

## Original Article

# 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\_farajipour@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.

# تأثیر کراس لینکینگ بر یافته‌های میکروسکوپی کونفوکال و شاخص‌های اشکی در بیماران مبتلا به کراتوکونوس پیشروندۀ

\* حسن فرجی‌بور

## خلاصه:

سابقه و هدف: این مطالعه به منظور ارزیابی تغییرات شاخص‌های اشک و یافته‌های میکروسکوپی کونفوکال بعد از کراس لینکینگ قرنیه در بیماران مبتلا به کراتوکونوس پیشروندۀ 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 پیشروندۀ بررسی شدند. کراس لینکینگ 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 آزوچی صورت گرفت.

نتایج: در بررسی میکروسکوپی کونفوکال تمام چشم‌ها کاهش یا فقدان شبکه عصبی زیر اپی‌تلیالم نشان دادند. اختلاف تراکم سلول‌های بازال اپی‌تلیوم، متوسط سطح سلولی اپی‌تلیوم و تراکم کراتوستیت‌ها در استرومای قدامی و میانی و پلیمورفیسم سلول‌های اندوتلیال یک ماه و شش ماه بعد از کراس لینکینگ از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). تغییر در تعداد سلول‌های اندوتلیال و پلی‌میگاتیس بعد از شش ماه از نظر آماری معنی دار نبود. بهبود قابل توجه در حدت بینایی اصلاح نشده و اصلاح شده، مریدین مسطح و کراتومتری ماکسیمم در پنجمین بعد از شش ماه ایجاد شد.

نتیجه‌گیری: کراس لینکینگ می‌تواند باعث کاهش قابل توجه در شبکه عصبی زیر اپی‌تلیوم و تغییرات قابل توجه در تراکم کراتوستیت‌های استرومای قدامی و میانی شود.

**واژگان کلیدی:** کراتوکونوس، کراس لینکینگ، 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 کراس لینکینگ را نشان می‌دهند [۶]. مطالعات محدودی اثر کراس لینکینگ را روی آپوپتوز کراتوستیت‌ها در استرومای قدامی و میانی با استفاده از میکروسکوپی کونفوکال نشان داده است [۷-۱۰]. با توجه به اهمیت تاثیر کراس لینکینگ روی قسمت‌های مختلف قرنیه و سطح چشم و فقدان مطالعه مشابه، هدف مطالعه حاضر بررسی تمام شاخص‌های میکروسکوپی کونفوکال در بزرگترین سایزی که تاکنون روی بیماران کراتوکونوس پیشروندۀ انجام شده است، می‌باشد. علاوه براین، برای اولین بار در این مطالعه اثر کراس لینکینگ 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 نمونه گیری آسان وارد مطالعه شد. معیارهای ورود شامل سن بالای ۱۳ سال با کراتوکونوس پیشروندۀ، 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 کلارزن و ماتریکس خارج سلولی و نیز آپوپتوز کراتوستیت‌ها در استرومای قدامی و لایه بومن تا حدودی نازک شدگی بیومکانیکال قرنیه را توجیه می‌کند [۲]. افزایش آنزیم‌های پروتولیتیک و کاهش غلظت مهارکننده‌های پروتئاز، کاهش ضخامت استرومای و تغییر ساختار لایه‌های کلارزن به عنوان مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک کراتوکونوس مطرح می‌باشند [۳]. کراتوکونوس بیماری پیشروندۀ‌ای است که در اغلب موارد پیشرفت 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 کراس لینکینگ با استفاده از ریبوفلاوین 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: ۰۹۱۲ ۶۰۶۳۷۲۵، دوچرخه‌سواری: ۰۳۱ ۵۵۳۴۲۰۲۵

**پست الکترونیک:** h\_farajypour@yahoo.com

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

تیلیوم (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 نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ آنالیز شدند. متغیرها به شکل میانگین و انحراف معیار بیان شدند.  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار تلقی شد. تأثیرات درمان با استفاده از تست  $t$  زوجی بین زمانهای مختلف پرسه، گردید.

نماج

۳۲ چشم (۱۶ چشم راست و ۱۶ چشم چپ) از ۲۳ بیمار شامل ۱۸ مرد و ۵ زن وارد مطالعه شدند. میانگین سن بیماران  $46 \pm 9.1$  سال بود. جدول شماره ۱ خلاصه نتایج بینایی رفاقتیو، توبوگرافیک و پاکیمتیریک قبل و شش ماه بعد از کراس لینکینگ را نشان می دهد.

## شاخص‌های اشکی:

متوسط BUT قبل از کراس لینکینگ، یک ماه بعد و شش ماه بعد به ترتیب  $14.06 \pm 2.23$  ثانیه،  $13.91 \pm 1.67$  ثانیه و  $13.28 \pm 1.49$  ثانیه بود. تغییرات BUT در سه دوره زمانی مورد بررسی معنی دار بود. اختلاف قبل و بعد از ۱ ماه و ۶ ماه معنی دار بود، اما تغییرات بین ماه نخست تا ماه ششم معنی دار نبود. متوسط تست شیرمر ۱ قبل از کراس لینکینگ و یک ماه و شش ماه بعد از آن به ترتیب  $15.69 \pm 4.06$  میلی متر،  $15.41 \pm 3.74$  میلی متر و  $14.91 \pm 2.49$  میلی متر بود. هر چند نتایج این تست طی دوره مطالعه کاهاش نشان داد، اما تفاوت ها معنی دار نبود. متوسط اسمولاریته اشک قبل از عمل  $16.5 \pm 7.7$  میلی اسمول در لیتر، یک ماه بعد از عمل  $12.9 \pm 12.6$  میلی اسمول در لیتر و شش ماه بعد از عمل  $10.8 \pm 9.0$  میلی اسمول در لیتر بود. اختلاف مقادیر پایه و بعد از عمل معنی دار نبود. (جدول شماره ۲)

متری حداکثر کمتر از ۶۰ دیوبتر در پنتمام بودند. کراتوکونوس پیشرونده شامل یک یا بیشتر از موارد ذیل طی ۱۲ ماه بود: افزایش یک دیوبتر یا بیشتر در مریدین محدبتر، افزایش یک دیوبتر یا بیشتر در معادل اسپریک رفراکشن و نیز اظهار بیمار از بدتر شدن دید (به جز علل غیر قرنیه- ای مربوط به کاهش دید). معیارهای خروج شامل دیابت، بیماری- های 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 MAR log، معاینه اسلیت BUT، تست شیرمر یک بدون قطره بی حسی، تست توپوگرافی پنتمام، اسمولاریته اشک و میکروسکوپی کنفوکال 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 می کردند دو هفته قبل از عمل و یک ماه بعد از عمل لنز را برداشتند. همچنین، دو هفته قبل از هر معاینه لنز برداشته می شد. کراس لینکینگ براساس روش شرح داده شده توسط Wollensak و همکاران [۱۱] انجام شد. نخست برای بیماران بی حسی موضعی با قطره تراکائین ۰/۵ درصد، (سینا دارو، ایران) انجام شد، سپس اپی تلیوم قرنیه به صورت مکانیکی از ۹ میلی متر مرکزی برداشته شد. ریبوفلاوین ۰/۱ درصد در دکستان ۲۰ درصد، (سینادارو، ایران) هر سه دقیقه برای ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس، جذب ریبو- فلاوین به داخل استرومای قرنیه و اتاق قدامی با معاینه اسلیپ لمپ تأیید شد. قرنیه برای ۳۰ دقیقه در معرض اشعه UVA با طول موج ۳۶۵ نانومتر و توان ۳ میلی وات بر سانتی متر مربع قرار گرفت. در طول مواجهه با اشعه، قطره ریبوفلاوین هر سه دقیقه استفاده می شد. بعد از عمل قطره آنتی بیوتیک و استروئید موضعی ریخته شده و لنز تماسی درمانی گذاشته شد. لنز بعد از ترمیم ابی-

جدول شماره ۱- شاخص‌های بینایی، انکساری، توپوگرافیک و پاکی متريک قبل و ۶ ماه بعد از کراس‌لينکینگ در بيماران مورد مطالعه

	UCVA	BSCVA	Sub Ref SE	Cycl Ref SE	K1	K2	Kmax	Thin
قبل از کراس لینکینگ	+0.77 ± 0.18	+0.71 ± 0.20	-3.68 ± 2.26	-4.78 ± 2.81	50.0 ± 9.4 / 11	47.8 ± 4.47	54.0 ± 2.2 / 10	45.0 ± 2.2 / 9.9
۶ ماه بعد از کراس لینکینگ	+0.49 ± 0.21	+0.41 ± 0.21	-3.40 ± 2.42	-4.46 ± 2.68	49.8 ± 4.0 / 9	46.9 ± 4.20	53.0 ± 2.4 / 10	42.7 ± 3.6 / 3
P	0.01	0.002	0.24	0.40	0.31	0.46	0.33	0.38

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- شاخص های اشکی قبل، یک ماه بعد و ۶ ماه بعد از کراس لینکینگ در بیماران مورد مطالعه

	Schirmer (mm)	BUT(seconds)	TO(mOsm/L)
قبل از کراس لینکینگ	۱۵/۶۹±۴/۰۶	۱۴/۰۶±۲/۲۳	۳۰۰/۷±۱۶/۵
۱ ماه بعد از کراس لینکینگ	۱۵/۴۱±۳/۷۴	۱۳/۱۹±۱/۶۷	۳۰۰/۳±۱۲/۹
۶ ماه بعد از کراس لینکینگ	۱۴/۹۱ ±۲/۴۹	۱۳/۲۸±۱/۴۹	۳۰۲/۱±۱۰/۸
P	۰/۲۴*	۰/۰۷†	۰/۰۴۲*
(قبل و یک ماه بعد) P	۰/۶۷***	۰/۰۱۷‡	۰/۱۶***
(قبل و ۶ ماه بعد) P	۰/۲۴***	۰/۰۲۱‡	۰/۱۴***
(یک ماه و ۶ ماه بعد) P	۰/۳۲***	۰/۰۸۵‡	۰/۱۷***

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

\*repeated measure test

\*\*Paired t test

†Friedman test

‡Wilcoxon test

شاخص های میکروسکوپ کونفوکال:

متوسط تراکم سلول های پایه اپیتیلیال قبل از کراس لینکینگ  $600/6\pm413/8$  سلول در میلی متر مریع بود. اختلاف میان مقدار  $5295/3\pm690/1$  قبل و بعد از عمل از نظر آماری معنی دار بود ( $P<0/05$ ) اما اختلاف نتایج بین یک ماه و شش ماه بعد از عمل قابل توجه نبود.

(جدول شماره ۳)

عمل شماره  $5460/5\pm703/6$  سلول در میلی متر مریع و شش ماه بعد

جدول شماره ۳- یافته های میکروسکوپ کونفوکال قبل، ۱ ماه بعد و ۶ ماه بعد از کراس لینکینگ در بیماران مورد مطالعه

	BECD	MCA	ASKD	MSKD	PSKD	ECD	Poly	Pelo
قبل از کراس لینکینگ	۶۰۰/۶/۳±۴۱۳/۸	۱۷۱/۵±۱۵/۲	۸۸/۰/۱ ±۸۵/۱	۶۴۴/۶±۱۱۸/۸	۶۰۲/۱±۹۷/۸	۳۰۰/۵/۸ ±۳۰۴/۴	۲۷/۳±۳/۳	۳۱/۵±۸/۵
یک ماه بعد از کراس لینکینگ	۵۴۶۰/۵±۷۰۳/۶	۱۸۵/۴±۲۷/۸	۶/۰±۲۲/۱	۱۳۹/۴ ±۱۲۷/۲	۷۰۹/۳±۲۰۲/۹	۲۹۲۲/۳ ±۳۱۶/۴	۲۷/۱±۳/۶	۳۶/۵±۹/۷
۶ ماه بعد از کراس لینکینگ	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
P	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۰۴
(قبل و یک ماه بعد) P	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۲۱	۰/۰۴
(قبل و ۶ ماه بعد) P	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۰۴
(یک ماه بعد و ۶ ماه بعد) P	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۱۱	۰/۰۶	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, Pelo: pleomorphism

و بعد از عمل قابل توجه بود، اما اختلاف بین یک ماه و شش ماه اختلاف معنی داری نداشت (جدول شماره ۳). متوسط تراکم کراتوسیت ها در استرومای میانی قبل، یک ماه بعد و شش ماه بعد از عمل به ترتیب  $139/۴\pm127/۲$ ,  $644/۶\pm118/۸$  و  $139/۴\pm96/۵$  سلول در میلی متر مریع بود که اختلاف بین مقدار قبل و بعد از عمل قابل توجه بود، اما بین مقدار یک ماه و شش ماه بعد از عمل اختلاف مشاهده نشد (جدول شماره ۳). متوسط تراکم کراتوسیت ها در استرومای خلفی قرنیه قبل از عمل  $602/13\pm97/۸$  سلول در میلی متر مریع، یک ماه بعد از عمل  $709/3\pm203/۹$  سلول در میلی-

متوسط سطح سلولی اپیتیلیوم قبل از کراس لینکینگ  $171/5\pm15/2$  میکرومتر مریع، یک ماه بعد از عمل  $185/4\pm27/۸$  میکرومتر مریع و شش ماه بعد از عمل  $192/2\pm25/۸$  میکرومتر مریع بود. اختلاف بین مقدار پایه و بعد از عمل قابل توجه بود، اما بین یک ماه و شش ماه اختلاف مشاهده نشد (جدول شماره ۳). متوسط تراکم کراتوسیت ها در استرومای قدامی قبل از کراس لینکینگ  $880/8\pm85/۴$  سلول در میلی متر مریع، یک ماه بعد از عمل  $22/1\pm6/۵۳$  سلول در میلی متر مریع و شش ماه بعد از عمل  $14/35\pm45/۵$  سلول در میلی متر مریع بود. اختلاف بین مقدار 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 ۲۲ چشمی با کراتوکونوس پیشرونده تحت درمان با کراس لینکینگ 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 کراس لینکینگ 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 ۳۰۳/۹۲±۱۲/۵۲ 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 کراس لینکینگ 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 بهدلیل آن ارتباطات بیشتر عصبی و بهبود حساسیت قرنیه می‌باشد [۲۲]. این مطالعه نایدید شدن فیبرهای عصبی زیر اپی‌تلیوم و استرومای را در منطقه درمان شده و متعاقباً عصب گیری مجدد شش ماه بعد از عمل در مقایسه با پیگیری یک ماهه نشان داد. این یافته مطابق با مطالعات مشابه قبلی بود [۲۳, ۷۸, ۲۲]. ارزیابی ساختار میکروسکوپی فیبرهای عصبی توسط Mazzotta و همکاران [۸] نشان داد که رژئراسیون در شبکه عصبی زیر اپی‌تلیوم زودتر شروع شده که از ناحیه اشعه نخورده یک ماه بعد از جراحی رشد می‌کند، درحالی که فیبرهای استرومای قدامی از شبکه عصبی عمیقی ۲ تا ۳ ماه بعد از کراس لینکینگ بازسازی می‌شوند. مطالعه حاضر نشان داد که رژئراسیون 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 کراتوپیست‌ها 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 اندوتیال قرنیه و پلی‌مکاتیسم آنها در پیگیری یک ماهه و شش ماهه مشاهده شد که مطالعات مشابه قبلی نیز چنین بوده است [۱۱, ۱۴, ۹]. بهر حال افزایش قابل توجهی در

متر مربع و شش ماه بعد از عمل  $659/6\pm220/2$  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 اندوتیال قرنیه قبل از کراس لینکینگ  $3005/8\pm305/4$  سلول در میلی‌متر مربع، یک ماه بعد از عمل  $2922/3\pm319/4$  سلول در میلی‌متر مربع و شش ماه بعد از عمل  $2911/3\pm279/4$  سلول در میلی‌متر مربع بود که اختلاف مقادیر پایه و بعد از عمل قابل توجه نبود (جدول شماره ۳). متوسط پلی‌مکاتیسم اندوتیال قرنیه قبل از عمل  $27/3\pm3/3$ ، یک ماه بعد از عمل  $27/6\pm3/6$  و شش ماه بعد  $27/2\pm4/7$  بود. اختلاف بین مقادیر قبل و بعد از عمل اهمیت آماری نداشت. متوسط پلی‌مورفیسم اندوتیال قرنیه قبل از عمل  $31/5\pm3/5$ ، یک ماه بعد از عمل  $36/7\pm9/5$  و شش ماه بعد  $37/8\pm9/8$  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 اپی‌تلیال 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

کراس لینکینگ شامل فوتولیمیریزاسیون فیبرهای کلاژن استرومای ناشی از عملکرد ترکیبی یک ماده حساس به نور (ریبو-فلاؤین یا ویتامین ب) و اشعه ماوراء بنفش A (UVA ۳۶۵ نانومتر) می‌باشد که باعث سفت شدن قرنیه با افزایش تعداد اتصالات کوالان بین و داخل فیبری و افزایش مقاومت کلاژن به تخریب آنژیمی 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]. کراس لینکینگ در حال حاضر تنها راه تأخیر پیشرفت کراتوکونوس و کاهش نیاز به پیوند می‌باشد [۱۱, ۱۳]. در بسیاری از موارد کراس لینکینگ باعث بهبود وضعیت بینایی،

مطالعه کاهش ضخامت قرنیه مشاهده شد. با این حال، اطلاعات پاکی‌متريک پتاكم در شش ماه نخست احتمالاً تحت تأثير منفي نازك شدگي اپي تيلال، ادم قرنیه و کاهش کراتوسیت‌ها در استرومای قدامی و میانی می‌باشد که باعث کاهش کاذب ضخامت بعد از عمل به دليل تخمين کمتر از واقعیت و تغیيرات رفلکتوبیتی استرومای بعد از کراس‌لينکینگ می‌باشد که در آنالیز میکروسکوپی کونفوکال نیز تأیید شده است [۷، ۲۲]. احتمالاً مرز بین منطقه درمان شده و درمان نشده به عنوان سطح خلفی کاذب قرنیه تفسیر گردیده است. میکروسکوپی کونفوکال، OCT ویزانته و پاکی‌متري اولتراسوند کمتر تحت تأثير تغیيرات استرومای قرار گرفته و بنابراین ابزار دقیق‌تری برای بررسی پاکی‌متري بعد از عمل می‌باشد [۲۷، ۲۲، ۸، ۷]. در اين مطالعه ۴۳/۷ درصد از چشم‌های درمان شده، سلول‌های را نشان دادند که مشابه آن در بعضی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۲۹، ۲۸]. محدودیت اصلی مطالعه حاضر زمان پیگیری نسبتاً کوتاه آن می‌باشد. به‌حال نتایج اميد بخش بوده و ارزش پیگیری بيشتر تأثير کراس‌لينکینگ در کنترل پیشرفت کراتوکونوس را دارد.

#### نتیجه‌گیری

کراس‌لينکینگ تأثير پايداري روی تست‌های ارزیابی وضعیت اشک ندارد، ولی می‌تواند باعث کاهش شدید شبکه عصبی زیر اندولیال و تراکم کراتوسیت‌های استرومای قدامی و میانی در بررسی با میکروسکوپ کونفوکال گردد.

#### تشکر و قدردانی

از رياست محترم بيمارستان فارابي جناب آقاي دكتر جباروند، پرسنل خدوم بخش ليزيك بيمارستان فارابي و كاركتان بزرگوار بانک چشم که در انجام اين تحقيق همکاري نزديکی داشتند، صميماهه قدردانی می‌گردد.

#### References:

- [1] Pouliquen Y. Keratoconus; the Doyne 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

پلثمورفیسم سلولی اندولیال يك ماه بعد مشاهده شد که تا شش ماه هنوز باقی بود. فقدان شواهد کاهش سلول‌های اندولیال يك ملاحظه ايمني مهم در ارزیابی کراس‌لينکینگ می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که در صورت برداشتن اپي تيلوم و ضخامت باقیمانده حداقل ۴۰۰ میکرومتر [۱۱، ۱۵، ۲۲]، کراس‌لينکینگ ايجاد آپوپتوز و نکروز کراتوسیت‌ها محدود به استرومای قدامی و میانی تا عمق ۳۰۰ میکرون خواهد کرد و از آسیب به اندولیوم جلوگیری می‌کند. در مطالعه حاضر کراس‌لينکینگ منجر به بهبود قابل توجه دید اصلاح نشده تا حد MAR<sup>0/۲۸</sup> log و دید اصلاح شده تا حد MAR<sup>۰/۳</sup> log 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 توجه می‌کند که در مطالعات قبلی توسط Wollensak و همکاران و نیز Koller و همکاران تأیید شده بود [۱۱، ۲۴]. در اين مطالعه متوسط بهبود معادل اسفری در شش ماه ۰/۲۸ دیوپتر برای رفرکشن سابجکتیو و ۰/۳۲ دیوپتر برای سایكلو رفرکشن بود، اما اين تغیيرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. کراتومتری بيشينه يك شاخص کلیدی توپوگرافی برای موقفيت کراس‌لينکینگ می‌باشد؛ چرا که شدت برجستگي قرنیه را در کراتوکونوس نشان می‌دهد. اگرچه حدود يك دیوپتر کاهش در کراتومتری بيشينه در اين مطالعه ممکن است به اندازه کافی بازیابی دید را کفايت نکند اما تأثير تجمعی آن در سال‌های بعد احتمالاً چنین تأثيری خواهد داشت [۲۴]. به‌حال پیگیری طولانی‌تر برای ادامه کاهش کراتومتری بيشينه در بيماران کراتوکونوس بعد از کراس‌لينکینگ لازم است. مطالعات قبلی کاهش کراتومتری حداکثر را به ميزان ۲/۰۱ دیوپتر [۱۱]، ۱/۹۰ دیوپتر [۱۳]، ۱/۴۶ دیوپتر [۲۵] و ۱/۴۲ دیوپتر [۲۶] نشان داده‌اند. در حقیقت به‌نظر می‌رسد تغیير شکل قرنیه شاخص قابل اعتمادتری در توجيه تغیيرات بالینی و توپوگرافیک ناشی از کراس‌لينکینگ می‌باشد [۲۲، ۲۵]. در اين

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 ofUVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007; 26(4): 385–9.
- [16] Al-Aqaba M, Calienno R, Fares U, Otri AM, Mastropasqua L, Nobile 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, Tytun 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.