

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINA

**CERCETĂRI PRIVIND ROLUL MICROSCOPIEI
SPECULARE ÎN DIAGNOSTICUL ȘI URMĂRIREA
PACIENȚILOR CU KERATOCONUS**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CĂLIN-PETRU TĂTARU

Student-doctorand:

DINA MARIA-SILVIA

ANUL

2025

Lista lucrărilor științifice elaborate și publicate	3
Listă de abrevieri	4
Introducere	5
I. Partea generală	7
1. Corneea	7
1.1. Anatomia și fiziologia corneei	7
1.2. Proprietățile biomecanice ale corneei	9
2. Keratoconus	12
2.1. Definiția și clasificarea keratoconusului	12
2.2. Fiziopatologia și epidemiologia keratoconusului	13
2.3. Diagnosticul clinic al keratoconusului	15
2.4. Diagnosticul paraclinic al keratoconusului	16
2.4.1. Modificări topografice corneene în keratoconus	16
2.4.2. Modificări biomecanice corneene în keratoconus	17
2.4.3. Modificări ale endoteliului cornean în keratoconus	19
2.5. Metode de tratament în keratoconus	20
2.5.1. Metode de corecție optică	21
2.5.2. Metode de stopare a progresiei - Crosslinking cornean	21
2.5.3. Metode de tratament chirurgical în keratoconus	26
II. Contribuții personale	31
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	31
4. Studiul I: Efectul crosslinkingului standard asupra endoteliului cornean în keratoconus	33
4.1. Metodologia generală a cercetării	33
4.2. Rezultate	41
4.2.1. Rezultate descriptive	41
4.2.2. Analiza pre și post intervenție în stadiul I de Keratoconus	48
4.2.3. Analiza pre și post intervenție în stadiul II de Keratoconus	53
4.2.4. Analiza pre și post intervenție în stadiul III de Keratoconus	56
4.2.5. Analiza pre și post intervenție în stadiul IV de Keratoconus	59
4.2.6. Corelații în întreaga cohortă	62
4.3. Discuții	66
5. Studiul II: Compararea crosslinking-ului standard și accelerat în keratoconus	70
5.1. Metodologia generală a cercetării	70
5.2. Rezultate	72
5.2.1. Rezultate descriptive	72
5.2.2. Compararea crosslinking-ului cornean protocolul standard și cel accelerat	76
5.3. Discuții	92
Concluzii și contribuții personale	95
Listă figuri și tabele	98
Bibliografie	103

Lista lucrărilor științifice elaborate și publicate

Articole *in extenso* publicate în reviste ISI

1. **Impact of corneal crosslinking on endothelial and biomechanical parameters in keratoconus**, Maria-Silvia Dina, Maria-Cristina Marinescu, Cătălina-Gabriela Corbu, Mihaela-Monica Constantin, Cătălina-Ioana Tătaru, Călin-Petru Tătaru, **Journal of Clinical Medicine**, FI la momentul publicării **3.0** (Capitolul II.5).

Articole *in extenso* publicate în reviste indexate în baze de date internaționale (BDI)

2. **Corneal topography - review of available methods of investigation and impact in the diagnosis and follow-up of keratoconus**, Maria-Silvia Dina, Maria-Cristina Marinescu, Cătălina-Gabriela Corbu, Mihaela-Monica Constantin, Cătălina-Ioana Tătaru, Călin-Petru Tătaru - **Maedica**, Volume 20, No. 2, 2025, indexat Pubmed (Capitolul I.2.4)
3. **Standard and accelerated crosslinking protocols in keratoconus - differences and evolution at one year - Romanian Journal of Ophthalmology**, Volume 69 Issue 2, 2025 - indexat Pubmed (Capitolul II.5)

Introducere

Keratoconusul (KC) este o boală ectatică corneană, caracterizată printr-o subțiere progresivă a corneei, care conduce la miopie, astigmatism și o scădere a acuității vizuale ce nu mai poate fi corectată prin intermediul corecției optice aeriene [1]. Afecțiunea este bilaterală, asimetrică având o evoluție insidioasă care apare la populația tânără în timpul pubertății, evoluând în decadele a doua și a treia și stabilizându-se în jurul vârstei de 40 de ani. Constatările examinării cu lampa cu fantă în stadiile incipiente ale keratoconusului pot fi aparent normale, devenind evidente abia în stadiile avansate. Acuitatea vizuală este diminuată, ceea ce duce la o calitate a vieții mai scăzută în rândul tinerilor. Incidența este estimată la 1,5 - 25 de cazuri la 100.000 de persoane/an, cu o rată mai mare la pacienții din Orientul Mijlociu și Asia [1].

Topografia corneană este esențială în diagnosticarea precoce a bolii, analizând geometria corneană și ajutând astfel la stabilirea metodei de tratament și la urmărirea evoluției pacienților. Această investigație permite stadializarea keratoconusului, oferind markeri specifici ai acestei patologii și sprijinind clinicienii în gestionarea mai bună a acestei afecțiuni subdiagnosticate care afectează tinerii.[2]

Proprietățile biomecanice corneene prezintă din ce în ce mai multă semnificație în patologia oculară, fiind utile atât în progresia glaucomului, cât și în erorile de refracție și patologia keratoconusului.[3][4][5] Histerezisul cornean (CH) și factorul de rezistență corneană (CRF) pot fi măsurați cu ajutorul Analizorului de Răspuns Ocular (ORA), existând studii care arată că valorile acestor parametri biomecanici sunt semnificativ statistic mai mici în keratoconus în comparație cu persoanele sănătoase. În plus cu cât keratoconusul avansează, biomecanica corneana pare a fi mai afectată. [18]

Un pas semnificativ în tratamentul keratoconusului a fost reprezentat de reticularea colagenului cornean (CXL), introdusă în practica clinică în anii 2000, care oprește progresia ectaziei [6]. CXL își propune să stabilizeze ectazia corneană, fiind o procedură chirurgicală utilizată pentru a crește rezistența biomecanică a corneei prin formarea de legături chimice între fibrele de colagen, ceea ce duce la inhibarea progresiei

keratoconusului, menținând astfel acuitatea vizuală în timp și prevenind complicațiile [7][8][9].

Tehnica CXL de îndepărtare a epitelului a fost aplicată pentru prima dată în corneele cu keratoconus uman în 1998 și consta într-o îndepărtare epitelială, după care stroma corneană este saturată cu riboflavina (vitamina B2), un fotosensibilizator, timp de 30 de minute. Apoi, se aplică radiații ultraviolete A (UVA, 370 nm), care produc specii reactive de oxigen, care la rândul lor induc legături încrucișate interfibrilare de colagen. Motivul îndepărtării epitelului a fost descris ca fiind permiterea penetrării adecvate a riboflavinei în țesutul stromal, unde absoarbe lumina UVA și produce legături încrucișate efective între fibrele de colagen din stroma corneană. Numeroase tehnici de crosslinking corneean au fost create de-a lungul anilor în încercarea de a găsi o metodă care să combată disconfortul ocular creat de dezepitelizarea corneana și de durată lungă a procedurii și care să ofere același rezultat de oprire a evoluției bolii [10][11][12].

Microscopia speculară este o tehnică neinvazivă care ne permite să vizualizăm și să analizăm endoteliul cornean. Endoteliopatia corneană este un termen larg utilizat pentru a clasifica mai multe boli și afecțiuni clinice care afectează structura și funcția endoteliului cornean. Una dintre funcțiile fiziologice ale endoteliului este de a secreta o matrice de colagen care formează membrana Descemet, dar funcția fiziologică principală a endoteliului cornean este de a menține sănătatea și transparența stromei corneene [13].

Tehnicile de crosslinking corneean care au ca obiectiv să întrerupă evoluția ectatică caracteristică a keratoconusului, au fost create astfel încât să nu lezeze endoteliul cornean, a cărei posibilitate de regenerare este limitată. Totuși de-a lungul anilor studiile nu au reușit să stabilească în mod concret, dacă apar modificări endoteliale din cadrul acestei patologii, păreri fiind contrare.

Patologia încă pe deplin neînțeleasă, face ca lucrarea de față să abordeze o temă de actualitate din cadrul afecțiunilor ectatice corneene și își propune să evalueze endoteliul cornean, corelând parametrii oferiti de microscopia speculară cu parametrii topografici și ai biomecanicii corneene. Prin studierea celor două loturi de pacienți, mi-am propus să urmăresc parametrii endoteliali corneeni în funcție de stadiul afecțiunii corneene și să cercetez dacă există modificări apărute după intervenția de crosslinking. Având în vedere că linia de demarcație corneana poate fi urmărită după procedura pentru a observa gradul profunzimii reticularii corneene, voi analiza dacă există diferențe între cele două tehnici de CXL epi-off (standard și accelerat) care să ridice problema, afectării endoteliale sau a parametrilor biomecanici și topografici.

Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Scopul acestei cercetări este reprezentat de explorarea evoluției parametrilor endoteliali, biomecanici și topografici corneeni la pacienții cu keratoconus, înainte și după intervenția de stopare a progresiei - crosslinking cornean, fie protocolul standard, fie protocolul accelerat.

Obiectivele primului studiu vizează aprofundarea unei serii de idei principale și analize corelaționale, bazate pe lotul de pacienți înrolați în studiu:

- Evaluarea existenței unor corelații între stadializarea afecțiunii și parametrii măsurați cu ajutorul microscopiei speculare, a Ocular response analyser și a topografiei corneene;
- Evaluarea parametrilor topografici (keratometrie minimă, maximă, medie, astigmatism cornean), endoteliali (densitate celulară, suprafața medie celulară, variabilitate și hexagonalitatea celulelor, atât central, cât și paracentral), biomecanici (histerezis cornean și factor de rezistență corneană) și grosimea corneeană înainte de procedura de crosslinking cornean epi-off și la o lună și la 6 luni după efectuarea procedurii;

În plus, în cadrul celui de-al doilea studiu au fost evaluate o serie de ipoteze legate de comparația celor două proceduri de crosslinking cornean, protocolul standard și protocolul accelerat:

- Evaluarea parametrilor topografici corneeni (keratometrie minimă, maximă, medie, astigmatism cornean), grosimii corneene centrale, biomecanici corneeni (histerezis cornean și factor de rezistență corneană) înainte de procedura de crosslinking cornean protocol standard și la 12 luni după efectuarea procedurii și evaluarea liniei de demarcație la 12 luni după efectuarea procedurii, atât standard cât și accelerat pentru a observa dacă există diferențe între cele două proceduri aplicate și dacă adâncimea liniei de demarcație diferă ca profunzime între cele două proceduri astfel încât să altereze parametrii endoteliali corneeni.

Studiul I: Efectul crosslinking-ului asupra endoteliului cornean în keratoconus

Metodologia generală a cercetării

Acest studiu este conceput ca un studiu intervențional prospectiv și retrospectiv, nerandomizat. Toți pacienții care s-au prezentat și au fost diagnosticați cu keratoconus la Clinica Oftaclinic din București între data 2019 și 2024 au fost selectați pentru includerea în studiu. Cohorta de studiu a fost formată prin aplicarea criteriilor de includere și excludere. Toți pacienții și, în cazul minorilor, reprezentanții lor legali, și-au dat consimțământul informat. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică al Oftaclinic.

Criteriul de includere a fost diagnosticul de keratoconus progresiv. Keratoconusul a fost diagnosticat și stadializat conform stadializării Amsler-Krumeich, iar progresia a fost definită drept o creștere de cel puțin 1 dioptrie (D) în decurs de un an de urmărire a celui mai abrupt meridian cornean (Kmax) [14].

Criteriile de excludere din studiu au constat în:prezența alte patologii oculare (patologie vitreo-retiniană, glaucom, cataractă, alte ectazii corneene sau antecedente de chirurgie corneană), sarcina și alăptarea,nerespectare investigațiilor necesare (de exemplu, scor scăzut al forme de undă la testarea Ocular Response Analyser),prezența a oricare dintre contraindicațiile CXL cunoscute (sensibilitate cunoscută la ingredientele utilizate în timpul procedurii, grosimea corneei sub 400 μ m, antecedente de patologie corneană). [15]

Toți pacienții au fost supuși unei consultații oftalmologice complete, care a inclus acuitatea vizuala (fără și cu corecție), biomicroscopia, refracția manifestă, topografia corneana (Topcon, Tokyo, Japonia), examenul biomecanicii corneene (Ocular Response Analyser), grosimea corneană centrală și microscopia speculară(Nidek, Gamagori, Japonia).

Datele analizate în cadrul acestui studiu provin din consultația pre-intervenție și din consultația efectuată la 1 luna și 6 luni după intervenția CXL “epi-off”.

Datele analizate în acest articol au fost testate cu testul Levene, urmat de testul t dependent, pentru a identifica diferențe semnificative între examinări (același pacient -

înainte de intervenție, la o lună și la 6 luni după intervenție). Cele 4 stadii de keratoconus au fost comparate folosind testul ANOVA unidirecțional, urmat de testul Tukey pentru analiza post-hoc.

Coeficientul de corelație Pearson („r Pearson”) a fost calculat pentru a determina gradul de corelație dintre variabile (corelație slabă: r Pearson între 0,3 și -0,3, corelație moderată: 0,3 - 0,5 sau -0,3 - -0,5, corelație puternică: peste 0,5, sub -0,5). Valoarea p de 0,05 a fost considerată pragul de semnificație statistică. Analiza statistică a fost efectuată utilizând pachetul statistic IBM SPSS Statistics pentru Windows, versiunea 26 (IBM Corp., Armonk, NY, SUA).

Rezultate

Acest studiu a inclus 47 de pacienți și a analizat 66 de ochi (diagnosticați cu keratoconus progresiv, eligibili pentru intervenția de crosslinking). Din totalul pacienților, 17,02% dintre pacienți au fost femei, iar 82,98% bărbați. Vârsta medie a fost de 25,43 de ani (DS 6,68). Conform clasificării Amsler-Krumeich, 48,48% dintre ochi erau în stadiul I (32 ochi), 33,33% în stadiul II (22 ochi), 12,12% în stadiul III (8 ochi) și 6,06% în stadiul IV (4 ochi).

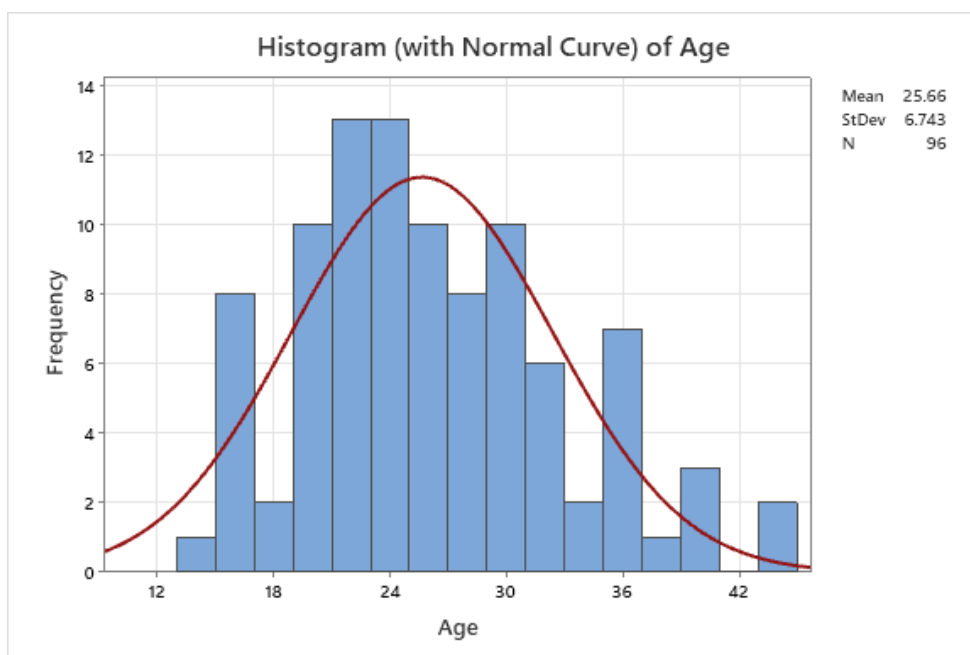


Figura 1. Distribuția pacienților cu keratoconus în funcție de vârstă

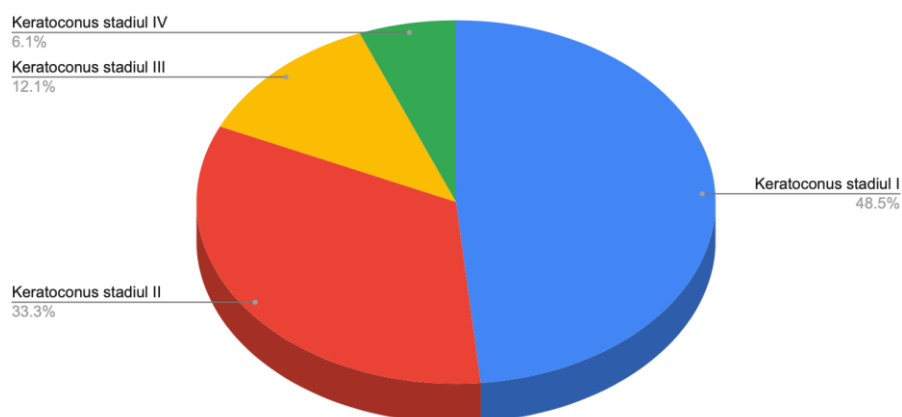


Figura 2. Distribuția pacienților în funcție de stadiul Keratoconusului

Parametrii de la nivelul endoteliului nu au prezentat diferențe semnificative între stadiile KC: variabilitatea celulară a crescut pe măsură ce ectazia a avansat ($p = 0,033$) (valoarea medie 24,81% în stadiul I, 24,77% în stadiul II, 26,00% în stadiul III și 28,75% în stadiul IV). Cu toate acestea, hexagonalitatea endoteliului cornean nu a fost modificată semnificativ (67,19% în stadiul I, 69,96% în stadiul II, 65,50% în stadiul III și 71,25% în stadiul IV). Alți parametri au prezentat diferențe semnificative: CRF a fost mai mic (valoarea $p = 0,006$), iar grosimea corneei centrale a fost mai mică ($p < 0,001$). De asemenea, parametrii topografici au fost mai avansați, cu valori mai mari ale keratometriei minime, maxime și medii și ale astigmatismului ($p < 0,001$) în cazurile mai avansate.

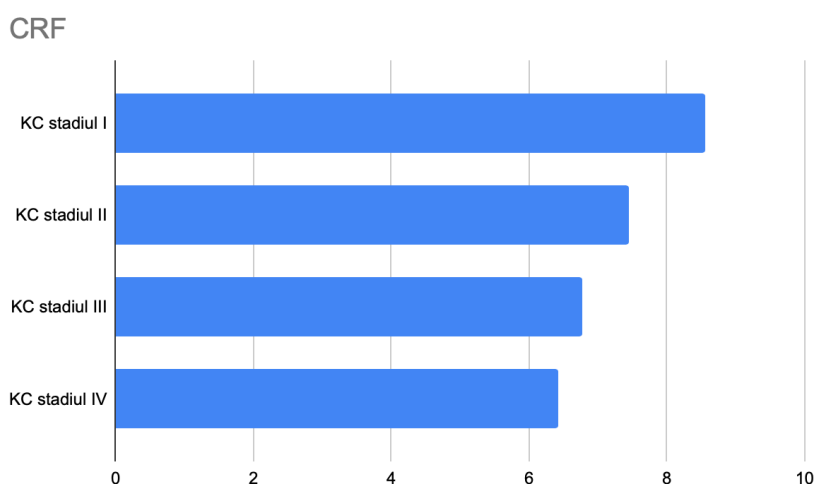


Figura 3. Distribuția valorii medii a factorului de rezistența corneana între stadiile keratoconusului conform clasificării Amsler-Krumeich (înainte de CXL)

Grupul KC stadiul I a fost compus din 32 de ochi. Testul T, care a comparat variabilele pre-CXL cu valorile post-CXL la 1 luna și la 6 luni, a arătat că foarte puțini parametri s-au modificat după procedură. Numărul de celule, hexagonalitatea și densitatea celulară paracentrală au scăzut semnificativ la 6 luni comparativ cu valoarea inițială, iar variabilitatea celulară a crescut semnificativ atât la 1 luna, cât și la 6 luni, comparativ cu grupul KC pre-CXL.

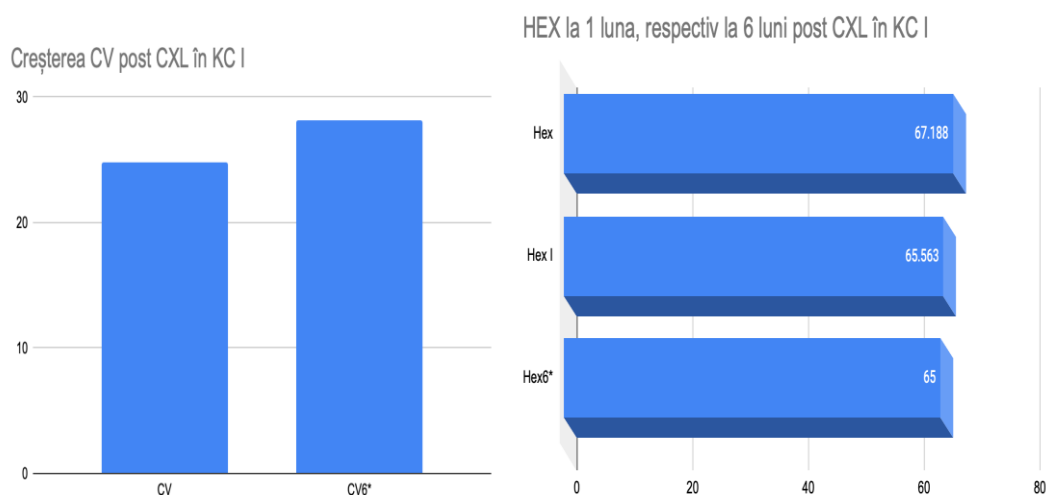


Figura 4. Creșterea valorii medii a coeficientului de variație la 6 luni post CXL în KC I și **Figura 5.** Scaderea mediei celulelor hexagonale post CXL în stadiul I KC

Grupul pacienților cu KC stadiul II a inclus 22 de ochi. Testul T, ce a comparat parametrii pre-CXL cu cei post-CXL la 1 și 6 luni, a evidențiat modificări în număr redus după procedură, însă diferențele devin semnificative după 6 luni. Densitatea celulară a scăzut semnificativ la 6 luni, variabilitatea au crescut semnificativ comparand cu grupul de bază. De asemenea, atât Kmax cat și K average au scăzut semnificativ la 6 luni post-CXL.

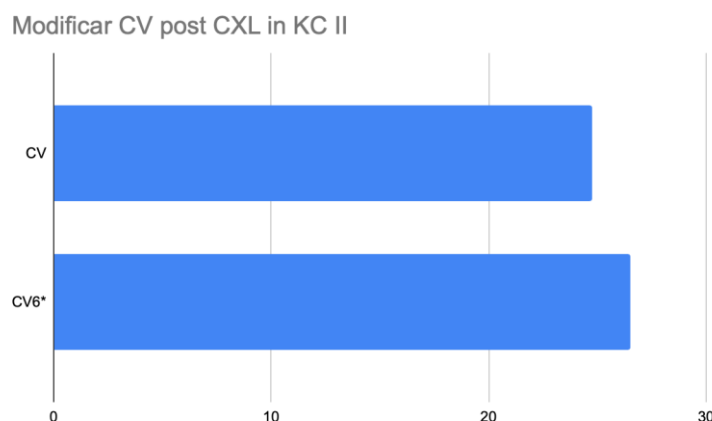


Figura 6. Creșterea coeficientului de variație la 6 luni post CXL în KC II

Grupul Keratoconus Stadiul III a fost compus din 8 ochi. Testul T pereche, care compară variabilele pre-CXL cu valorile post-CXL la una și șase luni, dezvăluie că CRF se îmbunătățește semnificativ după o lună, iar hexagonalitatea paracentrală este afectată numai după 6 luni.

Grupul cu keratoconus în stadiul IV a fost compus din 4 ochi. Testul T pereche, care compară variabilele pre-CXL cu valorile post-CXL la una și șase luni, relevă doar o medie CRF modificată la o lună după procedură.

Corelații în întreaga cohortă

Au existat corelații semnificative statistic între parametrii endoteliului cornean paracentral și variabilele topografice inițiale. Există corelație semnificativă, slabă și pozitivă între variabilitatea celulară paracentrală și keratometria medie și minimă. Există de asemenea corelații semnificative, moderate, negative între numărul celulelor endoteliale la nivel paracentral și keratometria maximă, minimă și medie.

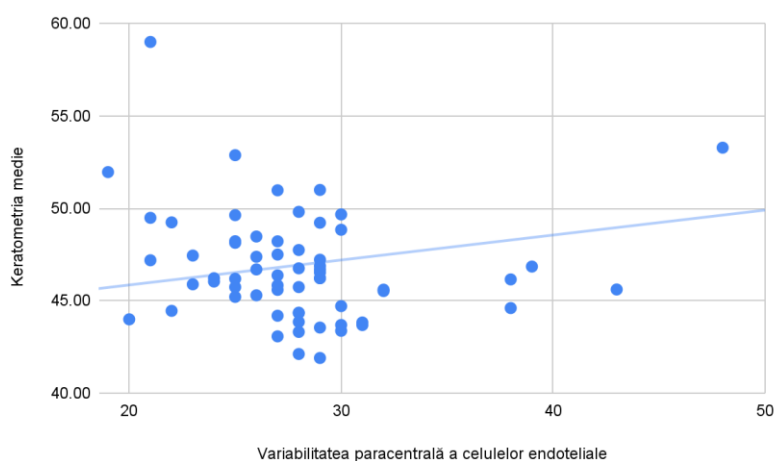


Figure 7. Corelații între keratometria medie și variabilitatea celulară paracentrală, pe întreaga cohortă studiată înainte de crosslinking.

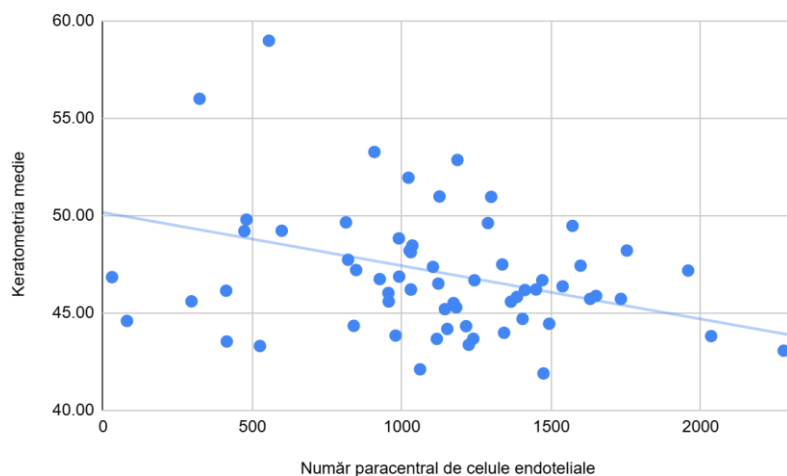


Figure 8. Corelații între keratometria medie și numărul paracentral de celule endoteliale, pe întreaga cohortă studiată înainte de crosslinking.

De asemenea, așa cum era de așteptat, au fost identificate corelații semnificative între parametrii biomecanici și cei topografici: CH a prezentat corelații negative moderate cu keratometria minimă, maximă și medie, CRF s-a corelat negativ moderat cu keratometria minimă, maximă și medie și astigmatismul, iar CCT a fost corelată negativ moderat-puternic cu keratometria minimă, maximă și medie.

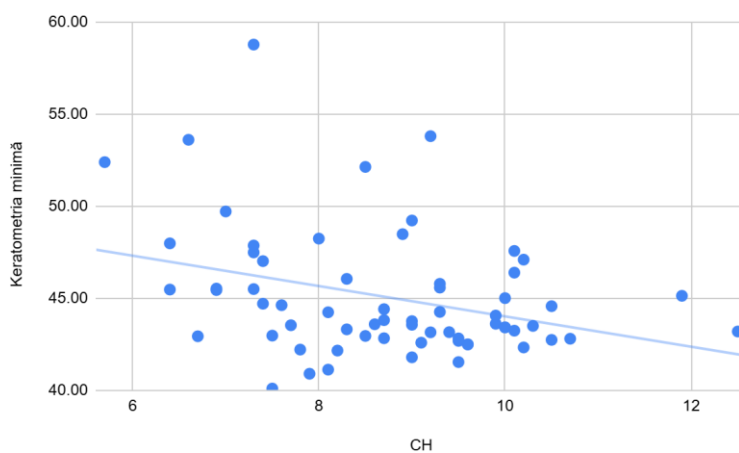


Figura 9. Corelații între keratometria minima și histerezisul cornean, în întreaga cohortă studiată înainte de crosslinking.

Discuții

Deși studiul a fost efectuat pe un număr redus de pacienți, rezultatele obținute au arătat diferențe semnificative în funcție de stadiul keratoconusului, în funcție de

severitatea ectaziei corneene. Conform clasificării Amsler-Krumeich, cu cât stadiul este mai avansat, cu atât astigmatismul cornean și keratometria sunt mai mari, iar grosimea corneei mai mică, lucruri identificate și la nivelul cohortei noastre.

Sturbaum și Peiffer (1993) au descoperit că în stadiile incipiente ale keratoconusului, endoteliul apare normal. Pe măsură ce afecțiunea progresează și stroma corneană se subțiază, celulele endoteliale se aplatizează. Aceasta reflectă, cel mai probabil, întinderea celulelor endoteliale în încercarea lor de a menține continuitatea de-a lungul suprafeței posterioare ce suferă un proces de ectazie continuă [16]. Mai târziu, în cursul bolii, modificările endoteliale includ pleomorfism, polimegatism, degenerare a celulelor endoteliale și prezența de fibrină, celule inflamatorii sau ambele pe suprafața endotelială. Rupturile endoteliului și ale membranei Descemet apar în 11% până la 35% din corneele KC, iar vindecarea acestor defecte poate duce, de asemenea, la pleomorfism și polimegatism.[16]. Deși pierderea progresivă a celulelor endoteliale poate reduce acuitatea vizuală prin pierderea transparenței stromale, momentan nu există un tratament definitiv pentru a opri pierderea celulară [17].

Au existat studii în literatură care sugerează o modificare a stratului de celule endoteliale în keratoconus. Un studiu amplu, ce a cuprins peste 700 de ochi, a arătat că în cazurile mai avansate există o densitate celulară mai scăzută și o variabilitate mai mare [18]. Aceasta se datorează, probabil, numărului mic de pacienți cu stadii avansate incluși în studiul nostru. Aceste rezultate sunt similare cu ale studiului nostru, doar variabilitatea fiind semnificativă în cohorta noastră. Pe de altă parte, există studii în literatură care nu au găsit diferențe în ceea ce privește densitatea, variabilitatea și hexagonalitatea între stadiile KC Amsler-Krumeich [19].

Un studiu care a utilizat tehnologii de tip deep learning a constatat că numărul mediu de celule în keratoconus este 175,00, comparabil, dar ușor mai mare decât valoarea de aproximativ 137 găsită în prezentul studiu [20]. Mai important, această medie a diferit semnificativ față de cea a ochilor miopi, care au fost incluși ca grup de control [20]. Un alt studiu recent a inclus pacienți egipteni cu keratoconus, cu stadii 1-3 Amsler-Krumeich, și a găsit o scădere semnificativă a densității celulare și o creștere a variabilității [21]. Comparativ cu cohorta noastră, acești parametri au relevat o alterare mai importantă a stratului endotelial, sugerând că sunt necesare mai multe studii pentru a înțelege comportamentul endotelial al keratoconusului în diferite populații și ce factori pot influența sănătatea endoteliului. Important, în cohorta noastră, densitatea medie centrală a

celulelor endoteliale a fost suficientă pentru a menține transparența corneei (peste 2900 celule/mm²), iar scăderea densității celulare nu a fost semnificativă după CXL.

Keratoconusul este o afecțiune care implică degradarea fibrelor de collagen. Din punct de vedere histologic, KC se caracterizează printr-un număr mai mic de fibre de collagen, împreună cu o stromă mai subțire, keratocite anormale, membrana Bowman afectată și membrana bazală cu depozite de fier [22]. Creșterea expresiei metaloproteinazei matriceale (MMP-1) duce la degradarea matricei extracelulare, afectând collagenul, iar scăderea expresiei unei enzime responsabile pentru crosslinking-ul natural al collagenului contribuie la o structură corneană mai deficitară în keratoconus [23], la care se adaugă o concentrație lacrimală mai mare de markeri inflamatori la pacienții cu keratoconus [24]. Deoarece collagenul este responsabil pentru elasticitatea și rezistența corneei, se știe că HC și FRC sunt scăzute în keratoconus. Un studiu comparativ amplu a găsit o medie de 7,5 mmHg pentru HC și 6,2 mmHg pentru FRC, semnificativ mai mici decât media de 10,8 și respectiv 11,0 la ochii normali [25]. Aceste valori sunt comparabile cu mediile obținute în studiul nostru. Mai mult, așa cum era de așteptat, variabilele keratoconusului (keratometria medie și grosimea corneană) se corelează bine cu HC și FRC, similar altor rezultate din literatură [26].

Evaluarea biomecanică a corneei are o valoare mare, deoarece modificările focale pot să apară înainte ca cele topografice să devină evidente, având astfel un potențial mare în diagnosticarea precoce a ectaziei [27] HC și, mai ales, FRC reprezintă o bună acuratețe în diferențierea corneei normale de cea ectazică. [27] Similar, în studiul nostru doar FRC, nu și HC, a diferit semnificativ între stadiile keratoconusului, susținând rolul FRC în diagnosticul și stadializarea KC.

Pe lângă relația variabilă cu stadiul bolii, în cohorta noastră proprietățile endoteliale s-au corelat cu alți parametri specifici KC – anume astigmatismul cornean și valorile keratometrice (minime, maxime și medii). Aceste constatări au fost observate anterior în literatură, densitatea celulelor endoteliale fiind negativ corelată cu meridianele cele mai bombate și mai plate ale corneei și pozitiv corelată cu grosimea minimă a corneei [28]..

Crosslinking-ul corneean este un tratament bine stabilit în keratoconus, cu îmbunătățiri bine cunoscute ale acuității vizuale, valorilor refractive și aspectului topografic [29]. În studiul nostru, nu au existat modificări statistic semnificative în ceea ce privește topografia corneei sau parametrii biomecanici, deoarece perioada de urmărire raportată a fost de doar 6 luni. Studii care au urmărit pacienții de la un an până la 7 ani

descriu îmbunătățiri semnificative în keratometrie și erori refractive, dar mai puțin în parametrii biomecanici [30][31]. Pe de altă parte, anumite modificări endoteliale au fost observate în cohorta noastră, precum variabilitatea celulară crescută și aria medie a celulelor, precum și o scădere a numărului de celule în zona paracentrală. Un studiu similar al nostru, cu follow-up de un an, nu a găsit diferențe în ceea ce privește densitatea celulară, însă nu a investigat alți parametri endoteliali pe care noi i-am găsit diferiți înainte și după CXL [32]. Un alt studiu recent a arătat o scădere semnificativ statistică a densității celulare după 6 luni, însă densitatea finală nu afectează funcția endotelială și claritatea corneei. [33] Variația semnificativă a parametrilor endoteliali în zona paracentrală după crosslinking obținută în studiul nostru ar putea fi explicată și prin faptul că zona paracentrală la pacienții din studiu este cea mai deformată și cu cea mai mică rezistență corneană (coincide cu zona de ectazie corneană). Deși aceste modificări au fost statistic semnificative, este puțin probabil ca ele să fie clinic semnificative. Utilizarea riboflavinei previne leziunile celulelor endoteliale cauzate de UVA, iar mai multe studii nu au raportat nicio scădere a densității celulelor endoteliale și mult mai puține studii au raportat scăderi ale densității celulelor endoteliale după CXL [34]. Cel mai probabil, modificările semnificative apar în corneele KC foarte subțiri, unde endoteliul primește o doză mai mare de UVA [35]. Reacția UVA din procesul de crosslinking afectează nervii sub-bazali [36][37], care sunt esențiali pentru pompa endotelială. Astfel, apar modificări în celulele endoteliale. În timp, celulele care nu au fost afectate tind să le înlocuiască pe cele deteriorate[36].

În studiul nostru, a existat o creștere semnificativă a hexagonalității. În stadiul IV, fibrele nervoase sunt mai evidente și, probabil, prin procesul de iradiere, funcția endoteliului este afectată și, ulterior, procesul de regenerare duce la o creștere a hexagonalității. Edemul stromal începe să se reducă după prima lună de la CXL, când apare și regenerarea fibrelor nervoase și o creștere a densității stromale[37]. Totuși, numărul redus de subiecți în stadiul IV AK reprezintă o limitare a studiului nostru, fiind necesare mai multe cercetări pentru a determina dacă această creștere post-CXL a hexagonalității se poate reproduce în alte cohorte.

Studiul II: Compararea crosslinking-ului standard și accelerat în keratoconus

Metodologia generală a cercetării

Acest studiu retrospectiv evaluează evoluția cazurilor de keratoconus la un an după efectuarea CXL accelerată sau standard utilizând metoda epi-off. Toți pacienții care s-au prezentat la Clinica Oftaclinic din București între 2021 și 2022 au fost selectați pentru criteriile de includere. Pacienții și reprezentanții lor legali (în cazul minorilor) și-au oferit consimțământul informat. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică Oftaclinic.

Toți pacienții au fost supuși unei consultații oftalmologice complete, care a inclus și înregistrări ale refracției (folosind înregistrări auto-refractometrice), dioptrii corneene maxime și minime măsurate cu topografie corneeană Aladdin (Topcon, Tokyo, Japonia), adâncimea liniei de demarcație, măsurată cu Tomografie de Coerență Optică (OCT), grosimea corneeană centrală (CCT), proprietăți biomecanice corneene: histerezis corneean (CH) și factor de rezistență corneeană (CRF), măsurat cu Analizorul de Răspuns Ocular (ORA) (Reichert Ophthalmic Instruments Inc, Depew, NY, SUA).

Pacienții au fost incluși dacă îndeplineau criteriile pentru keratoconus progresiv: creșterea dioptriei corneene pe meridianul cel mai abrupt (Kmax) cu mai mult de 1 D, creșterea medie a dioptriei corneene cu mai mult de 0,75 D, creșterea echivalentului sferic (SE) cu mai mult de 0,50 D, subțierea grosimii corneene cu mai mult de 5% sau cu mai mult de 20 micrometri, antecedente de scădere a acuității vizuale.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de grosimea corneei mai mică de 400 micrometri, antecedente de keratită sau intervenție chirurgicală corneeană, sarcină și cicatrici corneene.

Clasificarea Amsler Krumeich a fost utilizată pentru stadializarea cazurilor de keratoconus, un sistem care ia în considerare gradul de miopie și astigmatism, keratometria medie și grosimea corneeană centrală minimă [38].

Pentru a identifica diferențe semnificative între momentele de timp ale aceluiași pacient (înainte și după CXL), a fost efectuat testul Levene, urmat de testul t dependent. Pentru a identifica diferențe semnificative între procedura accelerată și cea standard, a fost efectuat testul Levene, urmat de testul t independent. Gradul de corelație dintre variabile a fost calculat folosind coeficientul de corelație Pearson („r Pearson”), iar corelațiile au fost considerate slabe (r Pearson între 0,3 și -0,3), moderate (r Pearson 0,3 - 0,5 sau -0,3 - -0,5) și puternice (r Pearson peste 0,5, sub -0,5). Valoarea p de 0,05 a fost considerată pragul pentru semnificație statistică. Analiza statistică a fost efectuată utilizând pachetul statistic IBM SPSS Statistics pentru Windows, versiunea 26 (IBM Corp., Armonk, NY, SUA).

Rezultate

Rezultate descriptive

Cohorta cu pacienți cu keratoconus care au efectuat CXL **accelerat** a cuprins 20 de ochi, 15,00% femei și 85,00% bărbați, cu o vârstă medie de $24,55 \pm 6,27$ ani. Conform criteriilor Amsler-Krumeich, doi ochi au fost diagnosticați cu keratoconus stadiul I, zece ochi cu stadiul II, doi ochi cu stadiul III și șase ochi cu stadiul IV.

Cohorta cu pacienți cu keratoconus care au efectuat CXL **standard** a cuprins 21 de ochi, 33,33% femei și 66,67% bărbați, cu o vârstă medie de $19,80 \pm 5,99$ ani. Conform criteriilor Amsler-Krumeich, trei ochi au fost diagnosticați cu keratoconus stadiul I, nouă ochi cu stadiul II, doi ochi cu stadiul III și șapte ochi cu stadiul IV.

Cele două cohorte au avut caracteristici de bază similare. Cu toate acestea, vârsta a fost semnificativ mai mică (valoare p 0,018), iar valoarea refractivă cilindrică a fost semnificativ mai mare în grupul cu procedură standard (valoare p 0,026).

Protocolul de CXL accelerat a dus la îmbunătățiri semnificative. După CXL, valoarea refractivă cilindrică, echivalentul sferic și Kmax au fost semnificativ reduse, iar CCT și CRF au fost semnificativ mai mari.

Echivalent sferic (D)

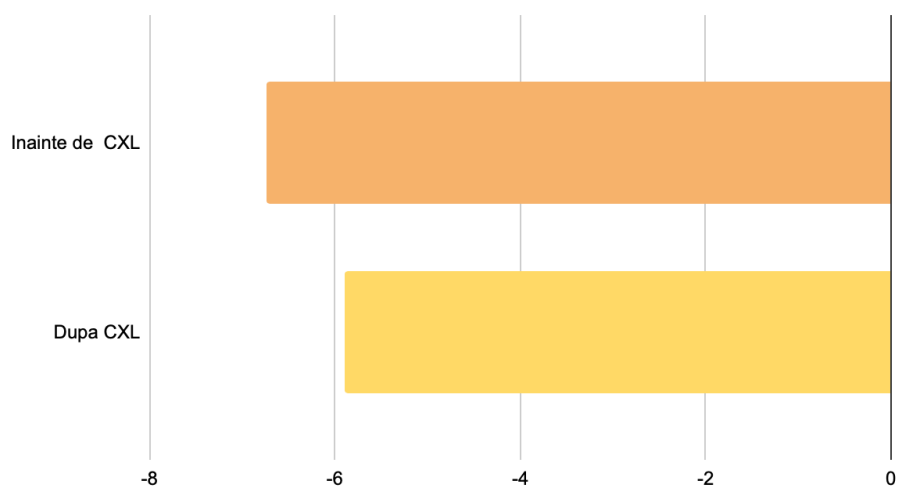


Figura 10 Echivalentul sferic la pacienții care au efectuat CXL accelerat după și înainte de intervenție

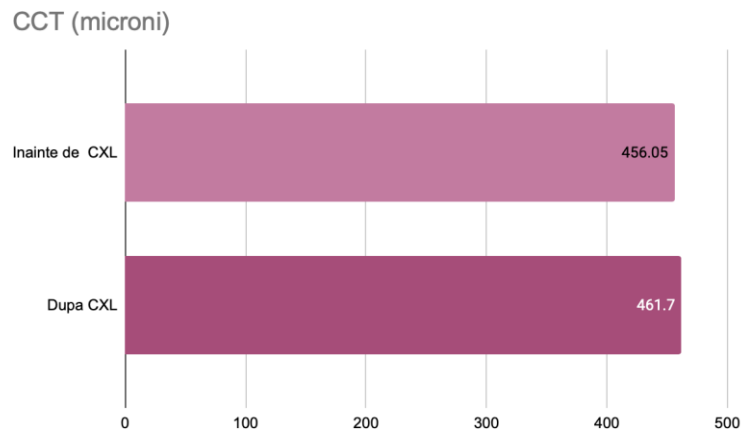


Figura 11 Grosimea centrala corneana la pacienții care au efectuat CXL accelerat după și înainte de intervenție

Rezultate similare au fost găsite și în grupul cu protocolul CXL standard. După CXL, valoarea cilindrică refractivă, echivalentul sferic și Kmax au fost semnificativ reduse, iar CCT și CRF au fost semnificativ mai mari.

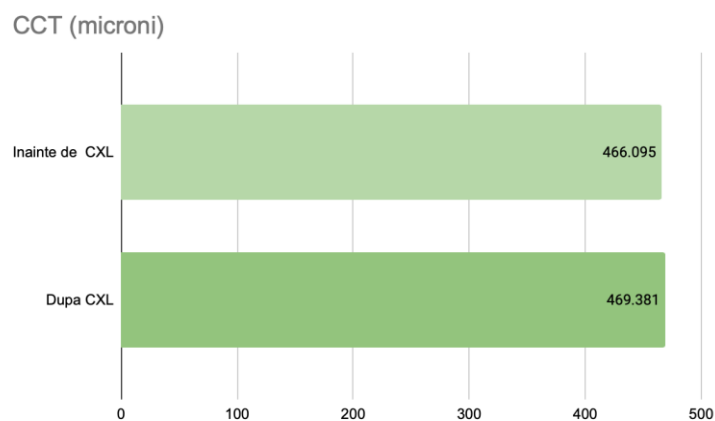


Figura 12 Grosimea centrala corneana la pacienții care au efectuat CXL standard după și înainte de intervenție

Factorul de Rezistența Corneană

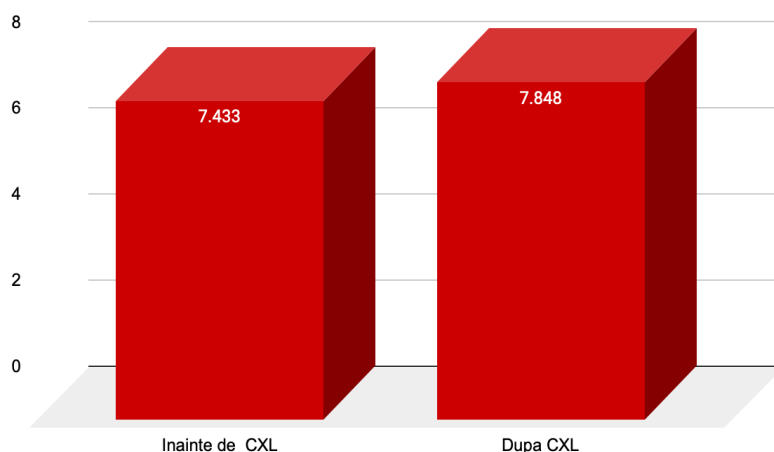
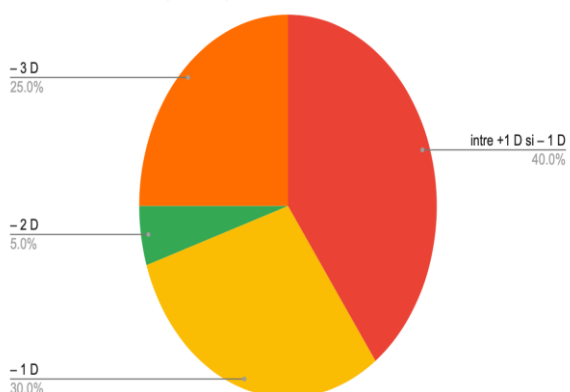


Figura 13. Factorul de rezistența corneana la pacienții care au efectuat CXL standard după și înainte de intervenție

Comparând celor două protocoale, ambele s-au dovedit a fi la fel de eficiente. Nu au existat diferențe statistic semnificative în magnitudinea îmbunătățirii ES, CCT, keratometriei maxime și minime, CH, CRF sau adâncimii liniei de demarcație.

Important de menționat este ca niciun pacient nu a avut o creștere a Kmax cu mai mult de o dioptrie după intervenție. Un procent similar de pacienți a avut un Kmax stabil (schimbări +1 D la -1 D) în cele două grupuri (40,0% pentru CXL accelerat și 38,09% pentru CXL standard).

Accelerated CXL (n = 20)



Standard CXL (n = 21)

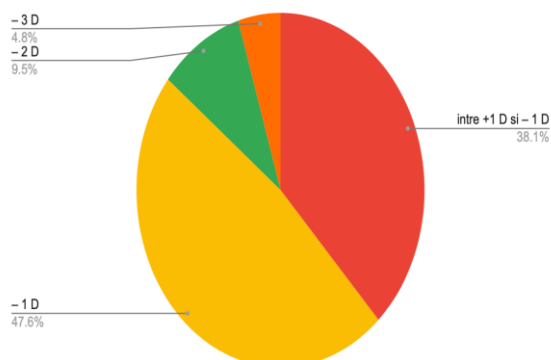


Figura 14 Distribuția pacienților care au efectuat CXL accelerat în funcție de gradul de aplatizare Kmax și **Figura 15** Distribuția pacienților care au efectuat CXL standard în funcție de gradul de aplatizare Kmax

Linia de demarcație a fost identificată utilizând OCT de Segment Anterior și adâncimea raportată la grosimea totală a corneei a fost calculată. Adâncimea absolută medie a fost de 278,90 micrometri în grupul accelerat și de 280,43 micrometri în grupul standard. Adâncimea medie raportată la grosimea corneei a fost de 61,21% în grupul accelerat și de 60,04% în grupul standard. Cele două grupuri nu au diferit semnificativ în ceea ce privește adâncimea liniei de demarcație (valoare p 0,904) sau în ceea ce privește adâncimea relativă (valoare p 0,574)

Au existat mai multe corelații semnificative între diferențele de dinainte și de după procedură și caracteristicile inițiale ale pacienților. Gradul de îmbunătățire refractivă (scăderea SE) a fost cu atât mai mare cu cât pacientul era mai miop și mai astigmat (corelație negativă r cu dioptriile sferice inițiale -0,332, $p = 0,034$ și cu dioptriile cilindrice inițiale r -0,319, $p = 0,042$), și cu cât forma inițială a corneei avea o curbura mai abruptă (corelații pozitive cu K_{max} r 0,529, valoare $p < 0,001$, cu K_{min} r 0,465, valoare $p = 0,002$).

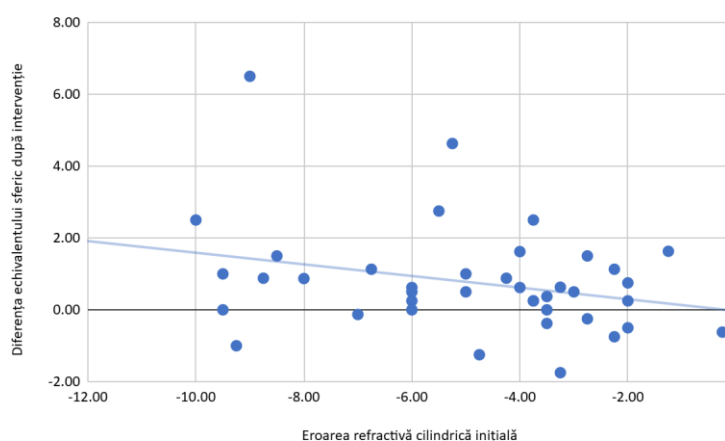


Figura 16. Corelația între eroarea relativă cilindrică inițială în întreaga cohortă și îmbunătățirea SE după procedura CXL.

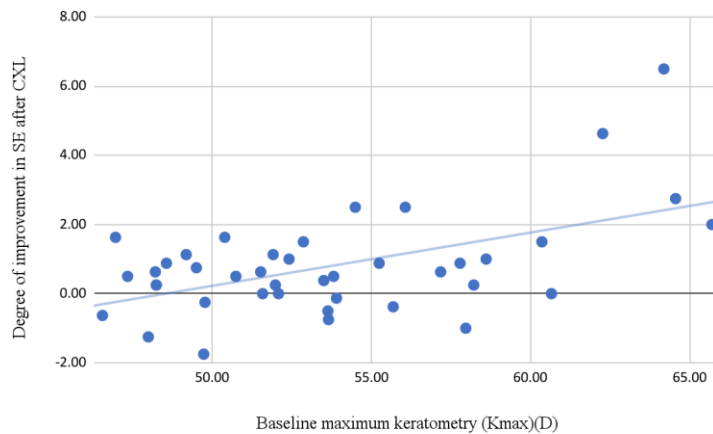


Figura 17. Corelația între Kmax inițial în întreaga cohortă și îmbunătățirea SE după procedura CXL.

Îmbunătățirea parametrilor biomecanici ai CRF-ului a fost corelată pozitiv cu valorile cilindrice ($r = 0,326$, valoare $p = 0,038$) (cu cât eroarea cilindrică a fost mai mică, cu atât îmbunătățirea CRF-ului a fost mai bună). Îmbunătățirea topografică a Kmax a fost de asemenea corelată pozitiv cu valoarea cilindrică de bază ($r = 0,327$, valoare $p = 0,037$), ES ($r = 0,417$, valoare $p = 0,007$) și FRC ($r = 0,378$, valoare $p = 0,015$), și corelată negativ cu Kmin de bază ($r = -0,515$, valoare $p = 0,001$) și Kmax ($r = -0,532$, valoare $p < 0,001$) – cu cât corneea era mai bombată și cu cât astigmatismul a fost mai mare înainte de procedură, cu atât Kmax a fost mai aplatizat după procedură.

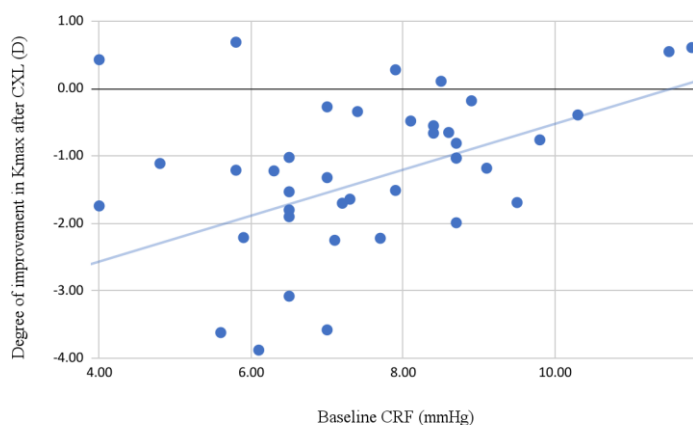


Figura 18. Corelația între CRF inițial în întreaga cohortă și îmbunătățirea Kmax după procedura CXL.

Adâncimea absolută a liniei de demarcație a avut o corelație negativă atât cu Kmax ($r = -0,416$, valoare $p = 0,007$), cât și cu Kmin ($r = -0,314$, valoare $p = 0,045$) (linia de demarcație a fost mai adâncă cu cât corneea era mai plată)

Discuții

În acest studiu, prezentăm eficiența crosslinking-ului corneean în oprirea și chiar reversia progresiei keratoconusului. Aplicând fie protocolul accelerat, fie cel standard, s-au obținut îmbunătățiri statistice semnificative în mai mulți parametri specifici.

Eficiența și siguranța protocolului standard CXL au fost demonstrate de numeroase studii, însă, pentru a reduce disconfortul intervenției prelungite, protocolul de CXL accelerat epi-off a fost introdus în practica clinică [39]. Acesta necesită o schimbare în compoziția soluției de riboflavină, pentru a îmbunătăți penetrarea stromală. Este bine cunoscut că fotooxidarea în crosslinking și siguranța acesteia depind de cantitatea de riboflavină din stroma corneei. În acest studiu, am utilizat o soluție de riboflavină ce conținea hipromeloză, care facilitează difuzia substanței active în stratul stromal. Se știe că progresia bolii este mai probabilă în rândul pacienților tineri și studiile arată eficiența metodei standard [39][40].

Unii autori recomandă CXL accelerat pentru copii, deoarece procedura este mai rapidă, în timp ce alții sugerează că perioadele de urmărire mai lungi pot revela evoluții divergente ale celor două grupuri [39]. Astfel, eficiența celor două proceduri epi-off a fost comparată, iar un studiu din 2020 a găsit că după 2 ani de urmărire, copiii care au suferit procedura accelerată au avut o evoluție mai proastă decât cei care au urmat procedura standard, în termeni de refracție, topografie și acuitate vizuală. [41] O meta-analiză recentă a comparat cele două protocoale utilizate în keratoconusul pediatric și nu a găsit nicio diferență în ceea ce privește Kmax, SE și CCT, dar o evoluție mai bună a CXL standard în ceea ce privește acuitatea vizuală după doi ani. [42]. De aceea, în studiul nostru, cele două grupuri de protocol au diferit semnificativ: pacienții din grupul standard au fost semnificativ mai tineri și au avut un grad de astigmatism semnificativ mai mare, deoarece procedura standard era preferată în cazul pacienților tineri, pediatrici. [39], [41][42]

Este important de menționat că, în această cohortă, nu au existat diferențe în adâncimea liniei de demarcație (ca procent din grosimea totală a corneei) – care a fost folosită ca un indicator indirect de eficiență. [39] Prin urmare, rezultatele noastre sugerează că, în această cohortă, eficiența este comparabilă între CXL standard și CXL accelerat.[39]

În acest studiu, ambele protocoale au fost utile pentru a opri progresia ectaziei corneene și chiar pentru a inversa parametrii refractivi, pachimetrici, topografici și biomecanici, după un an. Când studiul a fost efectuat pe grupurile individuale, s-au găsit

rezultate similare. Valorile refractive ale dioptriilor sferice și cilindrice și keratometria maximă au fost reduse, iar CH și CRF au fost crescute.

Evaluarea pacienților nu a demonstrat progresia keratoconusului după procedură. 40% din cazurile din grupul protocolului accelerat și 38,09% din cazurile din grupul protocolului standard au menținut parametrii constanți, iar aproximativ 60% dintre cazuri au prezentat îmbunătățiri. Un registru australian a arătat că ambele protocoale CXL sunt sigure și eficiente, însă procedura standard duce la o acuitate vizuală mai bună, o aplatizare mai semnificativă a meridianului cel mai abrupt, împreună cu o șansă mai mare de a obține un efect mai mare de o dioptrie.[43]

Rezultate similare cu ale noastre au fost obținute în literatură, comparând procedurile CXL epi-off standard și accelerat. Într-un studiu de urmărire pe doi ani al unei cohorte din România, acuitatea vizuală, refracția, grosimea corneei și meridianul cel mai bombat al corneei s-au îmbunătățit similar, cu mici diferențe precum: acuitatea vizuală s-a îmbunătățit mai rapid în grupul accelerat, iar cazul grupului standard a fost obținută o linie de demarcație mai adâncă [29].

În studiul nostru, a fost observată o scădere a erorii refractive cilindrice și a echivalentului sferic, în relație cu scăderea keratometriei maxime. Această schimbare a fost mai mare în grupul standard (Kmax a scăzut în medie cu 1,462 D, comparativ cu 1,276 D în grupul accelerat), ceea ce poate fi explicat prin pacienții mai tineri din grupul standard, care erau încă în creștere și aveau fluctuații hormonale [44].

Întrucât procedura CXL întărește legăturile dintre fibrele de colagen din stroma corneeană, s-a sugerat în literatura de specialitate că proprietățile biomecanice ale corneei ar trebui să se îmbunătățească după procedură. Studiile preclinice care implică corneea umană ex vivo demonstrează că rigiditatea este de peste trei ori mai mare, iar diametrul fibrelor de colagen crește în urma crosslinking-ului în modelele animale.[45][46][47]

Având în vedere numărul mic de cazuri pentru fiecare grup de studiu, pentru a efectua o analiză semnificativă statistic, au fost evaluate corelațiile pentru întreaga cohortă de cazuri. Au fost observate mai multe corelații între gradul de îmbunătățire a parametrilor corneei și caracteristicile inițiale ale pacienților. Scăderea echivalentului sferic a fost mai pronunțată în cazurile cu valori inițiale mai mari în ceea ce privește valorile dioptriilor cilindrice ale refracției și valorile dioptrice ale corneei. Diferența CRF a fost corelată cu valoarea cilindrică inițială, iar diferența Kmax a fost corelată cu FRC, SE și Kmax și Kmin de bază. [27]. Conform analizei statistice, îmbunătățirea factorului de rezistență corneeană a fost corelată pozitiv cu îmbunătățirea valorii dioptrice corneene pe meridianul cel mai

refractiv ca urmare a schimbărilor histopatologice induse de crosslinking, și anume creșterea diametrului fibrelor de colagen și formarea de noi legături între acestea [23]. O analiză multivariată a identificat SE și Kmax de bază ca predictorii pentru aplatizarea semnificativă a Kmax [27][28].

În ceea ce privește siguranța procedurii, grosimea corneei tuturor pacienților din studiul nostru a fost peste 400 de micrometri, o valoare care evită toxicitatea UVA asupra endoteliului corneean. OCT de segment anterior este esențial în investigarea grosimii corneei și în detectarea adâncimii liniei de demarcație, vizualizată ca o bandă hiperreflectivă în mijlocul stromei. În studiul actual, linia de demarcație a fost identificată la o adâncime medie de 278,90 micrometri în grupul accelerat și la 280,43 micrometri în grupul standard. Linia de demarcație a fost detectată la o adâncime mai mare în cazurile cu valori mai mici ale puterii dioptrice corneene.[48] [49]

Concluzii și Contribuții personale

1. În keratoconusul mai avansat, există o creștere a variabilității, care ar părea a fi corelată cu avansarea ectaziei corneene. Polimegetismul crescut este primul semn de afectare endotelială. Deși creșterea lui nu este semnificativă clinic, posibilitatea existenței lui ar putea fi justificată de existența protruziei corneene cauzatoare de stres în straturile mai profunde ale corneei.
2. În keratoconusul mai avansat, hexagonalitatea, deși fără valoare semnificativă statistic, a fost mai crescută, ceea ce poate atrage atenția că atunci când corneea devine mai abruptă, pleomorfismul corneean crește, încercând să compenseze gradul de tensiune corneeană apărută. Niciunul dintre pacienții din studiul de față nu a avut o valoare a celulelor hexagonale în afara limitelor, ceea ce întărește ideea că structura patului endotelial reușește să-și mențină structura și funcția chiar și în cazul unui keratoconus avansat.
3. Rezultatele au arătat odată ce keratoconusul avansează valorile medii ale grosimii corneene centrale scad, valorile medii ale factorului de rezistență corneeană se reduc, iar valorile medii ale keratometriei medii și ale astigmatismului cresc.
4. Studiul nostru a arătat că în cazul stadiului I al keratoconusului, după efectuarea crosslinking-ului corneean, apare o scădere semnificativă ale mediilor unor parametri endoteliali la 6 luni după procedura, respectiv a numărului de celule, a

- hexagonalității și a densității celulare paracentrale comparativ cu lotul de bază, iar variabilitatea celulară a crescut semnificativ atât la o luna cât și la 6 luni.
5. În ceea ce privește stadiul II, modificările endoteliale au apărut strict la 6 luni și au constat într-o scădere semnificativă a valorii medii ale densității celulare și o creștere semnificativă a valorii medii a variabilității celulare.
 6. Stadiile III și IV de keratoconus din studiul nostru, relevă însă modificări minime asupra parametrilor endoteliali, existând doar o creștere a valorii medii a celulelor hexagonale centrale în stadiul III.
 7. Efectuarea corelației între parametrii endoteliului cornean paracentral și variabilele topografice inițiale, pe întreaga cohortă de studiu a arătat că există o corelație semnificativă, slabă și pozitivă între variabilitatea celulară paracentrală și keratometria medie și minimă și corelații semnificative, moderate, negative între numărul celulelor endoteliale la nivel paracentral și keratometria maximă, minimă și medie.
 8. În ceea ce privește studiul II, așa cum era de așteptat ambele proceduri, au arătat o eficiență similară asupra indicilor topografici și a biomecanicii corneene, astfel ambele proceduri aduc o reducere semnificativă asupra astigmatismului cornean, echivalentului sferic și keratometriei maxime și o creștere a factorului de rezistență corneeană și a grosimii corneene centrale.
 9. Din punct de vedere statistic, între cele două loturi de pacienți nu au existat diferențe statistice semnificative între magnitudinea îmbunătățirii parametrilor topografici și biomecanici corneeni.
 10. Cele două grupuri nu au diferit semnificativ în ceea ce privește adâncimea liniei de demarcație sau în ceea ce privește adâncimea relativă, aceasta reflectând eficiența tratamentului în ambele tipuri de proceduri.
 11. În studiul nostru, adâncimea absolută medie și adâncimea medie a liniei de demarcație raportată la grosimea corneei a fost similară în ambele loturi de pacienți, profunzime care nu determină toxicitate endoteliului cornean.

Contribuții personale

Singura metodă de tratament pentru stoparea evoluției keratoconusului în stadii incipiente este crosslinking-ul cornean. Patologia acestei afecțiuni rămâne încă neînțeleasă în zilele noastre, existând studii care demonstrează afectări ale stromei și epiteliului cornean, ale membranelor Bowman și Descemet, însă în ceea ce privește modificările stratului endotelial, cercetările rămân contradictorii. Contribuțiile personale ale studiului I au constatat în identificarea diferențelor și corelațiilor între parametrii corneeni topografici, biomecanici și endoteliali, între diferite stadii de evoluție ale acestei patologii, precum și înainte și după intervenția de crosslinking prin tehnica “epi-off”. Studiul al II-lea a constatat în corelarea parametrilor evolutivi ai bolii, topografici și biomecanici, și urmărirea efectului celor două proceduri de crosslinking epi-off, respectiv standard și accelerat, prin linia de demarcație. Cele două proceduri au fost aplicate în studiul II, asigurând o eficacitate similară statistic și nu produc efecte diferite asupra endoteliului cornean, ambele având o profunzime a liniei de demarcație similară.

Ținând cont că este o afecțiune ce afectează în principal populația tânără, în viitor este importantă lărgirea lotului de studiu, în special în cazurile avansate și nediagnosticate, dar și urmărirea pe termen mai lung a cohortei actuale.

Având în vedere dezvoltarea de noi tehnologii, care caută să studieze tot mai amănunțit această patologie, oferind indici cât mai preciși și de depistare cât mai precoce a bolii, ne dorim că această patologie să fie cât mai bine înțeleasă.

Bibliografie selectiva

1. Santodomingo-Rubido J, Carracedo G, Suzaki A, Villa-Collar C, Vincent SJ, Wolffsohn JS. Keratoconus: An updated review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2022 Jun;45(3):101559.
2. Cavas-Martínez F, De la Cruz Sánchez E, Nieto Martínez J, Fernández Cañavate FJ, Fernández-Pacheco DG. Corneal topography in keratoconus: state of the art. *Eye Vis (Lond)*. 2016 Feb 22;3:5.
3. Potop V, Coviltir V, Corbu C, Burcel MG, Ionescu CI, Dascalescu DMC. Corneal hysteresis, a glaucoma risk factor independent of the intraocular pressure. *Rev Roum Sci Techn–Électrotechn et Énerg*. 2019;64(3):297–300.
4. Sun Y, Guo Y, Pang R, Peng J, Cao K, Wang N. Corneal biomechanical properties and potential influencing factors in varying degrees of myopia. *Scientific Reports*. 2024 Sep 4;14(1):1–10.
5. Marinescu MC, Dascalescu DMC, Constantin MM, Coviltir V, Potop V, Stanila D, et al. Particular Anatomy of the Hyperopic Eye and Potential Clinical Implications. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2023 Sep 14;59(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/medicina59091660>
6. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American journal of ophthalmology* [Internet]. 2003 May [cited 2025 Feb 5];135(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12719068/>
7. Kymionis GD, Grentzelos MA, Plaka AD, Stojanovic N, Tsoulnaras KI, Mikropoulos DG, et al. Evaluation of the corneal collagen cross-linking demarcation line profile using anterior segment optical coherence tomography. *Cornea* [Internet]. 2013 Jul [cited 2025 Feb 12];32(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23538626/>
8. Yam JC, Chan CW, Cheng AC. Corneal collagen cross-linking demarcation line depth assessed by Visante OCT After CXL for keratoconus and corneal ectasia. *Journal of refractive surgery (Thorofare, NJ : 1995)* [Internet]. 2012 Jul [cited 2025 Feb 12];28(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22767165/>
9. Doors M, Tahzib NG, Eggink FA, Berendschot TTJM, Webers CAB, Nuijts RMMA. Use of anterior segment optical coherence tomography to study corneal changes after collagen cross-linking. *Am J Ophthalmol*. 2009 Dec;148(6):844–51.e2.
10. Mihaela Monica Constantin, Catalina Corbu, Gabriela Ionita. EPR Study on the Role of Riboflavin Used in Photo-Oxidative Collagen Cross-Linking. *Revista de Chimie*. 2010;61(5):495–7.
11. Salgado JP, Khoramnia R, Lohmann CP, von Mohrenfels C W. Corneal collagen crosslinking in post-LASIK keratectasia. *The British journal of ophthalmology* [Internet]. 2011 Apr [cited 2025 Feb 12];95(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20679077/>
12. Spadea L. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in pellucid marginal degeneration. *Journal of refractive surgery (Thorofare, NJ : 1995)* [Internet]. 2010 May [cited 2025 Feb 12];26(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20128533/>
13. Phillips C Laing R Yee. Specular Microscopy. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2005. p. 261–77.

14. Kuechler SJ, Tappeiner C, Epstein D, Frueh BE. Keratoconus Progression After Corneal Cross-Linking in Eyes With Preoperative Maximum Keratometry Values of 58 Diopters and Steeper. *Cornea*. 2018 Nov;37(11):1444–8.
15. Mohammadpour M, Masoumi A, Mirghorbani M, Shahraki K, Hashemi H. Updates on corneal collagen cross-linking: Indications, techniques and clinical outcomes. *Journal of Current Ophthalmology*. 2017 Sep 12;29(4):235.
16. Masoud M. Corneal Endothelial Changes in Keratoconus Patients. In Benha University; 2016.
17. Feizi S. Corneal endothelial cell dysfunction: etiologies and management. *Therapeutic Advances in Ophthalmology*. 2018 Dec 7;10:2515841418815802.
18. Goebels S, Eppig T, Seitz B, Szentmàry N, Cayless A, Langenbucher A. Endothelial alterations in 712 keratoconus patients. *Acta Ophthalmol*. 2018 Mar;96(2):e134–9.
19. El-Agha MS, El Sayed YM, Harhara RM, Essam HM. Correlation of corneal endothelial changes with different stages of keratoconus. *Cornea* [Internet]. 2014 Jul [cited 2025 Feb 11];33(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24858019/>
20. Wan Q, Wei R, Ma K, Yin H, Deng YP, Tang J. Deep Learning-Based Automatic Diagnosis of Keratoconus with Corneal Endothelium Image. *Ophthalmology and Therapy*. 2023 Sep 4;12(6):3047.
21. Elmassry A, Osman A, Sabry M, Elmassry M, Katkat M, Hatata MY, et al. Corneal endothelial cells changes in different stages of Keratoconus: a multi-Centre clinical study. *BMC Ophthalmology*. 2021 Mar 21;21:143.
22. Labiris G, Gatziofias Z, Sideroudi H, Giarmoukakis A, Kozobolis V, Seitz B. Biomechanical diagnosis of keratoconus: evaluation of the keratoconus match index and the keratoconus match probability. *Acta Ophthalmologica*. 2013 Jun 1;91(4):e258–62.
23. Volatier TLA, Figueiredo FC, Connon CJ. Keratoconus at a Molecular Level: A Review. *The Anatomical Record*. 2020 Jun 1;303(6):1680–8.
24. Burcel MG, Constantin M, Ionita G, Dascalescu D, Ionescu C, Stanila D, et al. Levels of lactoferrin, lysozyme and albumin in the tear film of keratoconus patients and their correlations with important parameters of the disease. *Revista Romana de Medicina de Laborator*. 2020 May 4;28(2):153–61.
25. Ortiz D, Piñero D, Shabayek MH, Arnalich-Montiel F, Alió JL. Corneal biomechanical properties in normal, post-laser in situ keratomileusis, and keratoconic eyes. *J Cataract Refract Surg*. 2007 Aug;33(8):1371–5.
26. Viswanathan D, Kumar NL, Males JJ, Graham SL. Relationship of Structural Characteristics to Biomechanical Profile in Normal, Keratoconic, and Crosslinked Eyes. *Cornea* [Internet]. 2015 Jul [cited 2025 Feb 18];34(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25850703/>
27. Herber R, Hasanli A, Lenk J, Vinciguerra R, Terai N, Pillunat LE, et al. Evaluation of Corneal Biomechanical Indices in Distinguishing Between Normal, Very Asymmetric, and Bilateral Keratoconic Eyes. *Journal of Refractive Surgery*. 2022;38(6):364–72.
28. Bozkurt B, Yılmaz M, Meşen A, Kamış Ü, Köktekir BE, Okudan S. Correlation of Corneal Endothelial Cell Density with Corneal Tomographic Parameters in Eyes with Keratoconus. *Turkish Journal of Ophthalmology*. 2017 Oct 27;47(5):255.

29. Burcel MG, Lacraru IC, Dascalescu DMC, Corbu MC, Potop V, Coviltir V. Assessment of two-year clinical outcomes after keratoconus treatment using two different crosslinking protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 Feb;26(3):906–16.
30. Eslami M, Ghaseminejad F, Dubord PJ, Yeung SN, Iovieno A. Delayed Topographical and Refractive Changes Following Corneal Cross-Linking for Keratoconus. *Journal of Clinical Medicine*. 2022 Mar 31;11(7):1950.
31. Sedaghat M, Bagheri M, Ghavami S, Bamdad S. Changes in Corneal Topography and Biomechanical Properties after Collagen Cross Linking for Keratoconus: 1-Year Results. *Middle East African Journal of Ophthalmology*. 2015 Apr;22(2):212.
32. Sun L, Zhao J, Zhang X, Shen Y, Tian M, Zhou X. Transepithelial accelerated corneal crosslinking for keratoconus eyes with maximum keratometry values larger than 58 diopters. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2021 Jun 23;48(2):208.
33. Bahar TS, Şahin V, Ayaz Y, Ünal M. Long-Term Outcomes in Crosslinking Therapy for Patients with Progressive Keratoconus. *Diagnostics*. 2025 Mar 5;15(5):626.
34. Subasinghe SK, Ogbuehi KC, Dias GJ. Current perspectives on corneal collagen crosslinking (CXL). *Arbeitsphysiologie*. 2018 Aug;256(8):1363–84.
35. Yurttaser Ocak S, Mangan MS. Endothelial cell loss after accelerated corneal crosslinking using pachymetry-guided hypo-osmolar riboflavin dosing in thin keratoconic corneas. *J Cataract Refract Surg*. 2021 Dec 1;47(12):1530–4.
36. Badawi AE. Corneal endothelial changes after accelerated corneal collagen cross-linking in keratoconus and postLASIK ectasia. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2016 Sep 30;10:1891.
37. Mazzotta C, Hafezi F, Kymionis G, Caragiuli S, Jacob S, Traversi C, et al. In Vivo Confocal Microscopy after Corneal Collagen Crosslinking. *Ocul Surf*. 2015 Oct;13(4):298–314.
38. Giannaccare G, Murano G, Carnevali A, Yu AC, Vaccaro S, Scuteri G, et al. Comparison of Amsler–Krumeich and Sandali Classifications for Staging Eyes with Keratoconus. *Applied Sciences*. 2021 Apr 28;11(9):4007.
39. Papachristoforou N, Ueno A, Ledwos K, Bartuś J, Nowińska A, Karska-Basta I. A Review of Keratoconus Cross-Linking Treatment Methods. *Journal of Clinical Medicine*. 2025 Mar 3;14(5):1702.
40. Polido J, dos Xavier Santos Araújo ME, Alexander JG, Cabral T, Ambrósio R, Freitas D. Pediatric Crosslinking: Current Protocols and Approach. *Ophthalmology and Therapy*. 2022 Apr 28;11(3):983–99.
41. Iqbal M, Elmassry A, Saad H, Am Gad A, Ibrahim O, Hamed N, et al. Standard cross-linking protocol versus accelerated and transepithelial cross-linking protocols for treatment of paediatric keratoconus: a 2-year comparative study. *Acta Ophthalmol*. 2020 May;98(3):e352–62.
42. Li Y, Lu Y, Du K, Yin Y, Hu T, Fu Y, et al. Comparison of Efficacy and Safety Between Standard, Accelerated Epithelium-Off and Transepithelial Corneal Collagen Crosslinking in Pediatric Keratoconus: A Meta-Analysis. *Front Med*. 2022 Mar 17;9:787167.
43. Kandel H, Abbondanza M, Gupta A, Mills R, Watson AS, Petsoglou C, et al. Comparison of standard versus accelerated corneal collagen cross-linking for keratoconus: 5-year outcomes

from the Save Sight Keratoconus Registry. *Eye*. 2023 Jun 27;38(1):95–102.

44. Van L, Bennett S, Nicholas SE, Hjortdal J, McKay TB, Karamichos D. Prospective Observational Study Evaluating Systemic Hormones and Corneal Crosslinking Effects in Keratoconus. *Ophthalmology Science*. 2023 Jul 11;4(2):100364.
45. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* [Internet]. 2004 Jul [cited 2025 Apr 22];23(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15220736/>
46. Hamid A, Jahadi-Hosseini H, Khalili MR, Jahanbani-Ardakani H. Corneal Biomechanical Changes after Corneal Cross-Linking in Patients with Keratoconus. *Journal of Current Ophthalmology*. 2023 Apr 29;34(4):409.
47. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *Journal of cataract and refractive surgery* [Internet]. 2003 Sep [cited 2025 Apr 22];29(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14522301/>
48. Ghaffari R, Hashemi H, Asghari S. Intraoperative OCT for Monitoring Corneal Pachymetry during Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus. In: *A Practical Guide to Clinical Application of OCT in Ophthalmology*. IntechOpen; 2019.
49. Roongpoovapatr V, Shousha MA, Charukamnoetkanok P. Keratoconus Treatment Toolbox: An Update. In: *Eyesight and Imaging - Advances and New Perspectives*. IntechOpen; 2020.