

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE “CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT**

Evaluarea proprietăților biomecanice corneene la
pacienții cu keratoconus după efectuarea crosslinkingului
cornean fotooxidativ

Conducător științific:

*PROF. UNIV. DR. LILIANA MARY
VOINEA*

Doctorand:

*DR. MIRUNA-GABRIELA CRISTEA
(BURCEL)*

2018

CUPRINS

CUPRINS.....	1
LISTĂ DE ABREVIERI.....	6
I. PARTEA GENERALĂ.....	7
1 ANATOMIA ȘI FIZIOLOGIA CORNEANĂ.....	7
1.1 Embriologia corneei.....	7
1.2 Anatomia corneei.....	8
1.3 Filmul lacrimal.....	10
2 PROPRIETĂȚILE BIOMECANICE CORNEENE.....	12
3 NOȚIUNI DE EPIDEMIOLOGIE ȘI ETIOPATOGENIE ÎN KERATOCONUS.....	19
3.1 Repere epidemiologice.....	19
3.2 Etiopatogenia keratoconusului.....	20
3.2.1 Factorii de mediu.....	20
3.2.2 Factorii genetici.....	22
4 DIAGNOSTICUL CLINIC ÎN KERATOCONUS.....	25
5 DIAGNOSTICUL PARACLINIC ÎN KERATOCONUS.....	28
5.1 Topografia corneană.....	28
5.2 Pahimetria.....	30
5.3 Microscopia confocală.....	33
6 CLASIFICĂRI ALE KERATOCONUSULUI.....	34
6.1 Clasificarea Amsler-Krumeich.....	34
6.2 Clasificarea morfologică.....	35
6.3 Clasificarea topografică.....	35
6.4 Clasificarea Alio-Shabayek.....	36

6.5	Clasificarea Belin	37
7	TRATAMENTUL KERATOCONUSULUI.....	39
7.1	Corecția optică	39
7.2	Crosslinking-ul cornean	41
7.2.1	Modalitățile și mecanismul crosslinkingului	41
7.2.2	Indicațiile crosslinkingului fotooxidativ	43
7.2.3	Contraindicațiile crosslinkingului fotooxidativ.....	47
7.2.4	Tipuri de protocoale utilizate.....	47
7.2.5	Complicațiile crosslinkingului cornean fotooxidativ	54
7.3	Tratamentul chirurgical în keratoconus	57
7.3.1	Inele intracorneene.....	57
7.3.2	Alte tratamente chirurgicale în keratoconus.....	59
7.3.3	Keratoplastia	60
7.3.4	Tratamente noi în keratoconus.....	64
8	MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	66
II.	CONTRIBUȚII PERSONALE.....	69
9	EVALUAREA CONCENTRAȚIILOR DE ALBUMINĂ, LIZOZIM ȘI LACTOFERINĂ ÎN LACRIMILE PACIENȚILOR CU KERATOCONUS ȘI CORELAȚIILE LOR CU PARAMETRII IMPORTANTI AI AFECȚIUNII.....	69
9.1	Introducere.....	69
9.2	Material și metode.....	70
9.2.1	Designul studiului.....	70
9.3	Metode de întocmire a bazei de date	71
9.4	Recoltarea probelor biologice	72
9.5	Metoda de determinare a concentrației lacrimale a lactoferinei, la pacienții cu keratoconus	73

9.5.1	Mod de lucru	73
9.6	Metoda de determinare a concentrației lacrimale a proteinei lizozim C, la pacienții cu keratoconus	74
9.6.1	Mod de lucru	75
9.7	Metoda de determinare a concentrației lacrimale a proteinei albumină, la pacienții cu keratoconus	76
9.7.1	Mod de lucru	76
9.8	Metode de analiză statistică	77
9.9	Rezultate	78
9.9.1	Descrierea loturilor de participanți studiate	78
9.9.2	Evaluarea concentrațiilor lactoferinei, lizozimului și albuminei la pacienții cu keratoconus comparativ cu lotul martor	79
9.9.3	Concentrația lactoferinei în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor	80
9.9.4	Concentrația lizozimului în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor	81
9.9.5	Concentrația albuminei serice în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor	83
9.9.6	Keratometria	85
9.9.7	Pahimetria	86
9.9.8	Histerezisul cornean (CH).....	87
9.9.9	Factorul de rezistență corneană (CRF)	89
9.9.10	Indicele de keratoconus (KMI-keratoconus match index)	90
9.9.11	Corelații statistice între proteinele filmului lacrimal și parametrii ai afecțiunii la pacienții cu keratoconus	91
9.10	Discuții	100
10	EVALUAREA CROSSLINKINGULUI CORNEAN UTILIZÂND PROCEDEUL STANDARD COMPARATIV CU PROCEDEUL	

ACCELERAT ÎN TRATAMENTUL KERATOCONUSULUI- REZULTATE LA 2 ANI.....	106
10.1 Introducere.....	106
10.2 Material și Metode	108
10.2.1 Protocolul studiului.....	108
10.3 Procedurile	109
10.3.1 Crosslinkingul cornean-procedeul standard.....	109
10.3.2 Crosslinkingul cornean-procedeul accelerat.....	110
10.4 Analiza statistică	110
10.5 Rezultate.....	111
10.6 Acuitatea vizuală	112
10.6.1 Acuitatea vizuală fără corecție	112
10.6.2 Acuitatea vizuală cu corecție	115
10.7 Parametrii refractivi	117
10.8 Keratometria	119
10.9 Pahimetria	123
10.10 Parametrii biomecanicii corneene	124
10.10.1 Histerezisul cornean.....	124
10.10.2 Factorul de rezistență corneană.....	125
10.10.3 Indicele de keratoconus.....	127
10.10.4 Indicele de probabilitate a keratoconusului	128
10.11 Corelații pe tip de tratament între parametrii biomecanici și alți parametrii ai afecțiunii pe tip de tratament.....	130
10.12 Linia de demarcație.....	139
10.13 Discuții	145
11 EVALUAREA CROSSLINKINGULUI CORNEAN CONVENȚIONAL CU DEZEPITELIZARE ÎN	

TRATAMENTULUL KERATOCONSULUI	
PROGRESIV:COMPARAȚIE ÎNTRE RIBOFLAVINA 0.1% CU	
DEXTRAN 20% ȘI RIBOFLAVINA CU HPMC 1.1%.....	152
11.1 Introducere.....	152
11.2 Protocolul studiului.....	153
11.3 Procedurile	154
11.3.1 Crosslinkingul cornean-procedeul standard utilizând riboflavina 0.1%	
cu dextran 20%	154
11.3.2 Crosslinkingul cornean-procedeul standard utilizând riboflavina cu	
HPMC 1.1%-	155
11.4 Analiza statistică	155
11.5 Rezultate.....	156
11.5.1 Acuitatea vizuală.....	158
11.5.2 Parametrii refractivi	160
11.5.3 Keratometria.....	162
11.5.4 Pahimetria.....	164
11.6 Parametrii biomecanicii corneene	165
11.6.1 Histerezisul cornean.....	165
11.6.2 Indicele de keratoconus.....	168
11.6.3 Linia de demarcație.....	169
11.7 Discuții.....	171
12 CONCLUZII	175
13 BIBLIOGRAFIE.....	178
CUPRINS LISTA FIGURILOR	197
CUPRINS LISTA TABELELOR	201

Partea generală este structurată în 8 capitole. Primul capitol sintetizează date despre anatomia și embriologia corneei și despre filmul lacrimal. Al doilea capitol sumarizează date despre proprietățile biomecanice corneene, în timp ce capitolul 3 evidențiază noțiuni generale despre etiopatogeneza keratoconusului. Capitolele 4 și 5 includ date despre diagnosticul clinic și paraclinic în keratoconus, iar capitolul 6 descrie clasificările acestei afecțiuni. În capitolul 7 sunt revizuite metodele de tratament disponibile în prezent. Noțiunile expuse în stadiul actual al cunoașterii constituie o bază justificativă pentru studiile care alcătuiesc partea de contribuții personale.

Trecerea de la partea generală la partea specială se realizează coerent, în capitolul 8 fiind descrise aspecte referitoare la motivația alegerii temei de doctorat prin prezentarea datelor actuale și a principalelor ipoteze de lucru, precum și scopul și obiectivele studiilor întreprinse.

Tema abordată în lucrarea de față este de actualitate în domeniul oftalmologiei întrucât deși keratoconusul constituie o patologie corneană intens studiată, etiopatogeneza este incomplet înțeleasă, iar metodele de detectare precoce și terapeutice rămân limitate. Mai mult decât atât, modificările proprietăților biomecanice corneene la pacienții cu keratoconus au fost amplu studiate în ultimii ani, cu speranța de a utiliza indicii biomecanici pentru detectarea keratoconusului subclinic, pornind de la faptul că aceștia se modifică înainte ca afecțiunea să poată fi evidențiată topografic. De asemenea evaluarea proteomului asociat keratoconusului, prin evaluarea compoziției lacrimilor poate furniza date importante referitoare la înțelegerea mecanismelor etiopatogenice din keratoconus.

Obiectivele urmărite de cercetarea doctorală au fost următoarele:

- ✓ evaluarea nivelurilor de albumină, lizozim și lactoferină, în lacrimile pacienților cu keratoconus, comparativ cu ale unui lot control, de subiecți normali.
- ✓ determinarea existenței unor corelații între aceste proteine și parametrii importanți ai afecțiunii.
- ✓ raportarea rezultatelor la 2 ani ale crosslinking-ului cornean convențional cu dezepitelizare (tehnica epi-off) protocolul standard comparativ cu ale crosslinking-ului accelerat, la pacienții cu keratoconus progresiv.

- ✓ evaluarea eficienței și siguranței la 1 an a crosslinking-ului convențional cu dezepitelizare-tehnica epi off folosind riboflavină 0,1% cu dextran 20% comparativ cu utilizarea roboflavinei 0,1% cu hidroxipropilmetilceluloză 1.1% la pacienții cu keratoconus progresiv.

Partea specială cuprinde 3 studii, fiecare dintre ele începând cu enunțarea obiectivelor, continuând cu considerațiile etice luate în calcul, enunțarea criteriilor de includere și excludere, metodele de examinare utilizate, analiza statistică efectuată și prezentarea rezultatelor obținute cu ajutorul a numeroase tabele și grafice, terminându-se cu discuții și concluzii.

Primul studiu efectuat a fost un studiu prospectiv observațional în care am evaluat mai multe proteine componente ale filmului lacrimal la pacienții cu keratoconus comparativ cu un lot martor. De asemenea am realizat o evaluare descriptivă și statistică a rezultatelor, pentru a stabili existența unor posibile corelații între datele obținute.

Material si metode

Pentru lotul martor au fost selectați participanți cu examen oftalmologic normal, astfel încât distribuția de vârstă și sex să fie similară în ambele loturi.

În componența lotului de studiu au fost selectați pacienți diagnosticați cu keratoconus care au fost examinați prin evaluare oftalmologică standard.

Atât participanții care au aparținut lotului martor cât și pacienții recrutați au fost selectați din rândul subiecților care s-au prezentat în perioada ianuarie 2017- iunie 2017 la clinica Oftaclinic, București, pentru consult oftalmologic.

Studiul s-a desfășurat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și cu aprobarea comisiei de etică a Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila București.

Toți pacienții au semnat un consimțământ informat care a fost explicat individual fiecărui pacient în parte pe înțelesul acestuia. Pacienții au fost informați cu privire la scopul acestui studiu, metodologia de cercetare, testele la care vor fi supuși.

Criteriile stabilite în vederea includerii în studiu pentru grupul cu keratoconus au fost: aspect al topografiei corneene sugestiv pentru keratoconus și conform clasificării Amsler Krumeich bazată pe valorile refracției, grosimea corneană și pe valorile dioptrice corneene pe meridianul cel mai refringent, pacienți care au fost supuși intervenției de crosslinking cornean fotooxidativ.

Criteriile de excludere pentru grupul cu keratoconus au fost următoarele: existența unei alergii oculare sau sistemice, existența inflamației locale sau sistemice, tratamente cu antiinflamatorii locale sau sistemice, sindrom de ochi uscat.

Au fost recrutați 16 pacienți cu keratoconus și 14 pacienți cu examinare oftalmologică normală. În cazul pacienților cu keratoconus, pentru includerea în studiu și analiza statistică a fost ales ochiul cu stadiu mai avansat de boală.

Recoltarea probelor biologice

Colectarea de lacrimi a fost efectuată cu atenție, fără anestezie locală. Pentru a evita lăcrimarea reflexă, am colectat probele într-o încăpere slab iluminată. Am utilizat tuburi capilare de 50 μ l pentru a colecta un minim de 15 μ l de lacrimi din sacul conjunctival inferior prin atracție capilară. După procedura de colectare lacrimile au fost transferate în tuburi Eppendorf. Pentru fiecare eșantion am folosit microcapilare și tuburi Eppendorf noi. După recoltare probele au fost depozitate la -80°C în decurs de o oră, fără centrifugare, până la analiză.

Rezultate

Concentrația lactoferinei în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor

În cazul lactoferinei (exprimată în mg/ml), prin analiza ELISA a lacrimilor pacienților și subiecților din lotul martor am obținut concentrații de 0.20 ± 0.21 mg/ml, și, respectiv, 1.06 ± 1.17 mg/ml (Fig. 1).

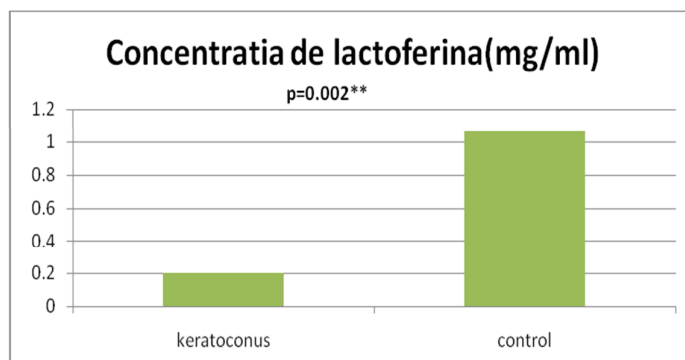


Fig. 1 Mediile concentrației de lactoferină, exprimată în mg/ml în lacrimile pacienților cu KC, comparativ cu lotul de control

Concentrația lizozimului în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor

În lacrimile pacienților cu keratoconus, concentrația lizozimului a atins valori de 2.85 ± 2.08 mg/ml, în timp ce în lacrimile participanților care au format lotul de control s-au înregistrat valori de 1.63 ± 0.3 mg/ml. (Fig. 2)

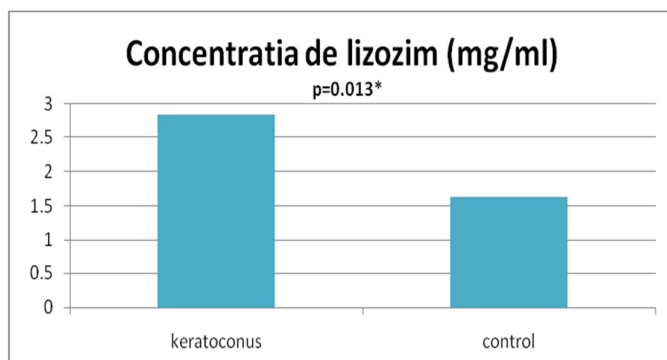


Fig. 2 Mediile concentrației de lizozim, exprimată în mg/ml în lacrimile pacienților cu KC, comparativ cu lotul de control

Concentrația albuminei serice în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor

În cadrul acestui studiu, s-a măsurat concentrația albuminei serice în lacrimi și am obținut următoarele rezultate.

Prin analiza ELISA a lacrimilor, am obținut valori medii de 7.49 ± 5.06 μ g/ml, pentru lotul format din pacienți diagnosticați cu keratoconus și 4.35 ± 2.43 μ g/ml, pentru lotul format din participanți sănătoși (Fig. 3).

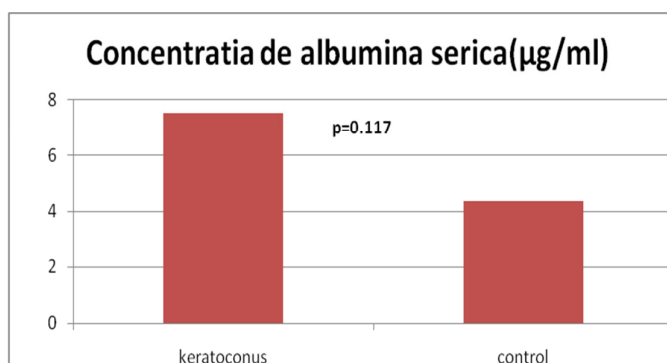


Fig. 3 Mediile concentrației de albumină, exprimată în μ g/ml în lacrimile pacienților cu KC, comparativ cu lotul de control

Tabel 1 Corelație între stadiul bolii și proteinele determinate în filmul lacrimal al pacienților cu keratoconus - Coeficientul de corelație Spearman
Corelații

			stadiu	Lactoferină	Lizozim	Albumină
Spearman's rho	Correlation Coefficient		1.000	-.779**	.742**	.340
	stadiu	Sig. (2-tailed)	.	.000	.001	.197
		N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient		-.779**	1.000	-.571*	-.368
	Lactoferina	Sig. (2-tailed)	.000	.	.021	.161
		N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient		.742**	-.571*	1.000	.100
	Lizozim	Sig. (2-tailed)	.001	.021	.	.713
		N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient		.340	-.368	.100	1.000
	Albumina	Sig. (2-tailed)	.197	.161	.713	.
		N	16	16	16	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

În tabelul de mai sus sunt prezentați coeficienții de corelație rezultați în urma analizei statistice cu testul Spearman.

Așadar, putem observa corelații puternice statistice între lactoferină, lizozim și severitatea bolii (cuantificată prin stadiul Amsler), cu un nivel de încredere de 99%, exceptând corelația dintre albumină și stadiul bolii, care este slabă și ne semnificativă din punct de vedere statistic.

După cum putem observa valoarea coeficientului de corelație Spearman dintre lactoferină și severitatea bolii indică o corelație puternică, negativă, indirectă ($\rho = -0.799$, $p=0.0001^{**}$), ceea ce semnifică faptul că atunci când boala este într-un stadiu mai avansat, concentrația de lactoferină este mai scăzută. Valoarea coeficientului de corelație Spearman dintre lizozim și severitatea afecțiunii indică de asemenea o corelație puternică, dar directă, pozitivă ($\rho = 0.742$), ceea ce semnifică faptul că atunci când boala este într-un stadiu mai avansat, există o creștere mai mare a concentrației de lizozim în filmul lacrimal. De altfel, valoarea coeficientului de corelație Spearman dintre albumină și stadiul

bolii indică o corelație slabă, directă ($\rho = 0.340$, $p = 0.197$), fără a fi semnificativă statistic cu un nivel de încredere de peste 95 %.

Tabel 2 Corelație între CH și proteinele determinate în filmul lacrimal al pacienților cu keratoconus - Coeficientul de corelație Spearman
Corelații

		CH	Lactoferina	Lizozim	Albumina
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.837**	-.571*	-.386
	CH Sig. (2-tailed)	.	.000	.021	.140
	N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient	.837**	1.000	-.571*	-.368
	Lactoferina Sig. (2-tailed)	.000	.	.021	.161
	N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient	-.571*	-.571*	1.000	.100
	Lizozim Sig. (2-tailed)	.021	.021	.	.713
	N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient	-.386	-.368	.100	1.000
	Albumina Sig. (2-tailed)	.140	.161	.713	.
	N	16	16	16	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

În tabelul de mai sus sunt prezentați coeficienții de corelație rezultați în urma analizei statistice cu testul Spearman.

Așadar putem observa, o corelație puternică, pozitivă, directă ($\rho = 0.837$, $p = 0.0001$) între histerezisul cornean și concentrația lactoferinei, cu un nivel de încredere de 99%, ceea ce semnifică faptul că o creștere cu 1 unitate a histerezisului cornean se corelează cu o creștere a concentrației lactoferinei. De asemenea, se observă o corelație moderată, negativă, indirectă ($\rho = -0.571$, $p = 0.021$), cu un nivel de încredere de 95% între histerezisul cornean și lizozim, ceea ce indică faptul că o creștere cu 1 unitate a histerezisului cornean se corelează cu o scădere a concentrației de lizozim, fiind valabilă și reciprocă și anume o creștere a concentrației lizozimului din filmul lacrima se corelează cu o scădere a histerezisului cornean. Valoarea coeficientului de corelație Spearman dintre

histerezis și albumina arată o corelație slabă, negativă ($\rho = -0.368$, $p = 0.161$), dar fără a atinge nivelul semnificației statistice.

Tabel 3 Corelație între CRF și proteinele determinate în filmul lacrimal al pacienților cu keratoconus - Coeficientul de corelație Spearman
Corelații

		CRF	Lactoferina	Lizozim	Albumina
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.779**	-.670**	-.038
	CRF Sig. (2-tailed)	.	.000	.005	.888
	N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient	.779**	1.000	-.571*	-.368
	Lactoferina Sig. (2-tailed)	.000	.	.021	.161
	N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient	-.670**	-.571*	1.000	.100
	Lizozim Sig. (2-tailed)	.005	.021	.	.713
	N	16	16	16	16
	Correlation Coefficient	-.038	-.368	.100	1.000
	Albumina Sig. (2-tailed)	.888	.161	.713	.
	N	16	16	16	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

După cum se observă mai sus, valoarea coeficientului de corelație Spearman indică:

-o corelație puternică între factorul de rezistență corneană și lactoferină (0.779, $p = 0.0001$), semnificativă statistic cu un nivel de încredere de 99 % . Această corelație este una directă (având semnul pozitiv), valoare ce indică faptul că o scădere a CRF-ului cu 1 unitate se corelează cu o scădere a concentrației lactoferinei;

-o corelație moderată între factorul de rezistență corneană și lizozim (- 0.670, $p = 0.005$), semnificativă statistic cu un nivel de încredere de 99%. Această corelație este una indirectă (având semnul negativ), valoare ce indică faptul că o scădere a CRF-ului cu 1 unitate se corelează cu o scădere a concentrației lizozimului;

-absența unei corelații între CRF și albumină (- 0.038 , $p = 0.888$)

Discuții

Keratoconusul rămâne o afecțiune oftalmologică incomplet înțeleasă în ciuda studiilor de bază și clinice extinse. Studiul prezent a evaluat modificările proteinelor filmului lacrimal și a unor parametri ai afecțiunii la pacienții cu keratoconus, comparativ cu participanți cu evaluare oftalmologică normală, cu parametri demografici similari, precum și existența unor corelații între acestea. S-au observat diferențe statistice semnificative între cele două loturi pentru aproximativ toți parametrii studiați.

Studiul actual demonstrează că profilul proteic al filmului lacrimal la pacienții cu keratoconus este modificat. Concentrațiile de lactoferină, lizozim și albumină la subiecții cu examinare oftalmologică normală din acest studiu seamănă cu cele raportate în literatura de specialitate (1) (2) (3) (4) (5) .

Am observat că lacrimile pacienților cu keratoconus prezintă o scădere marcată a concentrației de lactoferină, precum și o creștere a concentrațiilor de lizozim și albumină.

Studiile au demonstrat că lactoferina din filmul lacrimal are proprietăți antimicrobiene și antiinflamatoare (4). Astfel o scădere a concentrației lactoferinei în filmul lacrimal ar putea explica creșterea markerilor inflamatori prezenți în lacrimile pacienților cu keratoconus. În consecință, toate cele menționate mai sus pot sugera că, lactoferina ar putea avea un rol protector în keratoconus datorită proprietăților sale în scăderea expresiei citokinelor și colagenazelor proinflamatorii (1).

Fiind o proteină care leagă fierul, nivelul redus de lactoferină duce la creșterea concentrației de fier liber, care se depune astfel pe endoteliul cornean al pacienților cu keratoconus ducând la apariția semnului clinic numit inelul lui Fleisher (3).

Studiul prezent a demonstrat o creștere a concentrației de lizozim în lacrimile pacienților cu keratoconus, comparativ cu participanții cu evaluare oftalmologică normală. Aceasta sugerează că, în keratoconus, linia de apărare antibacteriană este crescută. Studii similare raportează de asemenea o creștere a concentrației de lizozim în lacrimile pacienților cu keratoconus (6).

Prezența albuminei serice în lacrimi indică afectarea barierei hemato-oculare, iar concentrația sa poate crește rapid în anumite condiții fiziopatologice (3). Studiul nostru a arătat o creștere a concentrației albuminei în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu lotul martor, chiar dacă nu a atins semnificație statistică, ceea ce sugerează că s-a produs exudarea albuminei din vasele de sânge. Niveluri crescute ale concentrației

de albumină au fost raportate în literatura de specialitate și în lacrimile pacienților cu sindrom de ochi uscat (7). Având în vedere că se cunoaște faptul că, inflamația este unul din principalii factori determinanți ai keratoconusului, prin urmare nu este surprinzător faptul că unii markeri cum ar fi lactoferina și albumina au concentrații asemănătoare (scăzute sau crescute) în lacrimile pacienților cu keratoconus, respectiv cu sindrom de ochi uscat. De asemenea alte studii au raportat niveluri scăzute ale concentrației albuminei în lacrimile pacienților cu keratoconus (2). Sunt necesare studii suplimentare pentru a determina efectul keratoconusului asupra albuminei din filmul lacrimal.

În plus, în studiul de față, analiza statistică avansată a demonstrat corelații Spearman puternice între concentrația lactoferinei și respectiv a lizozimului și stadiul afecțiunii (cuantificat prin stadiul Amsler), arătând că valorile concentrațiilor acestor două proteine sunt corelate cu severitatea bolii, dar și că o modificare a K max are impact direct asupra concentrațiilor acestor proteine. Rezultate similare au fost evidențiate și de alte studii cum ar fi cel al lui Balasubramanian și colaboratorii care în anul 2012 au arătat că în cazul pacienților cu keratoconus, o valoare dioptrică corneană pe meridianul cel mai refrigent mai mare se asociază cu o concentrație mai mică de lactoferină, respectiv Ig A secretorie (3).

Studiul biomecanicii corneene prezintă un interes din ce în ce mai mare în cercetările actuale datorită dezvoltării tehnicilor chirurgicale efectuate la nivel cornean și a riscului de ectazie corneană postoperatorie (8).

Studiile efectuate au arătat faptul că valorile CH și CRF sunt semnificativ statistic mai reduse în cazul pacienților cu keratoconus comparativ cu cei sănătoși, iar valorile sunt cu atât mai scăzute cu cât keratoconusul este mai avansat (9) (10). Programele mai noi de analiza ORA au introdus și alți parametrii pentru identificarea și urmărirea cazurilor cu keratoconus: indicele de keratoconus (KMI) și indicele de probabilitate a keratoconusului (KMP) (11).

Atât histerezisul cornean, cât și factorul de rezistență corneană și indicele de keratoconus sunt considerate instrumente utile pentru evaluarea pacienților cu keratoconus și sunt utilizate pe scară largă pentru aprecierea statusului biomecanicii corneene (12).

După cunoștința autorilor, acesta este primul studiu care a evaluat existența unor corelații între proteinele filmului lacrimal și parametrii biomecanici corneeni.

Limitările studiului sunt legate de numărul redus de pacienți, aceste date necesitând să fie confirmate de studii mai extinse, randomizate și pe loturi mai mari de participanți egal distribuiți în cele două loturi, pentru a putea crește puterea statistică.

Cel de-al doilea studiu s-a desfășurat pe o perioadă de 25 de luni (mai 2016-iunie 2018) în clinica Oftalnic București. S-a analizat întreaga bază de date, iar după aplicarea criteriilor de includere și excludere studiul a inclus un număr de 79 de ochi de la 62 de pacienți astfel încât perioada de urmărire să fie de 2 ani pentru fiecare pacient. Au fost evaluați 42 de ochi de la 32 de pacienți care au fost tratați cu procedeul standard și care au fost comparați cu un lot format din 37 de ochi de la 30 de pacienți diferiți supuși protocolului accelerat.

Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki adoptată în iunie 1964 și cu aprobarea comisiei de etică a Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila din București. Toți pacienții au semnat un consimțământ informat la momentul procedurii.

Criteriile de includere au fost: vârsta peste 18 ani, keratoconus progresiv, indicând necesitatea tratamentului și documentat prin examinări seriate. Progresia a fost definită de o creștere a keratometriei maxime de cel puțin 1 dioptrie, documentată prin topografiile corneene repetate sau de o creștere a cilindrului manifest de minimum o dioptrie în ultimele 12 luni.

Din studiu au fost excluși pacienții cu boli ale sistemului imunitar, gravidele, pacienții cu alte afecțiuni oculare și corneene de tipul keratita herpetică, sindromul de ochi uscat, cicatrici corneene.

Toți pacienții au fost examinați la momentul inițial și la 1, 3, 6, 12, 24 de luni de la intervenție.

Procedurile

Crosslinkingul cornean-procedeul standard

Acesta a fost efectuat la 42 de ochi (32 pacienți) incluși în studiu. Pentru a reduce riscul de expunere la radiații UVA, s-au instilat 2 picături de pilocarpina 2% cu 30 minute înaintea procedurii. Intervenția a fost efectuată sub anestezie topică, utilizând oxibuprocaina 0.4%, în condiții sterile. Îndepărtarea epiteliului a fost realizată cu ajutorul unui cuțit crescent, apoi a urmat etapa de încărcare stromală cu riboflavină. S-a instilat riboflavină izoosmolară 0.1% îmbogățită cu dextran 20% (Peschke D, Peschke Meditrade GmbH, Switzerland) la fiecare 3 minute timp de 15 minute.

Iradieră a fost efectuată cu o lampă UVA cu o lungime de undă de 370 nm timp de 30 min la 3mW/cm^2 de la o distanță de 5 cm. În timpul etapei de expunere la UVA continuă instilarea de riboflavină la fiecare 5 minute, acest lucru fiind necesar pentru a

menține concentrația acesteia în stroma corneeană. Postoperator, după lavajul corneei s-a aplicat o lentilă de contact terapeutică până la vindecarea epitelială completă. Medicația postoperatorie a constat în picături de moxifloxacină(Vigamox, Alcon), antiinflamatoare nesteroidiene-pranoprofen (Pranoflog, Sifi).

Crosslinkingul cornean-procedeul accelerat

Acesta a fost realizat pentru 37 de ochi de la 30 de pacienți. Etapele intervenției au fost aceleași ca la procedeul standard cu mențiunea că etapa de expunere la UVA cu o lungime de undă de 370 nm a fost realizată cu o intensitate de 9mW/cm², timp de 10 minute.

Rezultate

Acest studiu retrospectiv a comparat evoluția pe parcursul a 24 de luni a două grupuri cu crosslinking pentru keratoconus progresiv. Primul grup a inclus 42 de ochi de la 32 de pacienți care au fost supuși procedurii standard, iar cel de-al doilea grup a fost alcătuit din 37 de ochi provenind de la 30 de pacienți care au fost supuși procedurii accelerat. Loturile au fost comparabile, fără diferențe semnificative în ceea ce privește parametrii demografici și clinici urmăriți.

Caracteristicile celor două loturi înainte de efectuarea intervenției de crosslinking sunt prezentate în tabelul „tabel 4”.

Tabel 4 Caracteristicile la baseline în loturile studiate

		Standard CXL	Accelerat CXL	Valoarea p
Gen,n(%)	Bărbați	31 (73.8%)	26 (70.3%)	0.730
	Femei	11 (26.2%)	11 (29.7%)	
Vârsta, ani		23.3 ± 6.40	25.6 ± 5.63	0.091
UDVA, zecimal		0.22 ± 0.19	0.23 ± 0.18	0.864
CDVA, zecimal		0.51 ± 0.20	0.47 ± 0.12	0.263
Sfera, D		-3.7 ± 2.86	-2.8 ± 2.42	0.123
Cilindru, D		-4.6 ± 2.49	-3.6 ± 2.13	0.065
K max, D		52.7 ± 4.93	51.63 ± 4.81	0.334
K min, D		46.91 ± 3.63	46.14 ± 3.70	0.355
Pahimetrie, μm		455.38 ± 41.42	460.51 ± 42.56	0.589
CH		8.4 ± 1.25	8.8 ± 2.33	0.278
CRF		7.0 ± 1.26	7.6 ± 2.18	0.120
KMI		0.242 ± 0.25	0.237 ± 0.34	0.940

UDVA-acuitatea vizuală la distanță fără corecție (uncorrected distance visual acuity), CDVA- acuitatea vizuală la distanță cu corecție (corrected distance visual acuity), K max-keratometria maximă, K min-keratometria minimă, pahimetria-grosimea corneana în punctul cel mai subțire, CH- histerezis cornean (corneal hysteresis), CRF –factor de rezistență corneană (corneal resistance factor), KMI- indice de keratoconus (keratoconus match index)

Acuitatea vizuală fără corecție

Nu a existat diferență semnificativ statistică în valorile medii ale UDVA între cele două loturi de pacienți, înainte de efectuarea intervenției de crosslinking(tabel 4).

Acuitatea vizuală fără corecție a început să se îmbunătățească mai rapid în lotul accelerat, începând cu 3 luni postoperator, tendința spre ameliorare fiind semnificativă în cele două grupuri, dar fără să existe diferențe statistic semnificative între cele două loturi pe parcursul celor 24 de luni de urmărire (tabel 5).

Tabel 5 Evoluția acuității vizuale fără corecție în grupul de crosslinking cornean-procedeul standard și procedeul accelerat la 1, 3, 6, 12 și 24 de luni comparativ cu baseline

Parametru	UDVA, unități zecimale		
	CXL standard	CXL accelerat	stdCXL vs accCXL
Grup			
1 lună	0.25 ± 0.20	0.25 ± 0.18	0.901
3 luni	0.26 ± 0.19	0.29 ± 0.19*	0.487
6 luni	0.28 ± 0.21*	0.32 ± 0.20*	0.472
12 luni	0.30 ± 0.23*	0.29 ± 0.21*	0.861
24 luni	0.27 ± 0.21*	0.29 ± 0.22*	0.674

*p<0.05, diferența statistic semnificativă față de baseline

Acuitatea vizuală cu corecție

Acuitatea vizuală cu corecție înainte de efectuarea crosslinkingului a fost comparabilă între cele două loturi (tabel 4).

Acuitatea vizuală cu corecție s-a ameliorat semnificativ în cele două grupuri, începând cu vizita de 1 lună în grupul accelerat și cu vizita de 3 luni în grupul standard și a

continuat să se amelioreze pe tot parcursul perioadei de urmărire, fără să existe diferențe semnificativ statistice între cele două loturi (tabel 6).

Tabel 6 Evoluția acuității vizuale cu corecție în grupul de crosslinking cornean-procedeul standard și procedeul accelerat la 1, 3, 6, 12 și 24 de luni comparativ cu baseline

Parametru	CDVA, unități zecimale		
	CXL standard	CXL accelerat	stdCXL vs accCXL
1 lună	0.58 ± 0.19	0.52 ± 0.10*	0.081
3 luni	0.60 ± 0.21*	0.55 ± 0.14*	0.262
6 luni	0.62 ± 0.20*	0.61 ± 0.13*	0.748
12 luni	0.65 ± 0.19*	0.62 ± 0.22*	0.422
24 luni	0.61 ± 0.24*	0.64 ± 0.24*	0.583

*p<0.05, diferența statistic semnificativă față de baseline

Histerezisul cornean

La baseline, valorile medii ale histerezisului cornean au fost comparabile între grupuri (tabel 4).

Valorile histerezisului cornean nu au înregistrat modificări în niciunul dintre grupuri în primele 6 luni de urmărire. La controalele de 12 și 24 de luni s-a remarcat o îmbunătățire a histerezisului în grupul standard. În grupul accelerat îmbunătățirea histerezisului a fost evidențiată la 24 de luni postoperator.

Nu s-au evidențiat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește valorile histerezisului cornean între cele două loturi, pe tot parcursul perioadei de urmărire (Fig.5).

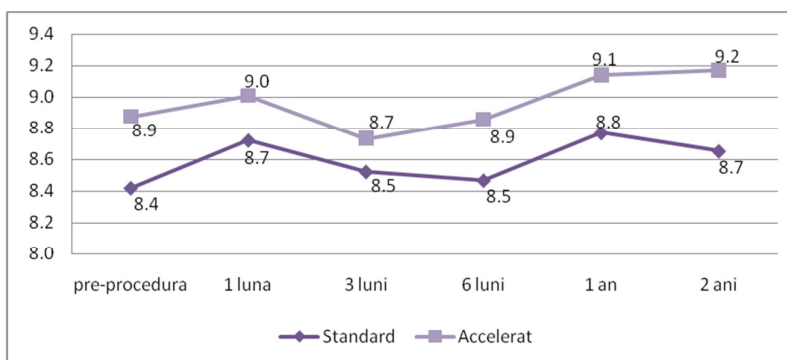


Fig. 5 Evoluția valorii medii a histerezisului cornean în grupul CXL-standard și CXL-accelerat

Factorul de rezistență corneană

La momentul inițial, factorul de rezistență corneană nu a fost semnificativ statistic diferit între cele 2 grupuri de tratament (tabel 4)

Factorul de rezistență corneană a evoluat diferit după crosslinking. În grupul CXL-standard, CRF s-a îmbunătățit în prima lună, apoi s-a menținut stabil, ulterior înregistrând o creștere semnificativă statistic pe parcursul întregii perioade de urmărire. În grupul CXL-accelerat, CRF a prezentat îmbunătățiri semnificative din punct de vedere statistic la 1 lună și la un an de la intervenție (Fig. 6).

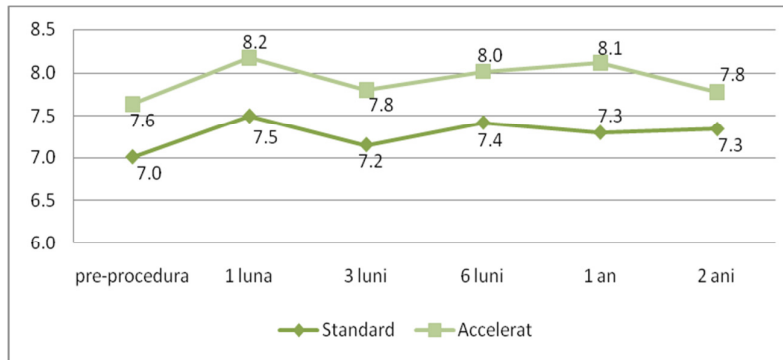


Fig. 6 Evoluția valorii medii a factorului de rezistență corneană în grupul CXL-standard și CXL-accelerat

Indicele de keratoconus

Preoperator, indicele de keratoconus a fost comparabil între grupuri (tabel 4).

Valorile KMI au început să crească începând cu 6 luni postoperator în ambele grupuri. Tendința spre ameliorare a acestui parametru biomecanic a continuat pe tot parcursul perioadei de urmărire, fără să existe o diferență semnificativă statistic între grupuri la nici unul dintre momentele de urmărire (Fig. 7).

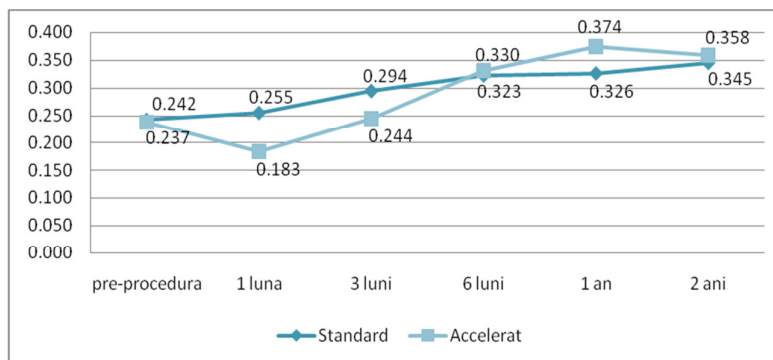


Fig. 7 Evoluția valorii medii a indicelui de keratoconus în grupul CXL standard și CXL accelerat

Linia de demarcație

La 1 lună postoperator a fost efectuată, la toți pacienții, tomografia în coerentă optică a segmentului anterior.

În grupul standard CXL, linia de demarcație a fost identificată la 90% dintre pacienți cu o profunzime medie de $301.34 \pm 27.02 \mu\text{m}$. În grupul CXL accelerat a fost identificată la 89% dintre pacienți dar cu o profunzime medie mai mică decât în grupul standard, de $286.18 \pm 37.85 \mu\text{m}$ (Fig.8; Fig.9). Un raport similar a fost obținut pentru adâncimea liniei de demarcație în raport cu grosimea totală a corneei în grupul standard față de grupul tratat cu protocolul accelerat (Fig.10).

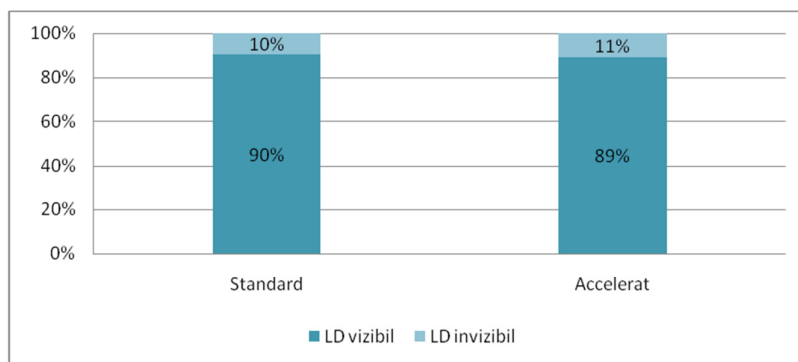


Fig. 8 Vizibilitatea liniei de demarcație la o lună postoperator comparativ în cele două grupuri de tratament

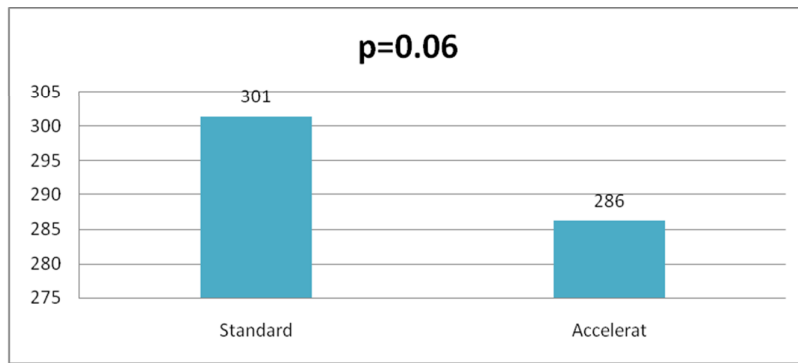


Fig. 9 Valoarea absolută a liniei de demarcație la 1 lună postoperator comparativ în cele două grupuri de tratament.

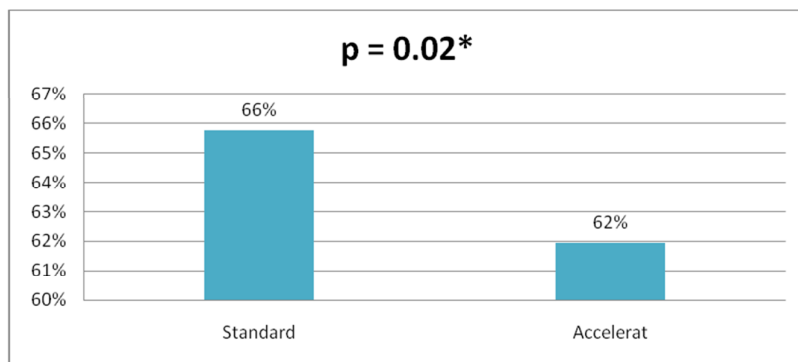


Fig. 10 Valoarea relativă a liniei de demarcație la 0 lună postoperator comparativ în cele două grupuri de tratament.

Crosslinkingul cornean reprezintă un tratament promițător pentru oprirea progresiei ectaziilor corneene. Multe studii efectuate în ultimii ani au dovedit eficiența crosslinkingului, utilizând protocolul standard de la Dresda, în stoparea progresiei keratoconusului progresiv (13) (14) (15) (16).

Cu toate acestea, acest protocol este consumator de timp, astfel că eforturile de reducere a duratei totale a tratamentului au dus deja la introducerea așa numitelor „protocoale accelerate” de crosslinking. În prezent, dispozitivele de iluminare UVA cu intensitate înalta propun, în conformitate cu legea de reciprocitate Bunsen-Roscoe, obținerea aceluiași efect fotochimic prin creșterea intensității iradierii, menținând constant nivelul total al energiei printr-o reducere corespunzătoare a timpului de iradiere (17) (18).

Studii clinice anterioare au demonstrat eficacitatea și siguranță crosslinkingului accelerat în stoparea progresiei keratoconusului (19) (20).

În studiul de față am raportat rezultatele pe termen lung ale crosslinkgului cornean cu dezepitelizare protocolul standard comparativ cu crosslinkingul cornean cu dezepitelizare procedeul accelerat în tratamentul keratoconusului progresiv.

După cunoștința noastră, acesta este primul studiu care compară protocolul standard cu protocolul accelerat din punctul de vedere al proprietăților biomecanice corneene, cu o perioadă lungă de urmarire-24 de luni, deși a fost utilizată o serie mică de cazuri. Loturile comparate au fost omogene din punctul de vedere al parametrilor demografici și clinici urmăriți.

Studiul nostru a demonstrat o recuperare mai rapidă a acuității vizuale fără corecție în grupul CXL accelerat comparativ cu grupul CXL standard. Acest lucru ar putea fi explicat prin edemul cornean mai scăzut, pierderea mai mică de keratocite și afectarea plexului nervos subepitelial mai mică în cazul protocolului accelerat datorită timpului de expunere mai scurt. Aceste modificări pot fi obiectivate prin analiza postoperatorie a microscopiei confocale în vivo, pe care nu am putut-o realiza datorită lipsei aparatului în clinica noastră, acesta fiind unul din limitele studiului prezent.

Acuitatea vizuală cu corecție s-a îmbunătățit în timp la ambele grupuri de pacienți. Modificările CDVA au fost mai precoce pentru grupul accelerat, înregistrând o creștere semnificativă statistic începând cu vizita de 1 lună postoperator. Totuși la 1 an și la 2 ani postoperator, nu s-a evidențiat o diferență semnificativă statistic între cele două loturi.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele obținute de alte studii (18) (21).

La 1 lună postoperator, tuturor pacienților incluși în studiu li s-a efectuat tomografia în coerentă optică a segmentului anterior pentru a identifica linia de demarcație. În cazul grupului CXL standard, linia de demarcație a fost identificată la 90% dintre pacienții, cu o profunzime medie de $301.34 \pm 27.02 \mu\text{m}$. În grupul CXL accelerat, linia de demarcație a fost identificată la 89% dintre pacienți cu o profunzime medie de $286.18 \pm 37.85 \mu\text{m}$. Din cele enunțate mai sus putem concluziona că atât vizibilitatea liniei de demarcație, cât și profunzimea ei în valoare absolută au fost comparabile în cele două grupuri studiate. Rezultatele noastre sunt în acord cu cele raportate de Shetty și colaboratorii, care au identificat o linie de demarcație cu o profunzime medie de $280 \pm 47 \mu\text{m}$ în grupul standard, respectiv $292 \pm 73 \mu\text{m}$ în grupul accelerat (22) precum și cu cele ale lui Kymionis și colaboratorilor care au măsurat o linie de demarcație cu o profunzime medie de $337 \pm 46.46 \mu\text{m}$ în grupul standard, respectiv $322.91 \pm 48.28 \mu\text{m}$ în grupul accelerat (17).

În schimb raportarea liniei de demarcație la grosimea corneană a identificat o profunzime mai mică, semnificativă statistic, a liniei de demarcație în grupul accelerat (62

%) comparativ cu grupul standard (66 %) ($p=0.02^*$). O explicație posibilă o poate constitui existența unei rate de difuzie limitată a riboflavinei cu dextran în corneele tratate pentru un timp redus în cazul protocolului rapid.

Rezultatele noastre sunt parțial în acord cu cele raportate de Sara Brittingham și colaboratorii, care, utilizând aceleași protocoale, au identificat o profunzime mai mare a liniei de demarcație în grupul standard CXL, exprimată atât ca valoare absolută cât și ca valoare relativă (23).

Analiza statistică post-hoc a datelor experimentale arată absența unor corelații semnificative statistic între linia de demarcație și dioptria pe meridianul cel mai refringent în ambele grupuri de tratament, atât la 12 luni cât și la 24 luni postoperator. Aceste date confirmă datele raportate de studii precedente (25).

În schimb s-au identificat corelații moderat-puternice între linia de demarcație și modificarea factorului de rezistență corneeană în ambele grupuri de tratament care au arătat că atunci când adâncimea liniei de demarcație crește, factorul de rezistență crește și el, adică cu cât linia de demarcație e mai adâncă, deci riboflavina pătrunde mai mult la nivelul stromei corneene, există o îmbunătățire a factorului de rezistență corneeană.

Luând în considerare mențiunile de mai sus, diferite protocoale de tratament par să inducă diferite adâncimi ale liniei de demarcație stromale. Chiar dacă ochii care au fost tratați conform protocolului standard Dresden au arătat o linie de demarcație mai profundă, exprimată ca procent din grosimea corneeană centrală, și o aplatizare semnificativă a corneei atât la 12 luni cât și la 24 luni postoperator, interpretarea adâncimii stromale a liniei de demarcație ca fiind un parametru al eficacității procedurii, poate fi pusă la îndoială, întrucât o asociere semnificativă între adâncimea liniei de demarcație și reducerea K_{max} nu a fost găsită în niciunul din grupuri.

Acesta este primul studiu care compară pe termen lung protocolul standard de CXL cu protocolul accelerat din punct de vedere al proprietăților biomecanice corneene și care investighează relația dintre linia de demarcație și biomecanica corneeană.

Studiul nostru demonstrează că atât procedeul standard de crosslinking cât și procedeul accelerat au prezentat îmbunătățiri ale parametrilor vizuali, refractivi, topografici și biomecanici la sfârșitul celor 24 luni de urmărire. De asemenea am identificat o ameliorare mai rapidă a acuității vizuale atât fără corecție cât și cu corecție, ceea ce reprezintă un avantaj important al protocolului accelerat deoarece permite o recuperare mai rapidă și o reintegrare precoce în câmpul muncii.

Ca o considerație practică, trebuie să luăm în considerare avantajele protocolului accelerat, nu numai datorită reducerii timpului de tratament și confortului crescut al pacientului, dar și datorită recuperării mai rapide a acuității vizuale și existenței unui “haze” cornean mai redus postoperator la examinarea biomicroscopica, în comparație cu protocolul standard Dresden.

Cel de-al 3-lea studiu s-a desfășurat pe o perioadă de 25 de luni (mai 2016-iunie 2018) în clinica Oftalnic București.

S-a analizat întreaga bază de date, iar după aplicarea criteriilor de includere și excludere studiul a inclus un număr de 60 de ochi de la 51 de pacienți astfel încât perioada de urmărire să fie de 1 an pentru fiecare pacient și loturile să fie omogene. Au fost evaluați 30 de ochi de la 26 de pacienți care au fost tratați cu riboflavină 0.1% cu dextran 20% și care au fost comparați cu un lot format din 30 de ochi de la 25 de pacienți diferiți tratați cu riboflavină cu HPMC 1.1%.

Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki adoptată în iunie 1964 și cu aprobarea comisiei de etică a Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila din București. Toți pacienții au semnat un consimțământ informat la momentul procedurii.

Criteriile de includere au fost: vârsta peste 18 ani, keratoconus progresiv, indicând necesitatea tratamentului și documentat prin examinări seriate, pacienți supuși intervenției utilizând protocolul standard. Progresia a fost definită de o creștere a keratometriei maxime de cel puțin 1 dioptrie, documentată prin topografii corneene repetate sau de o creștere a cilindrului manifest de minimum o dioptrie în ultimele 12 luni.

Din studiu au fost excluși pacienții cu boli ale sistemului imunitar, gravidele, pacienții cu alte afecțiuni oculare și corneene de tipul keratită herpetică, sindromul de ochi uscat, cicatrici corneene, pacienți supuși intervenției utilizând protocolul accelerat de crosslinking.

Toți pacienții au fost examinați la momentul inițial și la 1, 3, 6, 12 luni de la intervenție.

Procedurile

Crosslinkingul cornean-procedeu standard utilizând riboflavina 0.1% cu dextran 20%

Acesta a fost efectuat la 30 de ochi (26 pacienți) incluși în studiu. Pentru a reduce riscul de expunere la radiații UVA, s-au instilat 2 picături de pilocarpină 2% cu 30 minute înaintea procedurii. Intervenția a fost efectuată sub anestezie topică, utilizând oxibuprocaina 0.4%, în condiții sterile. Îndepărtarea epitelului a fost realizată cu ajutorul unui cuțit crescent, apoi a urmat etapa de încărcare stromală cu riboflavină. S-a instilat riboflavină izosmolară 0.1% îmbogățită cu dextran 20% (Pesckhe D, Pesckhe Meditrade GmbH, Switzerland) la fiecare 3 minute timp de 15 minute.

Iradieră a fost efectuată cu o lampă UVA cu o lungime de undă de 370 nm timp de 30 min la 3mW/cm^2 de la o distanță de 5 cm. În timpul etapei de expunere la UVA continuă instilarea de riboflavină la fiecare 5 minute, acest lucru fiind necesar pentru a menține concentrația acesteia în stroma corneeană. Postoperator, după lavajul corneei s-a aplicat o lentilă de contact terapeutică până la vindecarea epitelială completă. Medicația postoperatorie a constat în picături de moxifloxacină (Vigamox, Alcon), antiinflamatoare nesteroidiene-pranoprofen (Pranoflog, Sifi).

Crosslinkingul cornean-procedeu standard utilizând riboflavina cu HPMC 1.1%-

Acesta a fost realizat pentru 30 de ochi de la 25 de pacienți. Etapele intervenției au fost aceleași ca la procedeuul descris anterior cu mențiunea că riboflavina utilizată a avut ca moleculă transportoare hidroxipropilmetil celuloza- Pesckhe M, Pesckhe Meditrade GmbH, Switzerland.

Rezultate

Acest studiu retrospectiv a comparat evoluția pe parcursul a 12 luni a două grupuri cu crosslinking pentru keratoconus progresiv. Primul grup a inclus 30 de ochi de la 26 de pacienți care au fost supuși procedeuului standard utilizând riboflavina 0.1 % cu dextran 20%, iar cel de-al doilea grup a fost alcătuit din 30 de ochi provenind de la 25 de pacienți care au fost supuși procedeuului standard dar la care s-a utilizat riboflavină 0.1% cu hidroximetilpropil celuloză 1.1%.

Caracteristicile celor două loturi înainte de efectuarea intervenției de crosslinking sunt prezentate în tabelul „Tabel 7”.

Tabel 7 Caracteristicile la baseline în loturile studiate

		Riboflavina cu Dextran	Riboflavina cu HPMC	Valoarea p
Gen,n(%)	Bărbați	22 (73.3%)	26 (86.7%)	0.203
	Femei	8 (26.7%)	4 (13.3%)	
Vârsta, ani		23.53 ± 4.76	25.47 ± 6.91	0.213
UDVA, zecimal		0.23 ± 0.20	0.25 ± 0.23	0.764
CDVA, zecimal		0.48 ± 0.17	0.51 ± 0.13	0.510
Sfera, D		-3.78 ± 2.48	-3.34 ± 2.91	0.530
Cilindru, D		-3.77 ± 1.74	-4.26 ± 3.02	0.444
K max, D		51.59 ± 4.35	52.40 ± 4.65	0.492
K min, D		47.03 ± 3.70	46.48 ± 3.68	0.564
Pahimetrie, μm		450.20 ± 37.96	468.93 ± 40.95	0.071
CH		8.36 ± 1.29	8.99 ± 1.36	0.073
CRF		7.02 ± 1.08	7.64 ± 1.71	0.102
KMI		0.220 ± 0.26	0.268 ± 0.32	0.529

UDVA-acuitatea vizuală la distanță fără corecție (uncorrected distance visual acuity), CDVA- acuitatea vizuală la distanță cu corecție (corrected distance visual acuity), K max-keratometria maximă, K min-keratometria minimă, pahimetria-grosimea corneana în punctul cel mai subțire, CH- histerezis cornean (corneal hysteresis), CRF –factor de rezistență corneană (corneal resistance factor), KMI- indice de keratoconus (keratoconus match index)

Histerezisul cornean

La baseline, valorile medii ale histerezisului cornean au fost comparabile între grupuri (tabel 7).

Valorile histerezisului cornean nu au înregistrat modificări în niciunul dintre grupuri în primele 6 luni de urmărire. La controlul de 12 luni s-a remarcat o îmbunătățire a histerezisului în ambele grupuri de tratament.

Începând cu controlul de 3 luni postoperator, valorile histerezisului cornean au fost mai mari în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu hipromeloză comparativ cu grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran (tabel 8).

Tabel 8 Evoluția histerezisului cornean în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran și grupul pacienților cu riboflavină cu HPMC la 1, 3, 6, 12 luni comparative cu momentul inițial

Parametru	Histeresis cornean		
Grup	DEXTRAN	HPMC	Dextran vs HPMC
1 lună	8.5 ± 1.40	9.1 ± 1.74	0.116
3 luni	8.2 ± 1.15	9.0 ± 1.56	0.020 [†]
6 luni	8.4 ± 1.14	9.1 ± 1.69	0.041 [†]
12 luni	8.5 ± 1.24*	9.2 ± 1.58*	0.047 [†]

*p<0.05, diferență statistic semnificativă față de baseline

[†]p<0.05, diferență statistic semnificativă între grupuri

Factorul de rezistență corneană

La momentul inițial, factorul de rezistență corneană nu a fost semnificativ statistic diferit între cele 2 grupuri de tratament (tabel 7).

Valorile factorului de rezistență corneană au început să prezinte îmbunătățiri începând cu controlul de la 6 luni postoperator, în ambele grupuri de tratament. De asemenea se poate observa că la controalele de 6 luni, respectiv 12 luni postoperator valorile CRF au fost semnificativ statistic mai crescute în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu hipromeloză comparativ cu grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran (tabel 9).

Tabel 9 Evoluția factorului de rezistență corneană în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran și grupul pacienților cu riboflavină cu HPMC la 1, 3, 6, 12 luni comparative cu momentul inițial

Parametru	Factor de rezistență corneană		
Grup	DEXTRAN	HPMC	Dextran vs HPMC
1 lună	7.1 ± 1.45	7.8 ± 1.64	0.108
3 luni	7.0 ± 1.12	7.8 ± 1.64	0.055
6 luni	7.3 ± 1.13*	8.1 ± 1.56*	0.029 [†]
12 luni	7.3 ± 1.17*	8.0 ± 1.71*	0.044 [†]

*p<0.05, diferență statistic semnificativă față de baseline

[†]p<0.05, diferență statistic semnificativă între grupuri

Indicele de keratoconus

Preoperator, indicele de keratoconus a fost comparabil între grupuri (tabel 7).

Valorile KMI au început să crească începând cu 6 luni postoperator în ambele grupuri. Tendința spre ameliorare a acestui parametru biomecanic a continuat pe tot parcursul perioadei de urmărire. De asemenea începând cu controlul de 6 luni valorile indicelui de keratoconus au fost semnificativ statistic mai mari în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu hipromeloză comparativ cu grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran (tabel 10).

Tabel 10 Evoluția indicelui de keratoconus în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran și grupul pacienților cu riboflavină cu HPMC la 1, 3, 6, 12 luni comparative cu momentul inițial

Parametru	INDICE DE KERATOCONUS		
	DEXTRAN	HPMC	Dextran vs HPMC
1 lună	0.254 ± 0.27	0.279 ± 0.32	0.744
3 luni	0.264 ± 0.23	0.303 ± 0.27	0.554
6 luni	0.311 ± 0.22*	0.447 ± 0.28*	0.046 [†]
12 luni	0.314 ± 0.24*	0.467 ± 0.32*	0.044 [†]

*p<0.05, diferență statistic semnificativă față de baseline

[†]p<0.05, diferență statistic semnificativă între grupuri

Discuții

Există puține studii care analizează rezultatele crosslinkingului cornean utilizând comparativ riboflavina cu dextran și cu hidroximetilpropilceluloză. Aceste studii au dovedit că riboflavina cu hipromeloză stabilizează grosimea corneană în timpul intervenției de crosslinking și a fost comparată favorabil cu riboflavina cu dextran (26) (27). Malhotra și colaboratorii au studiat comparativ utilizarea acestor două tipuri de riboflavină și au demonstrat o linie de demarcație mai adâncă în cazul pacienților la care s-a folosit riboflavina cu hipromeloză (28).

În studiul prezent, 60 de ochi de la 51 de pacienți cu keratoconus progresiv au fost repartizați aleatoriu în cele două grupuri de tratament, utilizând riboflavină cu dextran și riboflavină cu hipromeloză, dar același procedeu de iradiere și anume cel convențional. După cunoștința noastră, acesta este primul studiu care compară cele două tipuri de riboflavină din punctul de vedere al proprietăților biomecanice corneene.

Un rezultat important al studiului prezent se referă la proprietățile biomecanicii corneene. După cunoștința noastră este primul studiu care evaluează indicii biomecanicii corneene postcrosslinking comparativ între riboflavina cu dextran și riboflavina cu hipromeloză. Toți parametrii biomecanici urmăriți (factorul de rezistență corneană, histerezisul cornean și indicele de keratoconus) au prezentat valori mai mari în grupul pacienților tratați cu riboflavina cu hipromeloză comparativ cu grupul pacienților tratați cu riboflavina cu dextran. Îmbunătățirea mai mare a acestor indici în cazul utilizării hidroximetil propil celulozei poate fi explicată de linia de demarcație mai profundă întâlnită la acești pacienți.

Limitele studiului nostru sunt legate de natură retrospectivă, de numărul mic de pacienți, de perioada scurtă de urmărire, de absența măsurării grosimii corneene intraoperator. O altă limită o constituie absența măsurării celulelor endoteliale pentru a evalua dacă cele două substanțe determină lezarea endoteliului cornean. Pentru a clarifica dacă utilizarea unui agent osmotic diferit, dextran sau hidroximetilpropil celuloză determină rezultate postoperatorii diferite sunt necesare studii prospective cu un număr mai mare de pacienți și cu monitorizare pe termen mai îndelungat.

Sumarizând, studiul nostru demonstrează siguranță și eficacitatea utilizării celor două tipuri de riboflavina la pacienții cu keratoconus progresiv, cu mențiunea ca în cazul folosirii agentului osmotic hidroxipropilmetil celuloză valorile indicilor biomecanici se îmbunătățesc mai mult.

CONCLUZII

1. În lacrimile pacienților cu keratoconus a fost demonstrată o scădere marcată a concentrației de lactoferină precum și o creștere a concentrațiilor de lizozim și albumină, comparativ cu lotul martor.

2. Studiul nostru a demonstrat corelații semnificative între concentrația lactoferinei respectiv a lizozimului și stadiul Amsler al keratoconusului, arătând ca valorile concentrațiilor acestor două proteine sunt corelate cu severitatea bolii; nu s-au evidențiat corelații semnificative între concentrația albuminei și stadiul bolii.

3. De asemenea au fost demonstrate corelații semnificative între concentrația lactoferinei, respectiv a lizozimului și valoarea dioptrică corneană pe meridianul cel mai refringent, arătând că o modificare a Kmax are impact direct asupra concentrațiilor acestor

proteine; nu s-au evidențiat corelații semnificative între concentrația albuminei și dioptria pe meridianul cel mai refringent.

4. Au fost demonstrate corelații semnificative între concentrația lactoferinei, respectiv a lizozimului și parametrii biomecanicii corneene (histerezis cornean, factor de rezistență corneană, indice de keratoconus); nu s-au evidențiat corelații semnificative între concentrația albuminei și parametrii biomecanici ai corneei.

5. Toate aceste rezultate determină apariția unor noi posibilități de cercetare. Astfel, analiza compoziției lacrimilor prezintă un interes din ce în ce mai mare în cercetările actuale, în vederea identificării unor biomarkeri care să permită diagnosticul și intervenția terapeutică precoce la pacienții cu keratoconus. În acest fel, s-ar putea elabora algoritmi de diagnostic și tratament care să cuprindă atât informațiile biochimice cât și cele topografice.

6. Pentru a aprofunda datele furnizate de studiul prezent, am putea analiza aceleași proteine în serul pacienților cu keratoconus, în vederea identificării unor corelații între proteinele din lacrimi cu cele din ser.

7. Procedeu accelerat de crosslinking cornean a avut o eficacitate și siguranță comparabile cu ale procedeuului standard, în stabilizarea bolii la pacienții adulți cu keratoconus progresiv, urmăriți pe o perioadă de 24 de luni.

8. Procedeu accelerat are avantajul unei reabilitări mai rapide a acuității vizuale, ceea ce permite, teoretic, o reintegrare profesională mai rapidă.

9. Alt avantaj al protocolului accelerat este reprezentat de reducerea timpului de tratament, crescând astfel atât confortul pacientului cât și al medicului.

10. Parametrii biomecanici corneeni au avut o evoluție comparabilă între cele două grupuri de tratament, fără să se evidențieze diferențe semnificativ statistice între procedeu standard și accelerat.

11. Atât vizibilitatea liniei de demarcație, cât și profunzimea ei în valoare absolută au fost comparabile între procedeu standard și accelerat; în schimb raportarea liniei de demarcație la grosime corneană a identificat o profunzime mai mică, semnificativă statistic, a liniei de demarcație în grupul accelerat comparativ cu grupul standard.

12. Studiul nostru a identificat corelații între linia de demarcație și modificarea factorului de rezistență corneană în ambele grupuri de tratament care au arătat că atunci când adâncimea liniei de demarcație crește, factorul de rezistență crește și el, adică cu cât linia de demarcație e mai adâncă, deci riboflavina pătrunde mai mult la nivelul stromei corneene, există o îmbunătățire a factorului de rezistență corneană.

13. Utilizarea riboflavinei cu dextran a avut o eficacitate și siguranță comparabile cu riboflavina cu hidroximetilpropil celuloză, în stabilizarea bolii la pacienții adulți cu keratoconus progresiv, urmăriți pe o perioadă de 12 luni.

14. Linia de demarcație exprimată atât ca valoare absolută cât și raportată la grosimea corneană a avut o profunzime mai mare, semnificativă statistic, în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu hidroxipropilmetil celuloză comparativ cu grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran.

15. Studiul nostru a demonstrat valori mai mari ale tuturor parametrilor biomecanici urmăriți (histerezis cornean, factor de rezistență corneană, indice de keratoconus) în grupul pacienților tratați cu riboflavină cu hipromeloză comparativ cu grupul pacienților tratați cu riboflavină cu dextran.

16. Sunt necesare studii prospective cu un număr mare de pacienți și cu o urmărire mai îndelungată pentru validarea rezultatelor noastre în protocoalele de management al keratoconusului.

BIBLIOGRAFIE

1. **Lema I, Brea D, Rodriguez-Gonzalez R, Diez-Feijoo E, Sobrino T.** *Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus.* s.l. : Mol Vis, 2010. 16:2055-2061.

2. **Acera A, Vecino E, Rodriguez-Agirretxe I, Aloria K, Arizmendi JM, Morales C et al.** *Changes in tear protein profile in keratoconus disease.* s.l. : Eye, 2011. 25: 1225-1233.

3. **Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MDP.** *Levels of lactoferrin, secretory Ig A and serum albumin in the tear film of people with keratoconus.* s.l. : Exp Eye Res, 2012. 96:132-37.

4. **Pastori V, Tavazzi S, Lechhi M.** *Lactoferrin-Loaded Contact Lenses: Eye Protection Against Oxidative Stress.* s.l. : Cornea, 2015. 34:693–97.

5. **Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K.** *Laboratory findings in tear fluid analysis.* s.l. : Clinica Chimica Acta, 2006. 369:17-28.

6. **Gorskova EN, Tarasova LN, Teplova SN et al.** *State of local immunity in keratoconus.* s.l. : Vestn Ophthalmol, 1998. 114:26-28.

7. **Versura P, Nanni P, Bavelloni A, Blalock VL, Piazza M, Roda A et al.** *Tear proteomics in evaporative dry eye disease.* s.l. : Eye, 2010. 24: 1396-1402.

8. **Terai N, Raiskup F, Haustein M, Pillunat LE, Spoerl E.** *Identification of biomechanical properties of the cornea: the ocular response analyzer.* s.l. : Current Eye Research, 2012. 37:553-62.

9. **Pinero DP, Alcon N.** *Corneal biomechanics: a review.* s.l. : Clin Exp Optom, 2015. 98:107-16.
10. **Fontes BM, Ambrósio R Jr, Velarde GC, Nosé W.** *Ocular response analyzer measurements in keratoconus with normal central corneal thickness compared with matched normal control eyes.* s.l. : J Refract Surg, 2011. 27(3):209.
11. **Labiris G, Giamoukakis A, Gatzoufas Z, Sideroudi H, Kozobolis V, Seitz B.** *Biomechanical diagnosis of keratoconus:evaluation of the keratoconus.* s.l. : Acta Ophthalmol, 2013. 91:258-62.
12. **Luz A, Faria-Correia F, Salomao MQ, Lopez BT, Ambrosio R Jr.** *Corneal biomechanics: Where are we?* s.l. : J Curr Ophthalmol, 2016. 28:97-98.
13. **Spoerl E, Huhle M, Seiler T.** *Induction of cross-links in corneal tissue.* s.l. : Exp Eye Res, 1998. 66: 97-103.
14. **G, Wollensak.** *Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope.* s.l. : Current Opin Ophthalmol, 2006. 17: 356-60.
15. **Witting-Silva C, Chan E, Islam FM, Wu T, Whiting M, Snibson GR.** *A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus:three-year results.* s.l. : Ophthalmology, 2014. 121:812-21.
16. **O'Brart DP, Chan E, Samaras K, Patel P, Shah SP.** *A randomised, prospective study to investigate the efficacy of riboflavin/ultraviolet A (370 nm) corneal collagen cross-linkage to halt the progression of keratoconus.* s.l. : Br J Ophthalmol, 2011. 95: 1519-24.
17. **Kymionis GD, Tsoulnaras KI, Grentzelos MA, Liakopoulos DA, Tsakalis NG, Blazaki SV et al.** *Evaluation of corneal stromal demarcation line depth following standard and a modified-accelerated collagen cross-linking protocol.* s.l. : Am J Ophthalmol, 2014. 158: 671-75.
18. **Mazzotta C, Baiocchi S, Bagaglia SA, Fruschelli M, Meduri A, Rechichi M.** *Accelerated 15 mW pulsed-light crosslinking to treat keratoconus: Two-year clinical results.* s.l. : J Cat Refract Surg, 2017. 43:1081-88.
19. **Kurt T, Ozgurhan EB, Yildirim Y, Akcay BI, Cosar MG, Bozkurt E et al.** *Accelerated (18mW/cm(2)) corneal cross-linking for progressive keratoconus:18-Month results.* s.l. : J Ocul Pharmacol Ther , 2016. 32:186-91.
20. **Konstantopoulos A, Mehta JS.** *Conventional versus accelerated collagen crosslinking for keratoconus.* s.l. : Eye Contact Lens, 2015. 41:65-71.

21. **Jiang LZ, Jiang Wei, Qui SY.** *Conventional vs. pulsed-light accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of progressive keratoconus:12-month results from a prospective study.* s.l. : Experimental and Therapeutic Medicine, 2017. 14:4238-4244.
22. **Shetty R, Pahuja NK, Nuijts RM, et al.** *Current protocols of corneal collagen cross-linking: visual, refractive, and tomographic outcomes.* s.l. : Am J Ophthalmol, 2015. 160:243–49..
23. **Brittingham S, Tappeiner C, Frueh BE.** *Corneal Cross-Linking in keratoconus using the standard and rapid treatment protocol:differences in demarcation line and 12-months outcomes.* s.l. : Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. 55:8371-76.
24. **Seiler T, Hafezi F.** *Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line.* s.l. : Cornea, 2006. 25:1057–59.
25. **Alex Lap Ki Ng, Tommy CY Chan, Arthur CK Cheng.** *Conventional versus accelerated corneal collagen cross-linking in the treatment of keratoconus.* s.l. : Clin and Exp Ophthalmol, 2016. 44: 8-14.
26. **Jain V, Gazali Z, Bidayi R.** *Isotonic riboflavin and HPMC with accelerated.* s.l. : Cornea, 2014. 33:910-13.
27. **Oltulu R, Satirtav G, Donbaloglu M, Kerimoglu H, Ozkagnici A, Karaibrahimoglu A.** *Intraoperative corneal thickness monitoring during corneal collagen crosslinking with isotonic riboflavin solution with and without dextran .* s.l. : Cornea, 2014. 33:1164- 67.
28. **Malhotra C, Jain AK, Gupta A, Ram J, Ramatchandirane B, Dhingra D et al.** *Demarcation line depth after contact lens-assisted corneal crosslinking for progressive keratoconus: Comparison of dextran-based and hydroxypropyl methylcellulose-based riboflavin solutions.* s.l. : J Cat Refract Surg, 2017. 43: 1263-70.
29. **Razmjoo H, Rahimi B, Kharraji M, Koosha N, Peyman A.** *Corneal haze and visual outcome after collagen crosslinking for keratoconus: a comparison between total epithelium off and partial epithelial removal methods.* s.l. : Adv Biomed Res, 2014. 3:221.
30. **Sadoughi MM, Einollahi B, Baradaran-Rafii A, Roshandel D, Hasani H, Nazeri M.** *Accelerated versus conventional corneal collagen cross-linking in patients with keratoconus:an inpatient comparative study.* s.l. : Int Ophthalmol, 2016. 38:67-74.
31. **Tomita M, Mita M, Huseynova T.** *Accelerated versus conventional corneal collagen crosslinking.* s.l. : J Cat Refract Surg, 2014. 40:1013-20.

32. **Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T.** *Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen crosslinking for keratoconus in Italy: the Sienna eye cross study.* s.l. : Am J Ophthalmol, 2010. 149:585-93.
33. **Holopainen JM, Krootila K.** *Transient corneal thinning in eyes undergoing corneal crosslinking.* s.l. : Am J Ophthalmol, 2011. 152:533-36.
34. **Hassan Z, Modis Jr. L, Sazlai E, Berta A, Nemeth G.** *Intraoperative and postoperative corneal thickness change after collagen crosslinking therapy.* s.l. : European J Ophthalmol, 2014. 24: 179-85.
35. **Gu S, Fan Z, Wang L, Tao X, Zhang Y, Mu G.** *Corneal Collagen Cross-Linking with Hypoosmolar Riboflavin Solution in Keratoconic Corneas.* s.l. : Biomed Res Int, 2014. 2014:754182.
36. **Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C et al.** *Treatment of progressive keratoconus by riboflavin UVA induced crosslinking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg retinal tomography II in vivo confocal microscopy in humans.* s.l. : Cornea, 2007. 26:390-97.
37. **Spoerl E, Wollensak G, Dittert DD, Seiler T.** *Thermomechanical behaviour of collagen-crosslinked porcine cornea.* s.l. : Ophthalmologica, 2004. 218:136-40.
38. **Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T.** *Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA.* s.l. : Cornea, 2004. 23: 503-507.
39. **Spoerl E, Terai N, Scholz, Raiskup F, Pillunat LE.** *Detection of biomechanical changes after corneal cross-linking using Ocular Response Analyzer software.* s.l. : J Cat Refract Surg, 2011. 27:452-57.
40. **Gkika M, Labiris G, Giarmoukakis A, Koutsogianni A, Kozobolis V.** *Evaluation of corneal hysteresis and corneal resistance factor after corneal cross-linking for keratoconus.* s.l. : Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. 250:565-573.
41. **Vinciguerra P, Albe E, Mahmoud AM, Trazza S, Hafezi F, Roberts CJ.** *Intra- and Postoperative Variation in Ocular Response Analyzer Parameters in Keratoconic Eyes After Corneal Cross-linking.* s.l. : J Refract Surg, 2010. 26:669-76.
42. **Greenstein SA, Kristen LF, Hersh PS.** *In vivo biomechanical changes after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: 1 year analysis of a randomized , controlled, clinical trial.* s.l. : Cornea, 2012. 31:21-25.

43. **Hashemi H, MirafTAB M, Seyedian MA, Hafezi F, Bahrmandy H, Heidarian S et al.** *Long-term results of an accelerated corneal cross-linking protocol (18 mW/cm²) for the treatment of progressive keratoconus.* s.l. : Am J Ophthalmol, 2015. 160: 1164-70.
44. **Lema I, Duran JA.** *Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus.* s.l. : Ophthalmology, 2005. 112: 654-9.
45. **Schnetler R, Gillan WDH, Koorsen G.** *Imunological and antimicrobial molecules in human tears: a review and preliminary report.* s.l. : S Afr Optom, 2012. 71:123-32.
46. **Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T.** *Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus.* s.l. : Exp Eye Res, 2003. 77:515-524.
47. **Fust A, Veres A, Kizsel P, Nagy ZZ, Cervenak I, Csakany B et al.** *Changes in tear protein pattern after photorefractive keratectomy .* s.l. : Eur J Ophthalmol, 2003. 13: 525-31.
48. **DA, Dartt.** *Neural Regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases.* s.l. : Prog Retin Eye Res, 2009. 28:155-77.
49. **Cristina Kenney M, Brown DJ.** *The cascade hypothesis of keratoconus.* s.l. : Cont Lens Ant Eye, 2003. 26:139-46.
50. **Moshirfar MR, Edmonds J.** eyewiki.aao.org/corneal_biomechanics. [Interactiv] 15 January 2015. [Citat: 18 November 2018.] http://eyewiki.aao.org/Corneal_Biomechanics.
51. **Hagem AM, Thorsrud A, Sandvik GF, Raen M, Drolsum L.** *Collagen Crosslinking with conventional and accelerated ultraviolet-A irradiation using riboflavin with hydroxypropyl methylcellulose.* s.l. : J Cat Refract Surg , 2017. 43:511-17.
52. **Kymionis GD, Kounis GA, Portaliou DM, Grentzelos MA, Karavitaki AE et al.** *Intraoperative pachymetric measurements during corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation.* s.l. : Ophthalmology, 2009. 116:2336-39.
53. **Ehmke T, Seiler TG, Fischinger I, Ripken T, Heisterkamp A, Frueh BE.** *Comparison of corneal riboflavin gradients using dextran and HPMC solutions.* s.l. : J Refract Surg, 2016. 32:798-802.
54. **Hayes S, Kamma-Lorger CS, Boote C, et al.** *The effect of riboflavin/UVA collagen cross-linking therapy on the structure and hydrodynamic behaviour of the ungulate and rabbit corneal stroma.* s.l. : PLoS One, 2013. 8:e52860..

55. **Jacob S, Kumar DA, Agarwal A, Basu S, Sinha P, Agarwal A.** *Contact lens-assisted collagen crosslinking (CACXL): a new technique for crosslinking thin corneas .* s.l. : J Refract Surg, 2014. 30:366-372.

56. **Meadows DL, Paugh JR, Joshi A, Mordaunt J.** *A novel method to evaluate residence time in humans using a nonpenetrating fluorescent tracer.* s.l. : Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43:1032–1039..

LUCRĂRI PUBLICATE PE PARCURSUL STUDIILOR DOCTORALE

1. Burcel M, Corbu C, Potop V, Constantin M, Dăscălescu D, Ionescu C, Coviltir V, Burcea M, Ciuluvică R, Voinea L. Efficiency evaluation of corneal collagen crosslinking intervention in patients with keratoconus. MRJMMS, 2017; 5(3): 142-148.

2. Burcel MG, Corbu CG, Constantin MM, Coviltir V, Burcea M, Potop V, Dăscălescu DMC, Ionescu IC, Ciuluvica R, Voinea LM. In Vivo Measurements of Corneal Biomechanics and their Relevance in Keratoconus - A Review. MRJMMS, 2017; 5(6): 280-289.