pm 279/4$  سلول در میلی‌متر مربع بود که اختلاف مقادیر پایه و بعد از عمل قابل توجه نبود (جدول شماره ۳). متوسط پلی‌مگاتیسیم اندوتلیال قرنیه قبل از عمل  $27/3 \pm 3/3$ ، یک ماه بعد  $27/6 \pm 3/6$  و شش ماه بعد  $27/2 \pm 4/7$  بود. اختلاف بین مقادیر قبل و بعد از عمل اهمیت آماری نداشت. متوسط پلنومورفیسیم اندوتلیال قرنیه قبل از عمل  $31/5 \pm 3/5$ ، یک ماه بعد  $36/7 \pm 9/5$  و شش ماه بعد  $37/8 \pm 9/8$  بود که اختلاف بین مقادیر قبل و بعد از عمل قابل توجه بود، اما بین مقادیر یک ماه و شش ماه پس از عمل اختلافی مشاهده نشد (جدول شماره ۳). بعد از یک ماه پیگیری شبکه عصبی زیر اپی-تلیال در ۲۵ چشم (۷۸/۱۲ درصد) وجود نداشت و در ۷ چشم (۲۱/۸۷ درصد) کاهش یافته بود. در پیگیری شش ماهه این شبکه در ۲۲ چشم (۶۸/۷۵ درصد) وجود نداشت و در ۱۰ چشم (۳۱/۲۵ درصد) کاهش یافته بود. التهاب خفیف تا متوسط در استرومای قرنیه در ۱۴ چشم (۴۳/۷ درصد) بعد از یک ماه مشاهده شد که تمام آنها بهبود کامل التهاب بعد از شش ماه را نشان دادند. ارتباط واضحی بین شاخص‌های اشکی و یافته‌های میکروسکوپ کونفوکال به‌جز کاهش یا فقدان شبکه عصبی زیر اپی‌تلیوم و افزایش اسمولاریته اشک در پیگیری یک ماهه مشاهده نشد. هیچ عارضه چشمی یا سیستمیک گزارش نگردید و فشار داخل چشم در طول پیگیری شش ماهه افزایش نداشت.

## بحث

کراس‌لینکینگ شامل فوتوپلیمریزاسیون فیبرهای کلاژن استروما ناشی از عملکرد ترکیبی یک ماده حساس به نور (ریبو-فلاوین یا ویتامین ب) و اشعه ماوراء بنفش A ( $365 \text{ UVA}$  نانومتر) می‌باشد که باعث سفت شدن قرنیه با افزایش تعداد اتصالات کوالان بین و داخل فیبری و افزایش مقاومت کلاژن به تخریب آنزیمی است [۱۲]. این درمان برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ در ایتالیا در بخش چشم پزشکی دانشگاه SIENA انجام شد که کاهش پیشرفت کراتوکونوس و کاهش نیاز به پیوند قرنیه را نشان داد [۱۳]. کراس‌لینکینگ در حال حاضر تنها راه تأخیر پیشرفت کراتوکونوس و کاهش نیاز به پیوند می‌باشد [۱۱، ۱۳]. در بسیاری از موارد کراس‌لینکینگ باعث بهبود وضعیت بینایی،

مطالعه کاهش ضخامت قرنیه مشاهده شد. با این حال، اطلاعات پانکی متریک پنتاکم در شش ماه نخست احتمالاً تحت تأثیر منفی نازک شدگی اپی‌تلیال، ادم قرنیه و کاهش کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی و میانی می‌باشد که باعث کاهش کاذب ضخامت بعد از عمل به دلیل تخمین کمتر از واقعیت و تغییرات رفلکتیوی استروما بعد از کراس‌لینکینگ می‌باشد که در آنالیز میکروسکوپی کونفوکال نیز تأیید شده است [۷، ۲۲]. احتمالاً مرز بین منطقه درمان شده و درمان نشده به‌عنوان سطح خلفی کاذب قرنیه تفسیر گردیده است. میکروسکوپی کونفوکال، OCT ویزانته و پانکی متری اولتراسوند کمتر تحت تأثیر تغییرات استروما قرار گرفته و بنابراین ابزار دقیق‌تری برای بررسی پانکی متری بعد از عمل می‌باشند [۷، ۲۲، ۲۸]. در این مطالعه ۴۳٪ درصد از چشم‌های درمان شده، سلول‌التهابی را نشان دادند که مشابه آن در بعضی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۲۸، ۲۹]. محدودیت اصلی مطالعه حاضر زمان پیگیری نسبتاً کوتاه آن می‌باشد. به‌رحال نتایج امید بخش بوده و ارزش پیگیری بیشتر تأثیر کراس‌لینکینگ در کنترل پیشرفت کراتوکونوس را دارد.

#### نتیجه‌گیری

کراس‌لینکینگ تأثیر پایداری روی تست‌های ارزیابی وضعیت اشک ندارد، ولی می‌تواند باعث کاهش شدید شبکه عصبی زیر اندوتلیال و تراکم کراتوسیت‌های استرومای قدامی و میانی در بررسی با میکروسکوپ کونفوکال گردد.

#### تشکر و قدردانی

از ریاست محترم بیمارستان فارابی جناب آقای دکتر جباروند، پرسنل خدمت بخش لیزیک بیمارستان فارابی و کارکنان بزرگوار بانک چشم که در انجام این تحقیق همکاری نزدیکی داشتند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

#### References:

- [1] Poulighen Y. Keratoconus; the Dooyne Lecture. *Eye (Lond)* 1987; 1 (Pt1): 1-14
- [2] Radner W, Zehemayer M, Skorpik C, Mallinger R. Altered organization of collagen in apex of keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 1998; 30(5): 327-32.
- [3] Andreasson TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1980; 31(4): 435-41.
- [4] Maeno A, Naor J, Lee HM, Hunter WS, Rootman DS. Three decades of corneal

پلنومورفیسیم سلولی اندوتلیال یک ماه بعد مشاهده شد که تا شش ماه هنوز باقی بود. فقدان شواهد کاهش سلول‌های اندوتلیال یک ملاحظه ایمنی مهم در ارزیابی کراس‌لینکینگ می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که در صورت برداشتن اپی‌تلیوم و ضخامت باقیمانده حداقل ۴۰۰ میکرومتر [۱۱، ۱۵، ۲۲]. کراس‌لینکینگ ایجاد آپتوزیس و نکروز کراتوسیت‌ها محدود به استرومای قدامی و میانی تا عمق ۳۰۰ میکرون خواهد کرد و از آسیب به اندوتلیوم جلوگیری می‌کند. در مطالعه حاضر کراس‌لینکینگ منجر به بهبود قابل توجه دید اصلاح نشده تا حد  $\log \text{MAR} 0.28$  و دید اصلاح شده تا  $\log \text{MAR} 0.3$  در طول شش ماه بعد از عمل گردید که مشابه بعضی مطالعات قبلی بود [۱۱، ۱۳، ۱۴]. کاهش مقدار کراتومتری در مطالعه حاضر بهبود دید بعد از عمل را توجیه می‌کند که در مطالعات قبلی توسط Wollensak و همکاران و نیز Koller و همکاران تأیید شده بود [۱۱، ۲۴]. در این مطالعه متوسط بهبود معادل اسفیری در شش ماه ۰/۲۸ دیوپتر برای رفرکشن سابجکتیو و ۰/۳۲ دیوپتر برای سایکلو رفرکشن بود، اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. کراتومتری بیشینه یک شاخص کلیدی توپوگرافی برای موفقیت کراس‌لینکینگ می‌باشد؛ چرا که شدت برجستگی قرنیه را در کراتوکونوس نشان می‌دهد. اگرچه حدود یک دیوپتر کاهش در کراتومتری بیشینه در این مطالعه ممکن است به اندازه کافی بازایی دید را کفایت نکند اما تأثیر تجمعی آن در سال‌های بعد احتمالاً چنین تأثیری خواهد داشت [۲۴]. به‌رحال پیگیری طولانی‌تر برای ادامه کاهش کراتومتری بیشینه در بیماران کراتوکونوس بعد از کراس‌لینکینگ لازم است. مطالعات قبلی کاهش کراتومتری حداکثر را به میزان ۲/۰۱ دیوپتر [۱۱]، ۱/۹۰ دیوپتر [۱۳]، ۱/۴۶ دیوپتر [۲۵] و ۱/۴۲ دیوپتر [۲۶] نشان داده‌اند. در حقیقت به‌نظر می‌رسد تغییر شکل قرنیه شاخص قابل اعتمادتری در توجیه تغییرات بالینی و توپوگرافیک ناشی از کراس‌لینکینگ می‌باشد [۲۲، ۲۵]. در این

transplantation: indications and patient characteristics. *Cornea* 2000; 19(1): 7-11.

[5] Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Witting C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32(2): 279-83

[6] Greenstein SA, Fry KL, Hersh MJ, Hersh PS. Higher-order aberrations after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38(2): 292-302

- [7] Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi 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(4): 390-97.
- [8] Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Sergio P, Caporossi T, Caporossi A. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation. *Eur J Ophthalmol* 2006; 16(4): 530-5.
- [9] Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial and accelerated corneal collagen cross linking procedures for keratoconus. *J Refract Surg* 2012; 28(11): 769-76.
- [10] Knappe S, Stachs O, Zhivov A, Hovakimyan M, Guthoff R. Results of confocal microscopy examinations after collagen cross linking with riboflavin and UVA light in patients with progressive keratoconus. *Ophthalmologica* 2011; 225(2): 95-104.
- [11] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 620-7.
- [12] Sloot F, Soeters N, Vandervalk R, Tahzib NG. Effective corneal collagen cross linking in advanced cases of progressive keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2013; 39(8): 1141-5.
- [13] Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32(5): 837-45.
- [14] Vinciguerra P, Albè E, Trazza S, Rosetta P, Vinciguerra R, Seiler T, et al. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. *Ophthalmology* 2009; 116(3): 369-78.
- [15] Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007; 26(4): 385-9.
- [16] Al-Aqaba M, Calienno R, Fares U, Otri AM, Mastropasqua L, Nubile M et al. The effect of standard and transepithelial ultraviolet collagen crosslinking on human corneal nerves: an ex vivo study. *Am J Ophthalmol* 2012; 153(2): 258-66.
- [17] Ishikawa T, Del Cerro M, Liang F, Loya N, Aquavella JV. Corneal sensitivity and nerve regeneration after excimer laser ablation. *Cornea* 1994; 13(3): 225-31.
- [18] Lemp MA, Hamill JR Jr. Factors affecting tear film breakup in normal eyes. *Arch Ophthalmol* 1973; 89(2): 103-5.
- [19] van Bijsterveld OP. Diagnostic tests In sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969; 82(1): 10-4.
- [20] Szalai E, Berta A, Szekanecz Z, Szucs G, Modis L. Evaluation of tear osmolarity in non-Sjögren and Sjögren syndrome dry eye patients with the tearLab system. *Cornea* 2012; 31(8): 867-71.
- [21] Jacobi C, Jacobi A, Kruse FE, Cursiefen C. Tear film osmolarity measurements in dry eye disease using electrical impedance technology. *Cornea* 2011; 30(12): 1289-92.
- [22] Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi O, Bovone C, Sparano MC, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modification. *Am J Ophthalmol* 2008; 146(4): 527-33.
- [23] Wasilwski D, Mello GH, Moreira H. Impact of Collagen Crosslinking on Corneal Sensitivity in Keratoconus Patients. *Cornea* 2013; 32(7): 899-902.
- [24] Koller T, Pajic B, Vinciguerra P, Seiler T. Flattening of the cornea after collagen crosslinking for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37(8): 1488-92.
- [25] Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34(5): 796-801.
- [26] Grewal DS, Brar GS, Jain R, Sood V, Singla M, Grewal SP. Corneal collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet-A light for keratoconus; one-year analysis using Scheimpflug imaging. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35(3): 425-32.
- [27] Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: The Siena eye cross study. *Am J Ophthalmol* 2010; 149(4): 585-93.
- [28] Croxatto JO, Tytium AE, Argento CJ. Sequential in vivo confocal microscopy study of corneal wound healing after cross-linking in patients with keratoconus. *J Refract Surg* 2010; 26(9): 638-45.
- [29] Esquenazi S, He J, Li N, Bazan HE. Immunofluorescence of rabbit corneas after collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A. *Cornea* 2010; 29(4): 412-7.