



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

**ΟΠΤΙΚΗ
ΡΑΣΗ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΠΤΙΚΗ & ΟΡΑΣΗ»
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΙΚΟΥ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ
ΦΩΤΟΕΚΤΟΜΗ ΚΑΘΟΔΗΓΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΑ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΚΩΝΟΥ**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Α. ΚΟΝΤΑΔΑΚΗΣ

ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2018



UNIVERSITY OF CRETE



**INTERDEPARTMENTAL POSTGRADUATE PROGRAMME
«OPTICS AND VISION»
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**

**CORNEAL COLLAGEN CROSSLINKING ALONE OR COMBINED
WITH TOPOGRAPHY GUIDED PHOTOREFRACTIVE
KERATECTOMY FOR THE TREATMENT OF KERATOCONUS:
CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDY**



DOCTORAL THESIS

GEORGE A. KONTADAKIS, MD, MSc

OPHTHALMOLOGIST

HERAKLION, 2018

Εικόνα εξωφύλλου: “cornea conica”, Friedrich August von Ammon, 1841

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Ιωάννης Παλλήκαρης

Ομότιμος Καθηγητής Οφθαλμολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

2. Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης

Καθηγητής Οφθαλμολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

3. Ιωάννα Μοσχανδρέα

Senior Medical Statistician, University of Oxford

π. Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοστατιστικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ιωάννης Παλλήκαρης

Ομότιμος Καθηγητής Οφθαλμολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης

Καθηγητής Οφθαλμολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννα Μοσχανδρέα

Senior Medical Statistician, University of Oxford

π. Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοστατιστικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Μελισσάς

συν. Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Αριστείδης Τσατσάκης

Καθηγητής Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Κυμιωνής

Professeur Ordinaire, Faculté de biologie et de médecine, Université de Lausanne

Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνα Τηνιακού

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας - Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Senior Lecturer, Institute of Cellular Medicine, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University

...στην οικογένεια

και στους φίλους...

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί μια πρωτότυπη έρευνα πάνω σε μία σχετικά νέα χειρουργική τεχνική, την διασύνδεση κερατοειδούς, η οποία αποκτά μεγάλη δημοφιλία στην χειρουργική του κερατοειδούς τα τελευταία χρόνια. Κύρια ένδειξη για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι η αντιμετώπιση του κερατοκώνου και της ιατρογενούς εκτασίας του κερατοειδούς μετά από διαθλαστική χειρουργική. Και οι δύο παθήσεις μέχρι πρόσφατα δεν μπορούσαν να θεραπευτούν στα αρχικά τους στάδια, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να καταλήγουν συχνά στην ανάγκη μεταμόσχευσης κερατοειδούς. Η χειρουργική τεχνική αυτή έχει προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παγκοσμίως μιας και είναι η μοναδική θεραπεία για την σταθεροποίηση των παθήσεων αυτών. Επιπλέον, οι ενδείξεις της σταδιακά επεκτείνονται και σε άλλες παθήσεις του κερατοειδούς ενώ μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες χειρουργικές τεχνικές.

Ιδιαίτερα ο συνδυασμός της διασύνδεσης κερατοειδούς με την διαθλαστική χειρουργική είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για την σταθεροποίηση και την βελτίωση της όρασης στους πάσχοντες από εκτατικές παθήσεις, όπως φαίνεται από την ευρεία αποδοχή της τεχνικής αυτής και την έντονη ερευνητική δραστηριότητα γύρω της. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε τον συνδυασμό της διασύνδεσης κερατοειδούς με προηγηθείσα ταυτόχρονη φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή καθοδηγούμενη από την τοπογραφία με το laser στερεάς κατάστασης, και εμβαθύναμε έτσι αρκετά σε μια νέα τεχνική με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Το σύνολο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε στους χώρους του Ινστιτούτου Οπτικής και Όρασης του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το πειραματικό σκέλος πραγματοποιήθηκε στο χώρο των εργαστηρίων του Ινστιτούτου ενώ η προοπτική κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη συμμετοχή ασθενών με κερατόκωνο οι οποίοι προσήλθαν για την αντιμετώπιση του.

Το υλικό της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατά την διάρκεια της εκπόνησής της έχει παρουσιαστεί σε διεθνή συνέδρια, όπως το συνέδριο του Ευρωπαϊκού Συνδέσμου για την Έρευνα στην Όραση και τον Οφθαλμό (EVER) στο συνέδριο της Αμερικανικής Ακαδημίας Οφθαλμολογίας (AAO) καθώς και στο συνέδριο της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Καταρράκτη και Διαθλαστικής Χειρουργικής (ESCRS).

Ταυτόχρονα, από το περιεχόμενο της παρούσας έρευνας έχουν πραγματοποιηθεί τρεις δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές. Οι δύο από τις

δημοσιεύσεις αυτές έγιναν δεκτές στο περιοδικό “Ophthalmology”, το οποίο θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα περιοδικά στο χώρο της οφθαλμολογίας, και η μια ακόμη στο περιοδικό “Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology” το οποίο επίσης είναι ένα από τα πλέον έγκριτα περιοδικά στο χώρο της έρευνας στην οφθαλμολογία.

Σήμερα η χειρουργική τεχνική αυτή εξελίσσεται διαρκώς και εκσυγχρονίζεται προς όφελος των ασθενών χάρη στη διαρκή έρευνα και καινοτομία. Τα πρωτότυπα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν ήδη συμπληρώσει ένα κομμάτι στο μεγάλο παζλ της χειρουργικής του κερατοειδούς και αποτελούν μέρος της συνεχιζόμενης έρευνας στον τομέα αυτό.

Κονταδάκης Γιώργος

Ηράκλειο, 2018

Ευχαριστίες

Με μεγάλη αγάπη και σεβασμό θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Ιωάννη Παλλήκαρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια και για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος αυτής της λαμπρής ερευνητικής ομάδας που έχει δημιουργήσει. Μέσα στο χώρο του Πανεπιστημίου Κρήτης, που χάρη σε αυτόν τον μεγάλο πρωτοπόρο έγινε ένα παγκόσμιο κέντρο αναφοράς στην οφθαλμολογία, μου έδωσε τη δυνατότητα να ανοίξω τους ορίζοντές μου και να γίνω ένας καλύτερος επιστήμονας, γιατρός, και άνθρωπος. Αποτέλεσε και αποτελεί πάντα τον φάρο που οδηγεί τον δρόμο στην επιστημονική μου σταδιοδρομία.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Μιλτιάδη Τσιλιμπάρη, ο οποίος ως συνεπιβλέπων της παρούσας διδακτορικής διατριβής αλλά και ολοκλήρης της ακαδημαϊκής μου πορείας, υπήρξε πάντοτε σημείο αναφοράς και παράδειγμα στις επιστημονικές μου αναζητήσεις. Η διαρκής υποστήριξή του ήταν αναγκαία συνθήκη για την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής κυρία Ιωάννα Μοσχανδρέα για την πολύτιμη υποστήριξη και βοήθειά της όλα αυτά τα χρόνια.

Με ιδιαίτερη συγκίνηση θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνθρωπο που από την αρχή της σταδιοδρομίας μου αποτελεί πολύτιμο φίλο και μέντορα, τον Καθηγητή Γεώργιο Κυμιωνή. Τον άνθρωπο που σε όλη την πορεία με καθοδηγεί και με εμπνέει να κάνω το επόμενο βήμα. Χάρη σε αυτόν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα διατριβή.

Κλείνοντας έναν κύκλο στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Οπτική και Όραση», στα πλαίσια του οποίου πραγματοποιήθηκε και η παρούσα διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δάσκαλους και συνεργάτες που συνάντησα φοιτώντας σε αυτό, από τους οποίους αποκόμισα πολύτιμη γνώση, όχι μόνο για την ερευνητική αλλά και για την κλινική μου πορεία. Ιδιαίτερα τους συναδέλφους και φίλους Χαρίλαο Γκίνη και Άρη Παλλήκαρη για την πολύτιμη συμμετοχή και βοήθεια στην παρούσα μελέτη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους συναδέλφους από το BEMMO για την πολύτιμη συνεργασία τους σε κάθε στάδιο αυτής της μελέτης. Κυρίως όμως τους συμφοιτητές συνεργάτες και φίλους από το μεταπτυχιακό, το BEMMO και την Οφθαλμολογική Κλινική, γιατί όλα αυτά τα χρόνια έκαναν την πορεία όχι μόνο ενδιαφέρουσα, αλλά και όμορφη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, την σύζυγο, την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου, γιατί χωρίς τις θυσίες, την αγάπη, την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους δεν θα έγραφα αυτές τις γραμμές.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	4
Abstract	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. Εισαγωγή	7
2. Ανατομία- Εμβρυολογία Κερατοειδούς	8
2.1. Ανατομική των Στιβάδων του Κερατοειδούς Χιτώνα	9
2.1.1. Επιθήλιο.....	9
2.1.2. Μembrάνη του Bowman	11
2.1.3. Στρώμα ή Θεμέλια ουσία	12
2.1.4. Μembrάνη Pre-Descemet (Dua's Layer).....	14
2.1.5. Δεσκεμέτιος Μembrάνη (Descemet)	14
2.1.6. Ενδοθήλιο κερατοειδούς	15
2.1.7. Νεύρωση κερατοειδούς χιτώνα	17
2.2. Εμβρυολογία Κερατοειδούς	19
3. Δακρυϊκή στιβάδα.....	20
4. Φυσιολογία κερατοειδούς	21
4.1 Διαφάνεια κερατοειδούς	21
4.2. Φυσιολογία και ενυδάτωση στρώματος κερατοειδούς.....	22
4.3. Μεταβολισμός και θρέψη του κερατοειδούς	24
4.4. Διατήρηση του επιθηλίου του κερατοειδούς και απάντηση στο τραύμα.....	24
4.5. Φυσιολογία του στρώματος-απάντηση στο τραύμα	25
5. Διαθλαστική Χειρουργική	26
5.1. Επιφανειακές τεχνικές	27
5.1.1. Φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (PRK)	27
5.1.2. Epi-LASIK.....	28
5.2. Εν τω βάθει τεχνικές	28
5.2.1 LASIK (Laser in Situ Keratomileusis)	28
5.2.2. SMILE (Small Incision Lenticule Extraction)	29
5.3. Χρήση λέιζερ στην διαθλαστική χειρουργική.....	29
5.3.1. Αλληλεπίδραση laser-ιστού:	30
5.3.2. Διαθλαστική χειρουργική με Excimer laser.....	31
5.3.3. Διαθλαστική χειρουργική με Laser στέρεας κατάστασης.....	33
5.4. Διαθλαστική χειρουργική και ξηροφθαλμία.....	34
5.5. Τοπογραφία κερατοειδούς	35
5.6. Εξατομικευμένες φωτοεκτομές καθοδηγούμενες από την τοπογραφία	36
6. Κερατόκωνος.....	38
6.1. Επιδημιολογία.....	38
6.2. Παθογένεια – Παθοφυσιολογία	41
6.3. Βιομηχανική του κερατοειδούς στον κερατόκωνο	43
6.4. Κερατόκωνος και ξηροφθαλμία	43
6.5. Διάγνωση του κερατοκώνου	44
6.5.1. Κλινική διάγνωση.....	44
6.4.2. Διαφορική διάγνωση	47
6.5.3. Διάγνωση με τοπογραφία κερατοειδούς	47
6.6. Αντιμετώπιση του κερατοκώνου	48
6.6.1. Ενδοκερατοειδικοί δακτύλιοι	49
6.6.2. Διασύνδεση κερατοειδούς με ριβοφλαβίνη και υπεριώδη ακτινοβολία (CXL):	49
6.6.3. Χρήση λέιζερ διαθλαστικής χειρουργικής	51
7. Σκοπός της Παρούσας Ερευνητικής Εργασίας.....	52

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
8.Υλικά και Μέθοδος	55
8.1. Πειραματικό μέρος	55
8.1.1. Προετοιμασία χοίρειων κερατοειδών	55
8.1.2. Παχυμετρία Κερατοειδούς.....	57
8.1.3. Μηχανικές μετρήσεις συμπιεστότητας.....	58
8.1.4. Μέτρηση της ενυδάτωσης	59
8.1.5. Στατιστική ανάλυση	60
8.2. Κλινικό μέρος	60
8.2.1. Κριτήρια ένταξης –προεγχειρητικός έλεγχος	61
8.2.2. Μετεγχειρητικός έλεγχος	62
8.3. 1 ^ο σκέλος: Συγκριτική αξιολόγηση επέμβασης διασύνδεσης κολλαγόνου με τον συνδυασμό της με την καθοδηγούμενη από την τοπογραφία φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (tPRK)	63
8.3.1. Χειρουργική τεχνική επέμβασης διασύνδεσης κολλαγόνου	64
8.3.2. Χειρουργική τεχνική συνδυασμένης θεραπείας	64
8.3.3. Συνεστιακή μικροσκοπία	66
8.3.4. Στατιστική ανάλυση	66
8.4. 2 ^ο σκέλος: ανάλυση παραμέτρων που αφορούν την αισθητικότητα και την ποιότητα της δακρυϊκής στιβάδας και την νεύρωση του κερατοειδούς.....	67
8.4.1. Κλινική αξιολόγηση	68
8.4.2. Στατιστική ανάλυση	71
9. Αποτελέσματα	72
9.1 Πειραματικό μέρος	72
9.1.1. Ενυδάτωση κερατοειδούς	72
9.1.2. Πάχος κερατοειδών	73
9.1.3. Συμπιεστότητα κερατοειδούς.....	74
9.1.4. Ανάλυση συσχέτισης.....	75
9.2. Κλινικό μέρος, 1 ^ο σκέλος κλινικής μελέτης	76
9.2.1. Αποτελέσματα Τοπογραφίας.....	78
9.2.2. Αποτελέσματα παχυμετρίας κερατοειδούς.....	83
9.2.3. Αποτελέσματα οπτικής οξύτητας	83
9.2.4. Αποτελέσματα διάθλασης	86
9.2.5. Συνεστιακή μικροσκοπία (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση).....	89
9.3. Κλινικό Μέρος, 2 ^ο σκέλος κλινικής μελέτης	93
9.3.1. Αποτελέσματα νεύρωσης κερατοειδούς	93
9.3.2. Αποτελέσματα αισθητικότητας κερατοειδούς	95
9.3.3. Αποτελέσματα δακρυϊκής στιβάδας.....	96
10. Συζήτηση	99
11. Βιβλιογραφία	110
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	131
Βιογραφικό.....	131
Δημοσιεύσεις περιεχομένου διατριβής σε διεθνή περιοδικά με κριτές	146

Περίληψη

Σκοπός: Η πειραματική και κλινική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και της μικροσκοπικής εικόνας του κερατοειδούς μετά από επέμβαση διασύνδεσης κερατοειδικού κολλαγόνου με ριβοφλαβίνη και υπεριώδη ακτινοβολία (CXL), καθώς και μετά από τον συνδυασμό της με προηγούμενα ταυτόχρονη τοπογραφικά καθοδηγούμενη φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή με λέιζερ στερεάς κατάστασης (tPRK-CXL). Η αξιολόγηση της ενυδάτωσης, της παχυμετρίας και της συμπίεστικότητας του κερατοειδούς με μία πρωτότυπη πειραματική διάταξη μετά από CXL. Επιπρόσθετα, σκοπός ήταν η συγκριτική αξιολόγηση των κλινικών αποτελεσμάτων ανάμεσα στην CXL και την tRK-CXL.

Υλικό και μέθοδος: Στο πειραματικό μέρος της μελέτης 42 χοίρειοι κερατοειδείς υπεβλήθησαν στο κλασσικό πρωτόκολλο CXL και υπολογίστηκε η μεταβολή της ενυδάτωσης τους σε συνθήκες ωσμωτικής ισορροπίας με δεξτράνη 20%. Επίσης η συμπίεστικότητα τους μετρήθηκε με ειδική πειραματική διάταξη. Στο κλινικό μέρος τα αποτελέσματα ως προς την όραση, την διάθλαση, και την τοπογραφία αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν ανάμεσα σε ομάδα 30 οφθαλμών που υπεβλήθησαν σε CXL και ομάδα 30 οφθαλμών που υπεβλήθησαν σε tPRK-CXL. Η ποιότητα της δακρυϊκής στιβάδας, η αισθητικότητα του κερατοειδούς και το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα του κερατοειδούς αξιολογήθηκαν σε 30 οφθαλμούς που υπεβλήθησαν σε CXL.

Αποτελέσματα: Η ενυδάτωση των κερατοειδών μετά την επέμβαση φαίνεται μειωμένη ενώ επίδραση στην συμπίεστικότητα δεν μπόρεσε να μετρηθεί. Η όραση και τοπογραφική εικόνα των ασθενών που υπεβλήθησαν στην συνδυασμένη επέμβαση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου είναι σημαντικά βελτιωμένες. Η συμπεριφορά των κερατοειδών ως προς τη σταθερότητα και στις δύο ομάδες μετεγχειρητικά ήταν όμοια μέχρι 3 χρόνια μετεγχειρητικά. Μεγαλύτερη διείσδυση της διασύνδεσης φαίνεται εμμέσως από το βάθος το αλλοιώσεων του στρώματος στην συνεσσιακή μικροσκοπία στους ασθενείς της ομάδας tPRK-CXL. Οι ποσοτικές παράμετροι αξιολόγησης του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος και η αισθητικότητά του κερατοειδούς ήταν σημαντικά μειωμένες μέχρι έξι μήνες μετεγχειρητικά. Η δακρυϊκή στιβάδα δεν φάνηκε να επηρεάζεται.

Συμπεράσματα: Η επέμβαση CXL φαίνεται να προκαλεί αφυδάτωση στον κερατοειδή, η οποία πιθανόν να συμμετέχει στην αύξηση της ακαμψίας του. Κλινικά προσφέρει σταθερότητα στους ασθενείς στο διάστημα παρακολούθησης της μελέτης μας, ενώ ο συνδυασμός της με PRK καθοδηγούμενο από την τοπογραφία με το λέιζερ στερεάς κατάστασης έχει πολύ καλά οπτικά αποτελέσματα, φαινομενικά μεγαλύτερη διείσδυση στο βάθος του κερατοειδούς και παρόμοια σταθερότητα με την απλή επέμβαση. Η επέμβαση CXL επηρεάζει προσωρινά την νεύρωση και την αισθητικότητά του κερατοειδούς.

Abstract

Purpose: To evaluate experimentally and clinically the results of corneal collagen cross-linking (CXL) and of its combination with preceding simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy (tPRK-CXL) with solid state laser for progressive keratoconus. In the experimental study, we focused on the in-vitro evaluation of the immediate effect of CXL on corneal hydration and stiffness. Clinically, the target of the study was to evaluate the results of CXL and of tPRK-CXL for progressive keratoconus and make comparison between techniques regarding topographic stability, visual acuity, keratometry and in vivo corneal microscopy. Additionally, we focused on the effect of CXL on corneal innervation, corneal sensitivity and tear function in patients with keratoconus.

Methods: In the experimental study forty two corneal buttons were divided in two groups; one was irradiated to simulate CXL according to the clinically applied protocol. Subsequently, both groups were brought to osmotic equilibrium with dextran 20% and each button underwent thickness measurement, and measurement of force versus deformation by compression. The hydration (%) of each button was calculated. For the prospective comparative evaluation of CXL and tPRK-CXL thirty eyes received combined tPRK with a solid state laser (maximum ablation depth 50 μ m) followed by CXL, and 30 eyes received CXL alone. Groups were matched in terms of age and keratoconus stage and corrected distance visual acuity (CDVA), uncorrected distance visual acuity (UDVA), keratometry, and corneal confocal microscopy findings were compared. For the evaluation of innervation and tear film we conducted a prospective, interventional case series with twenty four patients with bilateral keratoconus (30 eyes) who underwent CXL. Confocal microscopic analysis of corneal subbasal nerve plexus (total nerve length per image), corneal sensitivity (assessed with the Cochet–Bonnet esthesiometer), basic tear secretion (assessed with Schirmer's I test with anesthesia) and tear film stability (evaluated by means of tear film break up time [TFBUT]) were assessed preoperatively and at 1, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 postoperative month time intervals and pre- to postoperative values were compared

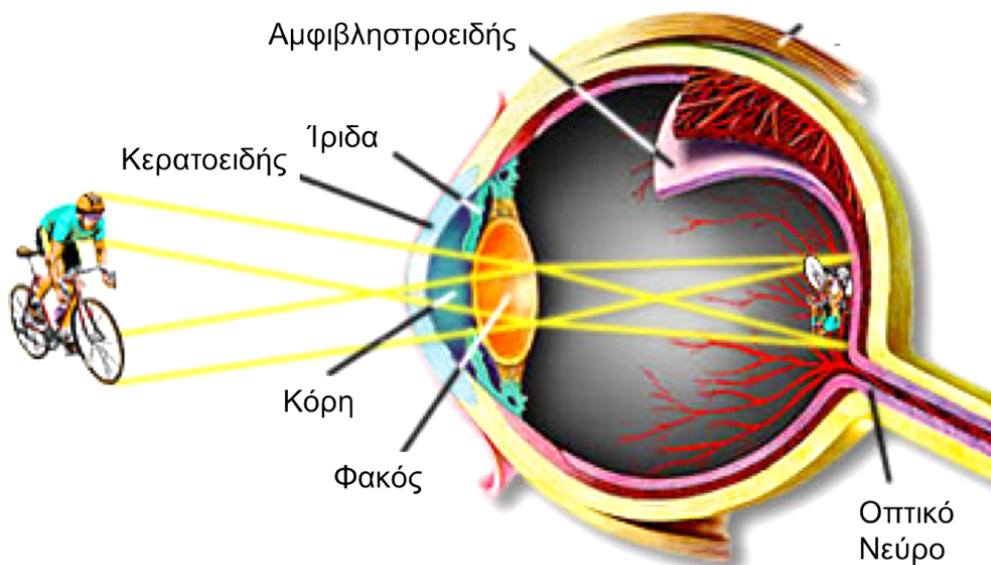
Results: In the experimental study a significant dehydration effect of CXL on corneal buttons after the procedure was demonstrated. In the clinical study of CXL and tPRK-CXL we found that visual acuity and topography of patients in the tPRK-CXL group were significantly better than in the CXL group, without compromising postoperative stability up to three years postoperatively. Effect of CXL as seen in confocal microscopy was deeper in the tPRK-CXL group. No effect was detected on endothelial cells. Regarding effect on innervation and tear film, we found total nerve length per image and corneal sensitivity significantly decreased until the sixth postoperative month. Results of Schirmer's I test and TFBUT had no statistically significant difference at any time point.

Conclusions: Corneal dehydration is detected immediately after the CXL procedure. This phenomenon may contribute to increased mechanical stiffness of the cornea. Simultaneous tPRK followed by CXL in this series of keratoconus patients offered significantly improved vision to treated patients in comparison to CXL alone, and similar good results regarding postoperative stability. A transient decrease in corneal innervation and corneal sensitivity can be observed up to six months after CXL.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Το φως εισέρχεται στον οφθαλμό διαμέσου του διαφανούς κερατοειδούς, που είναι το κύριο διαθλαστικό μέσο του οφθαλμού και ταυτόχρονα ένας ανατομικός φραγμός ανάμεσα στο εξωτερικό περιβάλλον και το εσωτερικό του οφθαλμού δίνοντάς του τεράστια σημασία για την λειτουργία της όρασης. Αυτή η διπλή ιδιότητα κάνει τον κερατοειδή ένα παράδειγμα οργάνου με μοναδικές ιδιότητες τόσο λειτουργικά όσο και ανατομικά, οι οποίες στηρίζονται στη μοριακή δομή των συστατικών του καθώς και στην ιδιαίτερη διαφοροποίηση των κυττάρων που συμμετέχουν στην δομή του.^{1,2} Η διαθλαστική δύναμη του κερατοειδούς ανέρχεται περίπου στις 45 διοπτρίες. Η μεγάλη συμμετοχή του κερατοειδούς στην συνολική διάθλαση του οφθαλμού είναι αυτή που εκμεταλλευόμαστε στη διαθλαστική χειρουργική καθώς επίσης η αιτία της σημαντικής μείωσης της όρασης σε ασθενείς που πάσχουν από κερατόκωνο. Στις εφαρμογές λέιζερ στη διαθλαστική χειρουργική με πολύ μικρή αλλαγή στην καμπυλότητα της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς μπορούμε να έχουμε μεγάλη αλλαγή στην διάθλαση. Στον κερατόκωνο η αύξηση του ανωμάλου αστιγματισμού αλλοιώνει σημαντικά την ποιότητα του ειδώλου στον αμφιβληστροειδή.



Εικόνα 1: Ο οφθαλμός σαν οπτική συσκευή (από: www.d.umn.edu)

2. Ανατομία- Εμβρυολογία Κερατοειδούς

Ο κερατοειδής χιτώνας αποτελεί μέρος του πρόσθιου τοιχώματος του οφθαλμού το οποίο ταυτόχρονα συνιστά και την πρώτη και κύρια διαθλαστική συσκευή που συμμετέχει στο οπτικό του σύστημα. Είναι ένας διαφανής ινώδης χιτώνας ο οποίος επιτρέπει στο 99% της ορατής ακτινοβολίας να τον διαπερνά και προς τα πίσω συνεχεται με τον αδιαφανή σκληρό χιτώνα.³ Οι δύο αυτές δομές του ινώδους χιτώνα διακρίνονται μεταξύ τους με την κυκλοτερή επιπολής σκληραία αύλακα εξωτερικά, μέσα στην οποία εντοπίζεται μία στενή ζώνη, η σκληροκερατοειδής στεφάνη.⁴ Ο κερατοειδής χιτώνας για να διατηρήσει την διαφάνεια του είναι ανάγγειος και άχρωμος.⁵⁻⁸ Αποτελεί το πρόσθιο 1/6 του βολβού του οφθαλμού. Επαλείφεται από την πολύ λεπτή δακρυϊκή στιβάδα η πρόσθια επιφάνεια της οποίας αποτελεί την πρώτη διαθλαστική επιφάνεια που συναντά το φως εισερχόμενο στον οφθαλμό. Φυσιολογικά προβάλλει διαμέσου της μεσοβλεφάριας σχισμής και με την βοήθεια του βλεφαρισμού διατηρείται η ομοιόμορφη επάλειψη της επιφάνειας του από την δακρυϊκή στιβάδα, ενώ κατά το κλείσιμο των βλεφάρων καλύπτεται και προστατεύεται εξολοκλήρου από το άνω βλέφαρο με την βοήθεια της άνω στροφής του βολβού.⁹

Σε επίπεδο περιγραφικής ανατομικής, ο κερατοειδής του μέσου ενήλικα κατά την παρατήρηση από την πρόσθια πλευρά του, έχει διάμετρο που αγγίζει τα 11,5 με 12mm στον οριζόντιο άξονα, και τα 11 περίπου mm στον κάθετο άξονα. Παρουσιάζει δύο επιφάνειες, μια πρόσθια υπόκυρτη και μια οπίσθια υπόκοιλη, με ακτίνες καμπυλότητας κατά μέσο όρο 7.8 mm και 6.5 mm αντίστοιχα.¹⁰ Το πάχος του είναι μικρότερο στο κέντρο και σταδιακά αυξάνεται προς την περιφέρεια (στον ζώντα οργανισμό είναι κατά μέσο όρο 520μm στο κέντρο και 650 – 1000μm στην περιφέρεια). Το σχήμα του είναι πιο κυρτό στο κέντρο σε σχέση με την περιφέρεια κάτι που παίζει σημαντικό ρόλο στην οπτική του οφθαλμού (ασφαιρικός prolate κερατοειδής με θετική σφαιρική εκτροπή, μέση τιμή στον πληθυσμό 0.25). Η πρόσθια επιφάνεια του κερατοειδούς είναι η πιο ισχυρή διαθλαστικά επιφάνεια του οφθαλμού με δύναμη περίπου 48 διοπτρίες. Ο κερατοειδής είναι διαπερατός σε ακτινοβολίες με μήκος κύματος περίπου από 310nm -στην περιοχή δηλαδή του υπεριώδους- έως 2500 nm -στην περιοχή δηλαδή του υπέρυθρου.¹¹

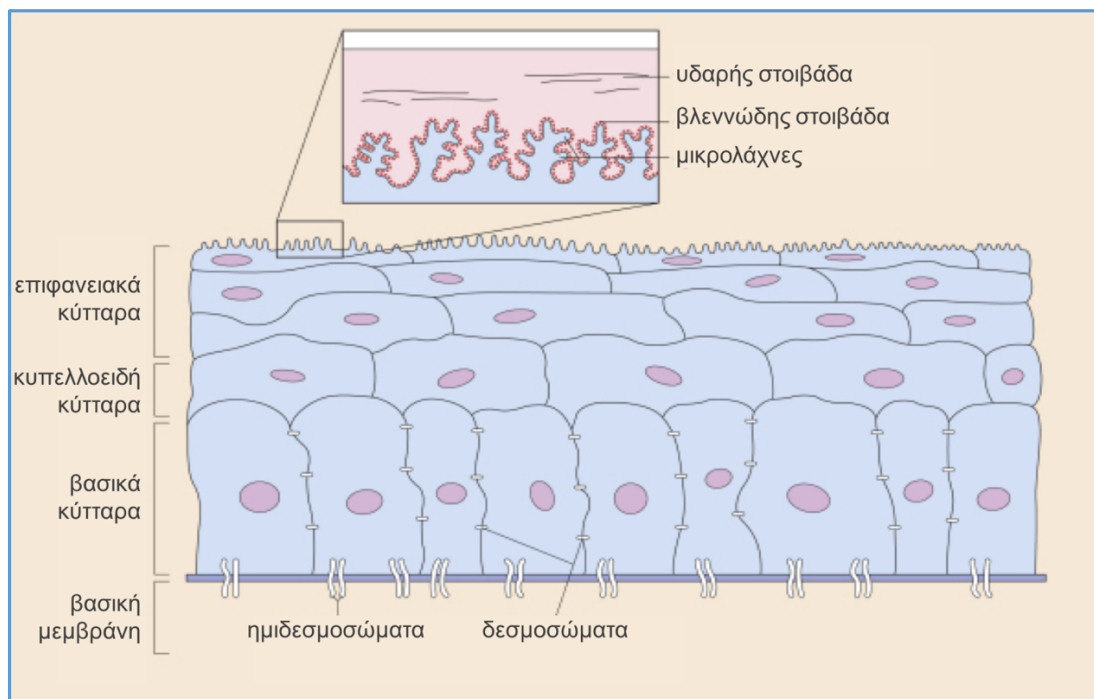
Το μεγαλύτερο μέρος του κερατοειδούς αποτελείται από μεσοκυττάρια ουσία, ινίδια κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνες, με την διάταξη των ινών κολλαγόνου σε ομοιόμορφα κατανεμημένα πέταλα να είναι το κυριότερο στοιχείο της ανατομίας του που του δίνει της οπτικές του ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές είναι η διαφάνεια και η καμπυλότητα.^{8,12} Τα κολλαγόνα και οι πρωτεογλυκάνες συντίθενται, οργανώνονται και επιδιορθώνονται από ένα σύστημα διαπλεκόμενων κυττάρων που βρίσκονται ανάμεσα τους, των κερατοκυττάρων. Στο στρώμα του κερατοειδούς έχουν βρεθεί τύποι κολλαγόνου I, III, V, VI, XII, XIV, με κύριο τύπο το κολλαγόνο τύπου I.³ Ο κερατοειδής χιτώνας του ανθρώπου αποτελείται από στοιβάδες με διαφορετικές ιδιότητες: το επιθήλιο, τη μεμβράνη του Bowman, το στρώμα, και το ενδοθήλιο με την δεσκεμέτιο μεμβράνη. Πρόσφατα περιεγράφηκε η ύπαρξη και μίας ακόμα στιβάδα με διαφορετικές ιδιότητες από το στρώμα του κερατοειδούς η προ-Δεσκεμέτιος μεμβράνη.¹³

2.1. Ανατομική των Στιβάδων του Κερατοειδούς Χιτώνα

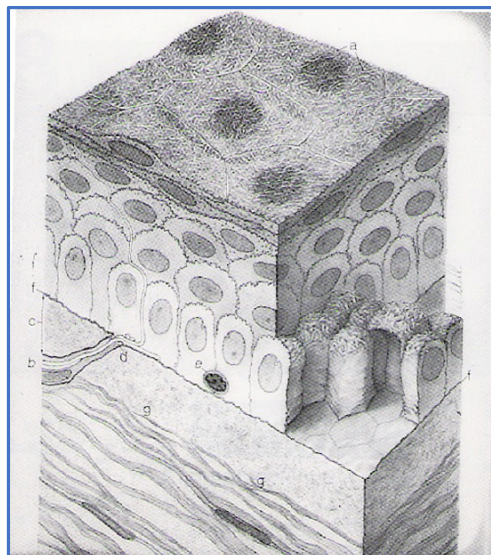
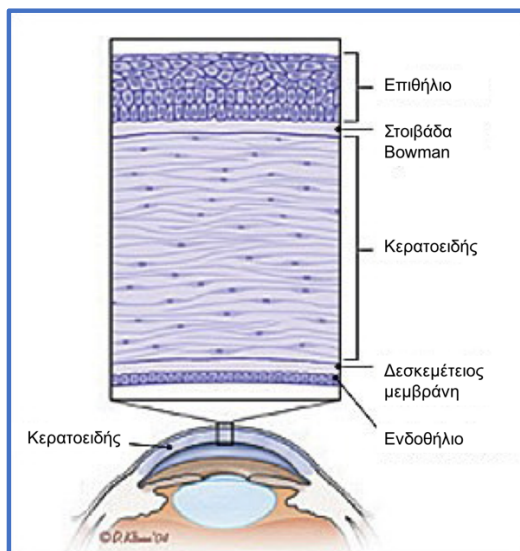
2.1.1. Επιθήλιο

Το επιθήλιο του κερατοειδούς αποτελεί την πρώτη δομή του κερατοειδούς που έρχεται σ' επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Είναι δομημένο κατά στρώματα, μη κερατινοποιημένο μη εκκριτικό πλακώδες επιθήλιο με πάχος 5 έως 7 στρωμάτων κυττάρων. Φυσιολογικά το πάχος βρίσκεται μεταξύ περίπου 50- 60μm.² Αποτελείται από τρεις τύπους κυττάρων, τα βασικά, τα ενδιάμεσα κυπελλοειδή κύτταρα και τα επιφανειακά πλακώδη κύτταρα. Τα βασικά κύτταρα οργανώνονται σε μία μόνο στιβάδα. Τα βασικά κύτταρα συνδέονται με ημιδεσμοσώματα με τη βασική μεμβράνη. Χάρη σε αυτήν την στέρεη σύνδεση αποτρέπεται η αποκόλληση του επιθηλίου του κερατοειδούς, ενώ σε βλάβες της βασικής μεμβράνης που πάσχουν τα ημιδεσμοσώματα μπορεί να προκύψουν διαταραχές στην ανάπτυξη του επιθηλίου και απόπτωση. Η βασική μεμβράνη αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και έχει πάχος 0,05μm. Τα βασικά κύτταρα είναι αυτά από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα των υπολοίπων στιβάδων. Με μίτωση δημιουργούνται τα θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν προς τα πάνω και διαφοροποιούνται στα κυπελλοειδή κύτταρα που σχηματίζουν μία έως τρεις επιθηλιακές στιβάδες.¹⁴⁻¹⁶ Τα κύτταρα αυτά αποπλατύνονται προς την επιφάνεια. Το τρίτο και πιο εξωτερικό τμήμα του

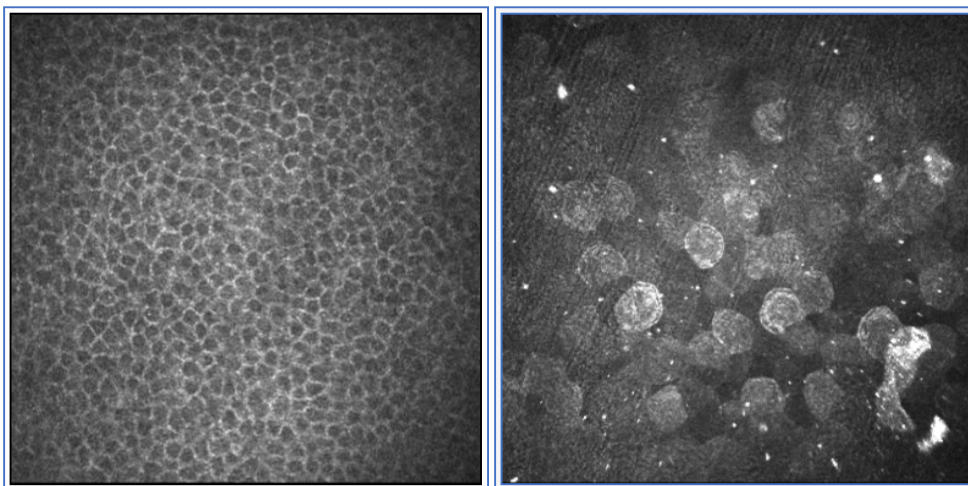
επιθηλίου αποτελείται από δύο έως τρεις στιβάδες τελικά διαφοροποιημένων κυττάρων, τα οποία είναι αποπλατυσμένα και κυβοειδή/πολυγωνικά. Τα επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με δεσμοσώματα στην βασική στιβάδα, με στεγανές συνδέσεις στην επιφανειακή καθώς και με συνδέσμους—διάυλους στις ενδιάμεσες.¹⁷ Τα επιφανειακά κύτταρα διαθέτουν μικρολάχνες. Οι μικρολάχνες αυξάνουν την επιφάνεια σύνδεσης μεταξύ των κυττάρων αυτών και της δακρυϊκής στιβάδας με την οποία βρίσκονται σε επαφή συμβάλλοντας στην σταθερότητά της. Η σταθερότητα της δακρυϊκής στιβάδας είναι πολύ σημαντική για την ευκρίνεια της όρασης καθώς και για την διατήρηση της καλής υγείας της οφθαλμικής επιφάνειας. Τα επιθηλιακά κύτταρα επιβιώνουν για 7 με 10 ημέρες και απομακρύνονται με τη διαδικασία της απόπτωσης και της απολέπισης. Έτσι το επιθήλιο του κερατοειδούς ανανεώνεται κάθε εβδομάδα.¹⁸ Νέα κύτταρα προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα του επιθηλίου τα οποία βρίσκονται στο σκληροκερατοειδές όριο και έχουν την ευθύνη της αναπαραγωγής και της ανανέωσης του επιθηλίου. Σημαντική απώλεια βλαστικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκειά τους, αδυναμία αναπαραγωγής του επιθηλίου, κάλυψη του κερατοειδούς με επιθήλιο επιπεφυκότα και απώλεια της διαύγειας του κερατοειδούς.^{14,19}



Εικόνα 2: Σχεδιαστική απεικόνιση στιβάδων επιθηλίου και συνδέσεων τους²



Εικόνες 3²⁰, 4: Σχεδιαστική απεικόνιση στιβάδων κερατοειδούς και επιθηλίου(Εικ. 4 από: Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: *Histology of the human eye*, Philadelphia, 1971, Saunders)



Εικόνες 5,6: Εικόνες επιθηλίου κερατοειδούς από συνεστιακή μικροσκοπία (βασική στιβάδα και επιφανειακή στιβάδα αντίστοιχα) (αρχείο ΒΕΜΜΟ)

2.1.2. Μembrάνη του Bowman

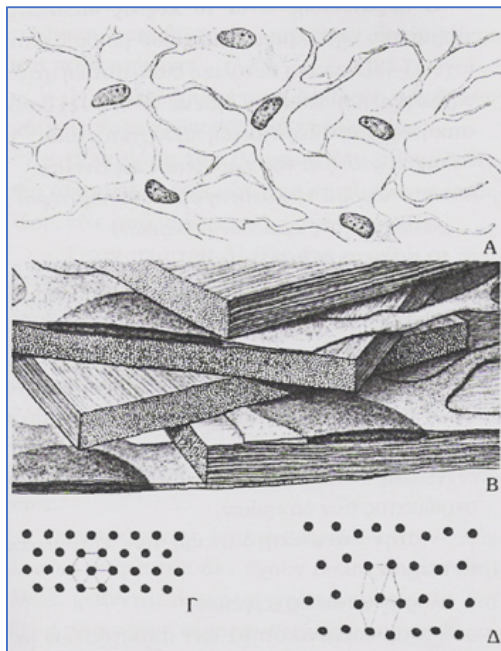
Η μεμβράνη του Bowman βρίσκεται ανάμεσα στο επιθήλιο και το στρώμα του κερατοειδούς και αποτελεί στην πραγματικότητα μία ακυτταρική συμπυκνωμένη περιοχή στρώματος. Το πάχος της είναι περίπου 8-12μm στον ενήλικα και συμβάλλει στη διατήρηση του σχήματος του κερατοειδούς. Θεωρείται ότι είναι μία μηχανικά πολύ ισχυρή στιβάδα του κερατοειδούς. Δεν έχει δυνατότητα αναγέννησης, οπότε όταν αφαιρείται, όπως σε περίπτωση laser φωτοδιαθλαστικής κερατεκτομής,

δεν αναγεννάται. Αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου, τύπου I, III και V ενώ οι ίνες τύπου VII συνδέουν τη ζώνη με το επιθήλιο. Στη μεμβράνη του Bowman οι ίνες του κολλαγόνου είναι λεπτότερες σε σχέση με τις ίνες του στρώματος και πιο τυχαία κατανομημένες. Η μεμβράνη του Bowman φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας του κερατοειδούς και την παρεμπόδιση εισβολής ιών και in situ νεοπλασιών.²¹⁻²³

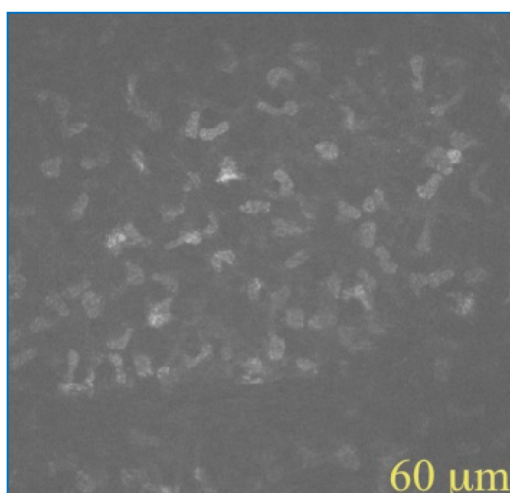
2.1.3. Στρώμα ή Θεμέλια ουσία

Το στρώμα του κερατοειδούς είναι το κυρίαρχο δομικό του στοιχείο και καταλαμβάνει περίπου το 90% του πάχους του. Επομένως το πάχος του κερατοειδούς καθορίζεται κυρίως από το στρώμα. Το στρώμα περιέχει κερατοκύτταρα τα οποία είναι διασπαρμένα ανάμεσα στην μεσοκυττάρια ουσία, η οποία αποτελεί τον κυρίως όγκο του στρώματος. Τα κερατοκύτταρα αποτελούν τους ινοβλάστες του στρώματος και σχηματίζουν ένα δίκτυο με προσεκβολές που σχηματίζουν συνδέσεις ανάμεσά τους. Η πυκνότητα τους είναι πιο μεγάλη στο πρόσθιο στρώμα από ότι στο μέσο και το οπίσθιο. Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες. Η περιεκτικότητα του στρώματος σε κολλαγόνο είναι περίπου 71%. Κύρια μορφή είναι οι ίνες κολλαγόνου τύπου I.²⁴ Οι μηχανικές ιδιότητες του κερατοειδούς, οι οποίες διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο και στη διαθλαστική δύναμή του, εξαρτώνται κατά κύριο βαθμό από την δομή του στρώματος. Το στρώμα του κερατοειδούς αποτελείται από 200 έως 250 πετάλια σχηματιζόμενα από ινίδια κολλαγόνου. Τα πετάλια έχουν πάχος περίπου 2μm και μήκος 9 έως 260μm και εκτείνονται από σκληροκερατοειδές όριο έως σκληροκερατοειδές όριο. Είναι διαπλεκόμενα και τοποθετημένα διαγώνια σε τυχαίες κατευθύνσεις το ένα ως προς το άλλο στο πρόσθιο στρώμα, ενώ στο οπίσθιο στρώμα είναι ορθογώνια μεταξύ τους. Στο σκληροκερατοειδές όριο τα ινίδια του κολλαγόνου στρέφονται και διατρέχουν κυκλοτερώς σχηματίζοντας ένα δακτύλιο πάχος ενάμισι έως δύο χιλιοστών στην περίμετρο του κερατοειδούς. Αυτός ο δακτύλιος των ινιδίων κολλαγόνου είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση της καμπυλότητας του κερατοειδούς.²⁵⁻²⁷ Τα ινίδια κολλαγόνου αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I και μικρότερες ποσότητες από κολλαγόνο τύπου V και τύπου IV. Τα ινίδια έχουν διάμετρο περίπου 30nm ενώ ανάμεσα τους υπάρχει απόσταση περίπου 42 έως 44nm. Ο δείκτης διάθλασης των ινιδίων του κολλαγόνου

είναι 1.411 ενώ αυτός της εξωκυττάριας ουσίας είναι 1.300. Παρόλη την διαφορά δεν πραγματοποιείται παρά ελάχιστη σκέδαση του φωτός στο στρώμα του κερατοειδούς εξαιτίας της πολύ ομοιόμορφης διαρρύθμισης. Η υπόλοιπη εξωκυττάρια ουσία αποτελείται κυρίως από πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεογλυκάνες επίσης έχουν ρόλο στην σύνδεση των ινιδίων του κολλαγόνου μεταξύ τους καθώς και στη διατήρηση της διαύγειας του κερατοειδούς.^{25,26} Η εξωκυττάρια ουσία του στρώματος του κερατοειδούς παράγεται και διατηρείται από τα κερατοκύτταρα του κερατοειδούς. Τα κύτταρα αυτά αντιστοιχούν μόνο στο 10% του όγκου του στρώματος και ενεργοποιούνται όταν το στρώμα του κερατοειδούς τραυματίζεται. Κάποια από αυτά διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επούλωσης. Τα κύτταρα αυτά συνδέονται μεταξύ τους.²⁸⁻³⁰



Εικόνα 7: Σχεδιαστική απεικόνιση κερατοειδικού στρώματος, από πάνω προς τα κάτω: διάταξη κερατοκυττάρων, πετάλια κολλαγόνου, διάταξη ινιδίων στο πετάλιο. (από: Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: *Histology of the human eye*, Philadelphia, 1971, Saunders)



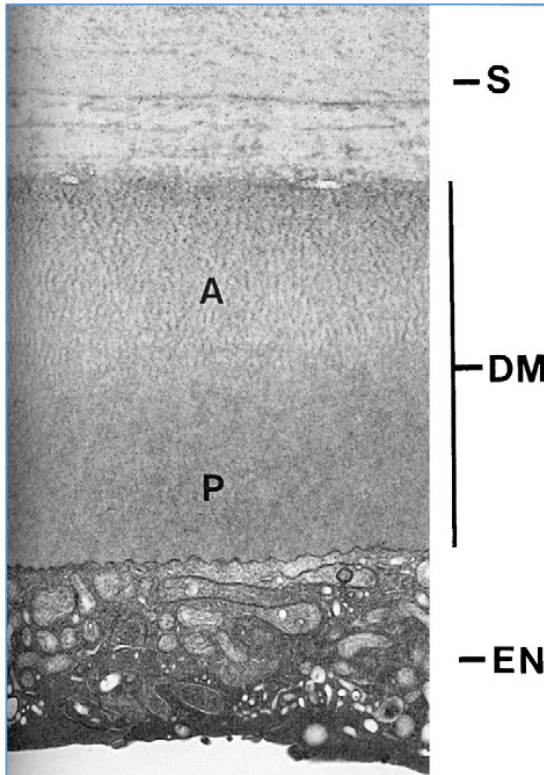
Εικόνα 8: Εικόνα από το πρόσθιο στρώμα κερατοειδούς από συνεστιακή μικροσκοπία όπου απεικονίζονται οι πυρήνες των κερατοκυττάρων σε πυκνή διάταξη.

2.1.4. Μεμβράνη Pre-Descemet (Dua's Layer)

Πρόσφατα περιεγράφηκε από την ομάδα του Harminder S. Dua η ύπαρξη μίας ακόμα στιβάδας, η οποία εντοπίζεται ανάμεσα στο στρώμα και τη μεμβράνη του Descemet. Η στιβάδα αυτή ονομάστηκε στιβάδα του Dua (Dua's layer) ή προδεσκεμέτειος μεμβράνη (pre-Descemet). Πρόκειται για μία στιβάδα που αποτελείται από 5 έως 8 φύλλα κολλαγόνου τύπου I. Έχουν επίσης βρεθεί μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου V αλλά και τύπου IV και VI.¹³ Η ύπαρξή της ως ξεχωριστής ανατομικής οντότητας αμφισβητείται από άλλους ερευνητές.

2.1.5. Δεσκεμέτειος Μεμβράνη (Descemet)

Η μεμβράνη του Descemet βρίσκεται ανάμεσα στο στρώμα και το ενδοθήλιο του κερατοειδούς. Η μεμβράνη αυτή εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία ουσιαστικά εδράζονται πάνω της. Το δομικό υλικό της μεμβράνης εκκρίνεται διαρκώς με αποτέλεσμα το πάχος της να αυξάνεται με την ηλικία. Στον ενήλικα φυσιολογικά το πάχος της μεμβράνης είναι μέχρι περίπου 10μm. Χωρίζεται σε δύο στοιβάδες, μια πρόσθια οργανωμένη που εκκρίνεται κατά την εμβρυική ζωή, και μία οπίσθια περισσότερο άμορφη που εκκρίνεται στην διάρκεια της ζωής μετά την γέννηση.⁹ Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι έχουν καταδείξει την ύπαρξη φιμπρονεκτίνης, λαμινίνης και κολλαγόνου τύπου IV. Η φιμπρονεκτίνη θεωρείται ότι συμμετέχει στην σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην μεμβράνη. Η δεσκεμέτειος μεμβράνη μπορεί να παραμένει εκτεθειμένη σε περιπτώσεις σοβαρής εξέγκωσης κερατοειδούς σχηματίζοντας μια δεσκεμετοκοίλη μετά την καταστροφή του επιθηλίου και του στρώματος. Αυτό δείχνει ότι μεμβράνη είναι πολυανθεκτική στα πρωτεολυτικά ένζυμα. Η ενδοθηλιακή δυστροφία του Fuch's είναι μία πάθηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην οποία εκκρίνεται παθολογική δεσκεμέτειος μεμβράνη. Η δεσκεμέτειος μεμβράνη συνδέεται με ημιδεσμοσωμάτια με το ενδοθήλιο αλλά όχι και με το στρώμα γι' αυτό και μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από αυτό.^{31,32}

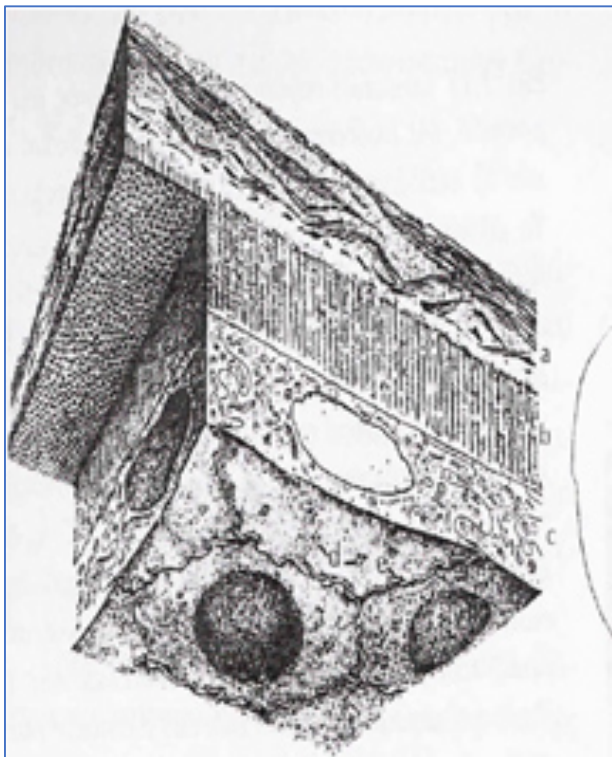


Εικόνα 9: Η Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην οποία απεικονίζεται σε τομή το στρώμα του κερατοειδούς(S) η πρόσθια (A) και η οπίσθια (P) στιβάδα της δεσμεμείου (DM), και το ενδοθήλιο (EN).

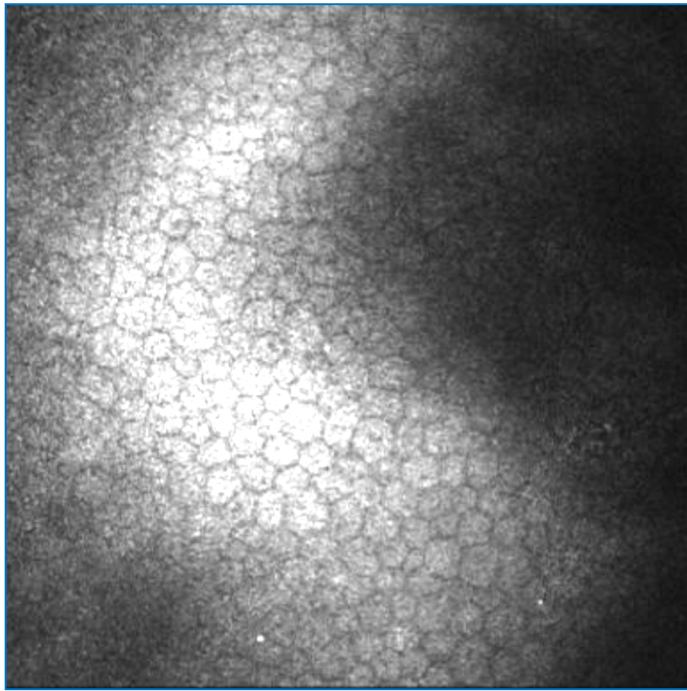
2.1.6. Ενδοθήλιο κερατοειδούς

Το ενδοθήλιο του κερατοειδούς είναι μια μονή στιβάδα κυττάρων που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς. Ο ρόλος των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι να διατηρούν την συγκέντρωση ύδατος του στρώματος με μια λειτουργία αντλίας. Αυτή η μονή στιβάδα σχηματίζεται από ομοιόμορφα κατανομημένα πολυγωνικά κύτταρα τα περισσότερα από τα οποία είναι εξαγωνικά. Η πυκνότητα των ανθρωπίνων ενδοθηλιακών κυττάρων μειώνεται με την ηλικία. Σύμφωνα με μελέτες το ποσοστό της μείωσης στο κέντρο είναι περίπου 0.60% ανά χρόνο σε ασθενείς χωρίς ιστορικό παθολογίας κερατοειδούς ή χειρουργείου. Ο κερατοειδής νεογέννητου ατόμου μπορεί να έχει πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων μεγαλύτερη από 3500 κύτταρα ανά τετραγωνικό χιλιοστό ενώ στους ενήλικες η αντίστοιχη ελαχίστη πυκνότητα που απαιτείται για να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία του κερατοειδούς είναι 400 έως 700 κύτταρα ανά τετραγωνικό χιλιοστό. Έτσι λοιπόν τα κύτταρα με τα οποία γεννιόμαστε είναι αρκετά για να κρατήσουν για μία διάρκεια ζωής περισσότερο από 100 έτη. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν διάμετρο περίπου 20 μm και πάχος 4 έως 6 μm. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα περιέχουν ένα μεγάλο πυρήνα και αρκετά μιτοχόνδρια επειδή είναι πολύ ενεργά μεταβολικά κύτταρα. Συνδέονται μεταξύ τους με σφιχτούς δεσμούς. Σε παθολογικές καταστάσεις

που επηρεάζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εκτός από την φυσιολογική πυκνότητα τους που ελαττώνεται λόγω απώλειας κυττάρων, επηρεάζεται και η φυσιολογική τους μορφολογία. Έτσι έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι απεικόνισης των ενδοθηλιακών κυττάρων οι οποίες δίνουν με άμεσο τρόπο εκτός από την πυκνότητα, και άλλες παραμέτρους που έχουν να κάνουν με το βαθμό διατήρησης το εξαγωνικού σχήματος, καθώς και της ομοιομορφίας στο μέγεθος των κυττάρων. Οι παράμετροι αυτοί ονομάζονται πλειομορφισμός (δηλαδή ποικιλία στο σχήμα) και πολυμεγεθισμός (δηλαδή ποικιλία στο μέγεθος). Καθώς ο αριθμός των ενδοθηλιακών κυττάρων στον κερατοειδή χιτώνα ελαττώνεται με την ηλικία, ή εμφανίζονται απώλειες λόγω φλεγμονής, τραυματισμού ή λόγω παθήσεων όπως η δυστροφία του Fuchs, τα εναπομείναντα κύτταρα «απλώνουν» ώστε να καλύψουν το κενό που προκύπτει από την καταστροφή των κυττάρων, αυξάνουν σε μέγεθος και χάνουν το εξαγωνικό τους σχήμα.^{31,33-37}



Εικόνα 10: Σχεδιαστική απεικόνιση στρώματος δεσκεμετίου μεμβράνης και ενδοθηλίου. (από: Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: *Histology of the human eye*, Philadelphia, 1971, Saunders)

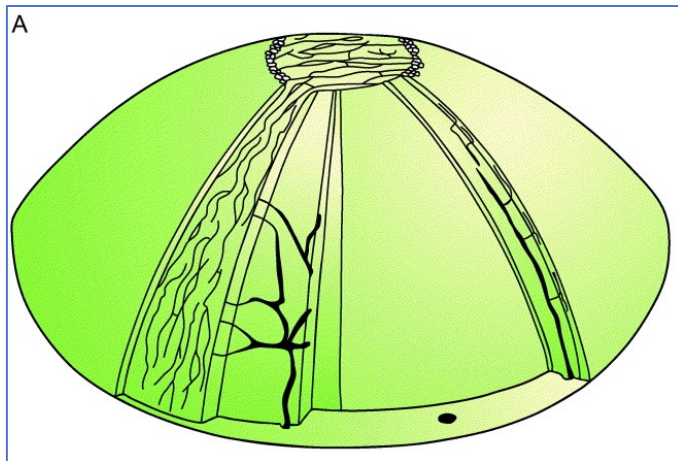


Εικόνα 11: Εικόνα από το ενδοθήλιο του κερατοειδούς από συνεστιακή μικροσκοπία όπου απεικονίζεται το χαρακτηριστικό εξαγωνικό το σχήμα και η διάταξη τους. (αρχείο ΒΕΜΜΟ)

2.1.7. Νεύρωση κερατοειδούς χιτώνα

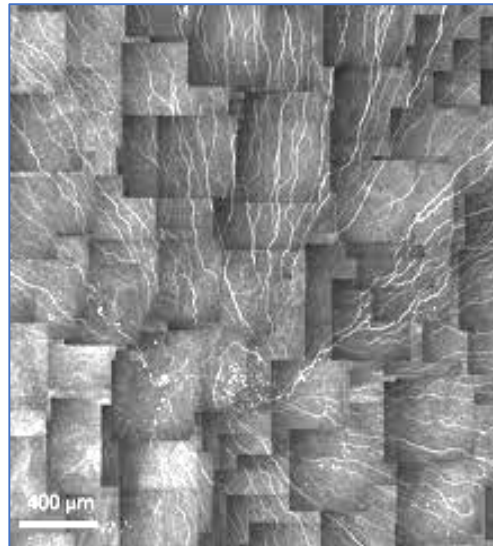
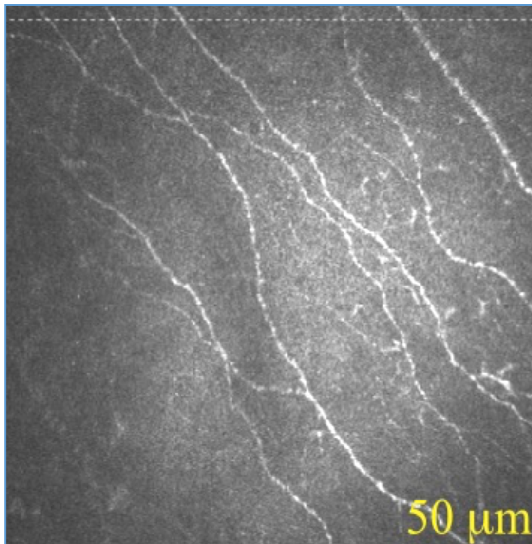
Ο κερατοειδής έχει πλούσια αισθητική νεύρωση. Νευρώνεται από το οφθαλμικό νεύρο, το οποίο είναι κλάδος του τρίδυμου νεύρου, διαμέσου των μακρών και των βραχέων ακτινοειδών νεύρων. Τα νεύρα εισέρχονται στο στρώμα στο μέσο τρίτο του πάχους του και διατρέχουν προς τα εμπρός και κεντρικά δίνοντας κλάδους που νευρώνουν το πρόσθιο και το μέσο στρώμα. Ανάμεσα από τη μεμβράνη του Bowman και το πρόσθιο στρώμα σχηματίζεται το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα. Στη συνέχεια τα νεύρα διαπερνούν τη μεμβράνη Bowman και σχηματίζουν το υποβασικό νευρικό πλέγμα παρέχοντας νεύρωση στην βασική στιβάδα του επιθηλίου ενώ απολήγουν ανάμεσα στα επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα. Η δεσκεμέτιος μεμβράνη και το ενδοθήλιο δεν έχουν καμία νεύρωση.

Ο κερατοειδής είναι ένας από τους πιο ευαίσθητους ιστούς του ανθρώπινου σώματος και αυτή η ευαισθησία εξυπηρετεί την προστασία του. Γι' αυτόν το λόγο οι περισσότεροι υποδοχείς στην επιφάνειά του κερατοειδούς είναι υποδοχείς πόνου. Ταυτόχρονα, υπάρχουν πολυδύναμοι υποδοχείς μηχανικών, θερμικών και χημικών ερεθισμάτων. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν την χαμηλότερη ουδό ευαισθησίας για τα μηχανικά ερεθίσματα.



Εικόνα 12: Σχεδιαστική απεικόνιση νεύρωσης του κερατοειδούς.³⁸

Εκτός από τη λειτουργία τους ως αισθητικοί υποδοχείς, τα κερατοειδικά νεύρα έχουν και τροφική λειτουργία. Ασθενείς με απώλεια των αισθητικών νεύρων του κερατοειδούς εξαιτίας κάποιου εγκεφαλικού επεισοδίου, διαβητικής νευροπάθειας ή ερπητικής λοίμωξης έχουν υψηλή επίπτωση αποπτώσεων επιθηλίου και εξέλκωσης του κερατοειδούς γνωστής ως νευροτροφικό έλκος. Αυτό μπορεί να έχει σχέση και με απώλεια του αισθήματος ξένου σώματος, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μηχανική βλάβη στον κερατοειδή. Διάφορα νευροπεπτίδια είναι παρόντα στα κερατοειδικά νεύρα και φαίνεται να έχουν άμεση τροφική λειτουργία για το επιθήλιο. Σε πειράματα όπου τα πεπτίδια αυτά εξαντλούνται υπάρχει καθυστερημένη επούλωση του επιθηλίου. Η νεύρωση του κερατοειδούς μπορεί να επηρεαστεί εκτός από τις προαναφερθείσες παθολογικές καταστάσεις και από χειρουργικές επεμβάσεις στον κερατοειδή οι οποίες οδηγούν σε απώλεια νευρικών ινών όπως διαθλαστική χειρουργική, επέμβαση καταρράκτη κλπ καθώς και από την χρόνια χρήση φακών επαφής και την ξηροφθαλμία.



Εικόνα 13: Εικόνα από το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα του κερατοειδούς από συνεστιακή μικροσκοπία όπου απεικονίζεται η χαρακτηριστική φυσιολογική πορεία των νεύρων και οι διακλαδώσεις τους.

Εικόνα 14: Σύνθεση εικόνων από το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα του κερατοειδούς από συνεστιακή μικροσκοπία.³⁹

2.2. Εμβρυολογία Κερατοειδούς

Ο κερατοειδής χιτώνας προέρχεται εμβρυολογικά από την νευρική ακρολοφία ενώ η διαφοροποίηση των δομών του ξεκινάει κατά την 6^η εβδομάδα της κύησης. Ειδικότερα το κερατικό επιθήλιο προερχόμενο από το επιφανειακό εξώδερμα αρχίζει να σχηματίζεται στην 6^η εβδομάδα. Από την 7^η εβδομάδα σε δύο κύματα μετανάστευσης κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας σχηματίζονται το ενδοθήλιο και το στρώμα του κερατοειδούς. Αρχικά με το πρώτο κύμα σχηματίζεται μια διπλή στιβάδα κερατικού ενδοθηλίου και στην συνέχεια σε ένα δεύτερο κύμα μετανάστευσης σχηματίζεται μία ζώνη πλούσια σε υαλουρονικό και ινίδια κολλαγόνου ανάμεσα στο επιθήλιο και στο ενδοθήλιο. Η Δεσκεμέτειος μεμβράνη εμφανίζεται κατά τον 4^ο μήνα της κύησης παραγόμενη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, κάτι που συνεχίζεται και μετά την γέννηση μέχρι το τέλος της ζωής, ενώ τον 5 μήνα εμφανίζεται η μεμβράνη του Bowman κάτω από την βασική μεμβράνη του κερατικού επιθηλίου. Από τον 3ο έως τον 7ο μήνα της κύησης τα βλέφαρα δεν έχουν διαχωριστεί ακόμα πλήρως, σχηματίζοντάς έτσι ένα χώρο μπροστά στον

κερατοειδή, τον σάκο του επιπεφυκότα και προστατεύοντας έτσι το επιθήλιο από το αμνιακό υγρό. Κατά τη γέννηση ο κερατοειδής είναι μεγαλύτερος σε μέγεθος αναλογικά με τον υπόλοιπο βολβό του οφθαλμού αλλά φτάνει σε μέγεθος αυτόν του ενήλικα σε ηλικία 2 ετών. Εντωμεταξύ αυξάνει και το μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα του οφθαλμού.^{3,40,41}

3. Δακρυϊκή στιβάδα

Η δακρυϊκή στιβάδα, το επιθήλιο του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα, οι δακρυϊκοί αδένες και τα βλέφαρα λειτουργούν σαν μια λειτουργική μονάδα τα συστατικά της οποίας έχουν κοινούς μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας τους με απώτερο στόχο την ομαλή διαβροχή της οφθαλμικής επιφάνειας και την καλή της υγεία.⁴² Η οφθαλμική επιφάνεια καλύπτεται από την δακρυϊκή στιβάδα. Τα δάκρυα είναι ένα διάλειμμα ενζύμων, πρωτεϊνών, ανοσοσφαιρινών, λιπιδίων, μεταβολιτών και αποπτωτικών κυττάρων σε νερό. Αποτελείται από τρεις στοιβάδες με διαφορετική σύσταση.

Το εσωτερο φύλλο της δακρυϊκής στιβάδας είναι η βλεννώδης στιβάδα. Παράγεται από τα καλυκοειδή κύτταρα του επιπεφυκότα στον μεγαλύτερο βαθμό, καθώς και από επιθηλιακά κύτταρα. Αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες και σταθεροποιείται από τις μικρολάχνες του επιθηλίου.^{43,44} Η βλεννώδης στιβάδα απλώνεται σ' ολόκληρη την οφθαλμική επιφάνεια και την καθιστά υδρόφιλη επιτρέποντας έτσι την αμέσως επόμενη υδαρή στιβάδα των δακρύων να απλώνεται ομαλά επάνω της. Χωρίς την βλεννώδη στιβάδα, η υδαρής στιβάδα διασπάται και αφήνει περιοχές της οφθαλμικής επιφάνειάς στεγνές με αποτέλεσμα την επιθηλιακή βλάβη.^{42,45} Επίσης η βλεννώδης στιβάδα συμμετέχει στις ιξωδοελαστικές ιδιότητες της δακρυϊκής στιβάδας, την σταθεροποιεί και προστατεύει την οφθαλμική επιφάνεια από πιθανό τραύμα κατά τον βλεφαρισμό.⁴⁶

Αμέσως έξω από την βλεννώδη στιβάδα υπάρχει η υδαρής αν και ο διαχωρισμός ανάμεσα τους δεν είναι σαφής. Παράγεται από τους κυρίως και τους επικουρικούς δακρυϊκούς αδένες και συνιστά τον κυρίως όγκο των δακρύων. Κεντρομόλα αισθητικά ερεθίσματα από την οφθαλμική επιφάνεια είναι απαραίτητα

για την ρύθμιση της παραγωγής της.⁴⁷ Είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών στα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς, ενώ και το οξυγόνο της ατμόσφαιρας διαλυμένο σ' αυτήν μεταφέρεται στον κερατοειδή. Επίσης μέσω αυτής απομακρύνονται τα προϊόντα του μεταβολισμού και τα αποπτωτικά επιφανειακά κύτταρα του επιθηλίου. Φέρει αντιμικροβιακούς παράγοντες και ανοσοσφαιρίνες που συμμετέχουν στην άμυνα της οφθαλμικής επιφάνειας.^{48,49}

Η λιπιδική στιβάδα είναι το εξώτερο μέρος της δακρυϊκή στιβάδας και παράγεται από τους μείβομιανούς αδένες. Ο ρόλος της είναι να αποτρέπει την εξάτμιση των δακρύων και να ενισχύει τη σταθερότητα της δακρυϊκής στιβάδας και φυσικά να παρέχει μια ομαλή διαθλαστική επιφάνεια στον οφθαλμό.⁵⁰ Ο βλεφαρισμός είναι απαραίτητος για την απελευθέρωση της έκκρισης των μείβομιανών αδένων και για το σωστό άπλωμα της λιπιδικής στιβάδας πάνω στη υδαρή.⁵¹

4. Φυσιολογία κερατοειδούς

4.1 Διαφάνεια κερατοειδούς

Η διαφάνεια του κερατοειδούς είναι η σημαντικότερη ιδιότητά του για την λειτουργία της όρασης. Η διαφάνεια του οφείλεται, αρχικά, σε ανατομικούς παράγοντες, όπως η ύπαρξη μικρού αριθμού κυττάρων στο στρώμα σε συνδυασμό με την ομοιόμορφη και κανονική διάταξη των πεταλίων του στρώματος και των κολλαγόνων ινιδίων, που τα αποτελούν. Επίσης, η έλλειψη αγγείων και η απώλεια του ελύτρου μυελίνης των νευρικών ινών κατά την είσοδό τους στο στρώμα είναι ανατομικά χαρακτηριστικά που σκοπό έχουν την διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδούς. Επίσης τα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε διάταξη που τα καθιστά διαφανή.^{7,52,53}

Η σταθερή ενυδάτωση του στρώματος του κερατοειδούς η οποία είναι σημαντική για την διατήρηση της διαφάνειας κερατοειδούς εξασφαλίζεται από την φυσιολογική λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως προαναφέρθηκε. Φυσιολογικά ο κερατοειδής είναι ενυδατωμένος κατά περίπου 75%.^{34,36,54}

4.2. Φυσιολογία και ενυδάτωση στρώματος κερατοειδούς

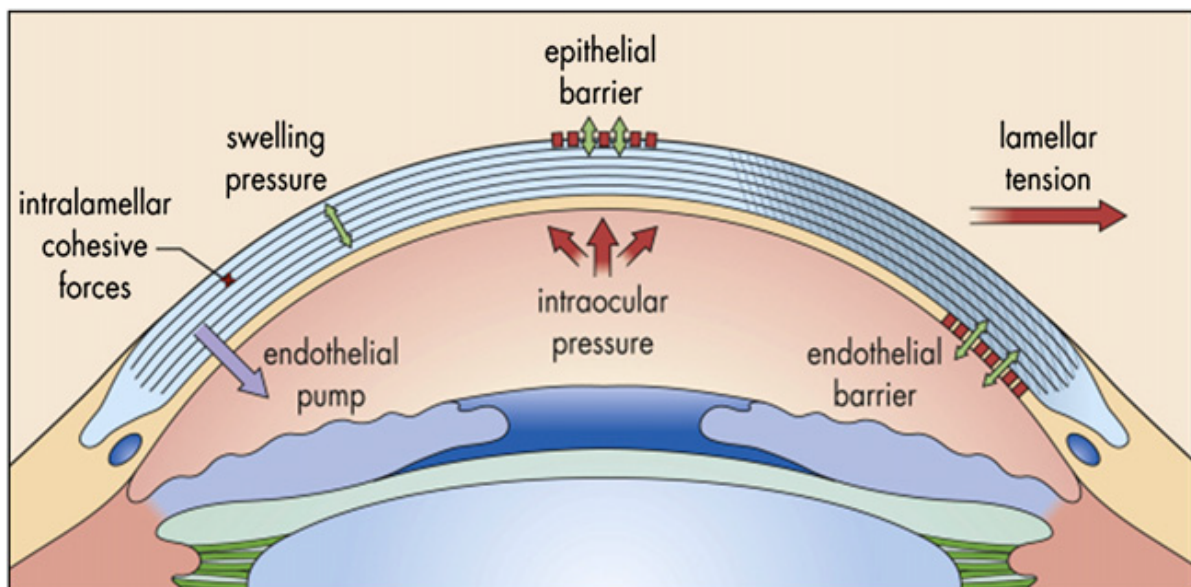
Η εξοίδηση του κερατοειδούς μέσω εισόδου υγρού από την πρόσθια επιφάνειά του αποτρέπεται από την ύπαρξη στερεών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του κερατοειδικού επιθηλίου, όταν αυτό είναι ακέραιο.

Υπό κανονικές συνθήκες το υδατοειδές υγρό εισέρχεται από τον πρόσθιο θάλαμο στο στρώμα του κερατοειδούς διαμέσου του ατελούς φραγμού του ενδοθηλίου. Η είσοδος του υγρού εξαρτάται από την ενδοφθάλμια πίεση κι από την ωσμωτική πίεση του στρώματος. Το κερατοειδικό στρώμα είναι υπερωσμωτικό λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε γλυκοζαμινογλυκάνες. Η ενυδάτωση του στρώματος του κερατοειδούς είναι φυσιολογικά περίπου 3.5 γραμμάρια νερό ανά γραμμάριο ξηρού βάρους και αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση του πάχους του κερατοειδούς. Το στρώμα του κερατοειδούς έχει μία τάση να απορροφά νερό και να παθαίνει οίδημα. Αυτή η ιδιότητα ανακλά την ικανότητα των πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας ουσίας να συνδέονται με νερό. Το οίδημα του στρώματος συμβαίνει στην εξωκυττάρια ουσία, στις πρωτεογλυκάνες ανάμεσα στα ινίδια του κολλαγόνου και οδηγεί στην αύξηση της απόστασης μεταξύ των ινιδίων του κολλαγόνου του στρώματος. Σε κερατοειδείς φυσιολογικού πάχους η ωσμωτική πίεση είναι περίπου 55mmHg. Η ωσμωτική πίεση είναι αντιστρόφως ανάλογη με το πάχος του κερατοειδούς. Για παράδειγμα, ένας εξοιδημένος κερατοειδής με πάχος 150% του φυσιολογικού έχει ωσμωτική πίεση μόνο 15 mmHg σε σύγκριση με έναν μη οιδηματώδη κερατοειδή που έχει 55 mmHg. Αντίστροφα, η συμπίεση του κερατοειδή με οποιοδήποτε τρόπο σχετίζεται με μια αύξηση στην ωσμωτική πίεση του στρώματος.⁹ Οι πρωτεογλυκάνες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της φυσιολογικής απόστασης και της θέσης των ινιδίων του κολλαγόνου που είναι και η βάση της διαύγειας του κερατοειδούς. Επίσης η ωσμωτική πίεση του κερατοειδικού στρώματος σχετίζεται με την ηλεκτροστατική απώθηση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεογλυκανών. Η κύρια πρωτεογλυκάνη του κερατοειδικού στρώματος είναι η θειική κερατάνη, η οποία αποτελείται από τρεις ξεχωριστές πρωτεΐνες: λουμικάνη, κερατοκάνη και μιμεκάνη.

Όπως προαναφέρθηκε, η περιεκτικότητα του στρώματος σε νερό είναι περίπου 75% κι αυτή διατηρείται σταθερή χάρη στο ενδοθήλιο το οποίο διατηρεί ένα φραγμό για την είσοδο του νερού από το υδατοειδές υγρό του προσθίου θαλάμου προς το στρώμα του κερατοειδούς και ταυτόχρονα πραγματοποιεί ενεργητική

αφυδάτωση του κερατοειδούς προς τον πρόσθιο θάλαμο. Ο μηχανισμός ενεργητικής μετακίνησης υγρού από το στρώμα προς τον πρόσθιο θάλαμο συνίσταται στην ενεργητική μεταφορά ιόντων Na^+ και HCO_3^- από το στρώμα προς το υδατοειδές υγρό με κατανάλωση ενέργειας με τη μορφή ATP από τα μιτοχόνδρια του κυτταροπλάσματος των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οποιαδήποτε βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να έχει επίπτωση στην λειτουργία της αντλίας με αποτέλεσμα την εξοίδηση του κερατοειδούς και την απώλεια της διαφάνειας του.^{36,55}

Η εξάτμιση από την δακρυϊκή στιβάδα συμμετέχει επίσης στην αφυδάτωση του κερατοειδούς. Ο ρυθμός της εξάτμισης είναι περίπου $2.5\text{ml}/\text{cm}^2/\text{hr}$ και προκαλεί λέπτυνση κατά περίπου 5% κατά τη διάρκεια της ημέρας στο πάχος του κερατοειδούς σε σύγκριση με το πάχος που μετρίεται αμέσως μετά την αφύπνιση.



Εικόνα 15: Σχεδιαστική απεικόνιση των μηχανισμών που συμμετέχουν στην διατήρηση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς (από: Yanoff M., Duker JS, Eds. *Ophthalmology*. Mosby, 2009)

4.3. Μεταβολισμός και θρέψη του κερατοειδούς

Η κύρια πηγή θρεπτικών συστατικών είναι το υδατοειδές υγρό. Κύρια πηγή οξυγόνου για τον κερατοειδή είναι το ατμοσφαιρικό οξυγόνο διαμέσου της διάλυσης του στην δακρυϊκή στιβάδα. Η περιφέρεια του κερατοειδούς δέχεται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και από το περικεράτιο τριχοειδικό αγγειακό δίκτυο. Επιπλέον στη θρέψη του κερατοειδούς και ιδιαίτερα των επιθηλιακών κυττάρων συμβάλλουν οι τελικές απολήξεις των κερατοειδικών νεύρων.

Οι ανατομικές δομές του κερατοειδούς συμμετέχουν στην άμυνα απέναντι στην είσοδο μικροβίων στο οφθαλμό. Το επιθήλιο του κερατοειδούς όταν είναι ακέραιο, καθώς και η βασική του μεμβράνη παρεμποδίζουν την εισβολή μικροοργανισμών. Επίσης διάφοροι αντιβακτηριακοί παράγοντες βρίσκονται σε διάλυση στα δάκρυα όπως η λυσοζύμη, η β-λυσίνη και η λακτοφερίνη. Επιπλέον η σωστή λειτουργία της δακρυϊκής συσκευής με τη διαρκή ανανέωση της δακρυϊκής στιβάδας συμμετέχει στην απομάκρυνση των μικροοργανισμών.

4.4. Διατήρηση του επιθηλίου του κερατοειδούς και απάντηση στο τραύμα

Το επιθήλιο του κερατοειδούς διατηρείται χάρη σ' ένα διαρκή κύκλο αποπτώσεων των επιφανειακών κυττάρων και πολλαπλασιασμού των βασικών κυττάρων του. Ο ρυθμός μίτωσής είναι περίπου 10 έως 15% την ημέρα. Ταυτόχρονα συμβαίνει μια αργή μετανάστευση των βασικών κυττάρων από την περιφέρεια προς το κέντρο του κερατοειδούς. Η πηγή των νέων βασικών κυττάρων είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του σκληροκερατοειδούς ορίου, σε μια ζώνη κυττάρων 0.5 έως 1mm πάχους στην περιφέρεια του κερατοειδούς. Το σκληροκερατοειδές όριο περιέχει τα βλαστικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε βασικά κύτταρα και μεταναστεύουν προς τον κερατοειδή διαρκώς, ανανεώνοντας την στιβάδα των βασικών κυττάρων. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στη βασική στιβάδα του σκληροκερατοειδούς ορίου και διαφοροποιούνται καθώς μεταναστεύουν πάνω στην βασική μεμβράνη του κερατοειδούς.¹⁴⁻¹⁶

Η βασική λειτουργία του επιθηλίου κερατοειδούς είναι να αποτελεί ένα φραγμό για την εισβολή παθογόνων μικροβίων στον οφθαλμό καθώς και για την προσρόφηση περίσσειας υγρού από το στρώμα του κερατοειδούς. Εάν συμβεί

εκδορά στο επιθήλιο του κερατοειδούς η άμεση απάντηση είναι απαραίτητη έτσι ώστε η εκτεθειμένη περιοχή της βασικής μεμβράνης να καλυφθεί με κύτταρα επιθηλίου. Έτσι όταν συμβεί αυτό τα κύτταρα στα όρια της εκδοράς διογκώνονται και μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις για να καλύψουν το έλλειμμα. Όταν κλείσει το έλλειμμα η μίτωση ξεκινάει πάλι έτσι ώστε το επιθήλιο να ξαναβρεί τη φυσιολογική του ανατομία. Η διαδικασία της επούλωσης συμβαίνει γρήγορα καθώς ο ρυθμός μετανάστευσης των επιθηλιακών κυττάρων είναι 60 έως 80 $\mu\text{m}/\text{h}$.^{14,56,57}

Η διαδικασία της επούλωσης του επιθηλίου έχει μεγάλο ερευνητικό και κλινικό ενδιαφέρον γιατί αφορά πολλές επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής καθώς και την επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου, οι οποίες πραγματοποιούνται μετά από αφαίρεση επιθηλίου του κερατοειδούς σε μία περιοχή διαμέτρου περίπου 8mm στο κέντρο του. Η επουλωτική αντίδραση του επιθηλίου του κερατοειδούς ελέγχεται από διάφορους παράγοντες οι οποίοι παράγονται είτε από τα ίδια τα επιθηλιακά κύτταρα είτε από άλλους παρακείμενους ιστούς όπως τα κερατοκύτταρα του στρώματος, και η έκφραση των οποίων αυξάνεται μετά από τραυματισμό του επιθηλίου του κερατοειδούς. Μετά την επούλωση του τραύματος, οι συνδέσεις ανάμεσα στο επιθήλιο και την βασική μεμβράνη του επανεμφανίζονται με τη δημιουργία νέων ημιδεσμοσωμάτων στην βασική στιβάδα των κυττάρων. Η τοποθέτηση αυτών των ημιδεσμοσωμάτων αντιστοιχεί επακριβώς στις θέσεις των ινιδίων αγκύρωσης της βασικής μεμβράνης. Έτσι λοιπόν όταν η εκδορά περιορίζεται στο επιθήλιο και η βασική μεμβράνη δεν τραυματίζεται, ένα φυσιολογικό επιθήλιο με συνδέσεις με τη βασική μεμβράνη σχηματίζεται σύντομα μετά την επούλωση· όταν όμως η βασική μεμβράνη αφαιρείται τότε το επιθήλιο πρέπει να παράξει νέα βασική μεμβράνη μετά την επούλωση, και έτσι η δημιουργία των κανονικών συνδέσεων καθυστερεί για πάνω από 12 μήνες. Παράδειγμα τέτοιας κατάστασης είναι η φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή όπου η βασική μεμβράνη αφαιρείται κατά την εφαρμογή του laser.⁵⁸⁻⁶⁰

4.5. Φυσιολογία του στρώματος-απάντηση στο τραύμα

Η απάντηση του κερατοειδικού στρώματος στο τραύμα συνίσταται στην παραγωγή νέου κολλαγόνου και την διασύνδεση του, και τις μεταβολές στη σύνθεση των πρωτεογλυκανών και στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας για να αποκατασταθεί η φυσιολογική ανατομία. Στην απάντηση αυτή τις πρώτες ώρες συμμετέχουν τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και αργότερα τα μονοκύτταρα. Τα

κερατοκύτταρα ενεργοποιούνται και μετασχηματίζονται σε μυοϊνοβλάστες. Οι περιοχές της επούλωσης έχουν διαφορετική συγκέντρωση πρωτεογλυκανών καθώς και διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου. Η φυσιολογική δομή και βιομηχανική ισχύς του κερατοειδούς σε περιοχή τραυματισμού του στρώματος μπορεί να πάρει χρόνια να αποκατασταθεί, ενώ όσο πιο κοντά στο σκληροκερατοειδές όριο είναι το τραύμα τόσο πιο γρήγορα επουλώνεται.^{30,61-64}

5. Διαθλαστική Χειρουργική

Η διαθλαστική χειρουργική είναι ένας διαρκώς αναπτυσσόμενος τομέας της οφθαλμολογίας ο οποίος γνωρίζει ραγδαία ανάπτυξη εδώ και 30 χρόνια, μετά τις πρώτες εφαρμογές των laser. Στόχος της είναι η αντιμετώπιση κάθε είδους αμετροπίας (μυωπίας, υπερμετροπίας, αστιγματισμού). Αρχικά με την εφαρμογή της φωτοδιαθλαστικής κερατεκτομής (PRK) από την M.MacDonald και εν συνεχεία με την ανακάλυψη της LASIK από τον Καθηγητή Ι. Παλλήκαρη, η διαθλαστική χειρουργική διαρκώς εξελίσσεται, ενώ οι τεχνικές της αποκτούν εφαρμογή και στην αντιμετώπιση κι άλλων παθήσεων όπως του κερατοκώνου.⁶⁵⁻⁶⁹

Η βασική αρχή της διαθλαστικής χειρουργικής με laser είναι η αλλαγή της καμπυλότητας του κερατοειδούς μέσω φωτοαποδόμησης το στρώματος έτσι ώστε να αλλάξει η διαθλαστική του δύναμη και να διορθωθούν έτσι τα διαθλαστικά σφάλματα. Η φωτοαποδόμηση μπορεί να εφαρμοστεί είτε στην επιφάνεια του κερατοειδούς κάτω από το επιθήλιο, είτε σε εκτεθειμένη επιφάνεια βαθύτερα στο στρώμα. Τελευταία έχει αναπτυχθεί μια ακόμη τεχνική κατά την οποία αφαιρείται ιστός σε μορφή φακιδίου από το εσωτερικό του στρώματος χωρίς φωτοαποδόμηση. Ανάλογα με την στιβάδα εφαρμογής του laser οι τεχνικές χωρίζονται σε επιφανειακές και στις εν τω βάθει διορθώσεις

5.1. Επιφανειακές τεχνικές

Οι κύριες επιφανειακές διαθλαστικές μέθοδοι για τη σμίλευση του κερατοειδούς με excimer laser (επιφανειακές φωτοεκτομές) και τη διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων του οφθαλμού είναι:

1. Η φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (PRK) ή επιφανειακή φωτοεκτομή με ή χωρίς τη διεγχειρητική εφαρμογή της μιτομυκίνης C (mitomycin C, MMC).
2. Η μέθοδος Epi-LASIK.

5.1.1. Φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (PRK)

Η φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (PRK) (επιφανειακή φωτοεκτομή) (photorefractive keratectomy, PRK), είναι μια καθιερωμένη διαθλαστική μέθοδος, που εκτελείται ήδη για περίπου 30 έτη. Στην τεχνική αυτή, η αλλαγή της καμπυλότητας του κερατοειδούς επιτυγχάνεται με την εφαρμογή laser φωτοεκτομής μετά την αφαίρεση του επιθηλίου στην επιφάνεια απευθείας στην στιβάδα του Bowman. Η μυωπία διορθώνεται με τη φωτοαποδόμηση (αφαίρεση ιστού) στην κεντρική περιοχή της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς προκειμένου να γίνει περισσότερο επίπεδη. Η υπερμετρωπία διορθώνεται με φωτοαποδόμηση στην περιφέρεια του κερατοειδούς προκειμένου το κέντρο του κερατοειδούς να γίνει πιο κυρτό. Όταν επιχειρείται διόρθωση του αστιγματισμού, αυτή επιτυγχάνεται με επιλεκτική φωτοεκτομή στον πιο επίπεδο μεσημβρινό, με συνέπεια την επιπέδωση του κυρτού μεσημβρινού.

Όσο μεγαλύτερη είναι η επιχειρούμενη διόρθωση της μυωπίας τόσο περισσότερος είναι και ο κερατοειδικός ιστός που πρέπει να φωτοαποδομηθεί, σύμφωνα με τον τύπο του Munnerlyn:

$$BE(\mu m) = \Delta P (D) \times d^2 (mm) / 3$$

όπου BE το βάθος εκτομής σε μm , ΔP η επιθυμητή αλλαγή της διαθλαστικής δύναμης του κερατοειδούς σε διοπτρίες και d η διάμετρος της ζώνης φωτοεκτομής.⁷⁰

Στην φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή, πριν τη φωτοαποδόμηση του στρώματος του κερατοειδούς πραγματοποιείται η αφαίρεση του επιθηλίου του κερατοειδούς. Τεχνικά αυτό μπορεί να γίνει είτε μηχανικά -όπως με τη χρήση περιστρεφόμενης συσκευής αποεπιθηλιοποίησης (rotating brush) ή με χρήσης

ειδικών μη αιχμηρών μαχαιριδίων- είτε με χημικά μέσα (χρήση αλκοόλης) είτε με το laser (φωτοαποδόμηση του επιθηλίου με χρήση φωτοθεραπευτικής κερατεκτομής). Ακολουθεί η φωτοαποδόμηση της στιβάδας του Bowman και του ανώτερου στρώματος του κερατοειδούς με σκοπό την μεταβολή της καμπυλότητάς του. Αμέσως μετά τοποθετείται στην επιφάνεια του κερατοειδούς ένας προστατευτικός μαλακός φακός επαφής μέχρι την πλήρη επανεπιθηλιοποίηση του κερατοειδούς. Φυσιολογικά, μέσα σε 3-5 ημέρες μετά την επέμβαση, το επιθήλιο του κερατοειδούς αναπλάθεται και καλύπτει την φωτοαποδομημένη περιοχή.^{67,71}

Στην φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή με διεγχειρητική εφαρμογή μιτομυκίνης (mitomycin C, MMC) μετά το πέρας της φωτοεκτομής τοποθετείται επάνω στην επιφάνεια του κερατοειδούς διάλυμα μιτομυκίνης C, συγκέντρωσης 0.02%. Η ουσία αυτή δρα ως κυτταροστατικός παράγοντας για να ελέγξει την επουλωτική διαδικασία του κερατοειδούς, η οποία διαφορετικά μπορεί πιο εύκολα να οδηγήσει σε υποεπιθηλιακή θόλωση του στρώματος.⁷²

5.1.2. Epi-LASIK

Στην τεχνική Epi-LASIK που σχεδιάστηκε από τον καθηγητή κ. Παλλήκαρη στο Πανεπιστήμιο της Κρήτης πραγματοποιείται φωτοεκτομή κάτω από έναν επιθηλιακό κρημό. Ο επιθηλιακός κρημός δημιουργείται με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου (επικερατόμου), το οποίο διαχωρίζει μηχανικά τη στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων από το υποκείμενο στρώμα του κερατοειδούς. Ακολουθεί η φωτοαποδόμηση και η επανατοποθέτηση του επιθηλιακού κρημού.⁷³⁻⁷⁵

5.2. Εν τω βάθει τεχνικές

5.2.1 LASIK (Laser in Situ Keratomileusis)

Η τεχνική LASIK, η δημοφιλέστερη τεχνική σήμερα, η οποία σχεδιάστηκε από τον καθηγητή κ. Παλλήκαρη στο Πανεπιστήμιο της Κρήτης, συνίσταται στη δημιουργία ενός κερατοειδικού κρημού (flap) με την χρήση ενός ειδικού εργαλείου που ονομάζεται μικροκερατόμος είτε με την χρήση του Femtosecond laser και στη

συνέχεια στην φωτοαποδόμηση του εκτεθειμένου στρώματος. Η τεχνική αυτή παρέχει ταχύτερη και ανώδυνη αποκατάσταση της όρασης, με μειωμένη πιθανότητα μετεγχειρητικής υποεπιθηλιακής θόλωσης συγκριτικά με την PRK.^{65,66,76}

5.2.2. SMILE (Small Incision Lenticule Extraction)

Στην τεχνική SMILE δημιουργούνται δύο αμφικυρτες τομές με το femtosecond laser στο εσωτερικό του κερατοειδικού στρώματος οι οποίες σε επαφή περιφερικά σχηματίζουν ένα φακίδιο. Στην συνέχεια μέσα από μια μικρή τομή με ειδικό εργαλείο αφαιρείται το φακίδιο αλλάζοντας την πρόσθια καμπυλότητα του κερατοειδούς.⁷⁷

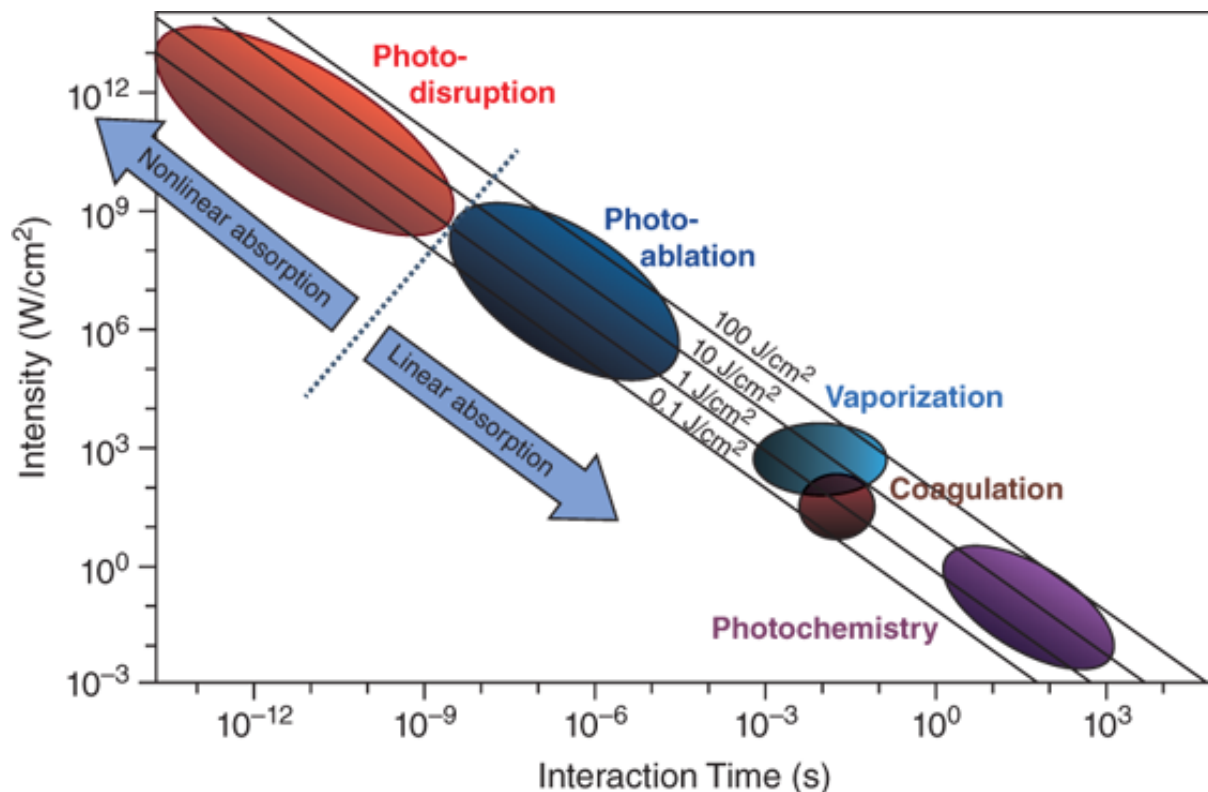
5.3. Χρήση λέιζερ στην διαθλαστική χειρουργική

Ο όρος Laser, είναι το ακρωνύμιο του όρου “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, που σημαίνει, «Ενίσχυση του Φωτός από Εξαναγκασμένη Εκπομπή Ακτινοβολίας». Πρόκειται για συσκευές εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, με βασικά χαρακτηριστικά την μονοχρωματικότητα (τα φωτόνια της δέσμης έχουν όλα σχεδόν την ίδια συχνότητα) την κατευθυντικότητα (τα φωτόνια της δέσμης έχουν όλα την ίδια διεύθυνση) και την συμφωνία (τα φωτόνια της δέσμης έχουν όλα την ίδια φάση). Υπάρχουν διάφοροι τύποι λέιζερ τα χαρακτηριστικά των οποίων διαμορφώνονται κυρίως από το ενεργό μέσο, το υλικό δηλαδή μέσα στο οποίο παράγεται η ακτινοβολία, αλλά και τα υπόλοιπα στοιχεία της συσκευής λέιζερ. Έτσι κάθε συσκευή λέιζερ μπορεί να μας δώσει ακτινοβολία που μπορεί να είναι συνεχής ή παλμική, να έχει διαφορετικό μήκος κύματος και διαφορετική ενέργεια. Αν το λέιζερ είναι παλμικό, η διάρκεια του παλμού και η συχνότητα των παλμών επίσης χαρακτηρίζει την ακτινοβολία.⁷⁸

Σήμερα η τεχνολογία λέιζερ έχει αναπτυχθεί πολύ και οι διαφορετικοί τρόποι αλληλεπίδρασης το λέιζερ με τους οφθαλμικούς ιστούς αξιοποιούνται με μεγάλη ακρίβεια στην θεραπεία μεγάλου φάσματος οφθαλμολογικών παθήσεων.

5.3.1. Αλληλεπίδραση laser-ιστού:

Ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας laser με κάθε ιστό εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας καθώς και από την σύσταση του ιστού. Τα κυριότερα είδη αλληλεπιδράσεις του laser με τους οφθαλμικούς ιστούς τα οποία χρησιμοποιούμε και στην κλινική πράξη είναι η φωτοδιάσπαση, η φωτοαποδόμηση και η φωτοπηξία (θερμική δράση- έγκαυμα).^{79,80}



Source: P. Riordan-Eva, J. J. Augsburger: Vaughan & Asbury's General Ophthalmology, Nineteenth Edition
Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Εικόνα 16: Τρόποι αλληλεπιδράσεων Laser με ιστούς σε συνάρτηση με την διάρκεια ακτινοβολήσης και της πυκνότητας ισχύος της δέσμης.

Στην διαθλαστική χειρουργική χρησιμοποιούμε την δράση της φωτοαποδόμησης για την αφαίρεση ιστού από την επιφάνεια του κερατοειδούς και την αλλαγή της καμπυλότητας της πρόσθιας επιφάνειάς του.

5.3.2. Διαθλαστική χειρουργική με Excimer laser

Τα κυρίως χρησιμοποιούμενα λέιζερ για τις φωτοεκτομές στον κερατοειδή είναι τα Excimer lasers. Ο όρος Excimer προκύπτει από σύντμηση του “excited dimer”, δηλαδή διηγεμένο διμερές. Πρόκειται για παλμικές πηγές υπεριώδους ακτινοβολίας, με ενεργό μέσο ένα σύστημα ευγενούς αερίου-αλογόνου. Τα μόρια των αερίων του ενεργού μέσου όταν βρίσκονται σε συνθήκες ηλεκτρικής διέγερσης και υψηλής πίεσης, δημιουργούν ένα βραχύβιο σύμπλεγμα (διηγεμένο διμερές) το οποίο μπορεί να υποστεί αυθόρμητη και εξαναγκασμένη εκπομπή και να παράγει ακτινοβολία λέιζερ. Διεγερμένα διμερή όπως το ArF, δεν υφίστανται στην θεμελιώδη ηλεκτρονική στάθμη, παρά δημιουργούνται μόνο κατά την διάρκεια ηλεκτρικών εκκενώσεων υψηλής τάξης σε μείγμα αερίων που περιέχει τα αντίστοιχα στοιχεία. Κατά την διάσπαση του μορίου του διμερούς παράγεται φωτόνιο με ενέργεια 6.4eV. Τυπικά η διάρκεια του παλμού είναι της τάξης των 20 nsec και η συνολική ενέργεια της τάξεως μερικών εκατοντάδων mJoules.^{81,82}

Το Excimer laser που χρησιμοποιείται για φωτοεκτομή στην επιφάνεια του κερατοειδούς είναι το ArF (193nm) λόγω της ακρίβειας στο βάθος της εκτομής στην καλή ποιότητα των επιφανειών μετά την εκτομή και στην μικρή θερμική βλάβη που προκαλεί.⁸³ Κατά την φωτοαποδόμηση ο παλμός του λέιζερ απορροφάται στην επιφάνεια του κερατοειδούς όταν η πυκνότητα της ενέργειας είναι μεγαλύτερη από ένα συγκεκριμένο κατώφλι, και προκαλεί τη διάσπαση μοριακών δεσμών στον ιστό. Τα κατάλοιπα της διάσπασης εκτοξεύονται ταχύτατα αφήνοντας ένα μικρό κρατήρα που αντιστοιχεί στο σημείο της φωτοαποδόμησης.^{84,85} Οι διαστάσεις του κρατήρα έχουν μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Στον ανθρώπινο κερατοειδή το κατώφλι ενέργειας για την πραγματοποίηση της φωτοαποδόμησης είναι 40 mJoules/cm².⁸⁶

Η χρήση του Excimer λέιζερ στη διαθλαστική χειρουργική ξεκίνησε τα τέλη της δεκαετίας του 80 μετά από μελέτες του Seiler και τις πρώτες κλινικές εφαρμογές από την McDonald στην επιφανειακή φωτοεκτομή η οποία ονομάστηκε φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή PRK (Photorefractive keratectomy).^{68,86} Σχεδόν ταυτόχρονα η ομάδα του καθηγητή Ιωάννη Παλλήκαρη έκανε τις πρώτες κλινικές εφαρμογές στην LASIK.⁶⁶

Για την διόρθωση των διαθλαστικών ανωμαλιών, το Laser που χρησιμοποιείται μπορεί να μετατρέψει ελεγχόμενα την καμπυλότητα της πρόσθιας

επιφάνειας του κερατοειδούς μέσω αφαίρεσης ιστού από προκαθορισμένη περιοχή του, έτσι ώστε να αποκτήσει την επιθυμητή διαθλαστική ισχύ για την διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων του οφθαλμού. Κάθε παλμός του Laser δημιουργεί ένα κρατήρα με μέγιστο βάθος μερικών δέκατων του μικρομέτρου και με διάμετρο αντίστοιχη με την διάμετρο της δέσμης που εστιάζεται στο πρόσθιο τμήμα του κερατοειδή. Με κατάλληλη εφαρμογή των επαλληλίας παλμών στον κερατοειδή δημιουργείται η επιθυμητή κατανομή φωτοεκτομής, και κατά συνέπεια η συνολική αλλαγή του προφίλ της πρόσθιας κερατοειδικής επιφάνειας. Η αλλαγή της καμπυλότητας γίνεται σε ζώνη προκαθορισμένης διαμέτρου, ανάλογα με την διάμετρο της κόρης του οφθαλμού σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.^{68,81,82,87}

Ο αλγόριθμος φωτοαποδόμησης που χρησιμοποιείται για την διόρθωση της μυωπίας βασίζεται όπως προαναφέρθηκε στον τύπο του Munnerlyn ο οποίος καθορίζει το μέγιστο βάθος ανάλογα με την επιθυμητή αλλαγή διαθλαστικής δύναμης του κερατοειδούς και την διάμετρο της ζώνης που μας ενδιαφέρει να διορθώσουμε διαθλαστικά.⁷⁰

Τα Excimer Laser για διαθλαστική χειρουργική, εκτός από το σύστημα με το ενεργό μέσο που παράγει την δέσμη λέιζερ, περιλαμβάνουν ένα σύνολο από υποσυστήματα για την κατεύθυνση της δέσμης στον κερατοειδή, τον έλεγχο της ευθυγράμμισης και την παρακολούθηση του οφθαλμού (Eye Trackers), τον έλεγχο εστίασης και τον αυτοέλεγχο της ενέργειας ανά παλμό. Όλες αυτές οι λειτουργίες ελέγχονται από ένα κεντρικό υπολογιστή στον οποίο και γίνεται ο υπολογισμός της επαλληλίας των παλμών για την εκάστοτε επιθυμητή διόρθωση.⁷¹

Η εφαρμογή των αλγορίθμων διόρθωσης αφορά διορθώσεις μυωπίας, υπερμετρωπίας, με ή χωρίς ταυτόχρονη διόρθωση αστιγματισμού, καθώς και τις εξατομικευμένες εκτομές. Στις τελευταίες, εκτός από το διαθλαστικό σφάλμα και την οπτική ζώνη, χρησιμοποιούμε και εξειδικευμένες πληροφορίες από την τοπογραφία του κερατοειδούς ή/και την ανάλυση μετώπου κύματος για την διαμόρφωση του προφίλ φωτοεκτομής.^{88,89}

Στην περίπτωση της μυωπίας η φωτοεκτομή είναι μεγαλύτερη στο κέντρο από ότι στην περιφέρεια της οπτικής ζώνης, ενώ στην περίπτωση της υπερμετρωπίας η φωτοεκτομή είναι μεγαλύτερη στην περιφέρεια από ότι στο κέντρο. Όταν πραγματοποιείται ταυτόχρονα και διόρθωση αστιγματισμού τότε το προφίλ τροποποιείται έτσι ώστε με επιπρόσθετη φωτοεκτομή στο λιγότερο κυρτό μεσημβρινό να ομογενοποιηθεί η διάθλαση σε όλους τους μεσημβρινούς.

5.3.3. Διαθλαστική χειρουργική με Laser στερεάς κατάστασης

Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει και η χρήση laser στερεάς κατάστασης αντί για Excimer laser, με εκπεμπόμενη ακτινοβολία στα 213nm. Η ακτινοβολία αυτή έχει παρόμοια χαρακτηριστικά απορρόφησης από τον κερατοειδή με τα 193nm.

Σύμφωνα με μελέτες, ο κερατοειδής έχει σταθερή απορρόφηση σε μήκη κύματος ακτινοβολίας από 190 έως 220nm.⁹⁰ Το λέιζερ Στερεάς κατάστασης είναι μια πηγή ακτινοβολίας με θεμελιώδη εκπομπή στα 1064 nm. Η άντληση πραγματοποιείται με λάμπες ξένου ή άλλα δυοδικά λέιζερ και το ενεργό μέσο είναι ένας κρύσταλλος Nd:YAG με θεμελιώδη εκπομπή στα 1064 nm. Με την βοήθεια τριών μη γραμμικών οπτικών κρυστάλλων παράγεται η πέμπτη αρμονική, με μήκος κύματος εκπομπής τα 213nm το οποίο βρίσκεται πολύ κοντά στο μήκος κύματος του Excimer laser.^{91,92} Το μήκος κύματος αυτό προκαλεί φωτοαποδόμηση με μεγάλη ακρίβεια όπως και το Excimer λέιζερ ενώ έχει μικρότερη εξάρτηση από την ενυδάτωση του κερατοειδούς.

Η ανεξαρτησία από την ενυδάτωση διαπιστώθηκε σε συγκριτική μελέτη απορρόφησης ακτινοβολίας μήκους κύματος 193nm και 213nm από διάλυμα χλωριούχου νάτριου 0,9% και BSS. Στην μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο συντελεστής απορρόφησης της ακτινοβολίας μήκος κύματος 193nm ήταν πολύ μεγαλύτερος από το συντελεστή απορρόφησης της ακτινοβολίας 213nm και για τα δύο διαλύματα ενώ το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας 213nm ήταν πολύ μεγαλύτερο από την ακτινοβολία 193nm. Αυτό δείχνει ότι ενυδάτωση του κερατοειδούς επηρεάζει πολύ λιγότερο την φωτοαποδόμηση που προκαλεί το laser στερεάς κατάστασης σε σχέση με το Excimer πράγμα που αποτελεί ένα πολύ σημαντικό θεωρητικό πλεονέκτημα του laser στερεάς κατάστασης.^{93,94}

Η εμπορικά διαθέσιμη πλατφόρμα με αυτή την αρχή λειτουργίας είναι το Pulsar Laser System 213nm της CustomVis. Τα έως τώρα εργαστηριακά και κλινικά αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι μία μέθοδος ικανή να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις των εφαρμογών της διαθλαστικής χειρουργικής για συμβατικές συμμετρικές διορθώσεις.⁹⁵⁻⁹⁷

Για την διενέργεια διαθλαστικών εκτομών με την χρήση των laser, είναι πολύ καθοριστικής σημασίας η ακρίβεια της φωτοαποδόμησης. Η σωστή ευθυγράμμιση των οπτικών ενός laser και η σωστή κατανομή ενέργειας της δέσμης που πέφτει στον κερατοειδή δίνουν πιο ομαλές και ομοιόμορφες επιφάνειες εκτομής. Για την

κάλυψη μιας περιοχής του κερατοειδούς, για παράδειγμα 6 χιλιοστών, μία μικρή δέσμη laser (1χιλ.), πρέπει να καλύψει την επιφάνεια, περνώντας αρκετές φορές από τα ίδια σημεία και με αλληλοεπικάλυψη των βολών για γειτονικά σημεία. Όσον αφορά την αλληλοεπικάλυψη των βολών για γειτονικά σημεία, η καλύτερη κατανομή ενέργειας είναι η κατανομή Gauss όπου η ενέργεια έχει κατανομή καμπάνας, δηλαδή μέγιστη τιμή στο κέντρο και μείωση συμμετρικά προς την περιφέρεια. Το εμπορικά διαθέσιμο solid state laser έχει μια δέσμη τύπου flying beam με διάμετρο παλμού (spot size) 0.6mm και Γκαουσιαννή κατανομή της ενέργειας.

5.4. Διαθλαστική χειρουργική και ξηροφθαλμία

Η μετεγχειρητική ξηροφθαλμία είναι μια από τις πιο συχνές επιπλοκές της διαθλαστικής χειρουργικής. Η ξηροφθαλμία έχει ως βασική αιτία την καταστροφή του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος του κερατοειδούς λόγω ακρωτηριασμού του κατά την δημιουργία του κρημού στην επέμβαση LASIK, είτε λόγω τις φωτοαποδόμησης του κατά τις επιφανειακές επεμβάσεις. Το αποτέλεσμα είναι η μειωμένη αισθητικότητά του κερατοειδούς και κατά συνέπεια η μειωμένη παραγωγή των κεντρομόλων νευρικών ερεθισμάτων που διεγείρουν την παραγωγή των δακρύων. Επίσης μετά τις διαθλαστικές επεμβάσεις απουσιάζει και η τροφική λειτουργία του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος η οποία φυσιολογικά υποστηρίζει τον μεταβολισμό του επιθηλίου. Η επιπλοκή αυτή αφορά όλους τους ασθενείς γιατί ότι ο παθογενετικός παράγοντας που την προκαλεί συμβαίνει πάντα μετά από διαθλαστική επέμβαση με λέιζερ.

Οι ασθενείς έχουν συχνά υποκειμενικά αίσθημα ξηρότητας και ξένου σώματος έως και 6 μήνες μετεγχειρητικά, ενώ και τα αποτελέσματα του Schirmer's τεστ και της μέτρησης του χρόνου διάσπασης της δακρυϊκή στιβάδας μπορεί να είναι παθολογικά στο διάστημα αυτό. Σύμφωνα με μελέτες, οι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε LASIK σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε επιφανειακές τεχνικές έχουν περισσότερο έντονη συμπτωματολογία.⁹⁸⁻¹⁰¹

Η ανατομία και λειτουργία του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος, όπως και η φυσιολογική λειτουργία της δακρυϊκής στιβάδας αποκαθίστανται σταδιακά τους πρώτους μετεγχειρητικούς μήνες. Ο χρόνος αποκατάστασης της αισθητικότητά και της νεύρωσης του κερατοειδούς διαφέρει ανάλογα με το είδος της επέμβασης που

έχει γίνει. Στις επιφανειακές τεχνικές η αισθητικότητα γυρνάει στο προεγχειρητικό επίπεδο περίπου τρεις έως έξι μήνες μετά το χειρουργείο ενώ στην LASIK αναφέρεται ότι χρειάζεται από έξι μήνες έως περισσότερο από ένα χρόνο για την αποκατάσταση της αισθητικότητας του κερατοειδούς.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Σε σχέση με την πυκνότητα των υποεπιθηλιακών νευρικών ινών σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες χρειάζεται έως δύο χρόνια μετά από PRK και πέντε χρόνια μετά από LASIK για να επανέλθει πλήρως. Οι διαφορές στη χρονική διάρκεια της αποκατάστασης της νεύρωσης ανάμεσα σε διαφορετικές χειρουργικές τεχνικές μπορεί να οφείλονται στην διαφορά τόσο της αιτίας όσο και της έκτασης της αρχικής βλάβης στις νευρικές ίνες.^{106,107}

5.5. Τοπογραφία κερατοειδούς

Ένα από τα πιο σημαντικά μέρη του σχεδιασμό μιας διαθλαστικής επέμβασης με λέιζερ είναι η μελέτη της καμπυλότητας της πρόσθιας και της οπίσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς καθώς και του πάχους του κερατοειδούς. Η επιφάνεια του κερατοειδούς καλυπτόμενη από την δακρυϊκή στιβάδα συμπεριφέρεται σαν διαθλαστική επιφάνεια όπως επίσης και σαν ανακλαστική επιφάνεια. Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλεύονται οι συσκευές τοπογραφίες κερατοειδούς με τη μέθοδο Placido. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο φωτεινοί ομόκεντροι κύκλοι προβάλλονται στην επιφάνεια του κερατοειδή, και η αντανάκλαση τους από αυτήν φωτογραφίζεται. Από την παραμόρφωση που προκαλείται (σμίκρυνση) στην αντανάκλαση των ομόκεντρων κύκλων σε κάθε περιοχή του κερατοειδούς υπολογίζεται με ειδικούς αλγορίθμους η καμπυλότητα του κερατοειδούς σε κάθε σημείο. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται χρωματικοί χάρτες στους οποίους με πιο θερμά χρώματα απεικονίζονται οι πιο κυρτές περιοχές και με πιο ψυχρά χρώματα απεικονίζονται λιγότερο κυρτές περιοχές.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Τα τελευταία χρόνια, σύγχρονες τεχνολογίες οπτικής απεικόνισης του κερατοειδούς έχουν αναπτυχθεί οι οποίες μας δίνουν εικόνα ταυτόχρονα και της πρόσθιας και της οπίσθιας επιφάνειάς του. Οι τεχνολογίες αυτές (scanning slit και Scheimpflug imaging) έχουν εφαρμοστεί σε συστήματα τομογραφίας και τοπογραφίας τα οποία μπορούν να χαρτογραφήσουν την καμπυλότητα όχι μόνο της

πρόσθιας επιφάνειας αλλά και της οπίσθιας, καθώς επίσης και το πάχος του κερατοειδούς στην περιοχή που καταγράφεται. Την τεχνολογία scanning slit σε συνδυασμό με Placido χρησιμοποιεί το σύστημα Orbscan (Bausch and Lomb), ενώ την τεχνολογία Scheimpflug imaging χρησιμοποιούν τα συστήματα Pentacam (OCULUS Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany) και Galilei (Ziemer Ophthalmic Systems AG, Port, Switzerland), το τελευταίο σε συνδυασμό με Placido.^{111–113}

Η χαρτογράφηση της καμπυλότητας και του πάχους του κερατοειδούς μας δίνει πληροφορίες για τις οπτικές ιδιότητες του και την ανατομία του. Συχνά υπάρχουν μικρότερες ή μεγαλύτερες ανωμαλίες καμπυλότητας στην επιφάνεια του οι οποίες μπορεί να μειώνουν την ποιότητα της όρασης ή ακόμα και την οπτική οξύτητα. Τέτοιες ανωμαλίες στην επιφάνεια μπορεί να προκύψουν σε ασθενείς με εκτατικές διαταραχές κερατοειδούς με ουλές από προηγούμενα τραύματα με προηγούμενες διαθλαστικές επεμβάσεις οι άλλες αιτίες.^{89,114–117}

5.6. Εξατομικευμένες φωτοεκτομές καθοδηγούμενες από την τοπογραφία

Οι εξατομικευμένες φωτοεκτομές είναι διορθώσεις που στόχο έχουν την αντιμετώπιση όχι μόνον της μυωπίας της υπερμετρωπίας και του αστιγματισμού αλλά και την βελτίωση της ποιότητας της όρασης μέσω της μείωσης των οπτικών εκτροπών υψηλής τάξης που προκαλούνται από ατέλειες στις οπτικές ιδιότητες του κερατοειδούς. Η εισαγωγή της μεθόδου αυτών στην διαθλαστική χειρουργική έγινε μετά από την έλευση των laser με δέσμη τύπου flying spot (δέσμη με κυκλικό στόχο, με γκαουσιανή ή ομοιογενή -top hat- κατανομή ενέργειας και μικρή διάμετρο), τα οποία μπορούν να επιτύχουν σμίλευση του κερατοειδούς με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια από τα παλαιότερα laser με σχισμοειδείς δέσμες. Επίσης σημαντική ήταν η χρήση των trackers στην εφαρμογή του laser. Η διόρθωση με το laser σε κάθε ασθενή σχεδιάζεται με βάση το διαθλαστικό του σφάλμα καθώς και την τοπογραφία του κερατοειδούς. Στόχος της διόρθωσης εκτός από την απαλοιφή του διαθλαστικού σφάλματος είναι η διόρθωση του σχήματος του κερατοειδούς έτσι ώστε να απαλοφούνται και οι εκτροπές υψηλής τάξης.^{88,116,118,119}

Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούν πληροφορίες από τοπογραφίες Placido ή τοπογραφίες Scheimpflug για να σχεδιάσουν την διόρθωση. Το λέιζερ Στερεάς κατάστασης Pulsar Laser System καθοδηγείται από την

πλατφόρμα ZCad η οποία αντλεί πληροφορίες από την Placido τοπογραφία του συστήματος iTrace για τον σχεδιασμό της διόρθωσης.^{120,121}

Οι τοπογραφικά καθοδηγούμενες διορθώσεις έχουν εφαρμοστεί σε ασθενείς με φυσιολογικό κερατοειδή στους οποίους εκτός από την απλή διαθλαστική διόρθωση έγινε συνδυασμός και με διόρθωση καθοδηγούμενη από την τοπογραφία. Μελέτες δείχνουν βελτίωση στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα, κυρίως κατά τον συνδυασμό με διόρθωση υπερμετρωπίας και υπερμετρωπικού αστιγματισμού.¹²² Η κύρια εφαρμογή της τοπογραφικά καθοδηγούμενης διόρθωσης είναι η ομαλοποίηση κερατοειδών με μη συμμετρικές εναλλαγές καμπυλότητας. Πολύ καλά αποτελέσματα έχουν ανακοινωθεί σε ασθενείς με επιπλοκές από προηγούμενη διαθλαστική διόρθωση όπως έκκεντρη διόρθωση, έκκεντρο flap μετά από Lasik, epithelial ingrowth, ουλοποίηση, ασύμμετρο αστιγματισμό μετά από ακτινωτή κερατοτομή.^{117,123} Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την ομαλοποίηση κερατοειδούς με ανώμαλο αστιγματισμό μετά από κερατοπλαστική.^{117,124} Έχουν γίνει προσπάθειες στο παρελθόν να εφαρμοστεί τεχνική αυτή σε ασθενείς με εκτατική διαταραχή του κερατοειδούς. Τα αποτελέσματα των καθοδηγούμενων από την τοπογραφία φωτοεκτομών για την διόρθωση ανώμαλων κερατοειδικών αστιγματισμών στον κερατόκωνο δείχνουν ενθαρρυντικά.^{125,126}

Η αποτελεσματικότητα των εξατομικευμένων επεμβάσεων εξαρτάται από την ακρίβεια της φωτοεκτομής. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια είναι το μέγεθος του παλμού (διάμετρος δέσμης), η συχνότητα λειτουργίας του συστήματος σε συνδυασμό με την ταχύτητα καθοδήγησης της δέσμης και ελέγχου της θέσης του οφθαλμού (tracker) έτσι ώστε το αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται από μικροκινήσεις του οφθαλμού κατά την διάρκεια της επέμβασης.^{127,128} Στα χαρακτηριστικά αυτά θεωρητικά πλεονεκτεί το laser στερεάς κατάστασης Pulsar Laser System.

6. Κερατόκωνος

Ο κερατόκωνος είναι μια μη φλεγμονώδης εκτατική διαταραχή του κερατοειδούς η οποία εκδηλώνεται κλινικά σε σχετικά προχωρημένα στάδια της νόσου με σημαντική κεντρική λέπτυνση του κερατοειδούς κωνική παραμόρφωση και εξελισσόμενο ανώμαλο στιγματισμό. Η πάθηση εκδηλώνεται συνήθως κατά την εφηβική ηλικία και μπορεί να εξελίσσεται μέχρι την ηλικία των 40 περίπου ετών.¹²⁹ Η αιτιολογία της πάθησης είναι πολυπαραγοντική και δεν είναι σαφής. Μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλίες στο κερατικό επιθήλιο, τα κερατινοκύτταρα του στρώματος ή στην εξωκυττάρια ουσία. Είναι πιθανό ότι ο κερατόκωνος αποτελεί ένα φάσμα νόσων και όχι μια ξεχωριστή νόσο ή ακόμα το τελικό προϊόν διαφορετικών παθογενετικών διαδικασιών. Θετικό οικογενειακό ιστορικό αναφέρεται στο 6-8% των περιπτώσεων, ενώ συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με κερατόκωνο αναφέρεται ότι έχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τοπογραφική εικόνα ανάπτυξης υποκλινικής μορφής της νόσου από ότι ο γενικός πληθυσμός. Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση της νόσου με το σύνδρομο Down και έτσι θεωρείται πιθανή γονιδιακή θέση για τον κερατόκωνο στο χρωμόσωμα 21.¹³⁰⁻¹³⁴

6.1. Επιδημιολογία

Η συχνότητα του κερατοκώνου στο γενικό πληθυσμό είναι σχετικά χαμηλή και κυμαίνεται σε διαφορετικές μελέτες. Ενδεικτικά αναφέρεται συχνότητα 6/1000 από τους Kennedy et al.¹³⁵, 1 έως 2.3/1000 από τους Krachmer et al.¹³⁶ – ενώ οι Jonas et al.¹³⁷ υπολογίζουν συχνότητα 23/1000 στην κεντρική Ινδία. Ο επιπολασμός της νόσου είναι περίπου 1/2000 ανά έτος και ποικίλει σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.^{129,135,136} Η διαφορά που παρατηρείται στον επιπολασμό και την συχνότητα του κερατοκώνου μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών πιθανότατα οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η μεγάλη έκθεση του πληθυσμού σε υπεριώδη ακτινοβολία. Οι διαφορές αυτές οφείλονται και στο γεγονός ότι τα κριτήρια διάγνωσης μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στις μελέτες, καθώς και η χρήση των τοπογραφικών και όχι μόνο των κλινικών κριτηρίων.

Ο κερατόκωνος θεωρείται αμφοτερόπλευρη και ασύμμετρη πάθηση. Οι περιπτώσεις που αναφέρονται ως μονόπλευρες είναι συνήθως περιπτώσεις με

κλινικά σημαντική νόσο στον ένα οφθαλμό και υποκλινική νόσο στον άλλο οφθαλμό η οποία μπορεί να ανιχνευθεί μόνο με τοπογραφία κερατοειδούς.¹³⁸

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει συσχέτιση του κερατόκωνου με διάφορα συστηματικά νοσήματα, όπως το σύνδρομο Down. Άλλα νοσήματα που σχετίζονται με τον κερατόκωνο είναι το σύνδρομο υπνικής άπνοιας και η ατοπία. Σε σχέση με την υπνική άπνοια, ενοχοποιούνται η υποξία που προκαλεί το σύνδρομο στον ύπνο σε συνδυασμό με μηχανικούς παράγοντες, όπως ο ύπνος σε πρηνή θέση. Ατοπία συνυπάρχει περίπου στο 25% των ασθενών με κερατόκωνο χωρίς να έχει ξεκαθαριστεί απόλυτα η φύση αυτής της συσχέτισης, αν και θεωρείται ότι ευθύνεται το έντονο τρίψιμο των οφθαλμών λόγω κνησμού.¹³⁹⁻¹⁴¹ Η εμφάνιση του κερατοκώνου σε ανθρώπους με σύνδρομο Down είναι 10 με 300 φορές μεγαλύτερη από ότι στο γενικό πληθυσμό κυρίως σε καυκάσιους. Η συσχέτιση αυτή υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή του χρωμοσώματος 21 στην παθογένεια της νόσου.^{131,142-145}

Επιπρόσθετα, ο κερατόκωνος συνδέεται με νοσήματα του συνδετικού ιστού, όπως το σύνδρομο Ehlers-Danlos, η πρόπτωση μιτροειδούς βαλβίδας, αν και αυτό αμφισβητείται, η ατελής οστεογένεση και το σύνδρομο Marfan.¹⁴⁶⁻¹⁵¹ Είναι πιθανό η συσχέτιση με τις νόσους αυτές να οφείλεται σε τοπική δυσλειτουργία στο μεταβολισμό του κολλαγόνου. Άλλες συσχετίσεις του κερατοκώνου έχουν περιγραφεί με οφθαλμικές νόσους, όπως οι κερατοειδικές δυστροφίες (ενδοθηλιακή, οπίσθια πολύμορφη, κοκκώδης), η συγγενής αμαύρωση του Leber και η δυστροφία της ωχράς.^{129,152-158}

Μελέτες αναφέρουν ότι ο διαβήτης και το κάπνισμα πιθανόν να αναστέλλουν την εμφάνιση ή να επιβραδύνουν την εξέλιξη του κερατοκώνου.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Αυτό είναι πιθανόν να έχει να κάνει με παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε διασύνδεση των ινιδίων του κολλαγόνου (corneal crosslinking) του στρώματος και αύξηση της ακαμψίας του κερατοειδούς. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η ανώμαλη γλυκοζυλίωση των ινιδίων του κολλαγόνου του κερατοειδικού στρώματος, που συμβαίνει στο διαβήτη και η έκθεση του κερατοειδούς των καπνιστών στα προϊόντα του καπνού.

Η κληρονομικότητα παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του κερατοκώνου, αφού εμφανίζεται πολύ συχνά και σε οικογενή μορφή. Η ανίχνευσή του εντός οικογενειών μπορεί να αυξηθεί αν συμπεριλάβουμε τις υποκλινικές μορφές κερατοκώνου, οι οποίες μπορούν να ανιχνευτούν με τοπογραφία κερατοειδούς χωρίς

να έχουν δώσει κλινικά συμπτώματα ή σημεία. Σχεδόν το 50% των κερατοκωνικών ασθενών έχει υπολογιστεί ότι έχουν έναν συγγενή που πάσχει επίσης.^{131,134,162,163}

Σε μελέτες πληθυσμών με διαφορετική καταγωγή που κατοικούν στην ίδια γεωγραφική περιοχή έχει βρεθεί ότι άτομα ασιατικής καταγωγής έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν κερατόκωνο σε σχέση με τους Καυκάσιους. Μελέτες διδύμων καταδεικνύουν ότι οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό συμφωνίας στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου σε σχέση με τους διζυγωτικούς. Χαρακτηριστικά, αναφέρονται στην βιβλιογραφία 18 ζευγάρια μονοζυγωτικών διδύμων να πάσχουν από κερατόκωνο από τα οποία τα έντεκα εμφάνισαν όμοιο τρόπο προσβολής, ενώ σε δύο ζευγάρια τα ευρήματα δεν ταυτίζονταν, υπογραμμίζοντας την συμμετοχή του περιβαλλοντικού παράγοντα στην εκδήλωση του φαινοτύπου. Συνεπώς θεωρείται ότι υπάρχει μια κληρονομική προδιάθεση για την ανάπτυξη της πάθησης, ενώ περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν εάν και σε τι βαθμό ο κερατόκωνος θα εκδηλωθεί κλινικά σε κάθε περίπτωση.^{164–170}

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα για την ανίχνευση γονιδίων υπεύθυνων για την ανάπτυξη του κερατοκώνου χωρίς όμως να έχει βρεθεί κάποιο σημαντικό υπεύθυνο γονίδιο. Οι μελέτες που πραγματοποιούνται χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τις μελέτες υποψηφίων γονιδίων, τις μελέτες σύνδεσης, και τις μελέτες έκφρασης. Από μελέτες υποψηφίων γονιδίων έχει βρεθεί αυξημένη συχνότητα ορισμένων πολυμορφισμών των γονιδίων που κωδικοποιούν τα κλάσματα της ιντερλευκίνης 1A και 1B (IL-1A και 1B) σε κερατοκωνικούς ασθενείς συγκριτικά με ομάδα ελέγχου.¹⁷¹ Επίσης ορισμένοι πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν τους κάποιους τύπους κολλαγόνου έχουν συσχετισθεί με την παρουσία κερατοκώνου.¹⁷² Ένα ακόμη υποψήφιο γονίδιο, το SOD1, το οποίο κωδικοποιεί τη υπεροξειδική δισμουτάση – 1 έχει βρεθεί με μετάλλαξη σε μια από τις 15 οικογένειες με κερατόκωνο που συμπεριελήφθησαν σε μια μελέτη.¹⁷³

Από τις γονιδιακές αναλύσεις σύνδεσης έχουν εντοπιστεί διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές, όπου μπορεί να βρίσκονται τα υπεύθυνα για τον κερατόκωνο γονίδια, με μεγάλη όμως ετερογένεια.^{174–176} Μελέτες έκφρασης γονιδίων έχουν δείξει διαφοροποίηση στην έκφραση γονιδίων που αφορούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, της εξωκυττάριας ουσίας, την διακυτταρική επικοινωνία, την απόπτωση, την επούλωση καθώς και την πυκνότητα των νευρικών ινών.^{177,178}

6.2. Παθογένεια – Παθοφυσιολογία

Παρά τις πολλαπλές κλινικές και εργαστηριακές μελέτες πάνω στην αιτιολογία και την παθογένεση του κερατοκώνου οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί που ευθύνονται για την ανάπτυξη της πάθησης αυτής καθώς και ο ρόλος που παίζουν οι κληρονομικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί φαίνεται να συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου χωρίς να είναι ξεκάθαρη η σημασία του καθενός. Έτσι θεωρείται ότι η φλεγμονή και η απόπτωση κερατοκυττάρων, η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, η ανώμαλη ενζυματική λειτουργία και η απώλεια κολλαγόνου, η διαφοροποίηση της παραγωγής κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών, η αλλοιωμένη βιομηχανική σταθερότητα του κερατοειδούς παίζουν ρόλο στην εκδήλωση και την εξέλιξη της νόσου. Υπάρχουν διαρκώς αυξανόμενες ενδείξεις ότι η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες μορφές κερατοκώνου.^{132,179,180}

Αρκετές φλεγμονώδεις παθήσεις της οφθαλμικής επιφάνειας έχουν αναφερθεί να σχετίζονται με εμφάνιση κερατοκώνου. Στην περίπτωση της ροδόχρους ακμής αναφορές περιστατικών δείχνουν μια συσχέτιση της με την εξέλιξη λέπτυνσης και εκτασίας του κερατοειδούς. Είναι πιθανό η συνεχής παρουσία φλεγμονής στην οφθαλμική επιφάνεια και τη δακρυϊκή στιβάδα να συνδράμουν στην αποδόμηση του κερατοειδούς, την λέπτυνση και την εξέλιξη της εκτασίας.^{181,182} Μια άλλη αποδεδειγμένη συσχέτιση χρονιάς φλεγμονώδους πάθησής της οφθαλμικής επιφάνειάς με τον κερατόκωνο είναι το σύνδρομο χαλαρού βλεφάρου. Έίχε ήδη παρατηρηθεί σε αρκετές αναφορές περιστατικών όταν μία μελέτη από τους Donnemfelt και συν. απέδειξε την σύνδεση. Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι και οι δύο παθήσεις εκδηλώνονται στην πλευρά του ύπνου.¹⁸³ Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και μία μελέτη 60 ασθενών με σύνδρομο χαλαρού βλεφάρου 11 από τους οποίους έπασχαν από κερατόκωνο πάντα στην πλευρά του ύπνου.¹⁸⁴

Σύμφωνα με μελέτες υπάρχει σύνδεση ανάμεσα στην αλλεργία και την ατοπική νόσο με τον κερατόκωνο. Σε μελέτες των επιπέδων της IgE ορού η οποία είναι γνωστό ότι βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με ατοπία, έχει βρεθεί αυξημένη στο 59% ομάδας ασθενών με κερατόκωνο.^{185,186} Σε δείγμα 82 ασθενών με εαρινή κερατοεπιπεφυκίτιδα, το 27% εμφάνισε πρώιμα σημεία κερατοκώνου στις

απεικονιστικές εξετάσεις.¹⁸⁷ Αρκετές μελέτες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα παραγόντων φλεγμονής και ενζύμων καταβολισμού της μεσοκυττάριας ουσίας στην επιφάνεια ασθενών με κερατόκωνο.^{188,189} Πιθανός μηχανισμός που συνδέει τον κερατόκωνο με την ατοπία είναι το συχνό και έντονο τρίψιμο των ματιών που συνηθίζουν οι ατοπικοί ασθενείς λόγω του κνησμού.

Το τρίψιμο των ματιών σε χρόνια βάση συνδέεται ισχυρά με το κερατόκωνο. Σε μελέτη 120 περιστατικών αξιολογήθηκαν διάφοροι παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβανομένης της ατοπίας, του οικογενειακού ιστορικού, της χρήσης φακών επαφής και του τριψίματος των ματιών. Από την πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο το τρίψιμο των ματιών φάνηκε να είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για κερατόκωνο.¹³⁹ Άλλες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι 50% των ασθενών ανέφεραν έντονο υπερβολικό τρίψιμο τουλάχιστον στον ένα οφθαλμό.^{190,191}

Αρκετοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την σύνδεση μεταξύ τριψίματος των οφθαλμών και του κερατοκώνου. Ο πιο πιθανός παθογενετικός μηχανισμός περιλαμβάνει τη μείωση της βιομηχανικής σταθερότητας του κερατοειδούς η οποία επιτρέπει την υπερβολική του κύρτωση και τη δημιουργία του κώνου.^{192,193} Επίσης το επιθηλιακό τραύμα που συνδέεται με το τρίψιμο των οφθαλμών προκαλεί την απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων και κυτταροκινών ως απάντηση στο τραύμα.¹⁹⁴ Όλα αυτά επηρεάζουν τα κερατινοκύτταρα, τα οποία μπορεί να υποστούν μέχρι και απόπτωση με αποτέλεσμα τη μειωμένη αναπαραγωγή κολλαγόνου και την αποδυνάμωση του στρώματος του κερατοειδούς. Η ανισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων μπορεί να συμμετέχει στο βιολογικό μηχανισμό ανάπτυξης πρωτοκόλλου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κεντρική λέπτυνση του κερατοειδούς κι εξέλιξη της πάθησης.¹⁹⁵

Οι μεταβολές στο μεταβολισμό του κερατοειδούς μπορεί να ενισχύονται από την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης που σχετίζεται με το τρίψιμο, η οποία επίσης μπορεί να αποδυναμώνει το στρώμα κερατοειδούς. Μεγάλες διακυμάνσεις και απότομες αυξήσεις της ενδοφθάλμιας πίεσης εξαιτίας του τριψίματος μπορεί να εκθέτουν ακόμα περισσότερο την λεπτότερη περιοχή του κερατοειδούς στην κύρτωση. Έχει δειχθεί ότι το έντονο τρίψιμο των ματιών μπορεί να ανεβάσει την ενδοφθάλμια πίεση μέχρι και 10 φορές.^{196,197}

Το τρίψιμο των οφθαλμών είναι μία αθώα δραστηριότητα που γίνεται σποραδικά σε φυσιολογικές συνθήκες πολλές φορές κατά την αφύπνιση πριν τον

ύπνο και κατά τη διάρκεια της ημέρας ως αντίδραση σε κούραση είσαι κάποιο ερεθισμό ή κνησμό. Παρόλα αυτά η συνήθεια αυτή μπορεί να γίνει υπερβολική ή παθολογική όταν συμβαίνει υπερβολικά συχνά ή όταν γίνεται με ιδιαίτερα βίαιο τρόπο όπως επίσης όταν τα επεισόδια τριψίματος είναι πολύ εκτεταμένα σε χρόνο και συμβαίνουν για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ο κερατόκωνος εμφανίζεται σε ένα μεγάλο αριθμό κλινικών συνδρομών πολλά από τα οποία συνδέονται στενά με παθολογικό τρίψιμο των ματιών όπως για παράδειγμα το σύνδρομο Down όπως και η συγγενής αμαύρωσή κατά Leber.^{142,152}

6.3. Βιομηχανική του κερατοειδούς στον κερατόκωνο

Οι βιομηχανικές ιδιότητες του κερατοειδούς στον κερατόκωνο έχουν μελετηθεί εργαστηριακά ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να μελετηθούν και in vivo με τη βοήθεια ειδικού εξοπλισμού. Οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι κερατοειδείς ασθενών με κερατόκωνο είναι σημαντικά πιο αδύναμοι από τους φυσιολογικούς κερατοειδείς. Αυτό μελετήθηκε με μελέτες εκτάνισης ιστοτεμάχιων κερατοειδούς. Σε αυτά τα πειράματα ασκείται δύναμη σε ένα ιστοτεμάχιο κερατοειδούς με σκοπό την διαμήκη εκτάνιση του και υπολογίζεται ο βαθμός εκτάνισης ανάλογα με τη δύναμη. Οι παθολογικοί κερατοειδείς μπορούσαν να υποστούν μεγαλύτερη εκτάνιση από τους φυσιολογικούς. Λόγω αυτού, ένας κερατοκωνικός κερατοειδής σε σχέση με έναν φυσιολογικό θα παραμορφωθεί πολύ πιο εύκολα και θα υποστεί εκτασία υπό την ίδια ενδοφθάλμια πίεση.^{198,199}

6.4. Κερατόκωνος και ξηροφθαλμία

Μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με κερατόκωνο η αισθητική νεύρωση του κερατοειδούς είναι διαταραγμένη με αποτέλεσμα μειωμένη αισθητικότητα και προβληματική λειτουργία της δακρυϊκής στιβάδας.²⁰⁰⁻²⁰³ Η αισθητικότητα στους ασθενείς αυτούς φαίνεται να μειώνεται αναλογικά με το στάδιο της νόσου.²⁰⁴ Επιπρόσθετα, έχει φανεί σε προηγούμενη μελέτη ότι οι οφθαλμοί με κερατόκωνο έχουν χαμηλότερη πυκνότητα καλυκοειδών κυττάρων, με αποτέλεσμα το χαμηλότερο χρόνο διάσπασης δακρυϊκής στιβάδας σε σύγκριση με το φυσιολογικό. Μία επιπλέον παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία της δακρυϊκής

στιβάδας στους ασθενείς με κερατόκωνο είναι η κατάσταση του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες με συνεστιακή μικροσκοπία η διαμόρφωση του είναι αρκετά επηρεασμένη στους ασθενείς αυτούς, οι οποίοι έχουν υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα με μη φυσιολογική στροβιλώδη πορεία και ανώμαλες διακλαδώσεις. Η ανωμαλία στη μορφή των νευρικών ινών φαίνεται να σχετίζεται με το στάδιο της νόσου.^{201–203}

6.5. Διάγνωση του κερατοκώνου

6.5.1. Κλινική διάγνωση

Ο κερατόκωνος χαρακτηρίζεται από κεντρική ή παρακεντρική λέπτυνση του στρώματος, ανώμαλο αστιγματισμό και κωνική προσεκβολή του κερατοειδούς, που εντοπίζεται συνήθως κροταφικά και κάτω. Η πάθηση είναι συνήθως αμφοτερόπλευρη και ασύμμετρη και καθώς εξελίσσεται η νόσος προκαλεί πτώση της οπτικής οξύτητας και σημαντική επιδείνωση της ποιότητας της όρασης.

Η έναρξη της νόσου τοποθετείται συνήθως στην εφηβική ηλικία, με συμπτώματα που διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή ανάλογα και με τη βαρύτητα της πάθησης. Στο πρώτο στάδιο, γνωστό ως υποκλινικός κερατόκωνος, ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός και η διάγνωση δεν μπορεί να γίνει κλινικά, παρά μόνο με τοπογραφία του κερατοειδούς, συνήθως τυχαία. Η ύπαρξη διαρκώς αυξανόμενου και μάλιστα ανώμαλου αστιγματισμού και γενικότερα οι συχνές αλλαγές στη διάθλαση είναι τα πρώτα σημάδια που θα κινήσουν την υποψία για την παρουσία της νόσου. Είναι πιθανό η χρήση γυαλιών και μαλακών φακών επαφής να μην προσφέρει απόλυτα ικανοποιητική όραση στον ασθενή, ενώ μπορεί να συνυπάρχουν φωτοφοβία, οφθαλμικός ερεθισμός και δυσοπτικά φαινόμενα όπως άλως ή ακτίνες γύρω από φωτεινές πηγές και σκιές (ακόμα και μονόφθαλμη διπλωπία) τα οποία οφείλονται στην παραμόρφωση του κερατοειδούς. Η πάθηση συνήθως εξελίσσεται και φτάνει σε σταθεροποίηση γύρω στην τέταρτη δεκαετία της ζωής.¹²⁹

Εξ ορισμού η κλινική διάγνωση του κερατοκώνου βασίζεται σε ορισμένα χαρακτηριστικά σημεία, τα οποία αποκαλύπτονται με την επισκόπηση και την εξέταση στη σχισμοειδή λυχνία. Τα σημεία αυτά είναι επακόλουθα της

παραμόρφωσης και της ουλοποίησης του κερατοειδούς καθώς η νόσος εξελίσσεται. Η παρακεντρική λέπτυνση του κερατοειδούς η οποία μπορεί να γίνει αντιληπτή στην εξέταση με τη σχισμοειδή λυχνία είναι ένα από τα κυριότερα κλινικά σημεία του κερατοκώνου και εντοπίζεται συνήθως κεντρικά ή παρακεντρικά κροταφικά και κάτω. Ταυτόχρονα, με σχισμοειδή δέσμη φωτός είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ακόμη και η κωνική προεκβολή του κερατοειδούς.

Οι γραμμές του Vogt (Vogt's striae) είναι λεπτές, κατακόρυφες πτυχές που εμφανίζονται στο οπίσθιο στρώμα, οι οποίες προέρχονται από τη συμπίεση της δεσκεμετείου. Οι γραμμές αυτές χαρακτηριστικά εξαφανίζονται αν η ενδοφθάλμια πίεση αυξηθεί από την άσκησης εξωτερικής πίεσης στον οφθαλμό ή με τη χρήση ενός ημίσκληρου φακού επαφής. Η αυξημένη ορατότητα των κερατοειδικών νεύρων είναι ένα ακόμα σημείο, πιθανόν οφειλόμενο στην λέπτυνση του κερατοειδούς.

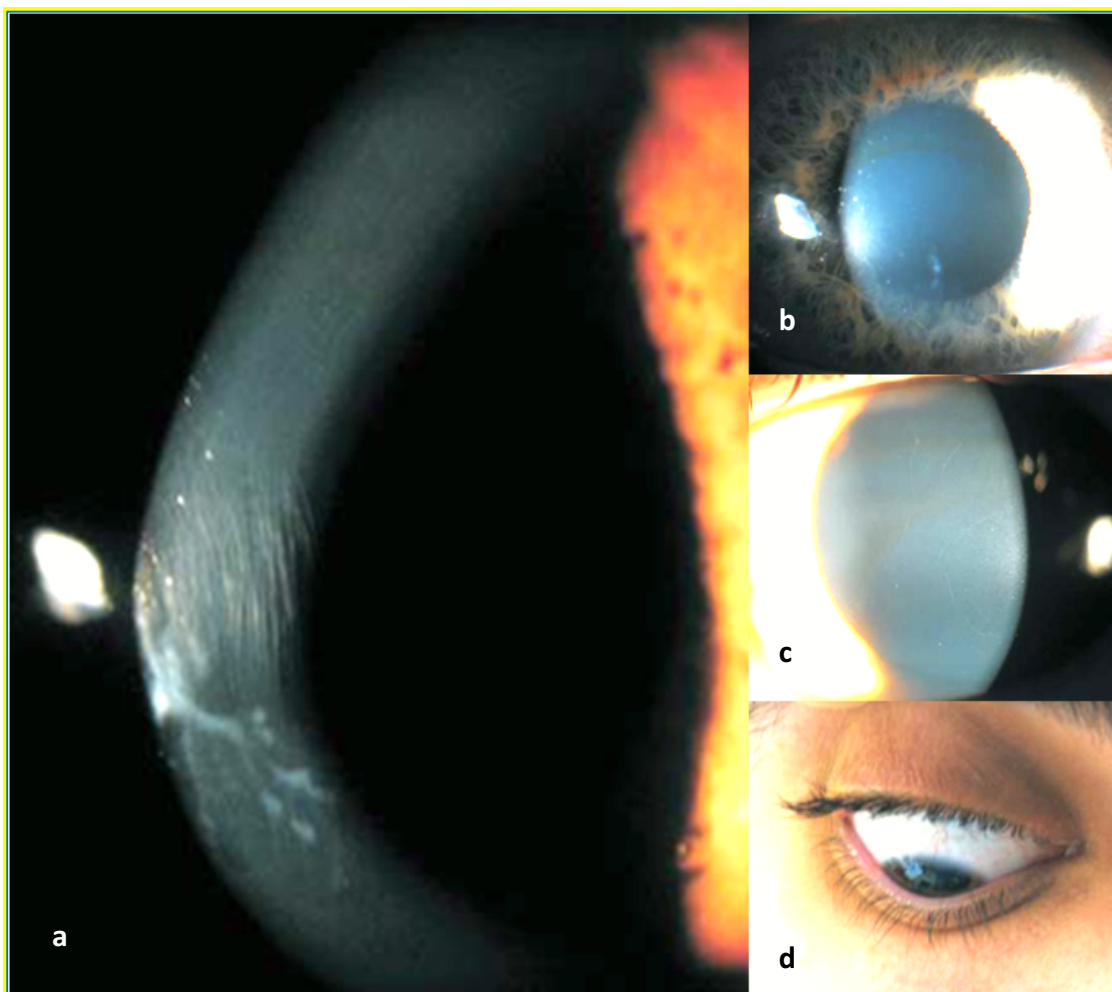
Σε περιπτώσεις μετρίου ή πιο προχωρημένου κερατοκώνου, ένα σύνηθες εύρημα της βιομικροσκόπησης είναι ένας πλήρης ή μερικός επιθηλιακός δακτύλιος αιμοσιδηρίνης, γνωστός ως δακτύλιος του Fleischer, που μπορεί να περιβάλλει τον κώνο. Ο δακτύλιος του Fleischer είναι καλύτερα ορατός με μπλε φωτισμό, βαθιά στο επιθήλιο. Θεωρείται ότι σχηματίζεται από εναποθέσεις σιδήρου από τη δακρυϊκή στιβάδα στην επιφάνεια του κερατοειδούς ως αποτέλεσμα της αλλαγής στην καμπυλότητα του κερατοειδούς. Μάλιστα τείνει να γίνεται πιο στενός και πιο έντονος όσο η εκτασία προχωρά.

Ακόμη, σε περισσότερο προχωρημένη νόσο μπορεί να αναπτυχθεί επιθηλιακή ή υποεπιθηλιακή ουλή λόγω της χρόνιας χρήσης ημίσκληρων φακών επαφής ή σαν αποτέλεσμα κερατοειδικού ύδρωπα. Ο ύδρωπας είναι μια κατάσταση, που εμφανίζεται ξαφνικά και οφείλεται σε ρήξη της δεσκεμετείου μεμβράνης στην περιοχή του κώνου, κατά την οποία συμβαίνει εισροή υδατοειδούς υγρού στον κερατοειδή με αποτέλεσμα οξύ οίδημα του στρώματος. Έντονος πόνος και μείωση της όρασης συνοδεύει την εμφάνιση του ύδρωπα. Οι ρήξεις της δεσκεμετείου συνήθως επουλώνονται εντός 6-10 εβδομάδων και το οίδημα υποχωρεί αφήνοντας ποικίλου βαθμού ουλή, που μπορεί να προκαλέσει μόνιμη μείωση της βέλτιστα διορθωμένης οπτικής οξύτητας του ασθενούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ουλοποίηση προκαλεί επιπέδωση του κερατοειδούς και κατά συνέπεια βελτίωση της μη διορθωμένης οπτικής οξύτητας του ασθενούς.

Ένα ακόμη σημαντικό σημείο του κερατοκώνου είναι η αμφιβληστροειδική αντανάκλαση (red reflex) δίκην «σταγόνας λαδιού», γνωστή ως σημείο του Charleux,

κατά τη άμεση οφθαλμοσκόπηση σε διεσταλμένη κόρη. Με την σκιασκοπία, είναι εμφανής η ανώμαλη αμφιβληστροειδική αντανάκλαση σε «σχήμα ψαλιδιού».

Κατά την επισκόπηση μπορούν να παρατηρηθούν το σημείο του Munson και το σημείο του Rizzuti. Το σημείο του Munson είναι διαμόρφωση του χείλους κάτω βλεφάρου σε γωνία στην κατώτερη βλεμματική θέση, η οποία οφείλεται στο κωνικό σχήμα του κερατοειδούς. Το σημείο του Rizzuti είναι η φωτεινή αντανάκλαση της ρινικής πλευράς του σκληροκερατοειδικού ορίου όταν φως κατευθύνεται στην κροταφική του πλευρά, και εντοπίζεται σε προχωρημένα στάδια κερατοκώνου.¹²⁹



Εικόνα 17: Κλινικά σημεία κερατοκώνου: a. κωνική προεκβολή και λέπτυνση, b: δακτύλιος του Fleisher, c: προβάλλοντα κερατοειδικά νεύρα και d: σημείο του Munson (αρχείο ΒΕΜΜΟ)

6.4.2. Διαφορική διάγνωση

Στη διαφορική διάγνωση του κερατοκώνου συμπεριλαμβάνονται άλλες διαταραχές του κερατοειδή που εμφανίζουν λέπτυνση και παραμόρφωση, όπως η διαφανής εκφύλιση του ορίου του κερατοειδούς (pellucid marginal degeneration) και η κερατόσφαιρα (keratoglobus) και η εκφύλιση του Terrien. Η διαφανής εκφύλιση του ορίου του κερατοειδούς εμφανίζεται με ανώμαλο αστιγματισμό ανάμεσα στην 2^η και την 5^η δεκαετία της ζωής. Χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρη, προοδευτική περιφερική ταινιοειδή λέπτυνση του κερατοειδούς, η οποία εκτείνεται συνήθως από την 4^η έως την 8^η ώρα και μπορεί να έχει πλάτος μέχρι και 2 χιλιοστά. Συνήθως έχει απόσταση 1-2mm από το σκληροκερατοειδικό όριο. Η κερατόσφαιρα είναι συγγενής πάθηση που προκαλεί προεξοχή και λέπτυνση ολόκληρου του κερατοειδούς περισσότερο περιφερικά. Η εκφύλιση του Terrien εμφανίζει περιφερική λέπτυνση και αστιγματισμό, παρόμοια με την Pellucid, μόνο που η λέπτυνση μπορεί να εμφανιστεί και στις ανώτερες ώρες.^{129,136,205}

6.5.3. Διάγνωση με τοπογραφία κερατοειδούς

Από τους χάρτες της καμπυλότητας του κερατοειδούς σε κάθε σημείο του μπορεί να γίνει διάγνωση του κερατοκώνου. Υπάρχουν συγκεκριμένα πρότυπα καμπυλότητες όπως αυτή φαίνεται στην τοπογραφία τα οποία είναι χαρακτηριστικά της ύπαρξης κερατοκώνου. Με τα συστήματα αυτά διευκολύνεται ακόμα περισσότερο η διάγνωση του κερατοκώνου ακόμη και σε πολύ πρώιμο στάδιο.^{108,115,206}

Από τα αριθμητικά δεδομένα της τοπογραφίας και της τομογραφίας κερατοειδούς έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αριθμητικοί δείκτες οι τιμές των οποίων βοηθούν επίσης στη διάγνωση εκτατικών παθήσεων όπως επίσης μας βοηθούν να εκτιμήσουμε την επίδραση του σχήματος του κερατοειδούς στην οπτική οξύτητα το εξεταζόμενου.

Η έως τώρα εμπειρία έχει επιδείξει ποια είναι τα χαρακτηριστικό pattern στην τοπογραφία κερατοειδούς που σχετίζονται με κερατόκωνο. Έτσι λοιπόν αυτά είναι κυρίως η κατώτερη κύρτωση, ο αστιγματισμός με στρεβλό άξονα, ο αστιγματισμός με ασυμμετρία στην καμπυλότητα πάνω και κάτω από την οριζόντια μέση γραμμή. Οποτεδήποτε εμφανίζεται κάποιο από τα pattern αυτά στην τοπογραφία μπαίνει η

υποψία διάγνωσης του κερατοκώνου ακόμα και σε υποκλινικό στάδιο. Επιπρόσθετα, η τομογραφία του κερατοειδούς μέσω της ανάλυσης της παχυμετρίας και της οπίσθιας επιφάνειας μας δίνει επιπλέον δείκτες που βοηθούν την πρώιμη διάγνωση. Στην περίπτωση αυτή η παρακολούθηση του ασθενούς είναι επιβεβλημένη, καθώς η εξέλιξη του κερατοκώνου μπορεί πολύ εύκολα να φανεί μέσα από την αύξηση της καμπυλότητας στον χάρτη της τοπογραφίας ή και τη μείωση του πάχους στον χάρτη της τομογραφίας.^{115,138,207-210}

6.6. Αντιμετώπιση του κερατοκώνου

Η αντιμετώπιση του κερατοκώνου μέχρι πριν από λίγα χρόνια περιοριζόταν στην προσπάθεια διόρθωσης της όρασης με γυαλιά ή φακούς επαφής, και σε πολύ προχωρημένα στάδια στην κερατοπλαστική. Η διαθλαστική χειρουργική με Excimer laser αντενδείκνυται σε αυτούς τους ασθενείς γιατί οδηγεί σε περεταίρω λέπτυνση και αποσταθεροποίηση του κερατοειδούς με αποτέλεσμα τα αρχικά καλά οπτικά αποτελέσματα να υποστρέφουν και να επιταχύνεται η εξέλιξη της νόσου. Η διόρθωση της όρασης με γυαλιά είναι δυνατή σε αρχικά κυρίως στάδια, όταν η πάθηση προκαλεί κυρίως μυωπία και αστιγματισμό. Σε πιο προχωρημένο στάδιο, οπότε ο ανώμαλος αστιγματισμός γίνεται η κύρια αιτία μείωσης της όρασης, η διόρθωση είναι δυνατή μόνο με σκληρούς φακούς επαφής. Οι φακοί αυτοί, έχοντας την κατάλληλη καμπυλότητα, έχουν την δυνατότητα να επιπλέουν πάνω στην δακρυϊκή στιβάδα χωρίς να ακολουθούν την καμπυλότητα του κερατοειδούς και να προσφέρουν μία νέα ομαλή πρόσθια επιφάνεια στο οπτικό σύστημα του οφθαλμού. Έτσι διορθώνουν ταυτόχρονα τον ανώμαλο αστιγματισμό και την αμετρωπία του ασθενούς. Οι φακοί συχνά δεν είναι καλά ανεκτοί από τους ασθενείς και η μακροχρόνια χρήση τους έχει πιθανές επιπλοκές.²¹¹ Καμία από τις θεραπείες αυτές δεν επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου, η οποία δεν έχει γνωστή αιτιολογία και δεν είναι προβλέψιμη. Όταν η νόσος εξελιχθεί σε πολύ προχωρημένα στάδια προκαλείται ο ύδρωπας, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε οφείλεται σε ρήξεις στην δεσκεμέτριο μεμβράνη και στην είσοδο υδατοειδούς υγρού με αποτέλεσμα οξύ οίδημα στρώματος που συνοδεύεται από πόνο και σημαντική θόλωση της όρασης. Η κατάσταση αυτή υποχωρεί αυτόματα καταλείποντας ουλοποίηση στον κεντρικό κερατοειδή. Στα στάδια αυτά της νόσου η μόνη ενδεικνυόμενη θεραπεία είναι η

διαμπερής κερατοπλαστική οποία συνίσταται στην αντικατάσταση του κεντρικού κερατοειδούς σε μία διάμετρο περίπου 8mm με κερατοειδή πτωματικού δότη. Η θεραπεία αυτή εμφανίζει αρκετές επιπλοκές διεγχειρητικά και μετεγχειρητικά και ο μεταμοσχευθείς κερατοειδής μετεγχειρητικά υποφέρει συχνά από υψηλό αστιγματισμό.^{212,213}

6.6.1. Ενδοκερατοειδικοί δακτύλιοι

Οι ενδοκερατοειδικοί δακτύλιοι αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση χαμηλού βαθμού μυωπίας. Πρόκειται για κυκλικούς δακτυλίους από πολυμεθύλμεθακρυλικό (PMMA) οι οποίοι τοποθετούνται περιφερικά στο μέσο στρώμα του κερατοειδή μέσω της δημιουργίας ενός πεταλοειδούς καναλιού. Η τοποθέτηση τους στην περιφέρεια προκαλεί μείωση της καμπυλότητας του κερατοειδούς. Τροποποιώντας το πάχος, το μήκος και την ακτίνα του δακτυλίου που θα τοποθετήσουμε, μπορούμε να ρυθμίσουμε την επίδραση στην καμπυλότητα του κερατοειδή.

Κύρια ένδειξη ένθεσής τους αποτελεί η αντιμετώπιση του κερατοκώνου και της εκτασίας μετά από διαθλαστική χειρουργική. Η ένθεση ενδοκερατοειδικών δακτυλίων (ιδιαίτερα σε ασθενείς που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της νόσου με διαφανή διαθλαστικά μέσα) μπορεί να βελτιώσει την όρασή τους μέσω της επιπέδωσης στην κερατοειδούς και της ομαλοποίησης του αστιγματισμού. Η θεραπεία με δακτυλίους δεν έχει προβλέψιμο διαθλαστικό αποτέλεσμα, ενώ δεν στοχεύει στην σταθεροποίηση της πάθησης παρά μόνο στην βελτίωση της οπτικής οξύτητας του ασθενούς.^{214–216}

6.6.2. Διασύνδεση κερατοειδούς με ριβοφλαβίνη και υπεριώδη ακτινοβολία (CXL):

Τα τελευταία χρόνια μια νέα θεραπεία έχει αρχίσει να εφαρμόζεται με σκοπό την σταθεροποίηση της εξέλιξης του κερατοκώνου έτσι ώστε να αποφευχθεί η κατάληξη σε στάδιο που απαιτεί αντιμετώπιση με κερατοπλαστική. Η θεραπεία αυτή στηρίζεται στην αύξηση των πλαγίων συνδέσεων μεταξύ των κολλαγόνων ινών και των πρωτεογλυκανών έτσι ώστε να αυξηθεί η μηχανική σταθερότητα του κερατοειδούς.²¹⁷ Οι πρώτες πειραματικές εφαρμογές και αργότερα κλινικές της νέας

αυτής επέμβασης έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του '90 από την ομάδα του καθηγητή Seiler.^{218,219}

Η θεραπεία διασύνδεσης κερατοειδικού κολλαγόνου πραγματοποιείται με διάχυση φωτοευαίσθητης ριβοφλαβίνης στο στρώμα του κερατοειδούς μετά από αποεπιθηλιοποίηση, και κατόπιν ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί ενεργοποίηση των μορίων της ριβοφλαβίνης και παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου οι οποίες αντιδρώντας με τα μόρια του κολλαγόνου οδηγούν στην αύξηση των ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα στα μόρια κολλαγόνου και στις πρωτεογλυκάνες του κερατοειδούς.^{220,221} Η ριβοφλαβίνη είναι μια φωτοευαίσθητη ουσία με μεγάλο φάσμα απορρόφησης το οποίο παρουσιάζει μέγιστο στην περιοχή του υπεριώδους.²²² Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ακτινοβολία 370nm στην επέμβαση. Η ριβοφλαβίνη δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, είναι ασφαλής για συστηματική απορρόφηση και υδατοδιαλυτή. Το μεγάλο της μοριακό βάρος δεν της επιτρέπει να διαπεράσει τις στεγανές συνδέσεις του επιθηλίου κι έτσι για να γίνει ο εμποτισμός του στρώματος απαιτείται αποεπιθηλιοποίηση.²²³

Το βασικό κλινικό πρωτόκολλο (πρωτόκολλο της Δρέσδης) έτσι όπως διαμορφώθηκε από τις πρώτες πειραματικές μελέτες και εφαρμόστηκε έκτοτε περιλαμβάνει ακτινοβολία 3 mW/cm^2 για 30 λεπτά, η οποία αντιστοιχεί στη συνολική δόση ενέργειας 5.4 J/cm^2 . Οι πρώτες μελέτες σε χοίρειους κερατοειδείς έδειξαν αύξηση μέχρι και 70% στην σκληρότητα του κερατοειδούς,²²⁴ ενώ με βάση αυτές τις πρώτες μελέτες διαμορφώθηκε το κλινικό πρωτόκολλο έτσι ώστε να είναι απόλυτα ασφαλές για το ενδοθήλιο.

Σε σχέση με την ασφάλεια της επέμβασης μας ενδιαφέρει η προστασία των υπολοίπων οφθαλμικών ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία και κυρίως του ενδοθηλίου αλλά και των βλαστικών κυττάρων του επιθηλίου. Για το λόγο αυτό απαιτείται ελάχιστο πάχος κερατοειδούς τουλάχιστον 400μm κατά την έναρξη της επέμβασης έτσι ώστε η επίδραση της να μην φτάνει στον ενδοθήλιο.²²⁵

Σύμφωνα με τα έως τώρα δημοσιευμένα κλινικά αποτελέσματα της επέμβασης οδηγεί σε σταθεροποίηση της νόσου και μικρή επιπέδωση του κερατοειδούς με αποτέλεσμα μικρή βελτίωση των οπτικών του ιδιοτήτων.^{226,227}

Προηγούμενες μελέτες οφθαλμών που υπεβλήθησαν σε διασύνδεση επέδειξαν ότι υπάρχει σταθερότητα στην οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση μετά την επέμβαση η ακόμα και μικρή βελτίωση. Μια προηγούμενη αναδρομική μελέτη

επέδειξε βελτίωση της τάξης του 0.15 LogMAR στην βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα σε τρία χρόνια,²²⁶ ενώ μια άλλη μελέτη έδειξε βελτίωση 0.09 LogMAR στην βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα σε τρία χρόνια και 0.15 LogMAR στην μη διορθωμένη οπτική οξύτητα.²²⁸

Ταυτόχρονα υπάρχουν και μελέτες με συνεστιακή μικροσκοπία που υποδεικνύουν ότι μετά από επέμβαση διασύνδεσης κερατοειδικού κολλαγόνου το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα εξαφανίζεται και επανέρχεται σταδιακά μήνες μετά την επέμβαση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών αυτών όλες οι δομές του κερατοειδούς επηρεάζονται με την επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου. Αναφέρεται ήδη στην βιβλιογραφία η εξαφάνιση των κερατοκυττάρων από το πρόσθιο στρώμα.^{229,230}

Επιπρόσθετα, η επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου υπάρχει περίπτωση να επηρεάζει την ενυδάτωση του κερατοειδούς μιας και αλλάζει την δομή του κερατοειδούς και τις συνδέσεις μεταξύ των μορίων του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών, οι οποίες κυρίως ευθύνονται για την ωσμωτική πίεση του κερατοειδούς. Η επίδραση της επέμβασης διασύνδεσης κερατοειδικού κολλαγόνου στην ενυδάτωση του κερατοειδούς δεν έχει ως τώρα μελετηθεί, παρά μόνο σε οιδηματώδης κερατοειδείς.^{231,232}

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της θεραπείας σχετικά με την σταθεροποίηση επιτρέπουν την αναθεώρηση της δυνατότητας διαθλαστικής χειρουργικής για την διόρθωση της αμετροπίας και του ανώμαλου αστιγματισμού στους ασθενείς με κερατόκωνο έτσι ώστε να καταστούν όσο το δυνατόν ανεξάρτητοι από την χρήση σκληρών φακών επαφής.²³³

6.6.3. Χρήση λέιζερ διαθλαστικής χειρουργικής

Στο παρελθόν σε περιπτώσεις σταθερού ή υποκλινικού κερατόκωνου έχουν αναφερθεί αρκετές απόπειρες αντιμετώπισης με διαθλαστική χειρουργική με Excimer laser. Οι περισσότερες αναφορές στην βιβλιογραφία αφορούν συμβατικές σφαιροκυλινδρικές διορθώσεις σε υποκλινικό κερατόκωνο, ενώ έχουν αναφερθεί και απόπειρες διόρθωσης με την χρήση εξατομικευμένων φωτοεκτομών καθοδηγούμενων από την τοπογραφία. Στην περίπτωση αυτή, μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του ανώμαλου κερατοειδικού αστιγματισμού

βασίζεται στη δημιουργία κατανομής φωτοεκτομής μέσω πληροφοριών από σύστημα τοπογραφίας του κερατοειδή (Topography guided ablation) σε συνδυασμό με την υποκειμενική διάθλαση του ασθενούς. Σε όλες της εργασίες οι συγγραφείς δηλώνουν βελτίωση των παραμέτρων όρασης των ασθενών.^{125,126,234} Παρόλα αυτά η διαθλαστική χειρουργική με λέιζερ δεν είχε καθιερωθεί σαν μέθοδος αντιμετώπισης το κερατοκώνου, γιατί η εφαρμογή της μειώνει το πάχος του κερατοειδούς με αποτέλεσμα πιθανή περαιτέρω επιδείνωση της εκτασίας.

7. Σκοπός της Παρούσας Ερευνητικής Εργασίας

Η επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου είναι μια νέα επέμβαση κάποιες παράμετροι της οποίας δεν έχουν ως τώρα μελετηθεί όπως η ενυδάτωση του κερατοειδούς μετά από αυτήν, η οποία είναι πιθανόν να επηρεάζεται όπως αναφέρθηκε προηγουμένως λόγω της επίδρασης στις πρωτεογλυκάνες. Παρ' όλα αυτά, τα έως τώρα κλινικά αποτελέσματα σε σχέση με την σταθερότητα είναι πολύ καλά και θεωρούμε ότι μας δίνουν τη δυνατότητα να την συνδυάσουμε με διαθλαστική χειρουργική με laser για την βελτίωση της οπτικής απόδοσης των ασθενών με κερατόκωνο. Ταυτόχρονα, σύμφωνα με τα προηγούμενα είναι φανερό πως η επέμβαση διασύνδεσης κερατοειδούς όπως και οι διαθλαστικές επεμβάσεις με laser επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την νεύρωση του κερατοειδούς. Σε ασθενείς με προεγχειρητικά συμπτώματα ξηροφθαλμίας όπως συχνά συμβαίνει σε ασθενείς με κερατόκωνο, το πρόβλημα μπορεί να γίνει εντονότερο και να επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η πειραματική και κλινική *in vivo* αξιολόγηση της φυσιολογίας και της μικροσκοπικής εικόνας του κερατοειδούς, καθώς και των κλινικών αποτελεσμάτων μετά από επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου κερατοειδούς με ριβοφλαβίνη και υπεριώδη ακτινοβολία καθώς και του συνδυασμού της με επιφανειακή φωτοεκτομή με το laser στερεάς κατάστασης.

Στο πειραματικό κομμάτι, η παρούσα διατριβή είχε στόχο σε πρωτότυπη πειραματική διάταξη την αξιολόγηση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς μετά από

επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου και την αξιολόγηση της συμπίεστικότητας του κερατοειδούς.

Στο κλινικό κομμάτι της μελέτης η επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου αξιολογήθηκε στην εφαρμογή της σύμφωνα με το κλασσικό πρωτόκολλο και σε σύγκριση με τον συνδυασμό της με φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή καθοδηγούμενη από την τοπογραφία (toro-guided PRK) για την βελτίωση της όρασης των ασθενών με κερατόκωνο. Για το toro-guided PRK χρησιμοποιήθηκε το laser στερεάς κατάστασης. Παράμετροι που αξιολογήθηκαν είναι η όραση των ασθενών, η καμπυλότητα του κερατοειδούς σύμφωνα με την τοπογραφία κερατοειδούς, και τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας κερατοειδούς ως προς την πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και το βάθος της διασύνδεσης κολλαγόνου στον κερατοειδή.

Επίσης αξιολογήθηκε η μετεγχειρητική κλινική πορεία της αισθητικότητας και της ποιότητας της δακρυϊκής στιβάδας και η μικροσκοπική εικόνα του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος του κερατοειδούς μετά από εφαρμογή του κλασσικού πρωτόκολλου διασύνδεσης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.Υλικά και Μέθοδος

8.1. Πειραματικό μέρος

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε χοίρειους οφθαλμούς. Οι χοίρειοι κερατοειδείς ανατομικά και φυσιολογικά προσομοιάζουν αρκετά τον ανθρώπινο οφθαλμό με αποτέλεσμα τα πειραματικά αποτελέσματα να είναι αξιόπιστοι δείκτες της συμπεριφοράς του ανθρώπινου οφθαλμού.^{235,236}

8.1.1. Προετοιμασία χοίρειων κερατοειδών

Πενήντα χοίρειοι οφθαλμοί κατόπιν εξόρυξης ελήφθησαν από ένα τοπικό σφαγείο μέσα σε 24 ώρες από τη σφαγή. Οι οφθαλμοί διατηρήθηκαν σε 4°C μέχρι την πειραματική διαδικασία. Κάθε οφθαλμός εξετάστηκε προσεκτικά κάτω από χειρουργικό μικροσκόπιο προκειμένου να γίνει ανίχνευση ύπαρξης πιθανών ανωμαλιών του κερατοειδούς. Μια ουλή κερατοειδούς ανιχνεύθηκε σε ένα οφθαλμό, ελαττώματα του επιθηλίου σε δύο οφθαλμούς και οίδημα του κερατοειδούς σε πέντε άλλους οφθαλμούς. Κατά συνέπεια, αυτοί οι οκτώ οφθαλμοί κρίθηκαν ακατάλληλοι και αποκλείστηκαν από τη μελέτη για να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα από τις προϋπάρχουσες παθολογίες του κερατοειδούς. Οι κερατοειδείς των υπολοίπων οφθαλμών οι οποίοι εμφάνισαν φυσιολογική εικόνα στην μικροσκοπική εξέταση κρίθηκαν κατάλληλοι και συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του κερατοειδικού επιθηλίου με μία ειδική βούρτσα απόξεσης στους υπόλοιπους 42 οφθαλμούς. Η βούρτσα απόξεσης αποτελείται από ειδική άκρη η οποία εφαρμόζει σε περιστρεφόμενο μοτέρ με την βοήθεια του οποίου περιστρέφεται γύρο από τον άξονα της και όταν έρχεται σε επαφή με τον κερατοειδή προκαλεί απόξεση του επιθηλίου χωρίς να τραυματίζει τη μεμβράνη του Bowman.²³⁷ Κλινικά χρησιμοποιείται στην απόξεση του επιθηλίου στην διαθλαστική χειρουργική και στην διασύνδεση κολλαγόνου.



Εικόνα 18: Η βούρτσα απόξεσης αποτελείται από την ειδική άκρη η οποία εφαρμόζει σε περιστρεφόμενο μοτέρ με την βοήθεια του οποίου περιστρέφεται γύρο από τον άξονα της. (αρχείο ΒΕΜΜΟ)

Μετά την αποεπιθηλιοποίηση, οι κερατοειδείς αποκόπηκαν με ένα χειρουργικό τρύπανο Barron διαμέτρου 8,00 χιλιοστών (Katena Products, New Jersey, USA) και εμβυθίστηκαν σε 0,1% ριβοφλαβίνη σε δεξτράνη 20% για τρεις ώρες, προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία στην ενυδάτωσή τους. Το διάλυμα ριβοφλαβίνης 0,1% σε δεξτράνη 20% που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη είναι το ίδιο που χρησιμοποιείται κλινικά.

Στη συνέχεια, οι κερατοειδείς απομακρύνθηκαν διαδοχικά και εναλλακτικά τοποθετήθηκαν σε κάθε μία από τις εξής δύο ομάδες:

- Η πρώτη ομάδα κερατοειδών (ομάδα 1) αποθηκεύτηκε σε σκοτεινές συνθήκες μέσα σε διάλυμα ριβοφλαβίνης 0,1% σε δεξτράνη 20%. για 30 λεπτά.
- Η δεύτερη ομάδα (ομάδα 2) κερατοειδών ακτινοβολήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία (370nm) για 30 λεπτά σύμφωνα με την κλινικό πρωτόκολλο της διασύνδεσης κερατοειδικού κολλαγόνου. Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε με ειδική πειραματική συσκευή. Η ένταση της ακτινοβολίας είχε μετρηθεί πριν την εκκίνηση της διαδικασίας έτσι ώστε να είναι η σωστή.



***Εικόνα 19:** Στην εικόνα φαίνεται η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβόληση των κερατοειδών με υπεριώδη ακτινοβολία.*

Μετά το πέρας των 30 λεπτών της αποθήκευσης (ομάδα 1) και της ακτινοβόλησης (ομάδα 2) οι κερατοειδείς και των δύο ομάδων εμβαπτίστηκαν σε δύο διαλύματα δεξτράνης 20% για 3 επιπλέον ώρες έτσι ώστε να επιτευχθεί ωσμωτική ισορροπία.

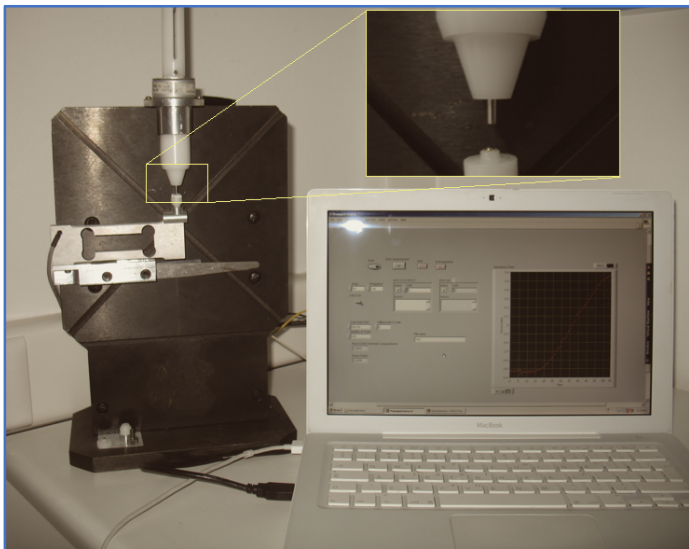
Τέλος, διεξήχθησαν οι ακόλουθες μετρήσεις:

8.1.2. Παχυμετρία Κερατοειδούς

Το πάχος κάθε κερατοειδούς μετρήθηκε με τη βοήθεια ενός ψηφιακού παχύμετρου με ακρίβεια 1 μ m (Mitutoyo, IL, USA). Η συσκευή αυτή διαθέτει δύο επίπεδες επιφάνειες ανάμεσα στις οποίες τοποθετείται το υπό μέτρηση αντικείμενο. Οι επιφάνειες αυτές συμπλησιάζονται και η συσκευή μετράει την απόσταση μεταξύ τους. Το αντικείμενο τοποθετείται πάνω στην κατώτερη επιφάνεια ενώ η ανώτερη επιφάνεια χαμηλώνει μέχρι να έρθει σε επαφή με το αντικείμενο χωρίς να το συμπιέσει. Η απόσταση των δύο πλακών όταν εφάπτονται στο αντικείμενο είναι το πάχος του αντικειμένου.

8.1.3. Μηχανικές μετρήσεις συμπιεστότητας

Μηχανικές μετρήσεις συμπιεστότητας του κερατοειδούς έγιναν με τη βοήθεια μιας πειραματικής διάταξης που αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Οπτικής και Όρασης για χρήση σε αυτό το πείραμα. Η διάταξη αυτή διαθέτει ένα κινητήρα που προωθεί ένα άξονα και μία κυψέλη φορτίου (αισθητήρας δύναμης) με μία επίπεδη επιφάνεια. Ο άξονας του κινητήρα έχει μία σφαιρική άκρη με ακτίνα 1 χιλιοστού. Ο κερατοειδής τοποθετείται ανάμεσα στην επίπεδη επιφάνεια της κυψέλης φορτίου και στην άκρη του άξονα. Η άκρη του άξονα συμπιέζει τον κερατοειδή από την επιθηλιακή πλευρά ενάντια στην επίπεδη επιφάνεια της κυψέλης φορτίου (Εικόνα 1). Το άκρο κινείται προς την κυψέλη φορτίου σε βήματα των 20μm. Για κάθε βήμα η κυψέλη φορτίου μετρά την δύναμη που δέχεται. Αυτό καταγράφεται από ειδικό λογισμικό υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με την διάταξη μέσα από τον οποίο ελέγχεται και η κίνηση του άξονα. Έτσι για κάθε βήμα της άκρης του άξονα καταγράφεται από το λογισμικό η δύναμη που δέχεται η κυψέλη φορτίου διαμέσου του τοποθετημένου στην διάταξη κερατοειδούς. Η κλίση της δύναμης συναρτήσεως της παραμόρφωσης υπολογίστηκε για κάθε κερατοειδή που τοποθετήσαμε στην διάταξη και θεωρήθηκε ως η συμπιεστότητα των κερατοειδών.

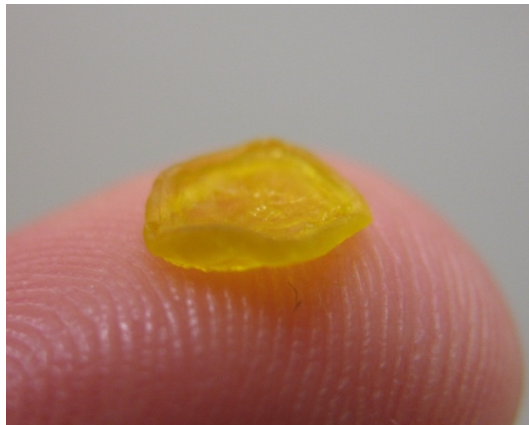


Εικόνα 20: Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τις μηχανικές μετρήσεις όπου φαίνεται η θέση τοποθέτησης του ιστού και ο υπολογιστής από τον οποίο γίνεται ο χειρισμός και καταγράφονται οι μετρήσεις. Στην ένθετη εικόνα φαίνεται σε μεγέθυνση η επίπεδη επιφάνεια και το σφαιρικό άκρο και που συμπιέζει τον κερατοειδή.

8.1.4. Μέτρηση της ενυδάτωσης

Για την μέτρηση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς πραγματοποιήθηκε μια μέτρηση του βάρους κάθε κερατοειδούς ως πρώτο βήμα της πειραματικής διαδικασίας μετά από την εμφύσηση στο διάλυμα δεξτράνης 20%. Κάθε ένα από τα δείγματα αφαιρέθηκε διαδοχικά από το διάλυμα δεξτράνης και σκουπίστηκε με ένα χειρουργικό σπόγγο για την αφαίρεση της επικαλύψεως διαλύματος δεξτράνης από την επιφάνεια του κερατοειδούς. Στη συνέχεια, κάθε κερατοειδής ζυγίστηκε με τη βοήθεια μιας ηλεκτρονικής κλίμακας με ακρίβεια 0,1mg, προκειμένου να υπολογιστεί η συνολική ενυδατωμένη μάζα. Μετά το πέρας όλων των άλλων μετρήσεων της πειραματικής διαδικασίας όλα οι κερατοειδείς τοποθετήθηκαν σε ένα ξηραντικό φούρνο σε θερμοκρασία 62C° για 48 ώρες έτσι ώστε να αφυδατωθούν (Εικόνα 2). Κατόπιν αφαιρέθηκαν από τον φούρνο και με την βοήθεια της ηλεκτρονικής κλίμακας η ξηρά μάζα τους μετρήθηκε και η ενυδάτωση των ιστών (H%) υπολογίστηκε για κάθε κερατοειδή με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$H = (\text{υγρή μάζα} - \text{ξηρή μάζα}) / \text{υγρή μάζα}$$



Εικόνα 21: Αφυδατωμένος χοίρειος κερατοειδής μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

8.1.5. Στατιστική ανάλυση

Η δοκιμασία independent samples t-test χρησιμοποιήθηκε στην σύγκριση των μεταβλητών μεταξύ των δύο ομάδων κερατοειδών. Οι μεταβλητές που συγκρίθηκαν ήταν το πάχος, η ενυδάτωση και η συμπίεστικότητα του κερατοειδών. Η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) διεξήχθη με την υγρή μάζα των κερατοειδών ως εξαρτημένη μεταβλητή μεταξύ των δύο ομάδων. Η ξηρά μάζα και το πάχος συμπεριλήφθηκαν ως συμμεταβλητές στο μοντέλο. Η γραμμική συσχέτιση μεταξύ ζευγών των ποσοτικών μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας συντελεστή συσχέτισης Pearson. Το επίπεδο του $p < 0.05$ ήταν το όριο στατιστικής σημαντικότητας. Το στατιστικό πακέτο PASW Statistics 18,0 χρησιμοποιήθηκε (SPSS inc., Chicago, IL, USA).

8.2. Κλινικό μέρος

Η κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Βαρδινογιάννειο Εργαστήριο Μεταμοσχεύσεων και Μικροχειρουργικής του Οφθαλμού (BEMMO) του Ινστιτούτου Οπτικής και Όρασης του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στην μελέτη συμπεριελήφθησαν ασθενείς που προσήλθαν στο BEMMO για εξέταση, και στους οποίους διαπιστώθηκε ύπαρξη εξελισσόμενου κερατόκωνου.

Το κλινικό μέρος της μελέτης χωρίστηκε σε δύο σκέλη:

Το **πρώτο σκέλος** της κλινικής μελέτης αφορά την μελέτη της διασύνδεσης κολλαγόνου με χρήση του κλασσικού πρωτοκόλλου και την σύγκριση των αποτελεσμάτων της με το νέο πρωτόκολλο του συνδυασμού της διασύνδεσης με φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή με το laser στερεάς κατάστασης. Η σύγκριση έγινε με βάση τα κλινικά αποτελέσματα της όρασης, κερατομετρίας και τοπογραφίας κερατοειδούς και με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της συνεστιακής μικροσκοπίας κερατοειδούς.

Το **δεύτερο σκέλος** της κλινικής μελέτης αφορά την διερεύνηση της επίδρασης της επέμβασης διασύνδεσης κολλαγόνου στο υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα του κερατοειδούς και στην λειτουργία της δακρυϊκής στιβάδας. Έγινε ανάλυση παραμέτρων που αφορούν την αισθητικότητα, την ποιότητα της δακρυϊκής στιβάδας και την εικόνα του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος στην συνεστιακή μικροσκοπία.

8.2.1. Κριτήρια ένταξης –προεγχειρητικός έλεγχος

Οι ασθενείς που ενταθήκαν στην μελέτη υποβλήθηκαν σε πλήρη προεγχειρητικό έλεγχο ο οποίος περιλαμβάνει:

- Λήψη πλήρους οφθαλμολογικού και γενικού ιατρικού ιστορικού
- Εξέταση με αυτόματο διαθλασίμετρο (Canon autorefractor), τοπογραφία κερατοειδούς και ανάλυση εκτροπών μετώπου κύματος (iTrace, Tracey Tech. Houston Texas),
- Τομογραφία κερατοειδούς (Galilei)
- Αξιολόγηση οπτικής οξύτητας χωρίς διόρθωση (UDVA)
- Αξιολόγηση καλύτερα διορθούμενης οπτικής οξύτητας (CDVA) και καλύτερα διορθούμενης οπτικής οξύτητας με σκληρό φακό επαφής,
- Υποκειμενική και κυκλοπληγική διάθλαση
- Τονομέτρηση
- Παχυμετρία κερατοειδούς (Sonogage Corneo Gage Plus),
- Εξέταση στην σχισμοειδή λυχνία για έλεγχο προσθίου ημιμορίου (κερατοειδή, έλεγχο προσθίου θαλάμου, γωνίας, ίριδος), και οπίσθιου ημιμορίου μετά από φαρμακολογική διαστολή της κόρης.
- Συνεστιακή μικροσκοπία κερατοειδούς

Η συνεστιακή μικροσκοπία του κερατοειδούς πραγματοποιήθηκε με ένα Συνεστιακό μικροσκόπιο λείζερ σάρωσης (HRT II [Heidelberg Engineering, Heidelberg, Γερμανία], με την προσθήκη του οπτικού εξαρτήματος Rostock Cornea Module). Μετά την ενστάλαξη του τοπικού αναισθητικού (Υδροχλωρική προπαρακαΐνη 0,5%) και γέλης υψηλού ιξώδους (Καρβομερές 3,0 mg / g · Thilogel [Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX]), τέθηκε σε επαφή ο αντικειμενικός φακός με τον κεντρικό κερατοειδή χιτώνα μέσω ενός κυπέλλου από μεθακρυλικό πολυμεθυλεστέρα που

καλύπτει τον αντικειμενικό φακό. Έγινε χειροκίνητα σάρωση σε ολόκληρο το βάθος του κερατοειδούς. Η εξωτερική επιφάνεια του κυπέλου λήφθηκε ως σημείο αναφοράς για τις μετρήσεις πάχους. Οι εικόνες που ελήφθησαν αποτελούνταν από 384*384 pixels ενώ κάθε μία έχει οπτικό πεδίο 400*400μm με εγκάρσια διακριτική ικανότητα περίπου 1,04μm και διαμήκη ανάλυση περίπου 4μm

Για όσους ασθενείς υπήρχαν σχετικές ύποπτες κλινικές ενδείξεις ο έλεγχος συμπληρώθηκε με ειδικότερες εξετάσεις όπως έλεγχο οπτικών πεδίων, υπερηχοτομογραφική εξέταση (B-scan) και άλλες.

Η διάγνωση του κερατοκώνου βασίστηκε στην εικόνα από την τοπογραφία. Για την επιβεβαίωση της εξέλιξης χρειάζονται δύο διαδοχικές τοπογραφίες σε διάστημα έξι μηνών με αύξηση κατά τουλάχιστον 0.75D στην κερατομετρία ή αύξηση κατά 0.75D στο σφαιρικό ισοδύναμο διάθλασης σε διάστημα 6 μηνών.

Στην ομάδα ασθενών της μελέτης συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με εξελισσόμενο κερατόκωνο με κριτήρια αποκλεισμού τα εξής: Κεντρικό πάχος κερατοειδούς κάτω από 400μm, ουλές κερατοειδούς, θολερότητες, ιστορικό παλαιού τραύματος ή εγκαύματος, σοβαρής μόλυνσης, ή οποιαδήποτε άλλη οφθαλμολογική πάθηση. Επίσης αποκλείστηκαν ασθενείς με συστηματική πάθηση που να επηρεάζει την οφθαλμική επιφάνεια όπως νοσήματα συνδετικού ιστού και διαβήτη, καθώς και γυναίκες σε κύηση ή γαλουχία.

8.2.2. Μετεγχειρητικός έλεγχος

Μετεγχειρητικά, οι ασθενείς υποβλήθηκαν στις εξής εξετάσεις:

- Εξέταση με αυτόματο διαθλασίμετρο (Canon autorefractor), τοπογραφία κερατοειδούς (iTrace, Tracey Tech. Houston Texas),
- Τομογραφία κερατοειδούς (Galilei)
- Αξιολόγηση οπτικής οξύτητας χωρίς διόρθωση (UDVA)
- Αξιολόγηση καλύτερα διορθούμενης οπτικής οξύτητας (CDVA)
- Υποκειμενική διάθλαση
- Τονομέτρηση
- Παχυμετρία κερατοειδούς (Sonogage Corneo Gage Plus),

- Εξέταση στην σχισμοειδή λυχνία για έλεγχο προσθίου ημιμορίου (κερατοειδής, έλεγχο προσθίου θαλάμου, γωνίας, ίριδος), και οπισθίων ημιμορίων μετά από φαρμακολογική διαστολή της κόρης.
- Συνεστιακή μικροσκοπία κερατοειδούς

Οι εξετάσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν ένα μήνα, τρεις, έξη, εννέα και 12 μήνες μετά το χειρουργείο, και στην συνέχεια ανά εξάμηνο μέχρι την λήξη της μελέτης



Εικόνα 22: Το συνεστιακό μικροσκόπιο (www.optometricmanagement.com)

8.3. 1^ο σκέλος: Συγκριτική αξιολόγηση επέμβασης διασύνδεσης κολλαγόνου με τον συνδυασμό της με την καθοδηγούμενη από την τοπογραφία φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (tPRK)

Οι ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στην μελέτη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Εντάχθηκαν είτε στην ομάδα που έλαβε την συνδυασμένη επέμβαση ή στην ομάδα που έλαβε επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου. Στην ομάδα της συνδυασμένης επέμβασης εντάχθηκαν αν το αναμενόμενο πάχος του κερατοειδούς τους μετά το tPRK ήταν πάνω από 400μm. Αν το κριτήριο αυτό δεν πληρούνταν οι ασθενείς ήταν επιλέξιμοι για ένταξη στην ομάδα που πραγματοποιήθηκε μόνο επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου. Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα επέμβασης διασύνδεσης κολλαγόνου αντιστοιχήθηκαν με τους ασθενείς στην ομάδα

συνδυασμένης θεραπείας όσον αφορά την ηλικία και την προεγχειρητική κερατομετρία.

8.3.1. Χειρουργική τεχνική επέμβασης διασύνδεσης κολλαγόνου

Σύμφωνα με το λεγόμενο «πρωτόκολλο της Δρέσδης», μετά από τοπική αναισθησία με σταγόνες τετρακαΐνης το επιθήλιο του κερατοειδούς απομακρύνθηκε μέσα σε μια διάμετρο 8,0 χιλιοστών. Στη συνέχεια, εμπορικώς διαθέσιμη ριβοφλαβίνη (Ριβοφλαβίνη 0,1% ισότονες οφθαλμικές σταγόνες με 20% δεξτράνη 500, Medicross, Medio - Haus, Behrensbrook, Neudorf, Γερμανία) ενσταλάχθηκε κάθε 3 λεπτά για 30 λεπτά περίπου. Στην συνέχεια έγινε ακτινοβολήση με υπεριώδη ακτινοβολία-A (UV-A, 370 nm) χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα UVA (UV-X, Peschke Meditrade, Γερμανία) για 30 λεπτά. Πριν την ακτινοβολήση, ένταση της ακτινοβολίας της συσκευής μετρήθηκε με το ειδικό φωτόμετρο ΥΚ-34UV (Lutron Electronic Enterprise Co., Ltd., Taipei, Taiwan) έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η ότι η ακτινοβολία στον κερατοειδή είναι 3 mW/cm^2 (συνολική δόση ενέργειας 5.4 J/cm^2 μετά από 30 λεπτά). Κατά τη διάρκεια της θεραπείας, γινόταν ενστάλαξη διαλύματος ριβοφλαβίνης κάθε 5 λεπτά για να εξασφαλιστεί ο κορεσμός της στο κερατοειδικό στρώμα.

Στο τέλος της διαδικασίας, τοποθετήθηκε θεραπευτικός φακός επαφής μέχρι την επούλωση του επιθηλίου και δόθηκε θεραπεία με συνδυασμό στεροειδούς κι αντιβιοτικού κολλυρίου. Μετά την επιθηλιοποίηση, δόθηκε κολλύριο φλουρομεθολόνης 0,1% (FML Liquifilm) με σταδιακή μείωση της δοσολογίας ανά εβδομάδα. Όλες οι διαδικασίες διεξήχθησαν στο Βαρδινογιάννειο Εργαστήριο Μεταμοσχεύσεων και Μικροχειρουργικής του Οφθαλμού (BEMMO) του Ινστιτούτου Οπτικής και Όρασης του Πανεπιστημίου Κρήτης από τον ίδιο χειρουργό.

8.3.2. Χειρουργική τεχνική συνδυασμένης θεραπείας

Μετά από τοπική αναισθησία με τετρακαΐνη, το επιθήλιο αφαιρέθηκε μηχανικά μέσα σε μια διάμετρο 8 χιλιοστών. Το laser στερεάς κατάστασης με μήκος κύματος 213nm (Pulzar Z1, CustomVis, Perth, WA) χρησιμοποιήθηκε για την εξατομικευμένη φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (PRK) καθοδηγούμενη από την τοπογραφία. Το

μήκος κύματος παράγεται χρησιμοποιώντας ως ενεργό μέσο κρύσταλλο Neodymium:Yttrium-Aluminum-Garnet με ακτινοβολία 1064nm, η οποία μέσω ειδικών κρυσταλλών, μετατρέπεται τελικά στην ακτινοβολία των 213 nm.^{238,239} Η διόρθωση στόχος έφθανε μέχρι το 33% της διαθλαστικής μυωπίας και το 66% του διαθλαστικού αστιγματισμού σε ζώνη φωτοαποδόμησης 5.5mm. Επιπρόσθετη εξατομίκευση της διόρθωσης πραγματοποιήθηκε με βάση τις εκτροπές μετώπου κύματος του κερατοειδούς όπως υπολογίζονται από την τοπογραφία iTrace με χρήση ειδικού λογισμικού (Zcad). Το λογισμικό του συστήματος επιτρέπει τη χρήση ενός ποσοστού προσαρμογής της εξατομίκευσης από 0% έως 100%. Χρησιμοποιώντας το 0% είναι ισοδύναμο με συμβατική θεραπεία με λέιζερ και 100% ισοδύναμο με μια πλήρως προσαρμοσμένη θεραπεία. Ρυθμίζοντας αυτό το ποσοστό και το ποσοστό διόρθωσης των κύριων διαθλαστικών σφαλμάτων, μπορούσαμε να μειώσουμε το μέγιστο βάθος ιστού που αφαιρέθηκε για να διατηρήσουμε το όριο ασφαλείας του στρώματος στα 400μm πάχος μετά το tPRK και πριν από το CXL. Μέγιστο βάθος φωτοεκτομής ήταν 50μm.

Στην συνέχεια ακολουθούσε η διασύνδεση κολλαγόνου με την ίδια τεχνική που περιεγράφηκε προηγουμένως.



Εικόνα 23: Η τοπογραφία iTrace που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη (www.traceytechnologies.com)

8.3.3. Συνεστιακή μικροσκοπία

Οι μικροσκοπικές εικόνες του στρώματος του κερατοειδούς με συνεστιακή μικροσκοπία ελήφθησαν και στα δύο ομάδες ασθενών. Για την ποσοτική τους αξιολόγηση, μετρήσαμε την πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων και το βάθος της θεραπείας CXL.

Για την αξιολόγηση της πυκνότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η εικόνα του ενδοθηλίου με την υψηλότερη ποιότητα από όσες ελήφθησαν, η οποία επιλέχθηκε από έμπειρο παρατηρητή για κάθε ασθενή πριν από την χειρουργική επέμβαση και κατά την τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη. Οι εικόνες αναλύθηκαν ποσοτικά με χρήση ημιαυτόματου λογισμικού που είναι εγκατεστημένο στο λογισμικό του μικροσκοπίου. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ο χειριστής ανίχνευε τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε μία περιοχή της εικόνας με καλή ποιότητα που έχει ήδη επιλέξει προηγουμένως, χρησιμοποιώντας μια απλή μέθοδο point-and-click. Το λογισμικό μετράει τον αριθμό κυττάρων στην περιοχή αυτή και υπολογίζει την πυκνότητα κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας.

Για την αξιολόγηση του βάθους διείσδυσης της διασύνδεσης κολλαγόνου, χρησιμοποιήσαμε την εξέταση του πρώτου μετεγχειρητικού μήνα. Το ολικό πάχος διείσδυσης της θεραπείας CXL του κερατοειδούς θεωρήθηκε ότι αντιστοιχεί στο βάθος της βαθύτερης εικόνας του στρώματος του κερατοειδούς με ερήμωση από κερατοκύτταρα και χαρακτηριστική κυψελωτή ή υπερανακλαστική διαμόρφωση στον κεντρικό κερατοειδή ή και τα δύο.²³⁰ Για να αποφύγουμε την επίδραση της υπερπλασίας του επιθηλίου στην αξιολόγηση του βάθους της αγωγής, αφαιρέσαμε το επιθηλιακό πάχος από το συνολικό μετρημένο πάχος διείσδυσης της διασύνδεσης. Θεωρήσαμε ότι το πάχος του επιθηλίου αντιστοιχεί στο βάθος της τελευταίας εικόνας με επιθηλιακά κύτταρα σε κάθε λήψη.

8.3.4. Στατιστική ανάλυση

Η κύρια παράμετρος που αναλύθηκε στο πρώτο σκέλος της κλινικής μελέτης είναι η όραση των ασθενών για την αξιολόγηση της οποίας συγκρίθηκε η αλλαγή στην οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση (CDVA) και την καλύτερα διορθούμενη οπτική

οξύτητα (UDVA). Ταυτόχρονα αναλύθηκαν το διαθλαστικό σφάλμα και η κερατομετρία των ασθενών. Έγινε σύγκριση των παραμέτρων αυτών σε κάθε ομάδα ανάμεσα στην προεγχειρητικές και στις μετεγχειρητικές τιμές και σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη, το σφαιρικό ισοδύναμο, και το ισοδύναμο αφεστίασης σε κάθε ομάδα συγκρίθηκαν με την προεγχειρητική τιμή, αλλά και μεταξύ των ομάδων. Το βάθος διείσδυσης της διασύνδεσης κολλαγόνου συγκρίθηκε μεταξύ των ομάδων. Οι διαφορές μεταξύ προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών τιμών αξιολογήθηκαν με paired samples t-test. Αξιολογήθηκε η συσχέτιση των κυρτών κερατομετρικών, του επιδιωκόμενου βάθους φωτοαποδόμησης, του βάθους διείσδυσης της διασύνδεσης και του πάχους κερατοειδούς με τη βελτίωση στην CDVA και UDVA και στις δύο ομάδες ξεχωριστά. Με την χρήση γραμμικής παλινδρόμησης αξιολογήθηκαν η κυρτή κερατομετρία και το επιδιωκόμενο βάθος φωτοαποδόμησης σαν πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες για την μετεγχειρητική CDVA. Το ποσοστό των ασθενών με βελτίωση μεγαλύτερη από 2 γραμμές οπτικής οξύτητας Snellen σε κάθε ομάδα συγκρίθηκε με το τεστ χ^2 . Η τιμή p μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Όλα τα δεδομένα συλλέχθηκαν σε φύλλο δεδομένων Excell (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Το στατιστικό πακέτο SPSS 18.0 χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση (SPSS A.E., Chicago, IL, USA). Με το στατιστικό πρόγραμμα G*Power πραγματοποιήθηκε ανάλυση post-hoc για την ισχύ της μελέτης ως προς την σύγκριση της μη διορθωμένης οπτικής οξύτητας.²⁴⁰

8.4. 2^ο σκέλος: ανάλυση παραμέτρων που αφορούν την αισθητικότητα και την ποιότητα της δακρυϊκής στιβάδας και την νεύρωση του κερατοειδούς

Στο δεύτερο σκέλος της κλινικής μελέτης αναλύθηκαν η αισθητικότητα του κερατοειδούς, ο χρόνος διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας, η μέτρηση της βασικής έκκρισης δακρύων και η εικόνα του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος, του στρώματος του κερατοειδούς και του κερατοειδικού ενδοθηλίου από την συνεστιακή μικροσκοπία. Με βάση αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης για την αισθητικότητα

κερατοειδούς μετά από επέμβαση διόρθωσης της μυωπίας με Excimer laser υπολογίστηκε ότι για να έχουμε ισχύ 95% για την ανίχνευση κλινικά σημαντικής διαφοράς στην αισθητικότητα του κερατοειδούς χρειαζόνταν 30 περίπου ασθενείς με εξελισσόμενο κερατόκωνο, με βάση τα προαναφερθέντα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού. Οι ασθενείς υπεβλήθησαν στην επέμβαση την σύνδεση κολλαγόνου κερατοειδούς σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Δρέσδης όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 8.3.1. της παρούσας διατριβής.

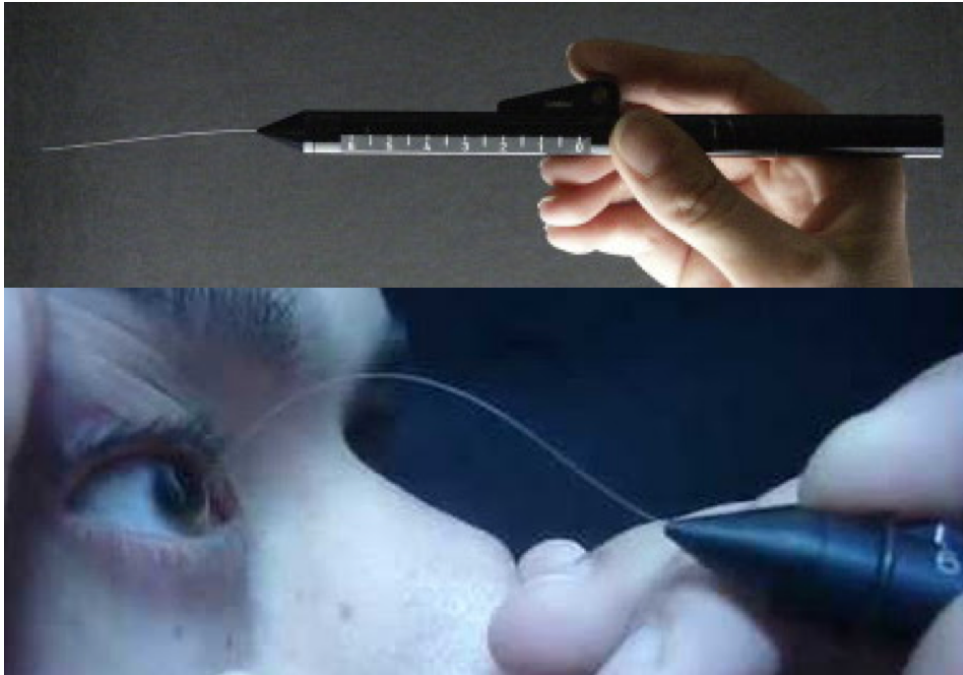
8.4.1. Κλινική αξιολόγηση

Για την μελέτη αυτή, επαναλάβαμε αξιολόγηση των ασθενών 1, 3, 6, 9, 12, 18 και 24 μήνες μετεγχειρητικά. Οι ασθενείς έλαβαν οδηγίες να διακόψουν τη χρήση φακών επαφής τουλάχιστον οκτώ εβδομάδες πριν από κάθε επίσκεψη, ώστε να αποφευχθούν πιθανές επιπτώσεις στην μέτρηση της αισθητικότητας.²⁴¹

Σε κάθε επίσκεψη, εκτός από τις προαναφερθείσες εξετάσεις στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιήθηκαν και οι εξής:

- Αισθησιμετρία κερατοειδούς με το αισθησιόμετρο Cochet-Bonnet
- Μέτρηση του χρόνου διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας
- Μέτρηση της βασικής έκκρισης δακρύων με Schirmer test υπό τοπική αναισθησία

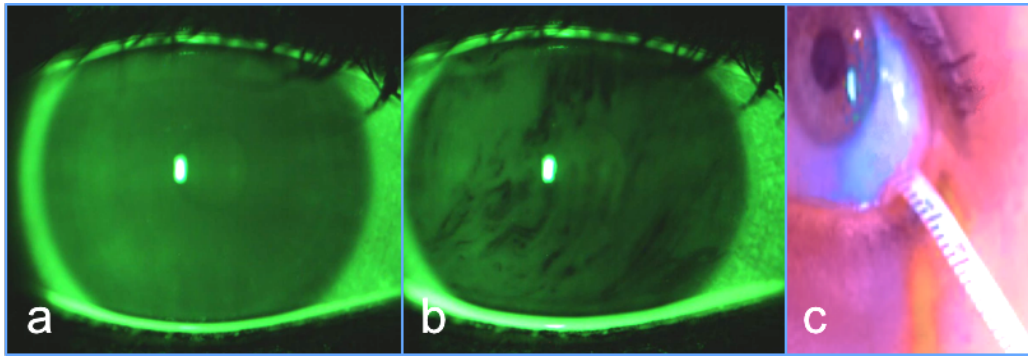
Η μέτρηση της αισθητικότητας έγινε χρησιμοποιώντας το αισθησιόμετρο τύπου Cochet-Bonnet.²⁴² Το όργανο αυτό αποτελείται από ένα νάιλον νήμα με 60 χιλιοστά μήκος και 0.12 χιλιοστά σε διάμετρο. Η δύναμη που ασκείται από το νήμα όταν αγγίζει τον κερατοειδή είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος του. Ο ίδιος παρατηρητής πραγματοποίησε όλες τις μετρήσεις στον κεντρικό κερατοειδή. Το νήμα μετακινούνταν προς τον κερατοειδή ομαλά υπό κάθετη γωνία. Η επαφή του νήματος με τον κερατοειδή ανιχνεύθηκε με ελαφρά κάμψη στο νήμα. Οι ασθενείς κοιτούσαν κατευθείαν εμπρός και τους ζητήθηκε να αναφέρουν πότε το ερέθισμα έγινε αισθητό. Εάν δεν υπήρχε απόκριση στην πρώτη επαφή, το μήκος του νήματος μειώνονταν κατά 5,0 mm ώστε να αυξηθεί η ακαμψία του, και η διαδικασία επαναλαμβάνονταν έως ότου ο ασθενής ανέφερε αίσθημα επαφής στον κερατοειδή. Το μέσο μήκος νήματος, από ένα ελάχιστο 3 επαφών με θετική ανταπόκριση από τον ασθενή, θεωρήθηκε ότι είναι ο ουδός ευαισθησίας.



Εικόνα 24: Το αισθησιόμετρο Cochet-Bonnet.²⁴³

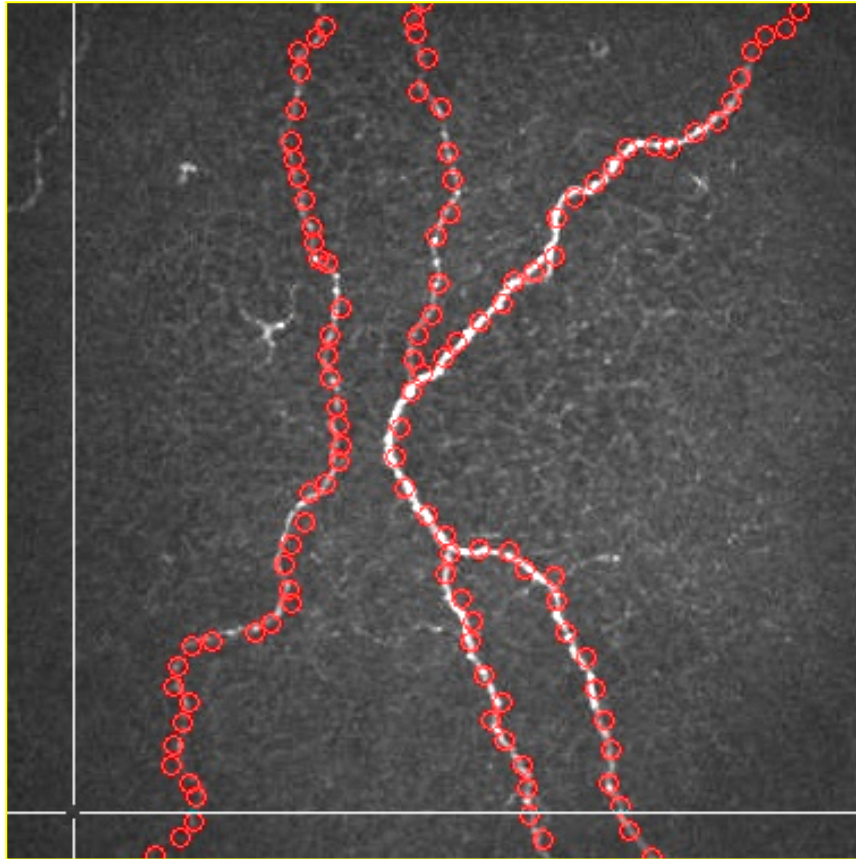
Για την αξιολόγηση της δακρυϊκής στιβάδας πραγματοποιήθηκε μέτρηση του χρόνου διάσπασης της. Έγινε ενστάλαξη τοπικού αναισθητικού και χρώση του κερατοειδούς με φλουροσκεΐνη. Στην συνέχεια ο ασθενής ανοιγόκλεινε μερικές φορές τα βλέφαρα ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή της χρωστικής στην δακρυϊκή στιβάδα. Στην συνέχεια ζητούνταν από τον ασθενή να κρατήσει τα βλέφαρα ανοιχτά, και με φωτισμό μπλε του κοβαλτίου ώστε να επιτευχθεί φθορισμός της φλουροσκεΐνης μετρούνταν ο χρόνος μέχρι να εμφανιστεί το πρώτο μαύρο σημείο στην επιφάνεια του κερατοειδούς (διάσπαση δακρυϊκής στιβάδας).

Για την αξιολόγηση της βασικής έκκρισης δακρύων, έγινε μέτρηση του μήκους διαβροχής ειδικών ταινιών Schirmer's μετά από 5 λεπτά που τοποθετούνταν στον κάτω βλεφαρικό σάκο κοντά στον έξω κανθό υπό τοπική αναισθησία.



Εικόνα 25: Διαβροχή της δακρυϊκής στιβάδας με φλουροσκεΐνη (a) και διάσπαση της δακρυϊκής στιβάδας (b), Schirmer test (c) (www.varpa.es/research/optics.html)

Η συνεστιακή μικροσκοπία αξιοποιήθηκε για την αξιολόγηση του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος. Σε κάθε εξέταση οι τρεις υψηλότερης ποιότητας εικόνες του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος επιλέχθηκαν από έναν έμπειρο παρατηρητή. Οι εικόνες που αναλύθηκαν ποσοτικά με ειδικό λογισμικό επεξεργασίας εικόνας στη Matlab (Matlab, MathWorks A.E. Natick, MA). Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ο χειριστής εντόπιζε το περίγραμμα του κάθε νεύρου, χρησιμοποιώντας μια point-and-click μέθοδο (χειροκίνητη ιχνηλάτηση), και το λογισμικό υπολόγιζε το συνολικό μήκος όλων των νεύρων ανά εικόνα. Η μέση τιμή του συνολικού μήκους των νεύρων των τριών επιλεγμένων εικόνων ανά ασθενή ανά χρονικό σημείο υπολογίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για στατιστική ανάλυση.



Εικόνα 26: Παράδειγμα ιχνηλάτησης των νεύρων από τον χρήστη ειδικού προγράμματος πάνω σε εικόνα υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος από το συνεστιακό μικροσκόπιο. Κάθε κόκκινος κύκλος αντιστοιχεί σε ένα click από τον χρήστη του προγράμματος. (αρχείο BEMMO)

8.4.2. Στατιστική ανάλυση

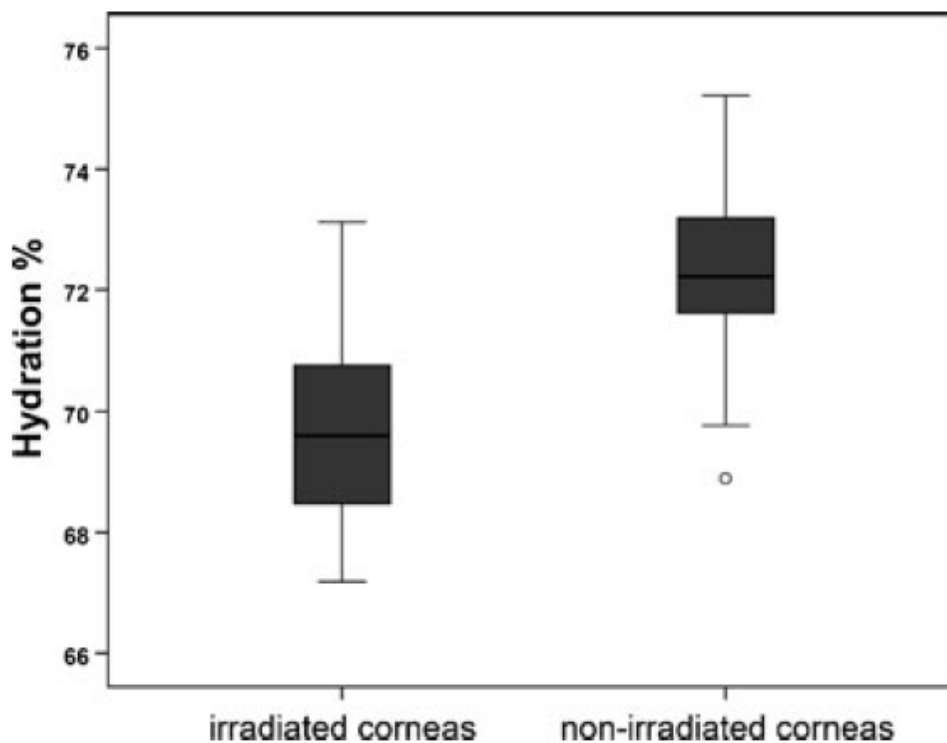
Εξετάσαμε την κατανομή των συνεχών μεταβλητών με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk για ομαλότητα. Συγκρίσεις μεταξύ προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών τιμών σε κάθε χρονικό σημείο πραγματοποιήθηκαν για την ευαισθησία του κερατοειδούς, το τεστ Schirmer, το TFBUT, και το μήκος των νεύρων. Οι διαφορές μεταξύ προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών τιμών εκτιμήθηκαν με paired samples t-test, εάν οι μεταβλητές είχαν μια κανονική κατανομή, καθώς και με την δοκιμασία Wilcoxon Signed Rank, εφόσον οι μεταβλητές δεν είχαν κανονική κατανομή. Το στατιστικό πακέτο SPSS 15.0 χρησιμοποιήθηκε (SPSS A.E., Chicago, IL, USA). Οι τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

9. Αποτελέσματα

9.1 Πειραματικό μέρος

9.1.1. Ενυδάτωση κερατοειδούς

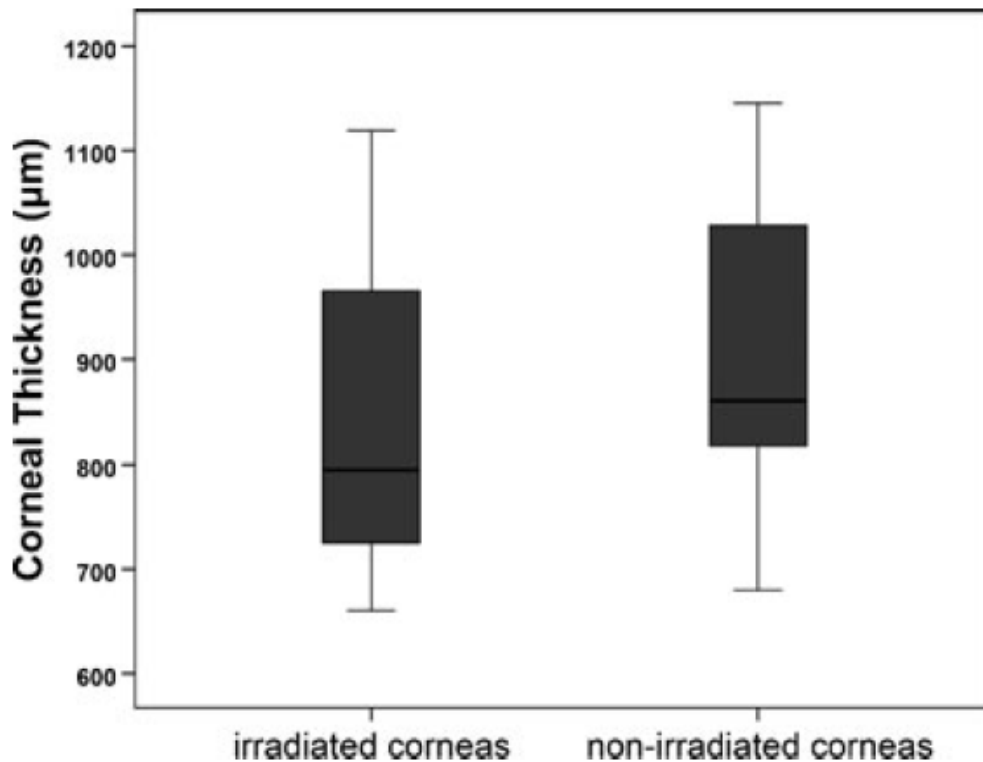
Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ της μέσης ενυδάτωσης στην ομάδα των ακτινοβολημένων και την ομάδα των μη ακτινοβολημένων κερατοειδών (Εικόνα 27). Η μέση ενυδάτωση του κερατοειδούς στην ακτινοβολημένη ομάδα βρέθηκε να είναι 69.8% (τυπικό σφάλμα [SE] 0.4%), ενώ στη μη ακτινοβολημένη ομάδα ήταν 72.2% (SE 0.3%), ($t = 4.693$, βαθμοί ελευθερίας [DF]: 40, $p < 0.001$, independent samples t-test). Τα αποτελέσματα του μοντέλου ANCOVA ήταν στατιστικά σημαντικά, υποδεικνύοντας ότι υπήρχε ανιχνεύσιμη διαφορά στην υγρή (ενυδατωμένη) μάζα των κερατοειδών μεταξύ των ομάδων ($F = 33.286$, $p < 0,001$).



Εικόνα 27: Διάγραμμα πλαισίου και απολήξεων (θηκόγραμμα) ενυδάτωσης του κερατοειδούς στις δύο ομάδες.

9.1.2. Πάχος κερατοειδών

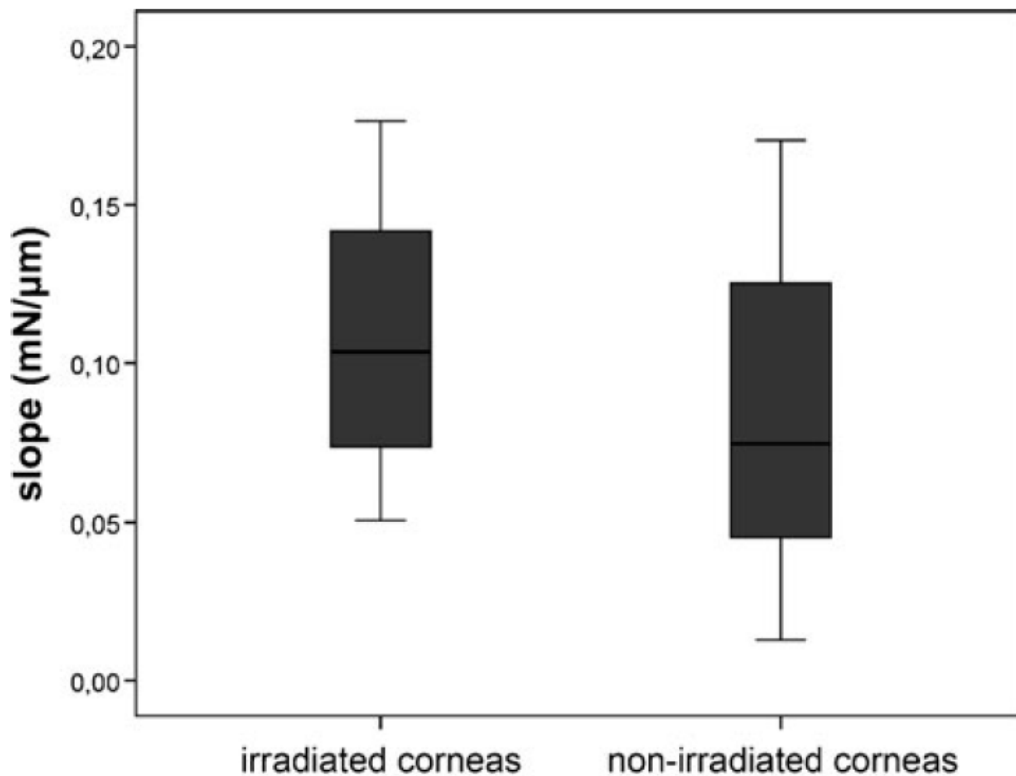
Το πάχος του κερατοειδούς, όπως μετρήθηκε με το ψηφιακό παχύμετρο, ήταν 850 μm (SE 32 μm) στην ομάδα των ακτινοβολημένων κερατοειδών και 899 μm (SE 30 μm) στη ομάδα των μη ακτινοβολημένων κερατοειδών. Η μέση διαφορά μεταξύ των ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($t = 1.111$, $df: 40$, $p=0.273$, independent samples t-test), Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Διάγραμμα πλαισίου και απολήξεων (θηκόγραμμα) παχυμετρίας του κερατοειδούς στις δύο ομάδες.

9.1.3. Συμπιεστικότητα κερατοειδούς

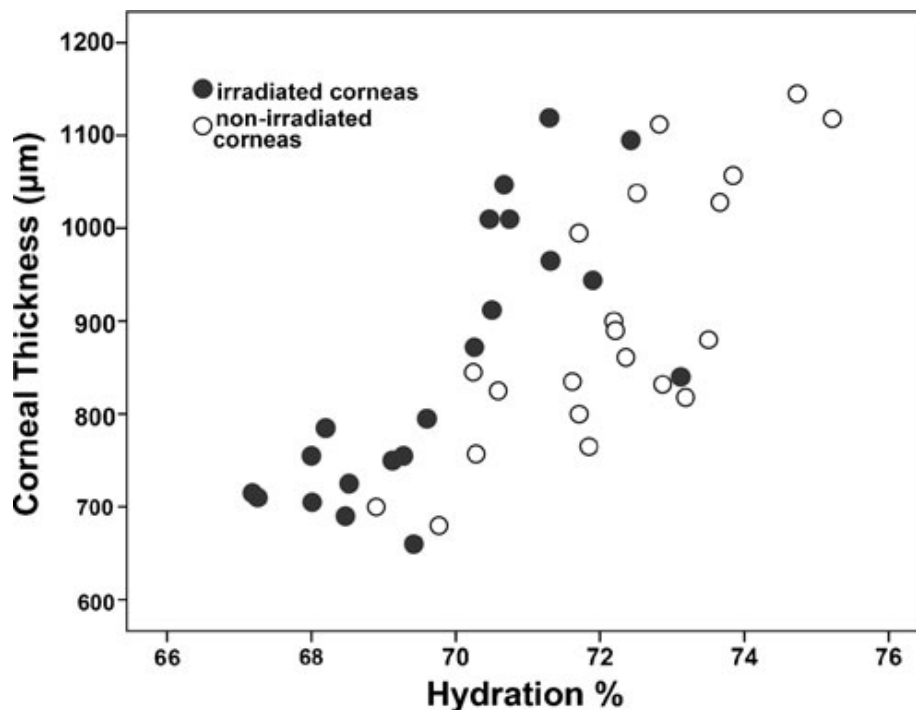
Η μέση κλίση συμπίεσης του κερατοειδούς στην ομάδα υπό ακτινοβολία ήταν 0.11mN/μm (SE 0.01) και στη μη-ακτινοβολημένη ομάδα ήταν 0.08mN/μm (SE 0.01). Παρόλο που οι ακτινοβολημένοι κερατοειδείς είχαν αυξημένη κλίση της καμπύλης σε σχέση με τους μη ακτινοβολημένους, η διαφορά μεταξύ των ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($t = 1.721$, $df: 40$, $p = 0.093$) (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Διάγραμμα πλαισίου και απολήξεων (θηκόγραμμα) για την κλίση της καμπύλης συμπίεσης του κερατοειδούς στις δύο ομάδες.

9.1.4. Ανάλυση συσχέτισης

Η ενυδάτωση του κερατοειδούς βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με το πάχος του κερατοειδούς. Η συσχέτιση ήταν στατιστικά σημαντική. (R κατά Pearson = 0.71, διάστημα εμπιστοσύνης [CI]: 0.52 σε 0.84, $p < 0.001$), (Εικόνα 30). Η συσχέτιση του πάχους του κερατοειδούς με την ενυδάτωση ήταν επίσης στατιστικά σημαντική σε κάθε ομάδα κερατοειδών ξεχωριστά (στην ακτινοβολημένη ομάδα: r κατά Pearson = 0.78, CI 0.53 έως 0.91, $p < 0.001$, στη μη-ακτινοβολημένα ομάδα: r κατά Pearson = 0.74, CI 0.45 έως 0.89, $p < 0.001$). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε μεταξύ της κλίσης συμπίεσης και της ενυδάτωσης (r κατά Pearson = -0.14, CI -0.43 έως 0.17, $p = 0.124$), ούτε μεταξύ της κλίση συμπίεσης και του πάχους του κερατοειδούς (r κατά Pearson = -0.18, CI -0.46 έως 0.13, $p = 0.43$).



Εικόνα 30: Διάγραμμα διασποράς του πάχους κερατοειδούς (σε μm) σε σχέση με την ενυδάτωση (%). Οι μαύρες κουκίδες αντιστοιχούν στους ακτινοβολημένους κερατοειδείς και οι λευκές με μαύρο περίγραμμα στους μη ακτινοβολημένους.

9.2. Κλινικό μέρος, 1^ο σκέλος κλινικής μελέτης

Σαράντα οκτώ ασθενείς (60 οφθαλμοί) με κερατόκωνο περιλήφθηκαν στη μελέτη. Η μέση ηλικία κατά την στιγμή της επέμβασης ήταν 28 ± 5.82 έτη (εύρος 17-39 έτη). η μέση μετεγχειρητική παρακολούθηση ήταν 39 ± 11 μήνες.

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και οι προεγχειρητικές τιμές περιλαμβάνονται στον Πίνακα 2. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων σε όλες τις παραμέτρους εκτός από το κεντρικό πάχος κερατοειδούς δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Για την καλύτερη αντιστοίχιση των ομάδων πραγματοποιήσαμε σύγκριση του σταδίου του κερατοκώνου των ασθενών κάθε ομάδας κατά το σύστημα Amsler-Krumeich (Πίνακας 1). Σύμφωνα με αυτό το σύστημα σταδιοποίησης, ο κερατόκωνος διαιρείται σε 4 στάδια ανάλογα με την διάθλαση, την παχυμετρία, την κερατομετρία και τα κλινικά του χαρακτηριστικά. Έτσι στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου 10 οφθαλμοί είχαν στάδιο 1 κερατοκώνου, 17 οφθαλμοί είχαν στάδιο 2 κερατοκώνου και τρεις οφθαλμοί είχαν στάδιο 3 κερατοκώνου. Στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας 14 οφθαλμοί είχαν στάδιο 1 κέρατο κώνου 14 οφθαλμοί είχαν στάδιο 2 κερατοκώνου και δύο οφθαλμοί είχαν στάδιο 3 κέρατο κώνου. Η σύγκριση των ομάδων με την δοκιμασία χ^2 δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο στάδιο του κερατοκώνου ($P=0.56$).

Stage I
Eccentric steepening
Myopia and astigmatism <5.00 D
Mean central K readings <48.00 D
Stage II
Myopia and astigmatism 5.00-8.00 D
Mean central K readings <53.00 D
Absence of scarring
Minimum corneal thickness >400 μm
Stage III
Myopia and astigmatism 8.00-10.00 D
Mean central K readings >53.00 D
Absence of scarring
Minimum corneal thickness 300-400 μm
Stage IV
Refraction not measurable
Mean central K reading >55.00 D
Central corneal scarring
Minimum corneal thickness 200 μm

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση κερατοκώνου κατά Amsler-Krumeich

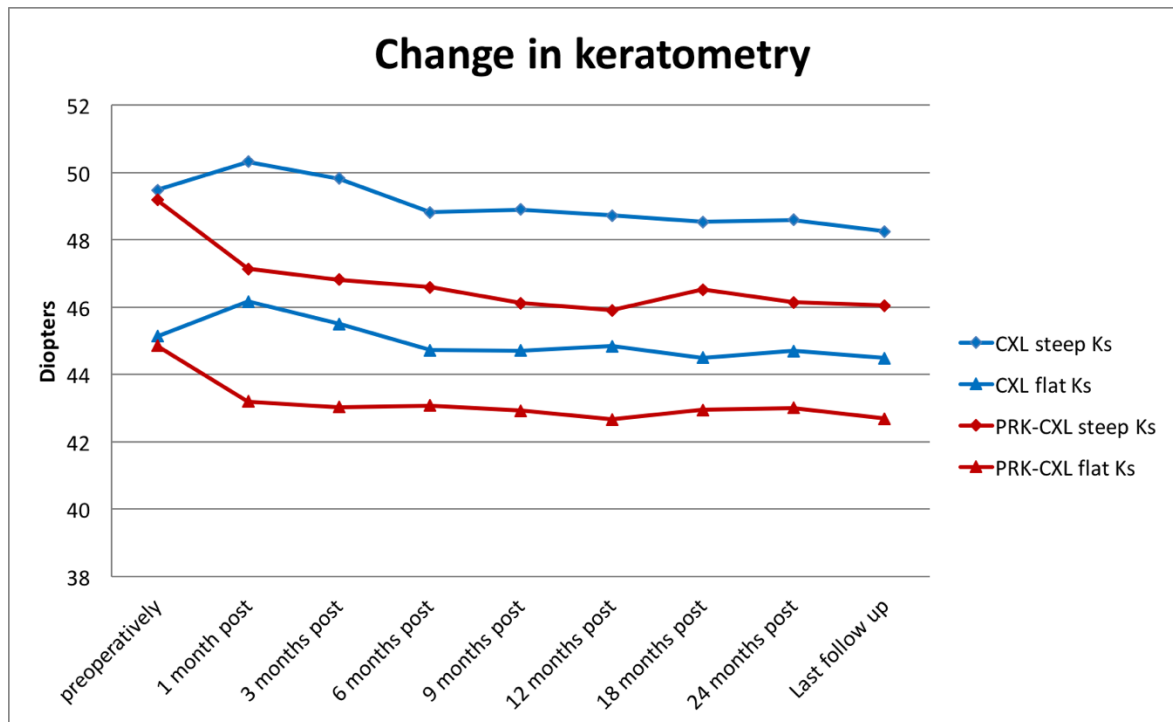
Πίνακας 2: Δημογραφικά στοιχεία και προεγχειρητικές τιμές

Mean±SD	Σύνολο n=60	Ομάδα CXL n=30	Ομάδα PRK- CXL n=30	p [†] - value
Ηλικία (έτη)	28±5.82	28±3.99	27±7.24	0.53
Μετεγχειρητική παρακολούθηση (μήνες)	39±10.89	39±9.34	39±12.41	0.95
Pre-op UDVA (LogMAR)	0.85±0.58	0.86±0.62	0.83±0.54	0.79
Pre-op CDVA (LogMAR)	0.25±0.17	0.24±0.18	0.26±0.17	0.58
Pre-op K1	49.34±3.61	49.48±3.55	49.19±3.73	0.75
Pre-op K2	45±2.49	45.14±2.73	44.85±2.26	0.66
σφαιρικό ισοδύναμο διάθλασης	-3.94±3.55	-4.15±3.46	-3.73±3.69	0.65
ισοδύναμο αφεστίασης	5.82±3.94	6±3.65	5.62±4.27	0.72
κεντρικό πάχος κερατοειδούς (μm)	468±42	448±35	490±38	<0.001
pre-op ECD (cells/mm ²)	2643±237	2674±254	2612±217	0.31
<p>CXL : διασύνδεση κολλαγόνου κερατοειδούς, tPRK: topography guided photorefractive keratectomy, Pre-op: προεγχειρητική, UDVA: οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση, CDVA: οπτική οξύτητα με διόρθωση, ECD: πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων p[†]-value: από τον έλεγχο t-test για την σύγκριση της αντίστοιχης παραμέτρου ανάμεσα στις ομάδες</p>				

Από το σύνολο των ασθενών, 12 χειρουργήθηκαν αμφοτερόπλευρα. Σε οκτώ από αυτούς κάθε οφθαλμός μπήκε σε διαφορετική ομάδα, δύο από αυτούς υπέστησαν αμφοτερόπλευρη CXL και άλλοι δύο που υπέστησαν αμφοτερόπλευρη συνδυασμένη θεραπεία.

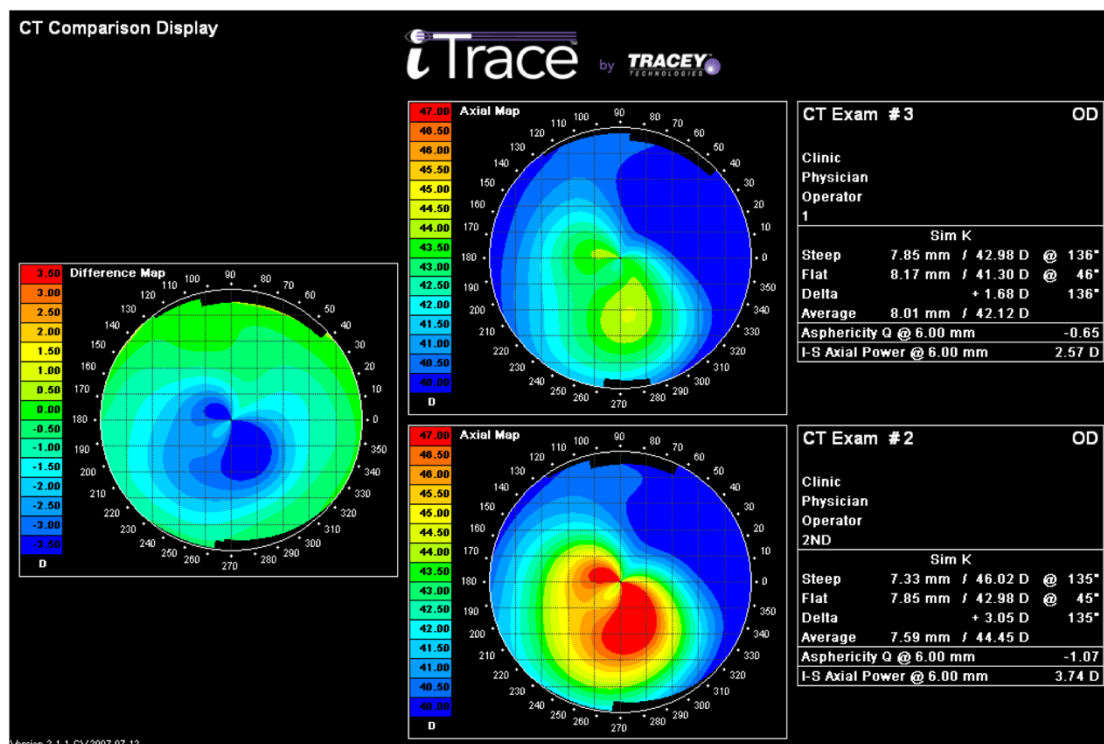
9.2.1. Αποτελέσματα Τοπογραφίας

Κατά την τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη τα κερατομετρικά (steep K1 και flat K2) είχαν επιπεδωθεί και στις δύο ομάδες. Οι διαφορές των μετρήσεων πριν την επέμβαση και κατά την τελευταία μετεγχειρητική παρακολούθηση ήταν στατιστικά σημαντικές, εκτός από την επίπεδη κερατομετρία στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου. Στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου κερατοειδούς η μέση επιπέδωση των κυρτότερων κερατομετρικών (K1) ήταν 1.24D ($p < 0.001$, paired samples t test) και των λιγότερο κυρτών κερατομετρικών (K2) ήταν 0.65D ($p = 0.06$, paired samples t test). Στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας η μέση επιπέδωση στα K1 ήταν 3.38D ($p < 0.0001$, paired samples t test) και στα K2 ήταν 2.37D ($p < 0,0001$, paired samples t test). Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων κατά την τελευταία μετεγχειρητική παρακολούθηση, βρήκαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε K1 και K2. Οι τιμές των K1 και K2 παρουσιάζονται στην εικόνα 31. Οι μετεγχειρητικές τιμές και οι συγκρίσεις με τις αντίστοιχες προεγχειρητικές και μεταξύ των ομάδων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Στις εικόνες 32-36 παρουσιάζονται τοπογραφίες ασθενών πριν και μετά την επέμβαση, καθώς και χάρτες διαφοράς που επιδεικνύουν την βελτίωση στην κερατομετρία καθώς και στην ομαλότητα του κερατοειδούς στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας, και την σταθερότητα και ελαφρά βελτίωση στην ομάδα της απλής CXL.

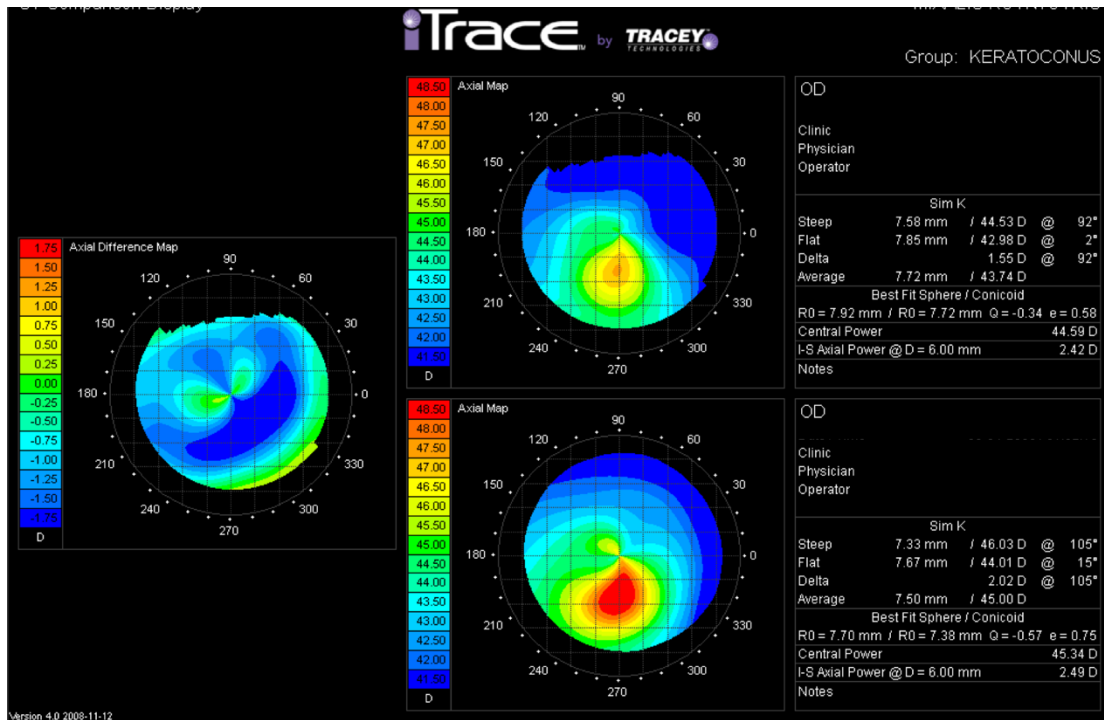


Εικόνα 31: Διάγραμμα εξέλιξης της κερατομετρίας στις δύο ομάδες ασθενών. Με γαλάζιους ρόμβους απεικονίζονται οι τιμές της κυρτότερης κερατομετρίας στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου. Με γαλάζια τρίγωνα απεικονίζονται οι τιμές της λιγότερο κυρτής κερατομετρίας στην ομάδα διασυνδέσεις κολλαγόνου. Με κόκκινους ρόμβους απεικονίζονται οι τιμές της κυρτότερης κερατομετρίας στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Με κόκκινα τρίγωνα απεικονίζονται οι τιμές της λιγότερο κυρτής κερατομετρίας στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Οι τιμές είναι σε διοπτρίες. Οι χρονικές στιγμές στις οποίες αντιστοιχίζονται οι τιμές είναι η προεγχειρητική επίσκεψη και οι επισκέψεις τον πρώτο, τρίτο, έκτο, ένατο, 12^ο, 18^ο, 24^ο μετεγχειρητικό μήνα καθώς και στην τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη του κάθε ασθενούς.

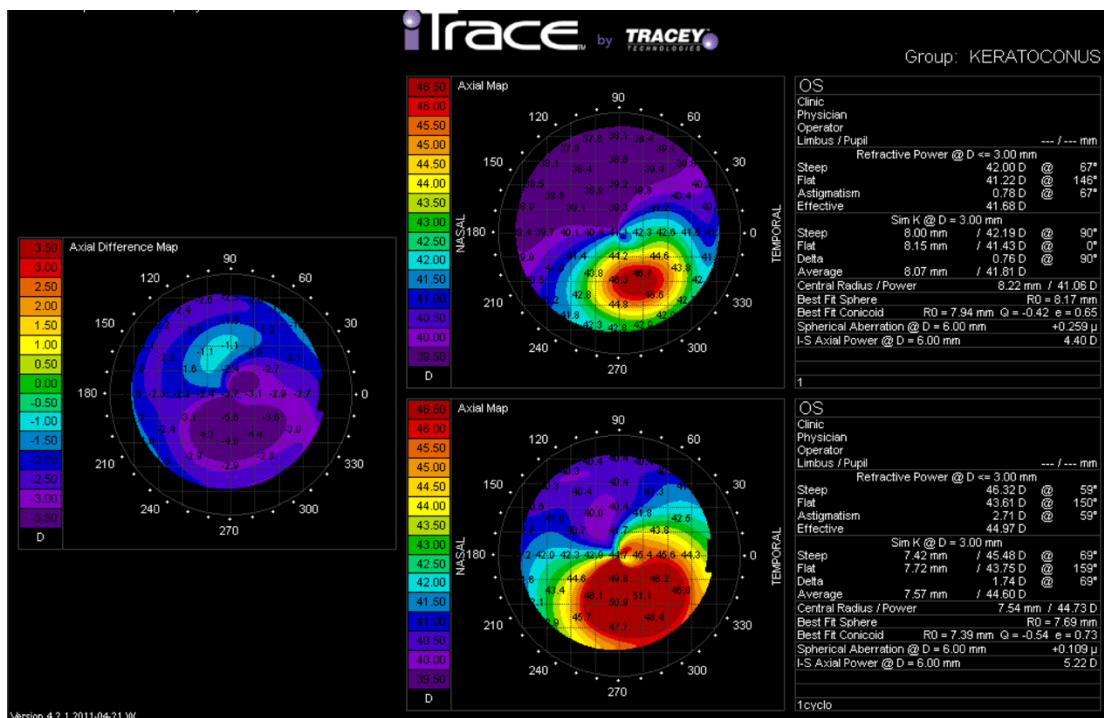
Εικόνες 32-36: Στις εικόνες 32 έως 34 απεικονίζονται χάρτες διαφοράς τοπογραφίας κερατοειδούς ασθενών που υπεβλήθησαν σε συνδυασμένη θεραπεία και στις εικόνες 35 και 36 ασθενών που υπεβλήθησαν σε διασύνδεση μόνο. Σε κάθε εικόνα αριστερά εμφανίζεται ο χάρτης της διαφοράς, κεντρικά και πάνω εμφανίζεται η μετεγχειρητική τοπογραφία και κεντρικά και κάτω εμφανίζεται η προεγχειρητική τοπογραφία. Σε όλες τις εικόνες είναι εμφανής η βελτίωση των κερατομετρικών, πιο σημαντική στους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε συνδυασμένη θεραπεία. Σε κάθε εικόνα δεξιά υπάρχουν οι τιμές των κερατομετρικών για την αντίστοιχη χρονική στιγμή.



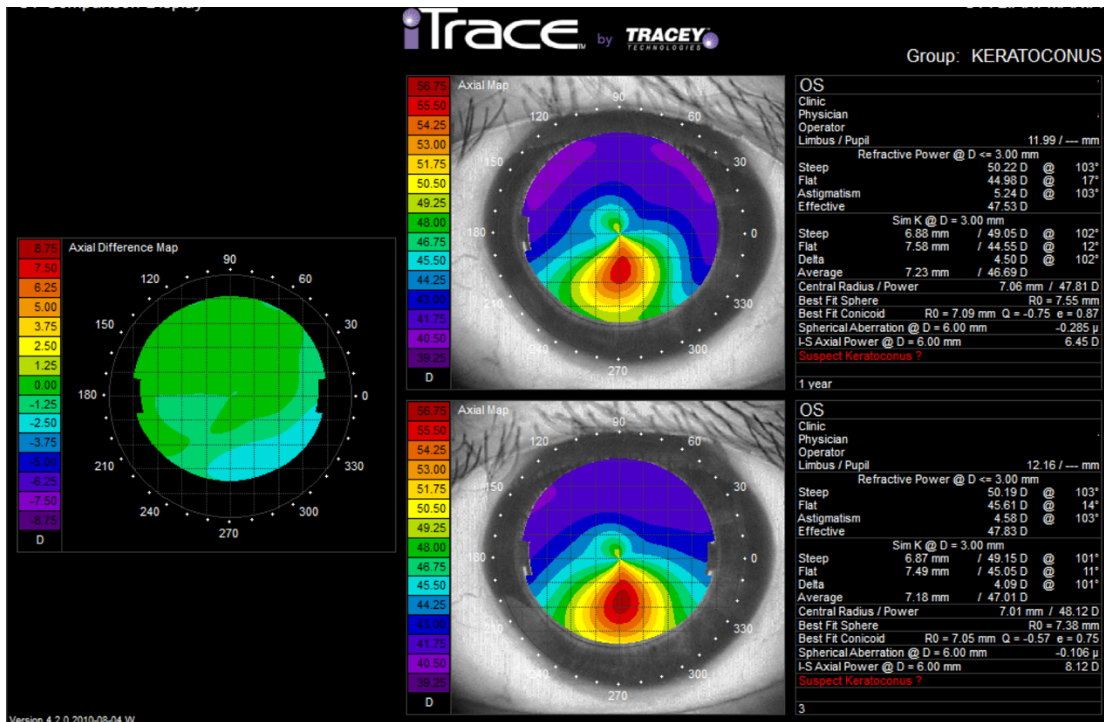
Εικόνα 32



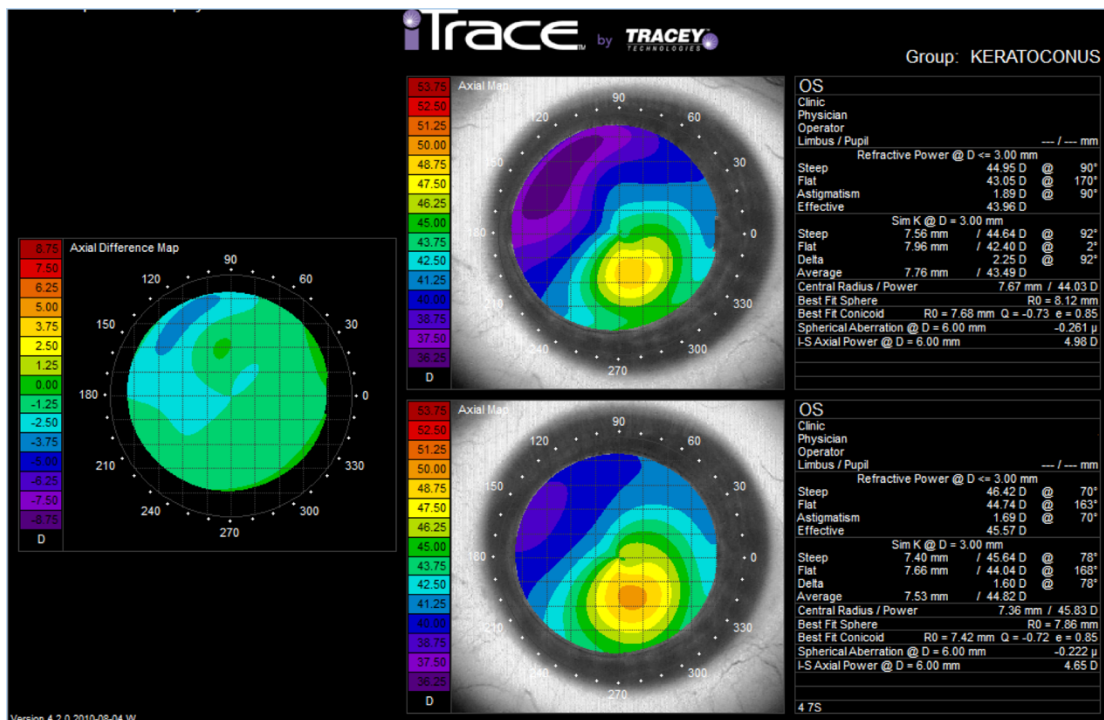
Εικόνα 33



Εικόνα 34



Εικόνα 35



Εικόνα 36

Σε σχέση με την σταθερότητα της τοπογραφίας μετά την επέμβαση, βρήκαμε ότι δύο οφθαλμοί σε κάθε ομάδα (6.7 %) επέδειξαν μια κύρτωση των

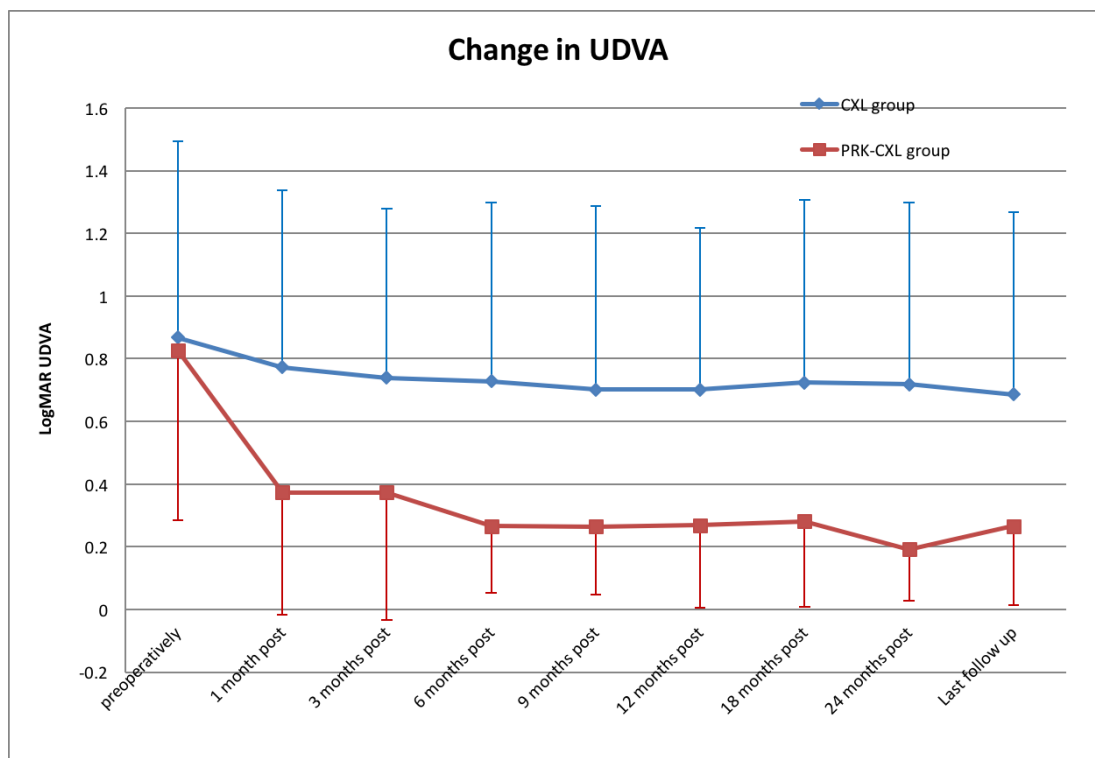
κερατομετρικών μεγαλύτερη από 0.75D κατά τη σύγκριση της τελευταίας μετεγχειρητικής μέτρησης με τη μέτρηση κατά τον έκτο μετεγχειρητικά μήνα άλλα όλοι αυτοί οφθαλμοί είχαν πιο επίπεδα κερατομετρικά σε σχέση με τα προεγχειρητικά στην τελευταία τους επίσκεψη. Επιπρόσθετα, η τοπογραφία τους ήταν σταθερή στις πιο πρόσφατες μετρήσεις. Πιο συγκεκριμένα, μετά τον έκτο μετεγχειρητικά μήνα και μέχρι την τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη στην ομάδα της διασύνδεσης κολλαγόνου υπήρξε μέση επιπέδωση των πιο κυρτών κερατομετρικών της τάξης των 0.6D (SD 0.83) και των λιγότερο κυρτών της τάξης των 0.34D (SD 0.98). Στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας η μέση επιπέδωση των κυρτών κερατομετρικών ήταν 0.42D (SD1.02) και των λιγότερο κυρτών 0.26D (SD 0.80). Οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0.45$, $p=0.72$, independent samples t-test για την σύγκριση των ομάδων στην μεταβολή κυρτών και λιγότερο κυρτών κερατομετρικών αντίστοιχα).

9.2.2. Αποτελέσματα παχυμετρίας κερατοειδούς

Σε σχέση με την παχυμετρία του κερατοειδούς, η διαφορά στη μέση κεντρική παχυμετρία μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική κατά την τελευταία μετεγχειρητική παρακολούθηση ενώ όπως προαναφέρθηκε ήταν στατιστικά σημαντική προεγχειρητικά. Και στις δύο ομάδες η μετεγχειρητική παχυμετρία είχε στατιστικά σημαντική διαφορά με την προεγχειρητική, μολονότι η λέπτυνση που υπέστη ο κερατοειδής από την επέμβαση ήταν αρκετά πιο σημαντική στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας σε σχέση με την ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου. Οι μετεγχειρητικές τιμές και οι συγκρίσεις με τις αντίστοιχες προεγχειρητικές και μεταξύ των ομάδων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

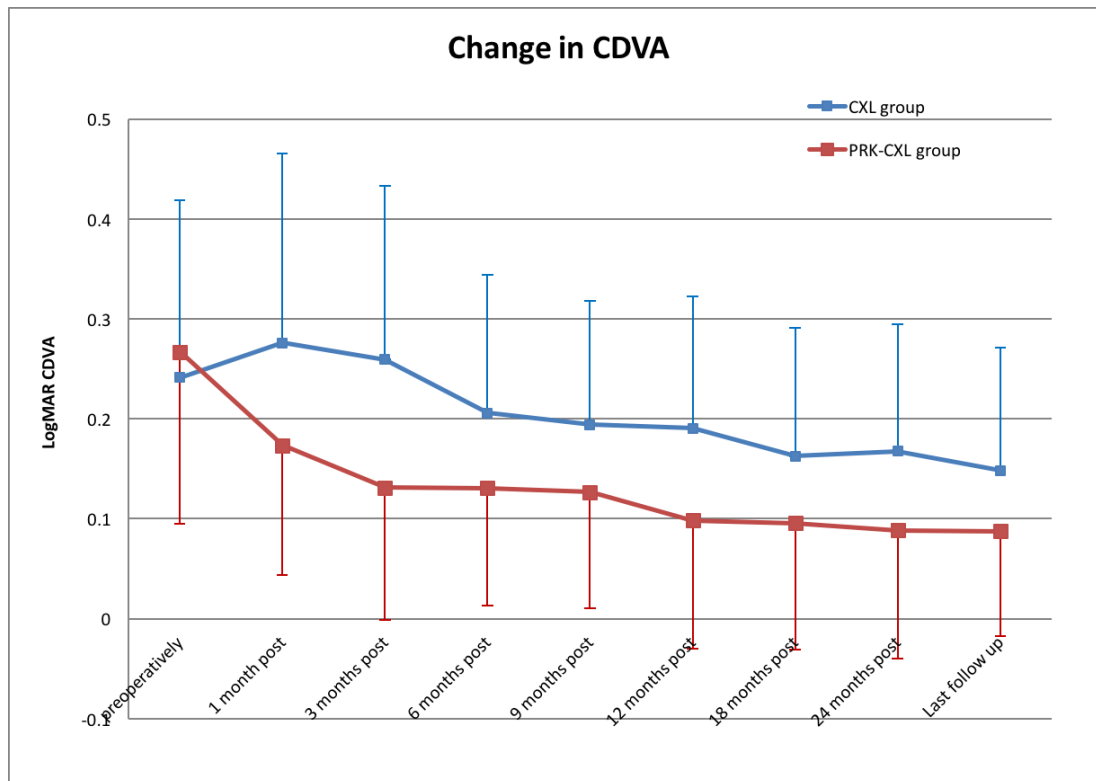
9.2.3. Αποτελέσματα οπτικής οξύτητας

Στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου κατά την τελευταία μετεγχειρητική παρακολούθηση η μέση οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση είχε βελτιωθεί κατά 9.1 γράμματα οπτικής οξύτητας LogMAR (SD 20.84) ενώ στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας η μέση οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση είχε βελτιωθεί κατά 26.9 γράμματα οπτικής οξύτητας LogMAR (SD 24.60), ($p=0.004$, independent samples t-test για τη σύγκριση των δύο ομάδων) (Εικόνα 37). Η post-hoc ανάλυση ισχύος αποκάλυψε ότι η ισχύς της μελέτης σχετικά με αυτή τη σύγκριση ήταν 84.46%.



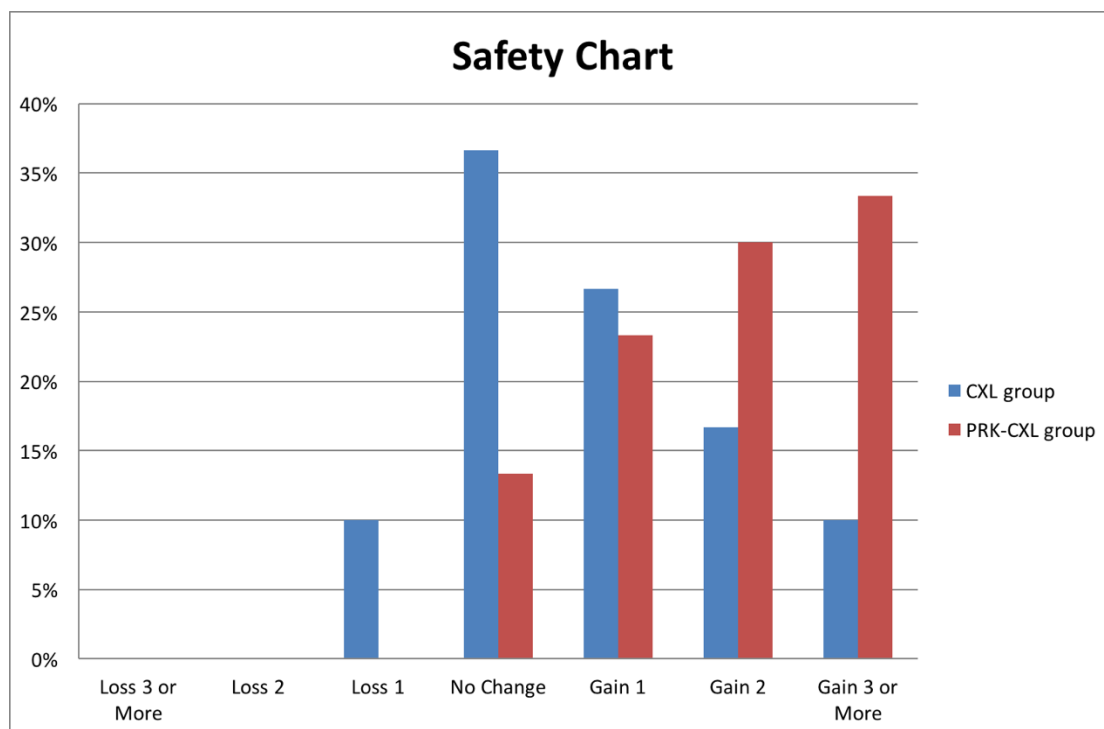
Εικόνα 37: Η μετεγχειρητική πορεία της οπτικής οξύτητας χωρίς διόρθωση (UDVA) και στις δύο ομάδες. Με γαλάζιους ρόμβους απεικονίζονται οι τιμές στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου. Με κόκκινα τετράγωνα απεικονίζονται οι τιμές στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Οι τιμές αντιστοιχούν σε οπτική οξύτητα LogMAR. Οι χρονικές στιγμές στις οποίες αντιστοιχίζονται οι τιμές είναι η προεγχειρητική επίσκεψη και οι επισκέψεις τον 1^ο, 3^ο, 6^ο, 9^ο, 12^ο, 18^ο, 24^ο μετεγχειρητικό μήνα καθώς και στην τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη του κάθε ασθενούς.

Σε σχέση με την βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα, στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου η μέση βελτίωση κατά την τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη σε σχέση με την προεγχειρητική επίσκεψη ήταν 4.7 γράμματα οπτικής οξύτητας LogMAR (SD 7,0) ενώ στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας η αντίστοιχη βελτίωση ήταν 8.6 γράμματα οπτικής οξύτητας LogMAR (SD 6.9), ($p=0.034$ independent samples t-test για τη σύγκριση των δύο ομάδων) (Εικόνα 38). Τα αποτελέσματα περιλαμβάνονται στον Πίνακα 3.



Εικόνα 38: Η μετεγχειρητική πορεία της βέλτιστα διορθωμένης οπτικής οξύτητας (CDVA) και στις δύο ομάδες. Με γαλάζια τετράγωνα απεικονίζονται οι τιμές στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου. Με κόκκινα τετράγωνα απεικονίζονται οι τιμές στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Οι τιμές αντιστοιχούν σε οπτική οξύτητα LogMAR. Οι χρονικές στιγμές στις οποίες αντιστοιχίζονται οι τιμές είναι η προεγχειρητική επίσκεψη και οι επισκέψεις τον πρώτο, τρίτο, έκτο, ένατο, 12^ο, 18^ο, 24^ο μετεγχειρητικό μήνα καθώς και στην τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη του κάθε ασθενούς.

Το ποσοστό των ασθενών που κέρδισαν δυο οι περισσότερες γραμμές βέλτιστα διορθωμένης οπτικής οξύτητας Snellen ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ασθενών που υπεβλήθη σε διασύνδεση κολλαγόνου (27% στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου έναντι 63% στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας, $p = 0.009$, δοκιμασία χ^2). Κανένας οφθαλμός δεν έχασε πάνω από δύο γραμμές οπτικής οξύτητας Snellen και στις δύο ομάδες. Οι μεταβολές οπτικής οξύτητας από την προεγχειρητική στην τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη παρουσιάζονται την Εικόνα 39. Τα αποτελέσματα της οπτικής οξύτητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.



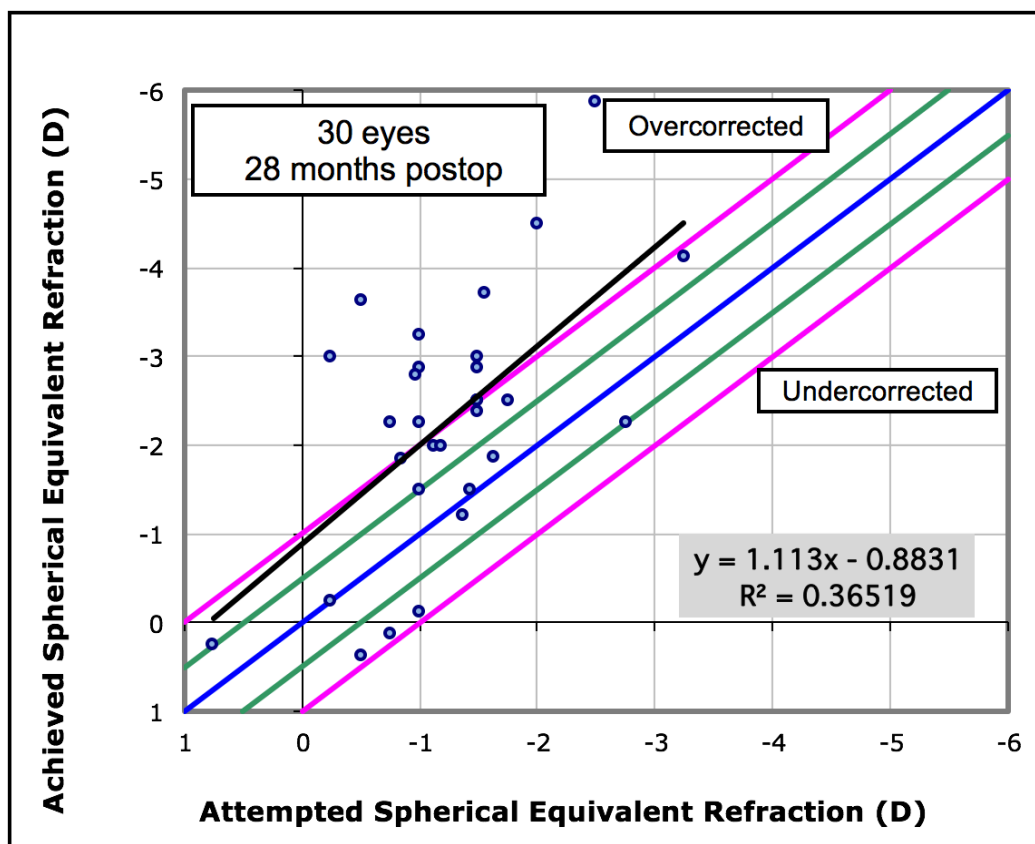
Εικόνα 39: Διάγραμμα ασφάλειας. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή της βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα σε γραμμές οπτικής οξύτητας Snellen. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των ασθενών κάθε ομάδας που είχε την αντίστοιχη μεταβολή. Με γαλάζιο χρώμα είναι τα ποσοστά των ασθενών από την ομάδα της διασύνδεσης κολλαγόνου και με κόκκινο χρώμα τα ποσοστά από την ομάδα συνδυασμένης θεραπείας.

9.2.4. Αποτελέσματα διάθλασης

Αναφορικά με τα διαθλαστικά αποτελέσματα οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες στο σφαιρικό ισοδύναμο διάθλασης και στο ισοδύναμο αφεστίασης κατά την τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0.018$ και $p=0.022$ αντίστοιχα, independent samples t-test). Η διαφορά μεταξύ μετεγχειρητικού και προεγχειρητικού σφαιρικού ισοδύναμου διάθλασης δεν ήταν στατιστικά σημαντική στην ομάδα που υπεβλήθη σε διασύνδεση κολλαγόνου ($p=0.43$, paired samples t-test) ενώ ήταν στατιστικά σημαντική στην ομάδα που υπεβλήθη σε συνδυασμένη θεραπεία ($p<0.0001$, paired samples t-test). Παρομοίως η διαφορά ανάμεσα στο προεγχειρητικό και το μετεγχειρητικό ισοδύναμο αφεστίασης δεν ήταν στατιστικά σημαντική στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου ($p = 0.45$, paired samples t-test) ενώ ήταν στατιστικά σημαντική στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας ($p < 0.0001$,

paired samples t-test). Οι μετεγχειρητικές τιμές και οι συγκρίσεις με τις αντίστοιχες προεγχειρητικές και μεταξύ των ομάδων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

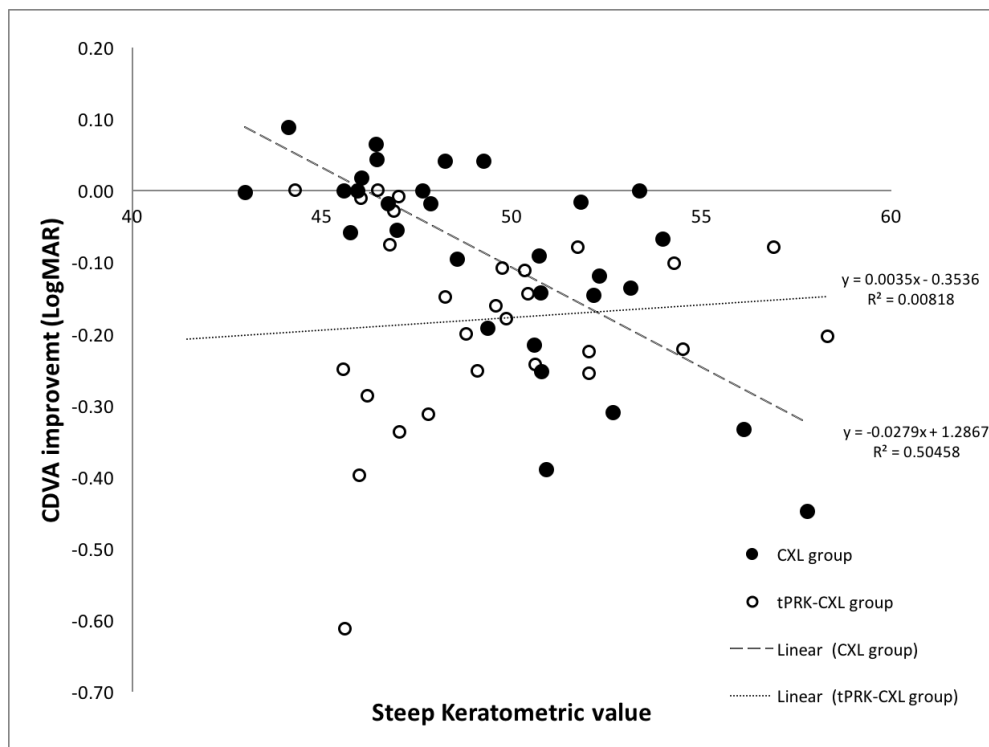
Το μέσο βάθος φωτοαποδόμησης στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας ήταν 33.9 μm (SD 8.9). Στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας η μέση επιδιωκόμενη διόρθωση ήταν -1.23D (SD 0.69) (σφαιρικό ισοδύναμο) ενώ η μέση διόρθωση που επετεύχθη ήταν -2.32D (SD 1.37). Το διάγραμμα της επιδιωκόμενης ως προς επιτυγχανόμενη διόρθωση παρουσιάζεται στην εικόνα 40.



Spherical Equivalent Attempted vs Achieved

Εικόνα 40: Διάγραμμα της επιδιωκόμενης ως προς επιτυγχανόμενη διόρθωση (σφαιρικό ισοδύναμο). Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε έναν οφθαλμό της ομάδας tPRK-CXL. Η περιοχή του διαγράμματος πάνω από την γαλάζια γραμμή αντιστοιχεί σε υπερδιόρθωση ενώ η περιοχή κάτω από την γαλάζια γραμμή σε υποδιόρθωση. Οι πράσινες γραμμές οριοθετούν τους οφθαλμούς με σφάλμα εντός 0.50 διοπτρίας από το στόχο και οι ροζ γραμμές εντός 1 διοπτρίας. Στο γκρι πεδίο σημειώνεται η εξίσωση παλινδρόμησης που αντιστοιχεί στην μαύρη γραμμή (regression line).

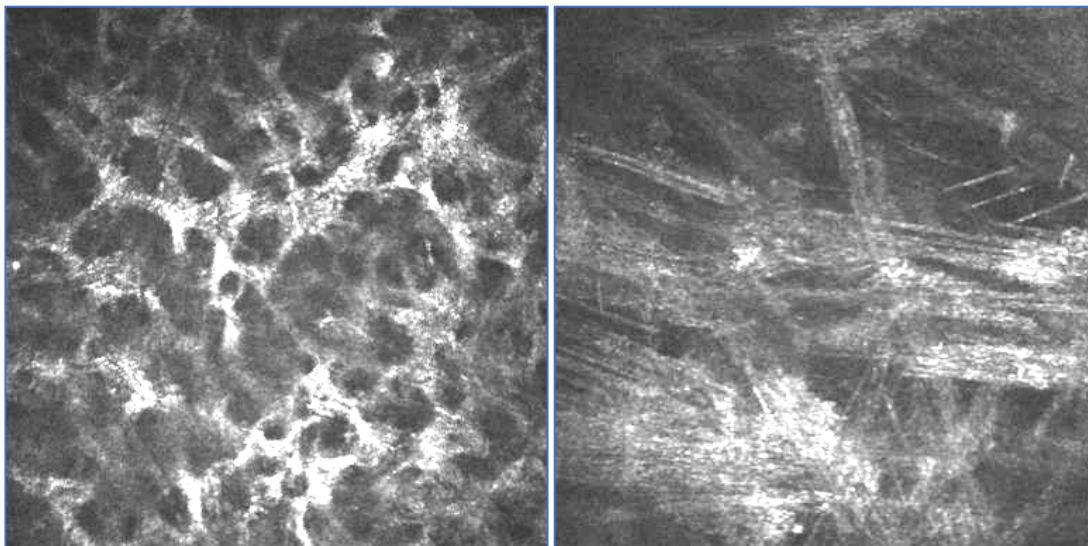
Από την ανάλυση συσχέτισης βρέθηκε ότι βελτίωση στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου σχετίζεται θετικά με στατιστικά σημαντικό τρόπο με την τιμή της προεγχειρητικής κυρτής κερατομετρίας (Pearson's $r=0.71$; $P < 0.0001$). Καμιά άλλη παράμετρος δεν είχε στατιστική σημαντική συσχέτιση με την βελτίωση στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα. Η βελτίωση στην οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση δεν είχε καμιά συσχέτιση με κάποια από της προεγχειρητικές παράμετρος στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας. Η βελτίωση στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα σχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με το βάθος της φωτοαποδόμησης (Pearson's $r=0.58$, $P<0.001$), καθώς και με το πάχος του κερατοειδούς (Pearson's $r=0.51$, $P< 0.006$). Δεν υπήρχε καμιά συσχέτιση της βελτίωσης στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα με την κερατομετρία σε αυτή την ομάδα. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης εμφανίζονται στην εικόνα 41. Η βελτίωση στην οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση επίσης δεν είχε καμιά συσχέτιση με άλλες παραμέτρους. Κάνοντας ανάλυση παλινδρόμησης φάνηκε ότι σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για την βελτίωση στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα ήταν η κυρτή προεγχειρητική κερατομετρία και το βάθος φωτοαποδόμησης ($R^2=0.22$).



Εικόνα 41: Διάγραμμα διασποράς της βελτιώσης στην βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα σε σχέση με την κερατομετρία του πιο κυρτού μεσημβρινού. Με μαύρες κουκίδες απεικονίζονται οι οφθαλμοί της ομάδας διασύνδεσης κολλαγόνου ενώ με λευκές κουκίδες με μαύρο περίγραμμα απεικονίζονται οι οφθαλμοί στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Στην εικόνα εμφανίζεται επίσης η γραμμική παλινδρόμηση που αντιστοιχεί σε κάθε ομάδα ξεχωριστά.

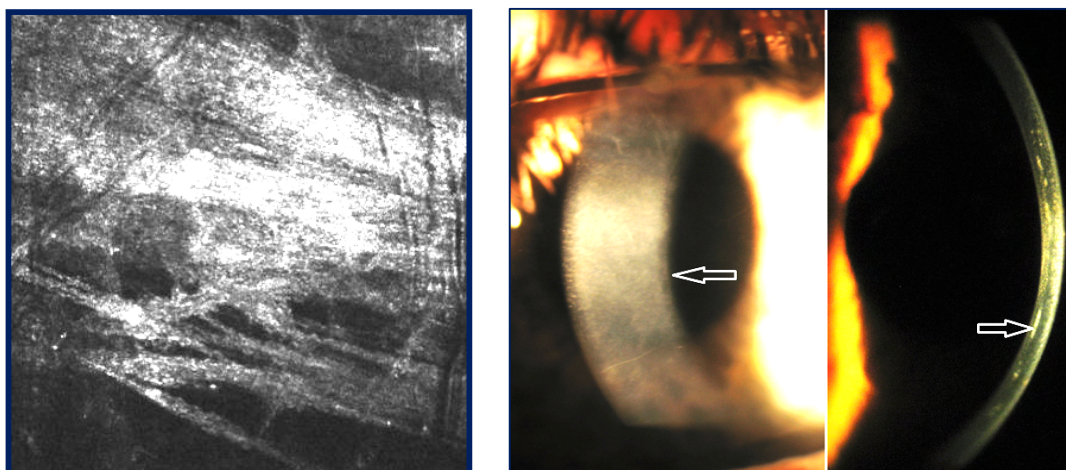
9.2.5. Συνεστιακή μικροσκοπία (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση)

Από την ποιοτική ανάλυση των εικόνων της συνεστιακής μικροσκοπίας παρατηρήσαμε και στις δυο ομάδες ασθενών την χαρακτηριστική κυψελωτή διαμόρφωση το στρώματος, την υπερανακλαστικότητα και την ερήμωση από πυρήνες κερατινοκυττάρων στο πρόσθιο στρώμα ήδη από τον πρώτο έλεγχο ένα μήνα μετεγχειρητικά. Στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας η ανομοιογενής υπερανακλαστικότητα του προσθίου στρώματος ήταν αρκετά πιο σημαντική από ότι στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου.



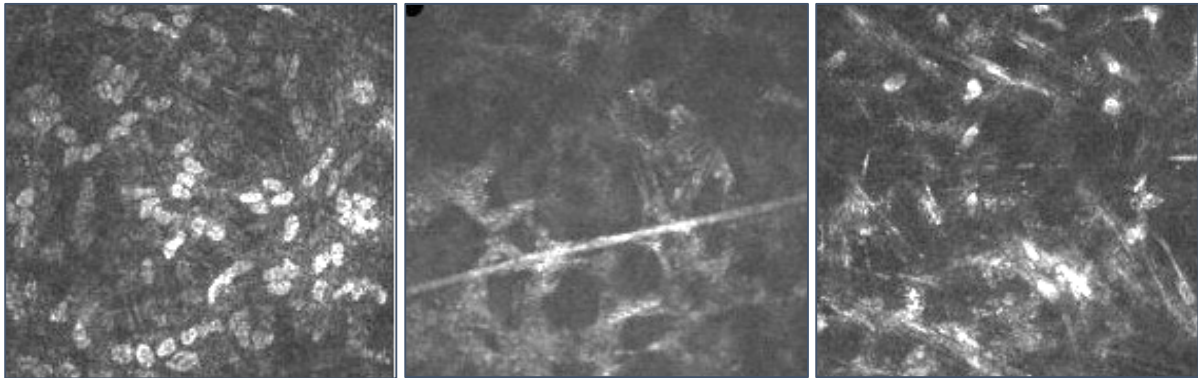
Εικόνα 42: Εικόνες πρόσθιου (αριστερά) και μέσου (δεξιά) στρώματος ασθενούς που υπεβλήθει σε επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου. Αριστερά απεικονίζεται η χαρακτηριστική κυψελωτή διαμόρφωση του στρώματος και δεξιά γραμμοειδείς ακανόνιστες δομές.

Σε 47% των οφθαλμών της ομάδας συνδυασμένης θεραπείας στο επίπεδο του οπισθίου στρώματος βρέθηκαν δομές ατρακτοειδούς και γραμμικού σχήματος με υψηλή ανακλαστικότητα οι οποίες είναι και κλινικά ορατές στην βιομικροσκοπία σαν εντοπισμένη υπερανακλαστικότητα στο επίπεδο του οπίσθιου στρώματος (οπίσθιο νεφέλιο) (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Αριστερά: Εικόνα συναστιακής μικροσκοπίας στο επίπεδο του οπισθίου στρώματος που εμφανίζει δομές ατρακτοειδούς και γραμμικού σχήματος με υψηλή ανακλαστικότητα. Δεξιά: Εικόνα βιομικροσκοπησης στην σχισμοειδή λυχνία. Τα λευκα βέλη δείχνουν τις περιοχές με το οπίσθιο νεφέλιο.

Οι πυρήνες των κερατινοκυττάρων επανεμφανίστηκαν σε όλους τους οφθαλμούς της ομάδας διασύνδεσης κολλαγόνου μέχρι ένα έτος μετεγχειρητικά, ενώ στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας ένα έτος μετεγχειρητικά δεν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε πυρήνες κερατινοκυττάρων στο 43% των οφθαλμών. Δύο χρόνια μετεγχειρητικά 13% των οφθαλμών που υπεβλήθησαν σε συνδυασμένη θεραπεία εξακολουθούσαν να εμφανίζουν ερήμωση από κερατινοκύτταρα στο πρόσθιο στρώμα, ενώ στο 20% των οφθαλμών της ομάδας αυτής είχαμε χαμηλή πυκνότητα πυρήνων κερατινοκυττάρων. Παρομοίως δεν υπήρχαν ανιχνεύσιμες υποεπιθηλιακές νευρικές ίνες σε περίπου 43% των οφθαλμών στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας ένα χρόνο μετεγχειρητικά ενώ σε περίπου 10% των ασθενών της ομάδας αυτής δύο χρόνια μετεγχειρητικά το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα εξακολουθούσε να είναι πολύ δύσκολα ορατό ή σημαντικά διαταραγμένο.



Εικόνα 44: Εικόνες συναστιακής μικροσκοπίας προεγχειρητικά (αριστερά), 1 μήνα μετεγχειρητικά (μέσο) όπου φαίνεται η ερήμωση πυρήνων, και 6 μήνες μετεγχειρητικά (δεξιά) όπου φαίνεται η υπερανακλαστικότητα του στρώματος και η επανεμφάνιση των πυρήνων.

Αναφορικά με την ποσοτική ανάλυση τις συναστιακής μικροσκοπίας βρήκαμε ότι η διαφορά στο βάθος διείσδυσης της διασύνδεσης κολλαγόνου ανάμεσα στις δύο ομάδες ήταν στατιστικά σημαντική, αφού έφτανε στα 269.8 μm (SD 31.8 μm) στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου και στα 299.7 μm (SD 29.8 μm) στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας ($P=0.0008$, independent samples t test). Η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην προεγχειρητική και την μετεγχειρητική τιμή σε κάθε ομάδα ούτε και ανάμεσα στις ομάδες μετά την επέμβαση.

Οι συγκρίσεις των προεγχειρητικών με τις μετεγχειρητικές τιμές και των μετεγχειρητικών τιμών μεταξύ των δύο ομάδων κατά την τελευταία παρακολούθηση συμπεριλαμβάνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Τιμές παραμέτρων μελέτης στην τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη και συγκρίσεις με προεγχειρητικές και μεταξύ των ομάδων

Mean±SD	Ομάδα CXL n=30	Ομάδα PRK- CXL n=30	p [†] -value
Last F/U UDVA (LogMAR)	0.69±0.58	0.27±0.25	0.0008
p* value	0.0009	<0.0001	
Last F/U CDVA (LogMAR)	0.15±0.12	0.09±0.10	0.049
p* value	0.017	<0.001	
Last F/U K1	48.24±3.09	46.05±3.92	0.02
p* value	0.0004	<0.0001	
Last F/U K2	44.49±2.68	42.69±2.53	0.01
p* value	0.06	<0.0001	
Last F/U Sph. Eq.	-3.79±3.73	-1.54±3.30	0.018
p* value	0.43	<0.0001	
Last F/U Def. Eq.	5.61±3.92	3.38±3.19	0.022
p* value	0.45	<0.0001	
Last F/U CCT (μm)	428±52	444±24	0.17
p* value	0.004	<0.0001	
Last F/U ECD (cells/mm ²)	2692±197	2611±205	0.12
p* value	0.56	0.98	

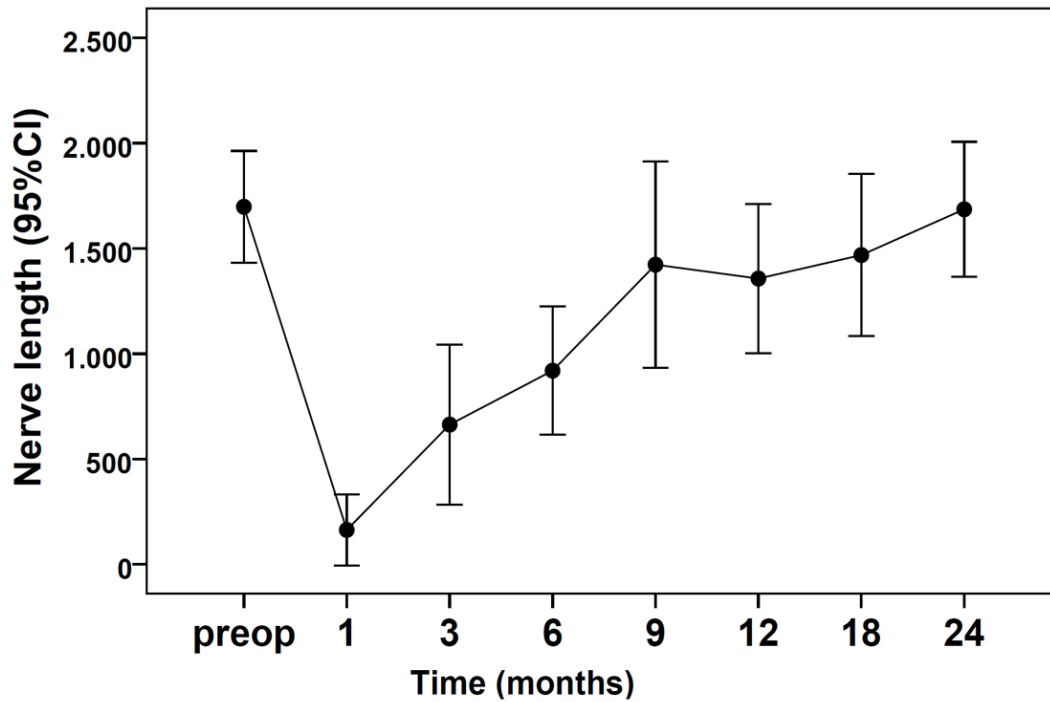
CXL : διασύνδεση κολλαγόνου κερατοειδούς
tPRK: φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή καθοδηγούμενη από την τοπογραφία,
Pre-op: προεγχειρητική,
UDVA: οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση,
CDVA: οπτική οξύτητα με διόρθωση,
ECD: πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων,
Last F/U: τελευταία μετεγχειρητική επίσκεψη,
Sph. Eq.: σφαιρικό ισοδύναμο,
Def. Eq.:ισοδύναμο αφεστίασης, CCT:κεντρικό πάχος κερατοειδούς.
p[†]-value:, για την σύγκριση των τιμών μεταξύ των δύο ομάδων,
independent samples t-test
p* value: για την σύγκριση των αναγραφόμενων τιμών με τις αντίστοιχες προεγχειρητικές paired samples t-test,

9.3. Κλινικό Μέρος, 2^ο σκέλος κλινικής μελέτης

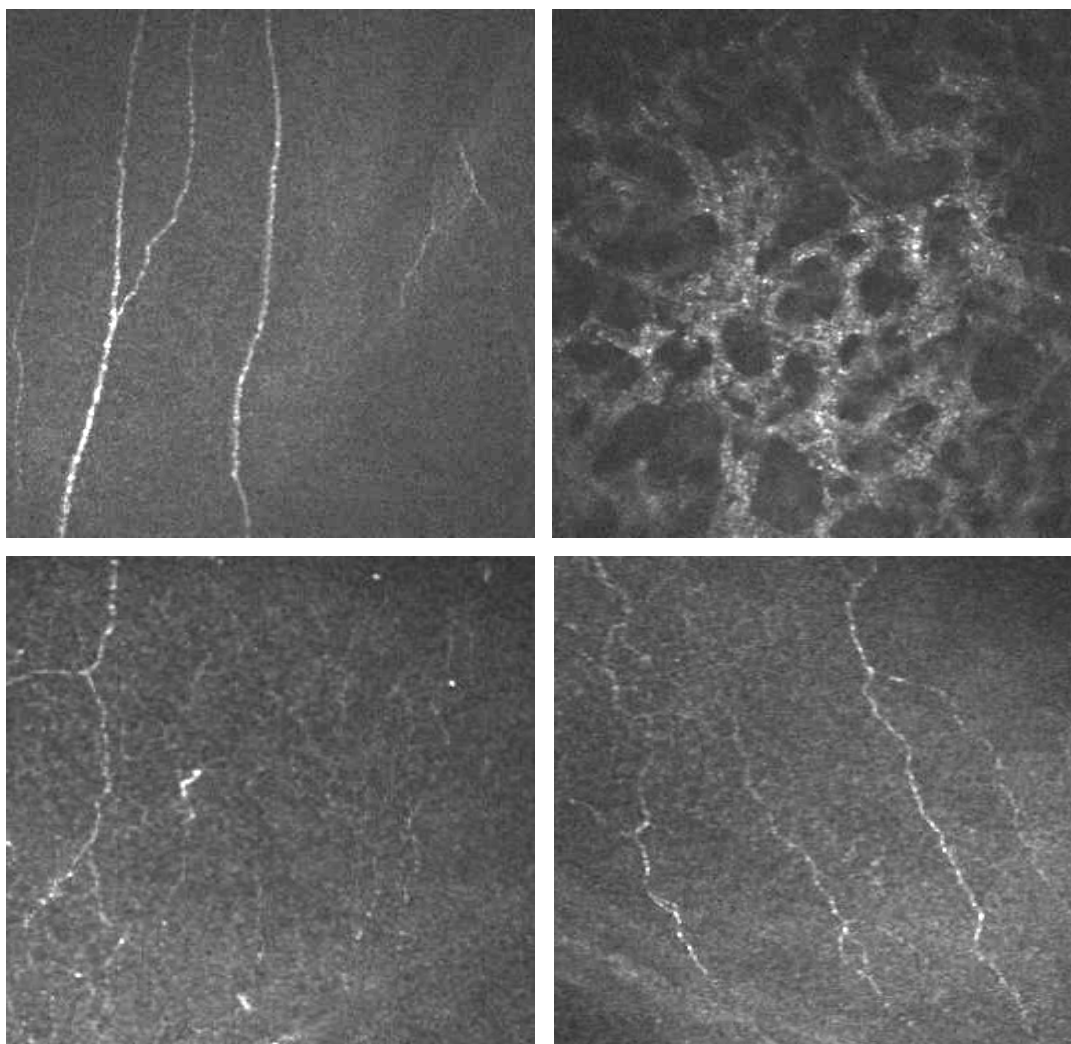
Είκοσι τέσσερις ασθενείς (30 μάτια) με κερατόκωνο περιλήφθηκαν στη μελέτη. Η μέση ηλικία κατά τη στιγμή της διαδικασίας ήταν $25 \pm 4,7$ χρόνια (εύρος 20-36 έτη).

9.3.1. Αποτελέσματα νεύρωσης κερατοειδούς

Οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων των εξετάσεων και οι τιμές p για τη σύγκριση του προεγχειρητικού και της μετεγχειρητικού αποτελέσματος σε κάθε χρονικό σημείο παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Το συνολικό μήκος των νεύρων ανά εικόνα σε κάθε μετεγχειρητικό χρονικό σημείο συγκρίθηκε με τις προεγχειρητικές τιμές μέσω independent samples t-test. Το συνολικό μήκος των νεύρων ανά εικόνα είχε μια στατιστικά σημαντική μείωση κατά τον πρώτο μετεγχειρητικό μήνα, που αντιστοιχεί στην πλήρη απονεύρωση του κερατοειδούς για πολλούς από τους ασθενείς. Στους ακόλουθους μετεγχειρητικούς μήνες, το συνολικό μήκος των νεύρων ανά εικόνα έτεινε να αυξηθεί σταδιακά μέχρι το δεύτερο έτος μετεγχειρητικά όταν αποκαταστάθηκαν πλήρως οι προεγχειρητικές μέσες τιμές (Εικ. 45, Εικ. 46). Παρόλα αυτά, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τις προεγχειρητικές τιμές από την ένατη μετεγχειρητική επίσκεψη και μετά. Στατιστικά σημαντική διαφορά του συνολικού μήκους των νεύρων ανά εικόνα μεταξύ των προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών τιμών βρέθηκε στον 1 μήνα ($p < 0.001$), 3 μήνες ($p < 0.001$) 6 μήνες ($p = 0,001$) μετεγχειρητικά (Πίνακας 4).



Εικόνα 45: Μετεγχειρητική πορεία μέσης τιμής συνολικού μήκους υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος ανά εικόνα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε μια χρονική στιγμή: προεγχειρητικά (preop) και στον 1^ο, 3^ο, 6^ο, 9^ο, 12^ο, 18^ο και 24^ο μετεγχειρητικό μήνα. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης της μέσης τιμής.

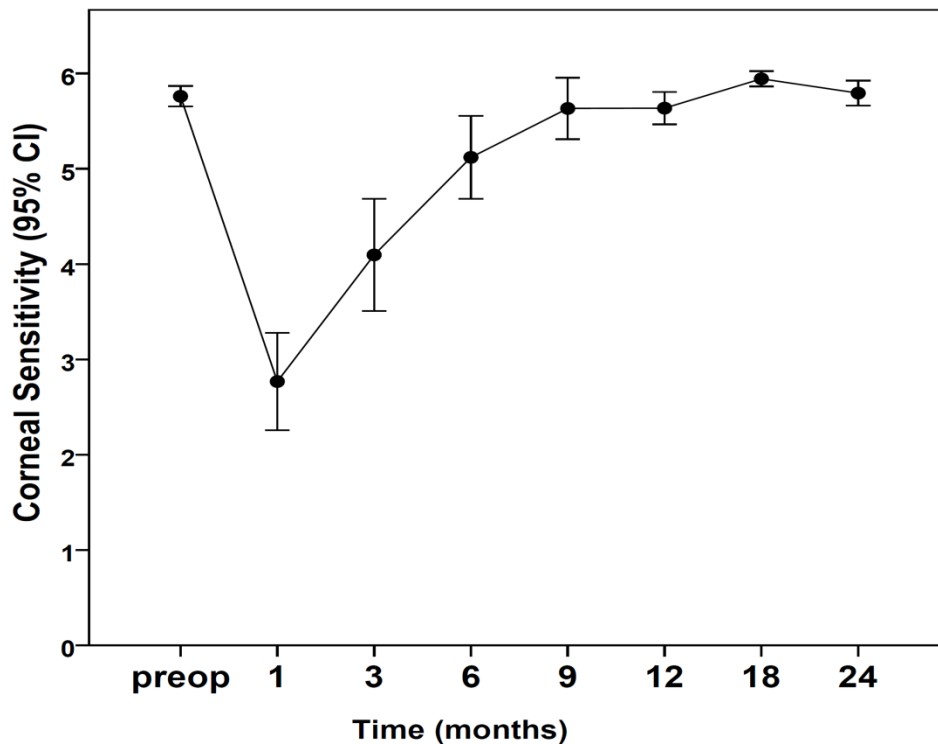


Εικόνα 46: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από το επίπεδο του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος οφθαλμού ασθενούς που υπεβλήθη σε επέμβαση διασύνδεσης κολλαγόνου κερατοειδούς προεγχειρητικά (πάνω αριστερά), ένα μήνα μετεγχειρητικά (πάνω δεξιά), εννέα μήνες μετεγχειρητικά (κάτω αριστερά) και δύο χρόνια μετεγχειρητικά (κάτω δεξιά).

9.3.2. Αποτελέσματα αισθητικότητας κερατοειδούς

Η αισθητικότητα του κερατοειδούς συγκρίθηκε σε κάθε χρονικό σημείο με την προεγχειρητική τιμή με τη δοκιμασία Wilcoxon Signed Rank. Η αισθητικότητα του κερατοειδούς είχε μια σημαντική μείωση κατά μετεγχειρητική επίσκεψη του πρώτου μήνα, με σταδιακή αποκατάσταση των προεγχειρητικών τιμών μέχρι τον ένατο μετεγχειρητικό μήνα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στον πρώτο μετεγχειρητικό μήνα ($p < 0.001$), τρίτο μετεγχειρητικό μήνα ($p < 0.001$) και το έκτο

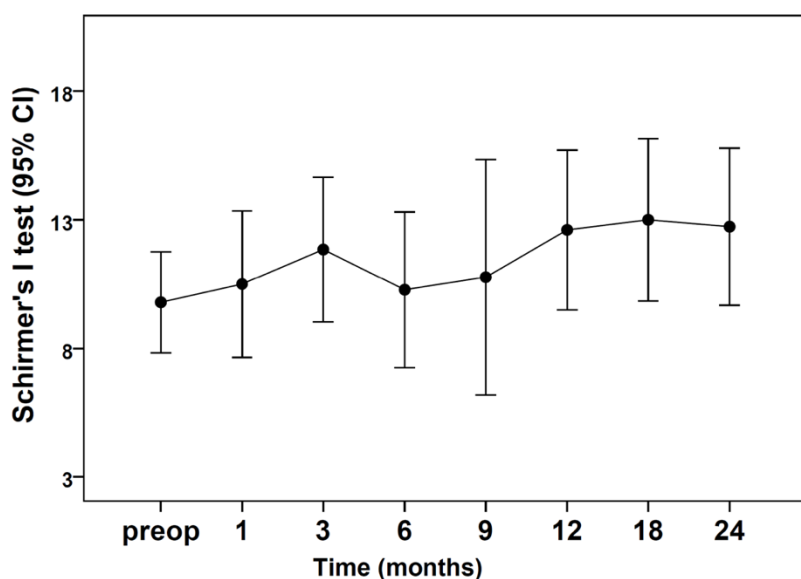
μετεγχειρητικό μήνα ($p = 0.003$). Στους 9, 12, 18 και 24 μήνες, η αισθητικότητα του κερατοειδούς δεν ήταν σημαντικά διαφορετική σε σχέση με τις προεγχειρητικές τιμές. (Πίνακας 4, Εικ. 47).



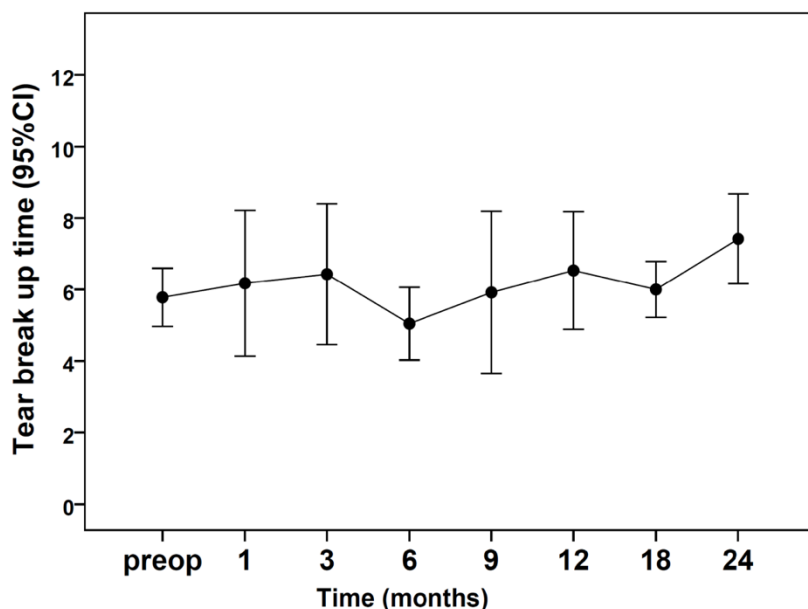
Εικόνα 47: Μετεγχειρητική πορεία μέσης τιμής αισθητικότητας κερατοειδούς. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε μια χρονική στιγμή: προεγχειρητικά (preop) και στον 1^ο, 3^ο, 6^ο, 9^ο, 12^ο, 18^ο και 24^ο μετεγχειρητικό μήνα. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης της μέσης τιμής.

9.3.3. Αποτελέσματα δακρυϊκής στιβάδας

Για τις συγκρίσεις των αποτελεσμάτων του χρόνου διάσπασης δακρυϊκής στιβάδας και του Schirmer's test σε κάθε χρονικό σημείο μετεγχειρητικά με τις προεγχειρητικές τιμές χρησιμοποιήσαμε τα paired samples t-test. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο μεταξύ της προεγχειρητικής και της μετεγχειρητικής τιμής των δύο δοκιμών (Πίνακας 4, Εικόνες 48 και 49).



Εικόνα 48: Μετεγχειρητική πορεία μέσης τιμής αποτελέσματος Schirmer's test. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε μια χρονική στιγμή: προεγχειρητικά (preop) και στον 1^ο, 3^ο, 6^ο, 9^ο, 12^ο, 18^ο και 24^ο μετεγχειρητικό μήνα. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης της μέσης τιμής.



Εικόνα 49: Μετεγχειρητική πορεία μέσης τιμής χρόνου διάσπασης δακρυϊκής στιβάδας. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε μια χρονική στιγμή: προεγχειρητικά (preop) και στον 1^ο, 3^ο, 6^ο, 9^ο, 12^ο, 18^ο και 24^ο μετεγχειρητικό μήνα. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης της μέσης τιμής.

Πίνακας 4: Μέσες τιμές των αποτελεσμάτων και τιμές *p* για τη σύγκριση της προεγχειρητικής και της μετεγχειρητικής τιμής σε κάθε χρονικό σημείο. Η αισθητικότητα παρουσιάζεται ως μέσος όρος (εύρος) και τα άλλα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση). Οι συγκρίσεις της αισθητικότητας έγιναν με *Wilcoxon signed rank test* και τα υπόλοιπα δεδομένα έχουν συγκριθεί με *paired samples t-test*.

Πίνακας 4: Μέσες τιμές και συγκρίσεις προ- και μετ-εγχειρητικών τιμών								
	Pre-op.	1 month	3 months	6 months	9 months	12 months	18 months	24 months
Sensitivity	5.8(5.0-6.0)	2.8(0.5-5.5)	4.1(1.0-6.0)	5.1(2.0-6.0)	5.6(4.0-6.0)	5.6(5.0-6.0)	5.9(5.5-6.0)	5.8(5.5-6.0)
P value		<0.001	<0.001	0.003	0.581	0.290	0.129	0.679
Schirmer's	9.79±6.74	10.50±6.42	11.85±6.967	10.28±6.09	10.77±7.58	12.61±7.18	13.00±6.93	12.73±6.52
P value		0.900	0.144	0.835	0.293	0.430	0.139	0.410
TFBUT	5.78±2.87	6.17±4.70	6.43±4.31	5.04±2.34	5.92±3.58	6.53±2.97	6.00±1.57	7.42±1.97
P value		0.833	0.662	0.112	0.453	0.136	0.629	0.619
Nerve length	1697±670	163±371	663±788	919±549	1422±920	1356±756	1468±798	1685±601
P value		<0.001	<0.001	0.001	0.175	0.214	0.370	0.834

10. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα του πειραματικού μέρους της μελέτης μας επιδεικνύουν ότι η διασύνδεση κερατοειδούς με ριβοφλαβίνη και υπεριώδη ακτινοβολία έχει άμεση επίδραση στην ενυδάτωση του κερατοειδούς αμέσως μετά την διαδικασία. Η φυσιολογική ενυδάτωση των χοίρειων κερατοειδών είναι 71.93% σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες,²⁴⁴ ενώ στις δικές μας ομάδες κερατοειδών η ενυδάτωση ήταν 69% στους ακτινοβολημένους κερατοειδείς και 72% στους μη ακτινοβολημένους μετά από εμφύσηση σε διάλειμμα δεξτράνης 20% (ισότονο διάλειμμα). Σε προηγούμενη μελέτη από τους Wollensak και συν. με την χρήση οπτικής μικροσκοπίας φάνηκε ότι η διασύνδεση κολλαγόνου επιδρά στην εξοίδηση του κερατοειδούς.²³¹ Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα μας άμεσα επιδεικνύουν ότι η διαδικασία αυτή όχι μόνο επιδρά στην εξοίδηση του κερατοειδούς αλλά και στην φυσιολογική ενυδάτωση του.

Η ελαστικότητα του κερατοειδούς έχει δείχθει από προηγούμενες μελέτες ότι σχετίζεται στενά με την ενυδάτωση του.^{245,246} Κερατοειδείς σε οίδηματώδη κατάσταση φαίνεται να έχουν αυξημένη ικανότητα να διαταθούν σε σχέση με φυσιολογικά ενυδατωμένους κερατοειδείς. Εφόσον η ελάττωση στη ενυδάτωση μπορεί να οδηγήσει σε μία ελάττωση στην ελαστικότητα, η ελαττωμένη ενυδάτωση των κερατοειδών που έχουν υποστεί διασύνδεση κολλαγόνου -την οποία διαπιστώσαμε στην παρούσα μελέτη- μπορεί να είναι ένας παράγοντας, έστω και μικρός, που συμμετέχει στην αυξημένη βιομηχανική σταθερότητα που προκαλείται από την διαδικασία.

Τα αποτελέσματα της διασύνδεσης κερατοειδούς έχουν μελετηθεί τελευταία με αυξημένο ενδιαφέρον σε οίδηματώδεις κερατοειδείς μετά από βλάβη του ενδοθηλίου.^{232,247-250} Σύμφωνα με μελέτες μετά την εφαρμογή της διασύνδεσης κερατοειδούς υπάρχει σημαντική βελτίωση στη διαύγεια του κερατοειδούς και μείωση της παχυμετρίας, μολονότι αυτό θεωρείται ότι είναι ένα προσωρινό αποτέλεσμα.^{232,249,250} Τα αποτελέσματα του πειράματος μας επιβεβαιώνουν την κλινική παρατήρηση ότι η ενυδάτωση του κερατοειδούς μειώνεται αμέσως μετά τη διαδικασία.

Σε κερατοειδείς που υποβάλλονται σε διασύνδεση, εκτός από την βελτίωση στην οπτική οξύτητα και την τοπογραφία έχει φανεί από προηγούμενη μελέτη ότι

παρουσιάζουν και μία μείωση στο συνολικό τους όγκο καθώς και στην περιφερική ταχυμετρία όπως αυτή μετριέται με τομογραφία κερατοειδούς.²⁵¹ Αντίθετα, το κεντρικό πάχος κερατοειδούς μπορεί και να μην μειωθεί. Μια προηγούμενη μελέτη δεν βρήκε καμία μεταβολή στο κεντρικό πάχος κερατοειδούς μετά τη διαδικασία όπως αυτό μετριέται με υπερηχητική παχυμετρία και με οπτική τομογραφία συνοχής προσθίου ημιμορίου, αλλά βρήκε διάφορα όπως μετριέται από οπτική τομογραφία, η οποία θεωρήθηκε ότι οφείλεται σε αλλαγές στην ανακλαστικότητα του κερατοειδούς.²⁵² Στην παρούσα πειραματική μελέτη το κεντρικό πάχος βρέθηκε μειωμένο στους κερατοειδείς που υπέστησαν διασύνδεση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αλλά η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ωστόσο, στο κλινικό μέρος της μελέτης μας οι οφθαλμοί που υπέστησαν διασύνδεση κολλαγόνου βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντικά μειωμένο κεντρικό πάχος μετά την επέμβαση. Είναι πιθανό το αποτέλεσμα του πειραματικού σκέλους της μελέτης μας να οφείλεται στο γεγονός ότι οι χοίρειοι κερατοειδείς έχουν πολύ αυξημένο πάχος (σχεδόν διπλάσιο) σε σχέση με τους ανθρώπινους, καθώς και στην μέθοδο μέτρησης του πάχους. Στην πειραματική μας μελέτη το πάχος του κερατοειδούς βρέθηκε να είναι θετικά συσχετιζόμενο με την ενυδάτωση όπως έχει ήδη φανεί στη βιβλιογραφία.²⁵³ Συμπερασματικά, κάποια μείωση στο πάχος του κερατοειδούς αναμένεται μετεγχειρητικά λόγω της μειωμένης ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι είναι πιθανό η μείωση αυτή να αντισταθμίζεται μερικώς από την αύξηση στη διάμετρο των ινιδίων του κολλαγόνου μετά την διασύνδεση, η οποία έχει φανεί σε προηγούμενη μελέτη.^{254,255}

Τα αποτελέσματα του πειράματος μας έδειξαν μικρή, αλλά όχι στατιστικά σημαντική διαφορά στην συμπίεστικότητα του κερατοειδούς. Σε μια προηγούμενη μελέτη οι Wollensak και συν.²⁵⁶ βρήκαν σημαντική αύξηση στη βιομηχανική ισχύ σε χοίρειους και ανθρώπινους κερατοειδείς όπως φάνηκε από τον υπολογισμό του Young's Modulus. Η αύξηση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε ανθρώπους κερατοειδείς από ότι σε χοίρειους. Αυτό αποδόθηκε στο πάχος των χοίρειων κερατοειδών, το οποίο είναι πολύ μεγαλύτερο από των ανθρώπινων, με αποτέλεσμα ένα μικρότερο ποσοστό του συνολικού πάχους να έχει υποβληθεί στην διασύνδεση σε σχέση με τον ανθρώπινο κερατοειδή. Στην παρούσα πειραματική μελέτη υπολογίσαμε την κλίση της καμπύλης δύναμης προς παραμόρφωση στην κάθετη διεύθυνση (συμπίεστικότητα κερατοειδούς) και δεν βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά. Εφόσον η διασύνδεση αφορά τα πρόσθια 300μm του

κερατοειδούς σύμφωνα με τις μελέτες,²⁵⁷ το χαμηλό ποσοστό πάχους του χοίρειου κερατοειδούς που υπέστη τη διασύνδεση μπορεί να ευθύνεται για αυτό το εύρημα.

Επιπρόσθετα, μια προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η διασύνδεση κερατοειδούς δεν προκαλεί αύξηση της συνεκτικής δύναμης μεταξύ των πεταλίων του κερατοειδούς αλλά μόνο την συνοχή μεταξύ των ινιδίων μέσα σε κάθε πετάλιο αυξάνοντας την ακαμψία του κερατοειδούς σε οριζόντια (εφαπτομενική) διεύθυνση. Στην πειραματική μας διάταξη η ακαμψία στην κάθετη διεύθυνσή μετρήθηκε με εμβύθυνση στον κερατοειδή ακίδα με στρόγγυλη άκρη, η οποία προκαλεί μεγαλύτερη παραμόρφωση στα επιφανειακά πετάλια σε σχέση με τα βαθύτερα και συνεπώς μικρή ολίσθηση μεταξύ τους. Άρα η αύξηση της ακαμψία στην κάθετη διεύθυνση είναι αναμενόμενο να εξαρτάται και από αύξηση της συνοχής των πεταλίων, η οποία φαίνεται να μην συμβαίνει.²⁵⁸

Έτσι λοιπόν το πειραματικό σκέλος της μελέτης μας κατέδειξε εργαστηριακά την ελαττωμένη ενυδάτωση των χοίρειων κερατοειδών αμέσως μετά τη διαδικασία της διασύνδεσης κερατοειδούς. Το αποτέλεσμα αυτό μετρήθηκε με απευθείας υπολογισμό της ενυδάτωσης του κερατοειδούς σε χοίρειους κερατοειδείς που υπέστησαν την διαδικασία σε σύγκριση με κερατοειδείς που δεν την υπέστησαν. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να συμμετέχει στην αυξημένη ακαμψία του κερατοειδούς,²⁵⁹ καθώς και σε άλλες ιδιότητες της διαδικασίας όπως η μείωση του όγκου του κερατοειδούς και η χρησιμότητα στην αντιμετώπιση του οιδήματος κερατοειδούς. Επιπρόσθετα η αλλαγή αυτή στην ενυδάτωση του κερατοειδούς, που επηρεάζει το συνολικό όγκο, αναμένεται να επηρεάζει και το διαθλαστικό αποτέλεσμα της επέμβασης καθώς και το αποτέλεσμα του συνδυασμού της επέμβασης με λέιζερ φωτοαποδόμηση. Αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα του κλινικού σκέλους της μελέτης μας όπου φάνηκε ότι υπήρχε σημαντική υπερδιόρθωση στους ασθενείς που υπεβλήθησαν στην συνδυασμένη επέμβαση, μολονότι δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι αυτή είναι η αιτία.

Στο πρώτο σκέλος του κλινικού μέρους της μελέτης μας πραγματοποιήσαμε μια σύγκριση ανάμεσα στο κλασσικό πρωτόκολλο της Δρέσδης για την διασύνδεση κερατοειδούς και στον συνδυασμό του με εξατομικευμένη καθοδηγούμενη από την τοπογραφία φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή προηγηθείσα της διασύνδεσης στον ίδιο χειρουργικό χρόνο. Σύμφωνα με τη μελέτη μας η μη διορθωμένη καθώς και βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα είχαν μία σημαντική βελτίωση στους οφθαλμούς που υπεβλήθησαν στη συνδυασμένη επέμβαση σε σύγκριση με τους οφθαλμούς που

υπεβλήθησαν στην απλή διασύνδεση μολονότι και αυτοί βελτιώθηκαν. Σε σχέση με την οπτική οξύτητα, η βελτίωση ήταν πολύ πιο σημαντική στην μη διορθωμένη οπτική οξύτητα (UDVA) η οποία βελτιώθηκε κατά εννέα γράμματα στην ομάδα της διασύνδεσης και κατά 27 γράμματα στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας, ενώ η βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα βελτιώθηκε κατά πέντε γράμματα στην ομάδα διασύνδεσης και κατά εννέα γράμματα στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Και για τις δύο παραμέτρους τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με προηγούμενες μελέτες συνδυασμένης θεραπείας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, ασθενείς που αντιμετωπίζονται έστω και με πολύ μικρή φωτοαποδόμηση σε συνδυασμό με διασύνδεση έχουν σημαντικό πλεονέκτημα στην όρασή τους χωρίς να χάνουν το όφελος της σταθερότητας μετά τη διασύνδεση. Το λέιζερ στερεάς κατάστασης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη επέδειξε ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει παρόμοιο αποτέλεσμα όσον αφορά στην φωτοαποδόμηση συγκρινόμενο με τα λέιζερ διεγερμένων διμερών.^{238,239} Σε προηγούμενη μελέτη με λέιζερ διεγερμένων διμερών και παρόμοιο σχεδιασμό με τη δικιά μας επίσης βρέθηκε σημαντική βελτίωση της όρασης των ασθενών σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε συνδυασμένη θεραπεία σε σύγκριση με ασθενείς που υπεβλήθησαν σε διασύνδεση κολλαγόνου.²⁶⁰

Προηγούμενες μελέτες οφθαλμών που υπεβλήθησαν σε διασύνδεση επέδειξαν ότι υπάρχει σταθερότητα στην οπτική οξύτητα χωρίς διόρθωση μετά την επέμβαση η ακόμα και μικρή βελτίωση. Μια προηγούμενη αναδρομική μελέτη επέδειξε βελτίωση της τάξης του 0.15 LogMAR στην βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα σε τρία χρόνια,²²⁶ ενώ μια άλλη μελέτη έδειξε βελτίωση 0.09 LogMAR στην βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα σε τρία χρόνια και 0.15 LogMAR στην μη διορθωμένη οπτική οξύτητα.²²⁸ Παρομοίως με αυτές τις μελέτες, η παρούσα μελέτη κατέδειξε βελτίωση κατά 0.09 LogMAR και κατά 0.18 LogMAR στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα και στην μη διορθωμένη οπτική οξύτητα, αντίστοιχα, των οφθαλμών που υπεβλήθησαν σε απλή διασύνδεση.

Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη τυχαιοποιημένη πολυκεντρική κλινική δοκιμή της διασύνδεσης κερατοειδούς συγκριτικά με ομάδα ελέγχου, που πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες, βρέθηκε βελτίωση κατά 0.11 LogMAR στην βέλτιστη διορθωμένη οπτική οξύτητα και κατά 0.09 LogMAR στην μη διορθωμένη οπτική οξύτητα ένα χρόνο μετά την διασύνδεση.²⁶¹ Η δική μας μελέτη με μεγαλύτερο χρόνο παρακολούθησης έδωσε παρόμοια αποτελέσματα.

Σχετικά με την τοπογραφία και την κερατομετρία και οι δύο ομάδες είχαν βελτίωση αλλά στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας η επιπέδωση ήταν πιο έντονη λόγω της φωτοαποδόμησης. Έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσει κανείς ότι στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου τον πρώτο μετεγχειρητικό μήνα, όπως φαίνεται στην εικόνα 31, υπάρχει έντονη κύρτωση η οποία μπορεί να αποδοθεί στην υπερπλασία του επιθηλίου ή σε οίδημα μετά την επέμβαση. Στην πρόσφατη πολυκεντρική τυχαιοποιημένη συγκριτική κλινική δοκιμή της διασυνδέσεως κολλαγόνου το εύρημα της κύρτωσης στον πρώτο μήνα επιβεβαιώθηκε, ενώ η συνολική επιπέδωση ένα χρόνο μετεγχειρητικά στην κυρτή κερατομετρία ήταν 1.6 διοπτρίες, πολύ κοντά δηλαδή στο δικό μας αποτέλεσμα.²⁶¹ Η συνεχόμενη επιπέδωση στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας από το πρώτο έως τον έκτο μετεγχειρητικό μήνα μπορεί να αποδοθεί σε υποστροφή της επιθηλιακής υπερπλασίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας υπάρχει σημαντικό όφελος σε σχέση με την επιπέδωση του κερατοειδούς σε οφθαλμούς που υπεβλήθησαν στη συνδυασμένη θεραπεία σε σύγκριση με τους οφθαλμούς που υπεβλήθησαν στη διασύνδεση κολλαγόνου η οποία αντιστοιχεί και με την βελτίωση της οπτικής οξύτητας. Η βελτίωση στην βέλτιστα διορθωμένη οπτική οξύτητα καθώς και το κέρδος σε γραμμές οπτικής οξύτητας Snellen στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας μπορεί να αποδοθεί στην εξατομίκευση της φωτοαποδόμησης και στην επακόλουθη βελτίωση της τοπογραφικής ανωμαλίας.

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι ότι σε σχέση με την τοπογραφική σταθερότητα μετά την επέμβαση δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε διαφοροποίηση ανάμεσα στους οφθαλμούς που αντιμετωπίστηκαν με διασύνδεση κολλαγόνου και τους οφθαλμούς που αντιμετωπίστηκαν με την συνδυασμένη θεραπεία, αφού και οι δύο ομάδες επέδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με ικανοποιητική σταθερότητα της τοπογραφίας μετά τον έκτο μετεγχειρητικό μήνα. Μπορούμε να συμπεράνουμε λοιπόν ότι η επιφανειακή φωτοαποδόμηση, με τον τρόπο που πραγματοποιήθηκε στην μελέτη μας δεν υποβαθμίζει το κλινικό αποτέλεσμα της διασύνδεσης κερατοειδούς ως προς την σταθερότητα.

Παρομοίως, μεγάλη σημασία έχουν τα αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής συγκριτικής αξιολόγησης του αποτελέσματος της διασύνδεσης κολλαγόνου στην μικροανατομία του κερατοειδούς στις δύο ομάδες, όπως αυτό φαίνεται στην συνεστιακή μικροσκοπία. Από τις εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας βρήκαμε τη χαρακτηριστική ερήμωση από πυρήνες κερατοκυττάρων

καθώς και την χαρακτηριστική κυψελωτή υπερανακλαστική διαμόρφωση του προσθίου στρώματος η οποία αποδίδεται στην αυξημένη ορατότητα και το οίδημα στο κύτταροπλασμα των κερατοκυττάρων που έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες.^{230,262-264} Η επανεμφάνιση των πυρήνων των κερατοκυττάρων στο πρόσθιο στρώμα ήταν αρκετά πιο καθυστερημένη στους κερατοειδείς της ομάδας συνδυασμένης θεραπείας παρά στην ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου. Η ορατότητα του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος ήταν πτωχή ή κατακερματισμένη σε αντίθεση με την ομάδα διασύνδεσης κολλαγόνου στην οποία το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα ήταν ήδη ορατό από τον τρίτο έως έκτο μετεγχειρητικά μήνα.²³⁰ Όμοια αποτελέσματα βρήκαμε και από το δεύτερο σκέλος της κλινικής μελέτης μας όπου εμβαθύνουμε περισσότερο και με αριθμητική ανάλυση στην επίδραση της διασύνδεσης κολλαγόνου στο υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα.²⁶⁵

Η υπερανακλαστικότητα του προσθίου στρώματος ήταν πιο έντονη στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας. Επιπρόσθετα βρήκαμε στο οπίσθιο στρώμα σε 47% των οφθαλμών στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας ότι υπήρχε περιοχή με γραμμοειδείς και ατρακτοειδείς δομές με υψηλή ανακλαστικότητα. Αυτές οι δομές είχαν συσχετιστεί σε προηγούμενη μελέτη με μετανάστευση και ενεργοποίηση κερατοκυττάρων και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου, αποδιοργάνωση του κολλαγόνου και παραγωγή περίσσειας εξωκυττάριας ουσίας από τα ενεργοποιημένα κερατοκύτταρα του οπίσθιου στρώματος.²⁶⁶ Κλινικά αυτό μπορεί να παρατηρηθεί από την βιομικροσκόπηση στην σχισμοειδή λυχνία ως ήπιο νεφέλιο στο οπίσθιο στρώμα αρκετά εντοπισμένο. Το οπίσθιο νεφέλιο σταδιακά γίνεται πιο ήπιο και μετακινείται προς τα εμπρός στους περισσότερους ασθενείς.

Από την ποσοτική αξιολόγηση της συνεστιακής μικροσκοπίας στο σκέλος αυτό της κλινικής μας μελέτης βρήκαμε ότι το βάθος διείσδυσης της διασύνδεσης κολλαγόνου στον κερατοειδή ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στους οφθαλμούς που αντιμετωπίστηκαν με την συνδυασμένη θεραπεία σε σύγκριση με τους οφθαλμούς που αντιμετωπίστηκαν μόνο με την διασύνδεση. Αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ένα τέτοιο εύρημα. Επιπρόσθετα βρήκαμε ότι η επίδραση της συνδυασμένης θεραπείας στα κερατοκύτταρα ήταν πιο έντονη και διήρκεσε περισσότερο από ότι η αντίστοιχη επίδραση της απλής διασύνδεσης. Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μια πιο ισχυρή δράση της διασύνδεσης κολλαγόνου λόγω τις φωτοαποδόμησης της στιβάδας του Bowman. Σε μια

προηγούμενη μελέτη η έλλειψη της στιβάδας Bowman έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για βαθύτερη διείσδυση της ριβοφλαβίνης στο στρώμα του κερατοειδούς.²⁶⁴

Επιπρόσθετα αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι η έλλειψη της στιβάδας αυτής, μετά από φωτοαποδόμηση μπορεί να διευκολύνει μεγαλύτερη διείσδυση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο στρώμα του κερατοειδούς, εφόσον στο φυσιολογικό κερατοειδή η στιβάδα Bowman απορροφά σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας αυτής.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν επηρεάστηκε σε καμία από τις δυο ομάδες επιδεικνύοντας έτσι ότι όταν οι προϋποθέσεις ασφαλείας, που αφορούν στο πάχος του κερατοειδούς, τηρούνται, η συνδυασμένη θεραπεία όσο και η απλή διασύνδεση είναι ασφαλείς για το ενδοθήλιο.

Ο σημαντικότερος προβληματισμός κατά το σχεδιασμό της συνδυασμένης θεραπείας ήταν το μετεγχειρητικό πάχος κερατοειδούς. Η φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή σχεδιάστηκε βασισμένη στο πάχος του κερατοειδούς κάθε ασθενούς με μέγιστο βάθος τα 50 μm ενώ η διόρθωση στόχος διαμορφώθηκε έτσι ώστε να αφαιρεθεί ο ελάχιστος δυνατός ιστός. Γνωρίζοντας από προηγούμενη πιλοτική μελέτη¹²¹ ότι συνδυασμένη θεραπεία οδήγησε σε διαθλαστική υπερδιόρθωση αποφασίσαμε να διορθώσουμε έως 33% το σφαιρώματος και έως 66% του αστιγματισμού ενώ και το ποσοστό εξατομίκευσης διαμορφώθηκε ανάλογα με το πάχος του κερατοειδούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επίσης έδειξαν ότι η συνδυασμένη θεραπεία οδηγεί σε υπερδιόρθωση διαθλαστικά. Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι το μέγιστο βάθος φωτοαποδόμησης πρέπει να είναι τα 50 μm εφόσον παραμένουν 400 μm υπολειπόμενου στρώματος για να γίνει με ασφάλεια για το ενδοθήλιο η διασύνδεση κολλαγόνου.^{121,260,270}

Λόγω του περιορισμού στο υπολειπόμενο πάχος μετά την φωτοαποδόμηση δεν μπορέσαμε να κάνουμε τυχαιοποίηση κατά την κατανομή των ασθενών, κάτι που θεωρητικά θα μπορούσε να εισάγει συστηματικό σφάλμα στην συγκριτική μελέτη και αποτελεί ένα πιθανό περιορισμό της μελέτης μας. Παρ' όλα αυτά οι δύο ομάδες είχαν αντιστοιχηθεί όσον αφορά το στάδιο το κερατοκώννου, καθώς και την ηλικία.²⁷¹ Ένας ακόμα περιορισμός της μελέτης αυτής είναι ότι δεν συμπεριλάβαμε έναν οφθαλμό από κάθε ασθενή αλλά κάποιοι χειρουργήθηκαν αμφοτερόπλευρα. Σε κάθε ομάδα δύο ασθενείς (4 οφθαλμοί) είχαν υποστεί αμφοτερόπλευρη θεραπεία, κάτι που μπορεί να θεωρηθεί μειονέκτημα της στατιστικής μας ανάλυσης,²⁷² μολονότι ο κερατόκωννος είναι μια ασύμμετρη πάθηση.

Κατά συνέπεια το πρώτο σκέλος του κλινικού μέρους της παρούσας μελέτης επέδειξε ότι ο συνδυασμός τις διασύνδεσης κολλαγόνο με εξατομικευμένη φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή με το λέιζερ Στερεάς κατάστασης οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της οπτικής οξύτητας των ασθενών και διακοπή της εξέλιξης του κερατοκώνου. Η επίδραση της διασύνδεσης κολλαγόνου όταν ακολουθεί την φωτοαποδόμηση όπως πραγματοποιήθηκε στη μελέτη μας φαίνεται να είναι πιο ισχυρή σε σχέση με την επίδραση της διασύνδεσης κολλαγόνου κατά το πρωτόκολλο της Δρέσδης με βάση τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπιάς.

Στο δεύτερο σκέλος της κλινικής μας μελέτης η ποσοτική ανάλυση των εικόνων του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος από την συνεστιακή μικροσκοπία αποκάλυψε ότι η νεύρωση του κερατοειδούς μειώνεται σημαντικά τον πρώτο μεταχειρητικό μήνα και αποκαθίσταται σταδιακά σε επίπεδα παρόμοια με τα προεγχειρητικά μέχρι τον ένατο περίπου μήνα. Οι εικόνες πάρθηκαν από το κεντρικό κερατοειδή επιδεικνύοντας την πυκνότητα νευρικών ινών στην περιοχή σε κάθε χρονική στιγμή και όχι την προέλευση και την πορεία της αποκατάστασης συγκεκριμένων νεύρων. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συνάδουν με τα αποτελέσματα προηγούμενων ποιοτικών αναλύσεων συνεστιακής μικροσκοπιάς σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε διασύνδεση κολλαγόνου. Σε μια προηγούμενη ποιοτική μελέτη φάνηκε ότι η νεύρωση του κερατοειδούς ξεκινάει να επανέρχεται τον τρίτο μήνα μετά τη διασύνδεση κολλαγόνου.²³⁰ Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι σε αντίθεση με το πρώτο μήνα, τα νεύρα είναι ορατά στον τρίτο μήνα αλλά όχι ακόμα στην πυκνότητα που είχαν προεγχειρητικά. Σε μια άλλη μελέτη²⁶² αναφέρεται μια πιο γρήγορη ανάκαμψη του υποεπιθηλιακού νευρικού πλέγματος ήδη από τον πρώτο μήνα η οποία ολοκληρώθηκε έξι μήνες μετεγχειρητικά, αλλά όχι στα προεγχειρητικά επίπεδα μέχρι δύο χρόνια μετά τη διαδικασία. Στη δική μας ποσοτική μελέτη το συνολικό μήκος νευρικών ινών ανά εικόνα έχει αυξητική τάση μέχρι και τον 24^ο μετεγχειρητικό μήνα παρόλο που ήδη από τον ένατο μετεγχειρητικό μήνα δεν είχαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τις προεγχειρητικές μετρήσεις.

Αναφορικά με την αισθητικότητα η μελέτη μας απέδειξε ότι υπάρχει μια σημαντική προσωρινή υποαισθησία μετεγχειρητικά όπως αναμένεται από την προσωρινή απονεύρωση. Στην ομάδα των ασθενών που συμπεριελήφθησαν σε αυτό το μέρος της μελέτης ανιχνεύσαμε πολύ σημαντική μείωση στην αισθητικότητα ένα μήνα μετεγχειρητικά η οποία σταδιακά επανήλθε μέχρι τον ένατο μετεγχειρητικό μήνα.

Σε μια πρόσφατη μελέτη της αισθητικότητας και της νεύρωσης του κερατοειδούς μετά από διασύνδεση κολλαγόνου σε κουνέλια,²⁷³ φάνηκε ότι η αισθητικότητα επανέκτησε φυσιολογικές τιμές 90 ημέρες μετά το χειρουργείο και η πυκνότητα νευρικών ινών επανήλθε στο φυσιολογικό μετά από 180 ημέρες. Στη δική μας μελέτη τόσο η αισθητικότητα όσο και η πυκνότητα των νευρικών ινών χρειάστηκαν εννέα μήνες για να επανέλθουν σε περίπου φυσιολογικό επίπεδο.

Σε άλλες διαθλαστικές επεμβάσεις μελέτες αναφέρονται ποικίλες χρονικές περίοδοι για την αποκατάσταση της αισθητικής λειτουργίας και της νεύρωσης του κερατοειδούς. Στην φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή και την epi-LASIK η αισθητικότητα γυρνάει στο προεγχειρητικό επίπεδο περίπου τρεις έως έξι μήνες μετά το χειρουργείο ενώ στην LASIK αναφέρεται ότι χρειάζεται από έξι μήνες έως περισσότερο από ένα χρόνο για την αποκατάσταση της αισθητικότητας του κερατοειδούς.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Σε σχέση με την πυκνότητα των υποεπιθηλιακών νευρικών ινών σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες χρειάζεται έως δύο χρόνια μετά από PRK και πέντε χρόνια μετά από LASIK για να επανέλθει πλήρως. Οι διαφορές στη χρονική διάρκεια της αποκατάστασης της νεύρωσης ανάμεσα σε διαφορετικές χειρουργικές τεχνικές μπορεί να οφείλονται στην διαφορά τόσο της αιτίας όσο και της έκτασης της αρχικής βλάβης στις νευρικές ίνες.^{106,107}

Η απονεύρωση του κερατοειδούς αποτελεί αιτία για την ξηροφθαλμία που είναι μια από τις πιο γνωστές επιπλοκές της διαθλαστικής χειρουργικής και της χειρουργικής του κερατοειδούς. Οι ασθενείς αναφέρουν ξηρότητα και αίσθημα ξένου σώματος και τα αποτελέσματα του Schirmer's τεστ και του χρόνου διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας μπορεί να είναι παθολογικά έως και τρεις έως έξι μήνες μετά από επέμβαση. Τα ευρήματα αυτά είναι πιο έντονα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε LASIK σε σχέση με ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε επιφανειακές τεχνικές.⁹⁸⁻¹⁰¹ Σε μια μελέτη μετά από epi-LASIK φάνηκε ότι δεν υπάρχει μείωση στο Schirmer's τεστ αλλά υπάρχει μια μικρή μείωση στο χρόνο διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας τον πρώτο μετεχειρητικό μήνα.⁷³ Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε μείωση στο Schirmer's τεστ αλλά όχι στο χρόνο διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε PRK.¹⁰¹ Στη δικιά μας μελέτη παρόλο που η αισθητικότητα μειώθηκε τα αποτελέσματα δείχνουν ότι βασική έκκριση δακρύων και ο χρόνος διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας δεν επηρεάζονται από την διασύνδεση κολλαγόνου. Ωστόσο οι ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη είχαν λάβει οδηγία να χρησιμοποιούν τεχνητά δάκρυα χωρίς συντηρητικά και μπορεί αυτό να

επηρέασε θετικά το αποτέλεσμα της δακρυϊκής στιβάδας. Επίσης μπορεί η αισθητικότητα του περιφερικού μέρος του κερατοειδούς που δεν επηρεάστηκε από την επέμβαση ή ακόμα και η ανώμαλη δραστηριότητα των ακρωτηριασμένων νεύρων να συμμετέχουν στη διατήρηση της παραγωγής δακρύων.²⁷⁴

Μια σημαντική παράμετρος που αφορά την ασφάλεια των ασθενών υποβάλλονται σε επεμβάσεις διασύνδεσης κολλαγόνου είναι το γεγονός ότι ασθενείς με κερατόκωνο φαίνεται να έχουν διαταραγμένη νεύρωση, αισθητικότητα και λειτουργία της δακρυϊκής στιβάδας.²⁰⁰⁻²⁰³ Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι αισθητικότητα είναι μειωμένη σε όλες τις ζώνες του κερατοειδούς των ασθενών και μάλιστα αναλογικά με το στάδιο της νόσου.²⁰⁴ Ο Dogru και οι συνεργάτες του²⁰⁰ έδειξαν ότι οφθαλμοί με κερατόκωνο έχουν χαμηλότερη πυκνότητα καλυκοειδών κυττάρων. Σε συμφωνία με αυτό οι συγγραφείς βρήκαν ότι οι ασθενείς αυτοί έχουν σημαντικά χαμηλότερο χρόνο διάσπασης δακρυϊκής στιβάδας μολονότι δεν είχαν μείωση στα αποτελέσματα του Schirmer's test. Στη δικιά μας ομάδα ασθενών η αισθητικότητα φαίνεται να είναι φυσιολογική προεγχειρητικά, μολονότι δεν συγκρίθηκε με ομάδα ελέγχου φυσιολογικών κερατοειδών. Ωστόσο αυτό ήταν αναμενόμενο εφόσον οι περισσότεροι από τους ασθενείς στην ομάδα μελέτης είχαν αρχόμενο στάδιο κερατοκώνου. Η βασική έκκριση δακρύων φαίνεται να είναι φυσιολογική στους ασθενείς μας προεγχειρητικά^{73,99} ενώ ο χρόνος διάσπασης δακρυϊκής στιβάδας φαίνεται να είναι μειωμένος σε συμφωνία με τα ευρήματα της μελέτης του Dogru και των συνεργατών του.²⁰⁰ Θεωρητικά η μειωμένη αισθητικότητα θα μπορούσε μετεγχειρητικά να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα ξηροφθαλμίας στους ασθενείς που υποβάλλονται σε διασύνδεση κολλαγόνου αλλά τα αποτελέσματα της μελέτης μας επιδεικνύουν ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει.

Σε σχέση με το υποεπιθηλιακό νευρικό πλέγμα μελέτες με συνεστιακή μικροσκοπία έχουν δείξει ότι η διαμόρφωση του είναι αρκετά επηρεασμένη και ανώμαλη σε ασθενείς με κερατόκωνο κάτι το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει την φυσιολογική του ανάκαμψη μετά από μια επέμβαση. Η ανωμαλία στη μορφή των νευρικών ινών σχετίζεται με το στάδιο το κερατόκωνου.²⁰¹⁻²⁰³ Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι το υποπιθηλιακό νευρικό πλέγμα διατηρεί την δυνατότητα να επανέλθει σε επίπεδα παρόμοια με τα προεγχειρητικά μετά την επέμβαση της διασύνδεσης κολλαγόνου.

Η χρήση φακών επαφής θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα μας και στα δύο σκέλη της κλινικής μελέτης.²⁴¹ Για να αποφύγουμε το πρόβλημα αυτό

ζητήσαμε από τους ασθενείς να παραμείνουν χωρίς φακούς επαφής για αρκετές εβδομάδες πριν από κάθε εξέταση. Είναι πιθανό ότι ασθενείς που συνεχίζουν χρήση φακών επαφής μετά τη διασύνδεση κολλαγόνου να έχουν διαφορετική χρονική πορεία στην αποκατάσταση της αισθητικότητας και τις νεύρωσης του κερατοειδούς.

Ένας σημαντικός περιορισμός στο δεύτερο σκέλος της κλινικής μελέτης είναι ότι χρησιμοποιήσαμε μόνο την αισθησιόμετρο Cochet-Bonnet για την παρακολούθηση της αισθητικότητας του κερατοειδούς. Το όργανο αυτό είναι ένα αισθησιόμετρο επαφής το οποίο προκαλεί μηχανικό ερέθισμα στην επιφάνεια του κερατοειδούς και ερεθίζει τους αντίστοιχους υποδοχείς. Κατά συνέπεια η αισθητικότητα για ερεθίσματα χημικά και θερμοκρασίας δε ελέγχθηκε. Άλλα όργανα όπως το αισθησιόμετρο αέρος θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό.^{275,276} Επίσης το αισθησιόμετρο Cochet-Bonnet δεν μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές αλλαγές στην αισθητικότητα ούτε και υπερευαισθησία το κερατοειδούς εφόσον έχει έναν ελάχιστο ουδό ανίχνευσης που είναι παρόμοιος με τον φυσιολογικό για τους περισσότερους ανθρώπους. Επιπρόσθετα, στο δεύτερο σκέλος της κλινικής μελέτης αυτής συμπεριλάβαμε 3 ασθενείς (6 οφθαλμούς) που είχαν υποστεί αμφοτερό-πλευρη θεραπεία,²⁷² κάτι που αποτελεί επιπλέον περιορισμό μολονότι ο κερατόκωνος είναι ασύμμετρη πάθηση.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδωσε επιπλέον στοιχεία στην βιβλιογραφία για την επίδραση στην φυσιολογία του κερατοειδούς μιας σχετικά νέας και πολύ δημοφιλούς χειρουργικής τεχνικής, της διασύνδεσης κολλαγόνου κερατοειδούς, καθώς και για τον συνδυασμό της με την διαθλαστική χειρουργική με λέιζερ. Η μεταβολή της ενυδάτωσης, που καταδείξαμε εργαστηριακά, είναι μια παράμετρος που πιθανόν να συμμετέχει στην αύξηση της ακαμψίας. Σε κλινικό επίπεδο, με βάση την παρούσα μελέτη η επέμβαση φαίνεται να επηρεάζει προσωρινά την νεύρωση και την αισθητικότητά του κερατοειδούς, ένα εύρημα που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν πραγματοποιείται η επέμβαση, έτσι ώστε να ενημερώνονται σωστά οι ασθενείς και να δίδεται η κατάλληλη μετεγχειρητική θεραπεία. Ο συνδυασμός της διασύνδεσης με PRK καθοδηγούμενο από την τοπογραφία με το λέιζερ στερεάς κατάστασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της όρασης των ασθενών εφόσον πληρούνται οι προϋποθέσεις, μιας και έχει πολύ καλά οπτικά αποτελέσματα, φαινομενικά μεγαλύτερη διείσδυση και ισοδύναμο αποτέλεσμα ως προς σταθερότητα σε σχέση με την απλή επέμβαση.

11. Βιβλιογραφία

1. MAURICE DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957;136(2):263–86.
2. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011;37(3):588–98.
3. Ehlers N, Hjortdal J. *The Cornea. Epithelium and Stroma*. 2005.
4. Rüfer F, Schröder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: Normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* 2005;24(3).
5. Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res* 1970;10(1).
6. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res* 2015;49:1–16.
7. Knupp C, Pinali C, Lewis PN, et al. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2009;78:25–49.
8. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010;91(3):326–35.
9. Levin LA, Adler FH. *Adler’s physiology of the eye*.
10. Rüfer F, Schröder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: Normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* 2005;24(3).
11. Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res* 1970;10(1):107–8.
12. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, et al. The cellular basis of corneal transparency: Evidence for “corneal crystallins.” *J Cell Sci* 1999;112(5).
13. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet’s layer (Dua’s Layer). *Ophthalmology* 2013;120(9).
14. Wiley L, SundarRaj N, Sun T-T, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: An immunohistochemical evaluation. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(3).
15. Thoft RA, Wiley LA, Sundarraj N. The multipotential cells of the limbus. *Eye*

- 1989;3(2).
16. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SCG. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 2007;17(1).
 17. Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology*.
 18. Hanna C, Bicknell DS, O'brien JE. Cell Turnover in the Adult Human Eye. *Arch Ophthalmol* 1961;65(5).
 19. Dohlman CH. The function of the corneal epithelium in health and disease. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Invest Ophthalmol* 1971;10(6).
 20. Wilson SA, Last A. Management of corneal abrasions. *Am Fam Physician* 2004;70(1):123–8.
 21. Mishima S. Corneal thickness. *Surv Ophthalmol* 1968;13(2).
 22. Schmoll T, Unterhuber A, Kolbitsch C, Le T, Stingl A, Leitgeb R. Precise thickness measurements of bowman's layer, epithelium, and tear film. *Optom Vis Sci* 2012;89(5).
 23. Patel S, Reinstein DZ, Silverman RH, Coleman DJ. The shape of Bowman's layer in the human cornea. *J Refract Surg* 1998;14(6).
 24. Meek KM, Fullwood NJ. Corneal and scleral collagens--a microscopist's perspective. *Micron* 2001;32(3):261–72.
 25. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: Optical and biomechanical implications. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(7).
 26. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2004;78(3).
 27. Müller LJ, Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001;85(4).
 28. Cheung IM, Mcghee CN, Sherwin T. Deficient repair regulatory response to injury in keratoconic stromal cells. *Clin Exp Optom* 2014;97(3).
 29. Stramer BM, Zieske JD, Jung J-C, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: Implications for surgical outcomes. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10).
 30. Netto MV, Mohan RR, Ambrósio Jr. R, Hutcheon AEK, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: A review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 2005;24(5).

31. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Fuchs Corneal Dystrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134:79–97.
32. Thomasy SM, Raghunathan VK, Winkler M, et al. Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: epithelium to endothelium. *Acta Biomater* 2014;10(2):785–91.
33. Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: The effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res* 1989;49(5).
34. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH. The developing corneal endothelium: Correlation of morphology, hydration and na/k ATPase pump site density. *Curr Eye Res* 1991;10(2).
35. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985;4(6).
36. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump Function of the Human Corneal Endothelium: Effects of Age and Cornea Guttata. *Ophthalmology* 1985;92(6).
37. Bourne WM, Nelson LIL, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(3).
38. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res* 2003;76(5):521–42.
39. Patel D V, McGhee CNJ, Schipper I. In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review. *Br J Ophthalmol* 2009;93(7):853–60.
40. Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, Inomata H. Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986;224(5).
41. Azuma N, Hirakata A, Hida T, Kohsaka S. Histochemical and Immunohistochemical Studies on Keratan Sulfate in the Anterior Segment of the Developing Human Eye. *Exp Eye Res* 1994;58(3).
42. Dilly PN. Structure and function of the tear film. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:239–47.
43. Chao C -c. W, Vergnes J-P, Freeman IL, Brown SI. Biosynthesis and partial characterization of tear film glycoproteins. Incorporation of radioactive

- precursors by human lacrimal gland explants in vitro. *Exp Eye Res* 1980;30(4):411–25.
44. Gipson IK, Inatomi T. Cellular origin of mucins of the ocular surface tear film. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998;438:221–7.
 45. Dilly PN. Contribution of the epithelium to the stability of the tear film. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1985;104(4):381–9.
 46. Tiffany JM. Composition and biophysical properties of the tear film: Knowledge and uncertainty. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:231–8.
 47. Farris RL. The dry eye: its mechanisms and therapy, with evidence that contact lens is a cause. *CLAO J* 1986;12(4):234–46.
 48. Thakur A, Willcox MDP, Stapleton F. The proinflammatory cytokines and arachidonic acid metabolites in human overnight tears: Homeostatic mechanisms. *J Clin Immunol* 1998;18(1):61–70.
 49. Brignole F, Pisella P-J, Goldschild M, De Saint Jean M, Goguel A, Baudouin C. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1356–63.
 50. Mishima S, Maurice DM. The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface. *Exp Eye Res* 1961;1(1):39–45.
 51. Korb DR, Baron DF, Herman JP, et al. Tear film lipid layer thickness as a function of blinking. *Cornea* 1994;13(4):354–9.
 52. Cox JL, Farrell RA, Hart RW, Langham ME. The transparency of the mammalian cornea. *J Physiol* 1970;210(3):601–16.
 53. MAURICE DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957;136(2).
 54. Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 1972;221(1):43–54.
 55. Dikstein S, Maurice DM. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 1972;221(1):29–41.
 56. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1985;26(6).
 57. Soong HK. Vinculin in focal cell-to-substrate attachments of spreading corneal epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 1987;105(8).
 58. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Keough M. Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the

- rabbit. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(3).
59. Gaster RN, Binder PS, Coalwell K, Berns M, McCord RC, Burstein NL. Corneal surface ablation by 193 nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(1).
 60. Ren Q, Simon G, Legeais J-M, et al. Ultraviolet Solid-state Laser (213-nm) Photorefractive Keratectomy: In Vivo Study. *Ophthalmology* 1994;101(5).
 61. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: Cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea* 2005;24(8 SUPPL.).
 62. Gabison EE, Huet E, Baudouin C, Menashi S. Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. *Prog Retin Eye Res* 2009;28(1).
 63. Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, et al. Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea* 2002;21(1).
 64. Gabison EE, Mourah S, Steinfels E, et al. Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: Role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction. *Am J Pathol* 2005;166(1).
 65. Pallikaris IG, Siganos DS. Excimer laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for correction of high myopia. *J Refract Corneal Surg* 1994;10(5).
 66. Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Siganos DS, Tsilimbaris MK. A Corneal Flap Technique for Laser In Situ Keratomileusis: Human Studies. *Arch Ophthalmol* 1991;109(12).
 67. Sakimoto T, Rosenblatt MI, Azar DT. Laser eye surgery for refractive errors. *Lancet (London, England)* 2006;367(9520):1432–47.
 68. McDonald MB, Frantz JM, Klyce SD, et al. One-year refractive results of central photorefractive keratectomy for myopia in the nonhuman primate cornea. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 1990;108(1):40–7.
 69. Seiler T, Kahle G, Kriegerowski M. Excimer laser (193 nm) myopic keratomileusis in sighted and blind human eyes. *Refract Corneal Surg* 1990;6(3):165–73.
 70. Munneryn CR, Koons SJ, Marshall J. Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 1988;14(1):46–

- 52.
71. Pallikaris I, McDonald MB, Siganos D, et al. Tracker-assisted photorefractive keratectomy for myopia of -1 to -6 diopters. *J Refract Surg* 1996;12(2).
 72. Diakonis VF, Kankariya VP, Kymionis GD, et al. Long term followup of photorefractive keratectomy with adjuvant use of mitomycin C. *J Ophthalmol* 2014;2014:821920.
 73. Kalyvianaki MI, Katsanevaki VJ, Kavroulaki DS, Kounis GA, Detorakis ET, Pallikaris IG. Comparison of Corneal Sensitivity and Tear Function Following Epi-LASIK or Laser In Situ Keratomileusis for Myopia. *Am J Ophthalmol* 2006;142(4).
 74. Pallikaris IG, Kalyvianaki MI, Katsanevaki VJ, Ginis HS. Epi-LASIK: Preliminary clinical results of an alternative surface ablation procedure. *J Cataract Refract Surg* 2005;31(5).
 75. Katsanevaki VJ, Kalyvianaki MI, Kavroulaki DS, Pallikaris IG. One-Year Clinical Results after Epi-LASIK for Myopia. *Ophthalmology* 2007;114(6).
 76. Kymionis GD, Kontadakis GA, Naoumidi I, et al. Comparative study of stromal bed of LASIK flaps created with femtosecond lasers (IntraLase FS150, WaveLight FS200) and mechanical microkeratome. *Br J Ophthalmol* 2014;98(1):133–7.
 77. Sekundo W, Kunert KS, Blum M. Small incision corneal refractive surgery using the small incision lenticule extraction (SMILE) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: results of a 6 month prospective study. *Br J Ophthalmol* 2011;95(3):335–9.
 78. Takac S, Stojanović S. [Characteristics of laser light]. *Med Pregl* 52(1–2):29–34.
 79. Tuchin V. Tissue Optics and Photonics: Light-Tissue Interaction II. *J Biomed Photonics Eng* 2016;2(3):30201.
 80. Letokhov VS. Laser biology and medicine. *Nature* 1985;316(6026):325–30.
 81. Srinivasan R. Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers. *Science* 1986;234(4776):559–65.
 82. Srinivasan R, Sutcliffe E. Dynamics of the ultraviolet laser ablation of corneal tissue. *Am J Ophthalmol* 1987;103(3 Pt 2):470–1.
 83. Trokel SL, Srinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 1983;96(6).

84. Trokel SL, Srinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 1983;96(6).
85. Hahn DW, Ediger MN, Pettit GH. Dynamics of ablation plume particles generated during excimer laser corneal ablation. *Lasers Surg Med* 1995;16(4):384–9.
86. Seiler T, McDonnell PJ. Excimer laser photorefractive keratectomy. *Surv Ophthalmol* 40(2):89–118.
87. Beuerman RW, McDonald MB, Shofner RS, et al. Quantitative histological studies of primate corneas after excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 1994;112(8):1103–10.
88. Panagopoulou SI, Pallikaris IG. Wavefront customized ablations with the WASCA Asclepion workstation. *J Refract Surg* 2001;17(5).
89. Jankov II MR, Panagopoulou SI, Tsiklis NS, Hajitanasis GC, Aslanides IM, Pallikaris IG. Topography-guided treatment of irregular astigmatism with the wavelight excimer laser. *J Refract Surg* 2006;22(4).
90. Lembares A, Hu X-H, Kalmus GW. Absorption spectra of corneas in the far ultraviolet region. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(6).
91. Ren Q, Gailitis RP, Thompson KP, Lin JT. Ablation of the Cornea and Synthetic Polymers Using a UV (213 nm) Solid-State Laser. *IEEE J Quantum Electron* 1990;26(12).
92. Ren Q, Simon G, Legeais J-M, et al. Ultraviolet solid-state laser (213-nm) photorefractive keratectomy: In vivo study. *Ophthalmology* 1994;101(5).
93. Dair GT, Ashman RA, Eikelboom RH, Reinholz F, Van Saarloos PP. Absorption of 193- and 213-nm laser wavelengths in sodium chloride solution and balanced salt solution. *Arch Ophthalmol* 2001;119(4).
94. Dair GT, Pelouch WS, Van Saarloos PP, Lloyd DJ, Paz Linares SM, Reinholz F. Investigation of corneal ablation efficiency using ultraviolet 213-nm solid state laser pulses. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11).
95. Tsiklis NS, Kymionis GD, Kounis GA, et al. One-year results of photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for myopia using a 213 nm wavelength solid-state laser. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(6).
96. Tsiklis NS, Kymionis GD, Kounis GA, Naoumidi II, Pallikaris IG. Photorefractive keratectomy using solid state laser 213 nm and excimer laser 193 nm: A randomized, contralateral, comparative, experimental study.

- Investig Ophthalmol Vis Sci 2008;49(4).
97. Tsiklis NS, Kymionis GD, Pallikaris AI, et al. Endothelial cell density after photorefractive keratectomy for moderate myopia using a 213 nm solid-state laser system. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(11).
 98. Battat L, Macri A, Dursun D, Pflugfelder SC. Effects of laser in situ keratomileusis on tear production, clearance, and the ocular surface. *Ophthalmology* 2001;108(7).
 99. Yu EYW, Leung A, Rao S, Lam DSC. Effect of laser in situ keratomileusis on tear stability. *Ophthalmology* 2000;107(12).
 100. Lee JB, Ryu CH, Kim J-H, Kim EK, Kim HB. Comparison of tear secretion and tear film instability after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2000;26(9).
 101. Nejima R, Miyata K, Tanabe T, et al. Corneal barrier function, tear film stability, and corneal sensation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2005;139(1).
 102. Matsui H, Kumano Y, Zushi I, Yamada T, Matsui T, Nishida T. Corneal sensation after correction of myopia by photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(3).
 103. Kim W-S, Kim J-S. Change in corneal sensitivity following laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 1999;25(3).
 104. Pérez-Santonja JJ, Sakla HF, Cardona C, Chipont E, Alió JL. Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for low myopia. *Am J Ophthalmol* 1999;127(5).
 105. Nassaralla BA, McLeod SD, Nassaralla Jr. JJ. Effect of myopic LASIK on human corneal sensitivity. *Ophthalmology* 2003;110(3).
 106. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol* 2005;140(6).
 107. Chan KY, Jarvelainen M, Chang JH, Edenfield MJ. A cryodamage model for studying corneal nerve regeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(10).
 108. Pallikaris I. Preoperative Placido photography in keratoconus and its meaning in conjunction with postoperative astigmatism | Die präoperative Placidophotographie bei Keratokonus und ihre Bedeutung im Zusammenhang mit dem postoperativen Astigmatismus. *Albr von Graefes Arch für Klin und Exp Ophthalmol* 1980;213(2).

109. Donaldson DD. A New Instrument for Keratography. *Arch Ophthalmol* 1972;88(4).
110. Kounis GA, Tsilimbaris MK, Kymionis GD, Ginis HS, Pallikaris IG. Estimating variability in placido-based topographic systems. *Optom Vis Sci* 2007;84(10).
111. de Sanctis U, Loiacono C, Richiardi L, Turco D, Mutani B, Grignolo FM. Sensitivity and Specificity of Posterior Corneal Elevation Measured by Pentacam in Discriminating Keratoconus/Subclinical Keratoconus. *Ophthalmology* 2008;115(9).
112. Nilforoushan M-R, Speaker M, Marmor M, et al. Comparative evaluation of refractive surgery candidates with Placido topography, Orbscan II, Pentacam, and wavefront analysis. *J Cataract Refract Surg* 2008;34(4).
113. Auffarth GU, Wang L, Völcker HE. Keratoconus evaluation using the Orbscan Topography System. *J Cataract Refract Surg* 2000;26(2).
114. Wilson SE, Klyce SD. Screening for corneal topographic abnormalities before refractive surgery. *Ophthalmology* 1994;101(1).
115. Maeda N, Klyce SD, Smolek MK. Neural network classification of corneal topography: Preliminary demonstration. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(7).
116. Bogan SJ, Waring GO 3rd, Ibrahim O, Drews C, Curtis L. Classification of normal corneal topography based on computer-assisted videokeratography. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 1990;108(7):945–9.
117. Chen X, Stojanovic A, Zhou W, Utheim TP, Stojanovic F, Wang Q. Transepithelial, Topography-guided Ablation in the Treatment of Visual Disturbances in LASIK Flap or Interface Complications. *J Refract Surg* 2012;28(2):120–6.
118. Pasquali T, Krueger R. Topography-guided laser refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2012;23(4):264–8.
119. Kymionis GD, Panagopoulou SI, Aslanides IM, Plainis S, Astyrakakis N, Pallikaris IG. Topographically supported customized ablation for the management of decentered laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2004;137(5).
120. Anderson I, Sanders DR, Van Saarloos P, Ardrey IV WJ. Treatment of irregular astigmatism with a 213 nm solid-state, diode-pumped neodymium:YAG ablative laser. *J Cataract Refract Surg* 2004;30(10).

121. Kymionis GD, Kontadakis GA, Kounis GA, et al. Simultaneous topography-guided PRK followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus. *J Refract Surg* 2009;25(9):S807-11.
122. Kanellopoulos AJ, Kahn J. Topography-guided hyperopic LASIK with and without high irradiance collagen cross-linking: initial comparative clinical findings in a contralateral eye study of 34 consecutive patients. *J Refract Surg* 2012;28(11 Suppl):S837-40.
123. Ghanem RC, Ghanem VC, de Souza DC, Kara-Jose N, Ghanem EA. Customized topography-guided photorefractive keratectomy with the MEL-70 platform and mitomycin C to correct hyperopia after radial keratotomy. *J Refract Surg* 2008;24(9):911–22.
124. Rajan MS, O'Brart DPS, Patel P, Falcon MG, Marshall J. Topography-guided customized laser-assisted subepithelial keratectomy for the treatment of postkeratoplasty astigmatism. *J Cataract Refract Surg* 2006;32(6):949–57.
125. Koller T, Iseli HP, Donitzky C, Ing D, Papadopoulos N, Seiler T. Topography-Guided Surface Ablation for Forme Fruste Keratoconus. *Ophthalmology* 2006;113(12).
126. Cennamo G, Intravaja A, Boccuzzi D, Marotta G, Cennamo G. Treatment of keratoconus by topography-guided customized photorefractive keratectomy: Two-year follow-up study. *J Refract Surg* 2008;24(2).
127. Guirao A, Williams DR, MacRae SM. Effect of beam size on the expected benefit of customized laser refractive surgery. *J Refract Surg* 2003;19(1).
128. Huang D, Arif M. Spot size and quality of scanning laser correction of higher-order wavefront aberrations. *J Cataract Refract Surg* 2002;28(3).
129. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 1998;42(4).
130. Rabinowitz YS, Maumenee IH, Lundergan MK, et al. Molecular genetic analysis in autosomal dominant keratoconus. *Cornea* 1992;11(4).
131. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmol Clin North Am* 2003;16(4).
132. Kim W-J, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res* 1999;69(5).
133. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: Evidence for major gene determination. *Am J Med Genet* 2000;93(5).

134. Rabinowitz YS, Rasheed K. KISA% index: A quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 1999;25(10).
135. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 1986;101(3).
136. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol* 1984;28(4).
137. Jonas JB, Nangia V, Matin A, Kulkarni M, Bhojwani K. Prevalence and Associations of Keratoconus in Rural Maharashtra in Central India: The Central India Eye and Medical Study. *Am J Ophthalmol* 2009;148(5).
138. Li X, Rabinowitz YS, Rasheed K, Yang H. Longitudinal study of the normal eyes in unilateral keratoconus patients. *Ophthalmology* 2004;111(3).
139. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: A multivariate analysis. *Br J Ophthalmol* 2000;84(8).
140. Harrison RJ, Klouda PT, Easty DL, Manku M, Stewart JCCM. Association between keratoconus and atopy. *Br J Ophthalmol* 1989;73(10).
141. Krachmer JH. Eye rubbing can cause keratoconus. *Cornea* 2004;23(6).
142. Shapiro MB, France TD. The ocular features of Down's syndrome. *Am J Ophthalmol* 1985;99(6).
143. CULLEN JF, BUTLER HG. MONGOLISM (DOWN'S SYNDROME) AND KERATOCONUS. *Br J Ophthalmol* 1963;47.
144. Kim JH, Hwang J-M, Kim HJ, Yu YS. Characteristic ocular findings in Asian children with Down syndrome. *Eye* 2002;16(6).
145. Olofsson EM, Marklund SL, Pedrosa-Domellöf F, Behndig A. Interleukin-1 α downregulates extracellular-superoxide dismutase in human corneal keratoconus stromal cells. *Mol Vis* 2007;13.
146. Kalkan Akcay E, Akcay M, Uysal BS, et al. Impaired corneal biomechanical properties and the prevalence of keratoconus in mitral valve prolapse. *J Ophthalmol* 2014;2014.
147. Lichter H, Loya N, Sagie A, et al. Keratoconus and mitral valve prolapse. *Am J Ophthalmol* 2000;129(5).
148. Street DA, Vinokur ET, Waring III GO, Pollak SJ, Clements SD, Perkins JV. Lack of association between keratoconus, mitral valve prolapse, and joint hypermobility. *Ophthalmology* 1991;98(2).

149. Beardsley TL, Foulks GN. An association of keratoconus and mitral valve prolapse. *Ophthalmology* 1982;89(1).
150. Robertson I. Keratoconus and the Ehlers Danlos syndrome: a new aspect of keratoconus. *Med J Aust* 1975;1(18).
151. Kuming BS, Joffe L. Ehlers-Danlos syndrome associated with keratoconus: a case report. *South African Med J* 1977;52(10).
152. Elder MJ. Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1994;31(1).
153. Sassani JW, Smith SG, Rabinowitz YS. Keratoconus and bilateral lattice-granular corneal dystrophies. *Cornea* 1992;11(4).
154. Wojcik KA, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci* 2013;14(9).
155. Woodward EG, Morris MT. Joint hypermobility in keratoconus. *Ophthalmic Physiol Opt* 1990;10(4).
156. Kosrirukvongs P, Ngowiyutagon P, Booranapong W. Keratoconus in Patients with Macular Stromal Dystrophy. *J Med Assoc Thai* 2016;99(1):65–70.
157. Bechara SJ, Grossniklaus HE, Waring GO, Wells JA. Keratoconus associated with posterior polymorphous dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1991;112(6):729–31.
158. Beckh U, Schonherr U, Naumnnn GOH. Autosomal inherited keratoconus as an ocular symptom of osteogenesis imperfecta tarda Lobstein | AUTOSOMAL DOMINANTER KERATOKONUS ALS OKULARES LEITSYMPTOM BEI OSTEOGERAESIS IMPERFECTA TARDA LOBSTEIN. *Klin Monbl Augenheilkd* 1995;206(4).
159. Kuo IC, Broman A, Pirouzmanesh A, Melia M. Is there an association between diabetes and keratoconus? *Ophthalmology* 2006;113(2):184–90.
160. Woodward MA, Blachley TS, Stein JD. The Association Between Sociodemographic Factors, Common Systemic Diseases, and Keratoconus: An Analysis of a Nationwide Health Care Claims Database. *Ophthalmology* 2016;123(3):457–65.e2.
161. Hafezi F. Smoking and corneal biomechanics. *Ophthalmology*. 2009;116(11):2259.e1.
162. Parker J, Ko WW, Pavlopoulos G, Wolfe PJ, Rabinowitz YS, Feldman ST. Videokeratography of keratoconus in monozygotic twins. *J Refract Surg*

- 1996;12(1).
163. Rabinowitz YS, Garbus J, McDonnell PJ. Computer-Assisted Corneal Topography in Family Members of Patients With Keratoconus. *Arch Ophthalmol* 1990;108(3).
 164. Bechara SJ, Waring III GO, Insler MS. Keratoconus in two pairs of identical twins. *Cornea* 1996;15(1).
 165. ETZINE S. Keratoconus and mental defect. *S Afr Med J* 1954;28(25):520–1.
 166. Ihalainen A. Clinical and epidemiological features of keratoconus. Genetic and external factors in the pathogenesis of the disease. *Acta Ophthalmol* 1986;64(SUPPL. 178).
 167. FRANCESCHETTI A, LISCH K, KLEIN D. [2 Pairs of identical twins with concordant keratoconus]. *Klin Monbl Augenheilkd Augenarztl Fortbild* 1958;133(1):15–30.
 168. Hammerstein W. [Keratoconus concurrent in identical twins]. *Ophthalmol J Int d'ophtalmologie Int J Ophthalmol Zeitschrift fur Augenheilkd* 1972;165(5):449–52.
 169. Owens H, Gamble G. A profile of keratoconus in New Zealand. *Cornea* 2003;22(2).
 170. McMahan TT, Shin JA, Newlin A, Edrington TB, Sugar J, Zadnik K. Discordance for keratoconus in two pairs of monozygotic twins. *Cornea* 1999;18(4).
 171. Kim S-H, Mok J-W, Kim H-S, Joo CK. Association of -31T>C and -511 C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients. *Mol Vis* 2008;14:2109–16.
 172. Stabuc-Silih M, Ravnik-Glavac M, Glavac D, Hawlina M, Strazisar M. Polymorphisms in COL4A3 and COL4A4 genes associated with keratoconus. *Mol Vis* 2009;15:2848–60.
 173. Udar N, Atilano SR, Brown DJ, et al. SOD1: A candidate gene for keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(8).
 174. Tynismaa H, Sistonen P, Tuupanen S, et al. A locus for autosomal dominant keratoconus: Linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(10).
 175. Hameed A, Khaliq S, Ismail M, et al. A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13.

- Investig Ophthalmol Vis Sci 2000;41(3).
176. Li X, Rabinowitz YS, Tang YG, et al. Two-stage genome-wide linkage scan in keratoconus sib pair families. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(9).
 177. Rabinowitz YS, Dong L, Wistow G. Gene expression profile studies of human keratoconus cornea for NEIBank: A novel cornea-expressed gene and the absence of transcripts for aquaporin 5. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4).
 178. Lee J-E, Oum BS, Choi HY, Lee SU, Lee JS. Evaluation of differentially expressed genes identified in keratoconus. *Mol Vis* 2009;15:2480–7.
 179. Kenney MC, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Contact Lens Anterior Eye* 2003;26(3).
 180. Patey A, Savoldelli M, Pouliquen Y. Keratoconus and normal cornea: a comparative study of the collagenous fibers of the corneal stroma by image analysis. *Cornea* 1984;3(2):119–24.
 181. Stoesser F, Lévy D, Moalic S, Colin J. Pseudokeratoconus and ocular rosacea | Pseudo-kératocône et rosacée oculaire. *J Fr Ophtalmol* 2004;27(3).
 182. Dursun D, Piniella AM, Pflugfelder SC. Pseudokeratoconus caused by rosacea. *Cornea* 2001;20(6).
 183. Donnenfeld ED, Perry HD, Gibraltar RP, Ingraham HJ, Udell IJ. Keratoconus associated with floppy eyelid syndrome. *Ophthalmology* 1991;98(11):1674–8.
 184. Culbertson WW, Tseng SC. Corneal disorders in floppy eyelid syndrome. *Cornea* 1994;13(1):33–42.
 185. Kemp EG, Lewis CJ. Immunoglobulin patterns in keratoconus with particular reference to total and specific IgE levels. *Br J Ophthalmol* 1982;66(11).
 186. KEMP EG, LEWIS CJ. MEASUREMENT OF TOTAL AND SPECIFIC IgE LEVELS IN THE MANAGEMENT OF A FAMILY EXHIBITING A HIGH INCIDENCE OF KERATOCONUS. *Acta Ophthalmol* 1984;62(4).
 187. Totan Y, Hepşen IF, Cekiç O, Gündüz A, Aydın E. Incidence of keratoconus in subjects with vernal keratoconjunctivitis: a videokeratographic study. *Ophthalmology* 2001;108(4):824–7.
 188. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/II but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: Evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(3).
 189. Lema I, Durán JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with

- keratoconus. *Ophthalmology* 2005;112(4).
190. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the collaborative longitudinal evaluation of keratoconus (CLEK) study. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(13).
 191. Weed KH, MacEwen CJ, Giles T, Low J, McGhee CNJ. The Dundee University Scottish Keratoconus study: Demographics, corneal signs, associated diseases, and eye rubbing. *Eye* 2008;22(4).
 192. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, et al. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(6).
 193. Dawson DG, Grossniklaus HE, McCarey BE, Edelhauser HF. Biomechanical and wound healing characteristics of corneas after excimer laser keratorefractive surgery: is there a difference between advanced surface ablation and sub-Bowman's keratomileusis? *J Refract Surg* 2008;24(1):S90-6.
 194. McMonnies CW, Korb DR, Blackie CA. The role of heat in rubbing and massage-related corneal deformation. *Contact Lens Anterior Eye* 2012;35(4).
 195. Bron AJ. The architecture of the corneal stroma. *Br J Ophthalmol* 2001;85(4).
 196. McMonnies CW. Abnormal rubbing and keratectasia. *Eye Contact Lens* 2007;33(6 PART 1 O).
 197. McMonnies CW. Mechanisms of rubbing-related corneal trauma in keratoconus. *Cornea* 2009;28(6).
 198. Luce DA. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg* 2005;31(1):156–62.
 199. Nash IS, Greene PR, Foster CS. Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1982;35(5):413–24.
 200. Dogru M, Karakaya H, Özçetin H, et al. Tear function and ocular surface changes in keratoconus. *Ophthalmology* 2003;110(6).
 201. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(7).
 202. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: Part I. *Am J Ophthalmol* 1963;55(1).
 203. Mocan MC, Yilmaz PT, Irkeç M, Orhan M. In vivo confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Curr Eye Res* 2008;33(11–12).

204. Bleshoy H. Corneal sensitivity in keratoconus. *J Br Contact Lens Assoc* 1986;1986(C).
205. Wilson SE, Lin DTC, Klyce SD, Insler MS. Terrien's marginal degeneration: Corneal topography. *Refract Corneal Surg* 1990;6(1).
206. Santhiago MR, Giacomini NT, Smadja D, Bechara SJ. Ectasia risk factors in refractive surgery. *Clin Ophthalmol* 2016;10:713–20.
207. Smolek MK, Klyce SD. Current keratoconus detection methods compared with a neural network approach. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(11).
208. Ambrosio RJ, Klyce SD, Wilson SE. Corneal topographic and pachymetric screening of keratorefractive patients. *J Refract Surg* 2003;19(1):24–9.
209. Shetty R, Rao H, Khamar P, et al. Keratoconus Screening Indices and Their Diagnostic Ability to Distinguish Normal From Ectatic Corneas. *Am J Ophthalmol* 2017;181:140–8.
210. Hashemi H, Beiranvand A, Yekta A, Maleki A, Yazdani N, Khabazkhoob M. Pentacam top indices for diagnosing subclinical and definite keratoconus. *J Curr Ophthalmol* 2016;28(1):21–6.
211. Bruce AS, Brennan NA. Corneal pathophysiology with contact lens wear. *Surv Ophthalmol* 35(1):25–58.
212. Brierly SC, Izquierdo Jr. L, Mannis MJ. Penetrating keratoplasty for keratoconus. *Cornea* 2000;19(3).
213. Kirkness CM, Ficker LA, Steele AD, Rice NS. The success of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Eye (Lond)* 1990;4 (Pt 5):673–88.
214. Kymionis GD, Siganos CS, Tsiklis NS, et al. Long-term Follow-up of Intacs in Keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2007;143(2).
215. Siganos CS, Kymionis GD, Kartakis N, Theodorakis MA, Astyrakakis N, Pallikaris IG. Management of keratoconus with Intacs. *Am J Ophthalmol* 2003;135(1).
216. Zare MA, Hashemi H, Salari MR. Intracorneal ring segment implantation for the management of keratoconus: Safety and efficacy. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(11).
217. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003;135(5).
218. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract*

- Refract Surg 2003;29(9).
219. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003;135(5).
 220. Zhang Y, Conrad AH, Conrad GW. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *J Biol Chem* 2011;286(15).
 221. Wollensak G. Fundamental principles of corneal collagen cross-linking. *Corneal Collagen Cross Link* 2013;13–8.
 222. Edwards AM. Structure and general properties of flavins. *Methods Mol. Biol.* 2014;1146:3–13.
 223. Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. Corneal crosslinking: Riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(5):893–9.
 224. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998;66(1).
 225. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, Kounis GA, Panagopoulou SI, Grentzelos MA. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas. *Am J Ophthalmol* 2012;153(1):24–8.
 226. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: Long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008;34(5).
 227. Sykakis E, Karim R, Evans JR, et al. Corneal collagen cross-linking for treating keratoconus. *Cochrane database Syst Rev* 2015;(3):CD010621.
 228. Wittig-Silva C, Chan E, Islam FMA, Wu T, Whiting M, Snibson GR. A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: Three-year results. *Ophthalmology* 2014;121(4).
 229. Mazzotta C, Caporossi T, Denaro R, et al. Morphological and functional correlations in riboflavin UV A corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Acta Ophthalmol* 2012;90(3):259–65.
 230. Kymionis GD, Diakonis VF, Kalyvianaki M, et al. One-Year Follow-up of Corneal Confocal Microscopy After Corneal Cross-Linking in Patients With Post Laser In Situ Keratasmileusis Ectasia and Keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2009;147(5).
 231. Wollensak G, Aurich H, Pham D-T, Wirbelauer C. Hydration behavior of

- porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(3).
232. Bottós KM, Hofling-Lima AL, Barbosa MC, et al. Effect of collagen cross-linking in stromal fibril organization in edematous human corneas. *Cornea* 2010;29(7).
 233. Kanellopoulos AJ, Binder PS. Collagen cross-linking (CCL) with sequential topography-guided PRK: A temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea* 2007;26(7).
 234. Alpíns N, Stamatelatos G. Customized photoastigmatic refractive keratectomy using combined topographic and refractive data for myopia and astigmatism in eyes with forme fruste and mild keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(4).
 235. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(4):475–82.
 236. Kampmeier J, Radt B, Birngruber R, Brinkmann R. Thermal and biomechanical parameters of porcine cornea. *Cornea* 2000;19(3):355–63.
 237. Pallikaris IG, Karoutis AD, Lydataki SE, Siganos DS. Rotating brush for fast removal of corneal epithelium. *J Refract Corneal Surg* 1994;10(4).
 238. Tsiklis NS, Kymionis GD, Kounis GA, Naoumidi II, Pallikaris IG. Photorefractive keratectomy using solid state laser 213 nm and excimer laser 193 nm: a randomized, contralateral, comparative, experimental study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(4):1415–20.
 239. Tsiklis NS, Kymionis GD, Kounis GA, et al. One-year results of photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for myopia using a 213 nm wavelength solid-state laser. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(6):971–7.
 240. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39(2).
 241. Martin XY, Safran AB. Corneal hypoesthesia. *Surv Ophthalmol* 1988;33(1).
 242. Beuerman RW, McCulley JP. Comparative clinical assessment of corneal sensation with a new aesthesiometer. *Am J Ophthalmol* 1978;86(6).
 243. Golebiowski B, Papas E, Stapleton F. Assessing the sensory function of the ocular surface: Implications of use of a non-contact air jet aesthesiometer versus the Cochet–Bonnet aesthesiometer. *Exp Eye Res* 2011;92(5):408–13.
 244. Xu Y-G, Xu Y-S, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. Development of a rabbit

- corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis* 2008;14:2180–9.
245. Hjortdal JO, Jensen PK. In vitro measurement of corneal strain, thickness, and curvature using digital image processing. *Acta Ophthalmol Scand* 1995;73(1).
 246. Hjortdal JØ. Extensibility of the normo-hydrated human cornea. *Acta Ophthalmol Scand* 1995;73(1).
 247. Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol* 2008;86(5).
 248. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham D-T. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res* 2009;41(2).
 249. Ghanem RC, Santhiago MR, Berti TB, Thomaz S, Netto MV. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *J Cataract Refract Surg* 2010;36(2).
 250. Cordeiro Barbosa MMV, Barbosa JB, Hirai FE, Hofling-Lima AL. Effect of cross-linking on corneal thickness in patients with corneal edema. *Cornea* 2010;29(6).
 251. Vinciguerra P, Albè E, Trazza S, et al. Refractive, Topographic, Tomographic, and Aberrometric Analysis of Keratoconic Eyes Undergoing Corneal Cross-Linking. *Ophthalmology* 2009;116(3).
 252. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term Results of Riboflavin Ultraviolet A Corneal Collagen Cross-linking for Keratoconus in Italy: The Siena Eye Cross Study. *Am J Ophthalmol* 2010;149(4).
 253. Hedbys BO, Mishima S. The thickness-hydration relationship of the cornea. *Exp Eye Res* 1966;5(3).
 254. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004;23(5).
 255. Mencucci R, Marini M, Paladini I, et al. Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin Exp Ophthalmol* 2010;38(1).
 256. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003;29(9).

257. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: New hope. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17(4).
258. Wollensak G, Spörl E, Mazzotta C, Kalinski T, Sel S. Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. *Br J Ophthalmol* 2011;95(6).
259. Hatami-Marbini H, Rahimi A. The relation between hydration and mechanical behavior of bovine cornea in tension. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014;36:90–7.
260. Alessio G, L'Abbate M, Sborgia C, La Tegola MG. Photorefractive keratectomy followed by cross-linking versus cross-linking alone for management of progressive keratoconus: Two-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2013;155(1).
261. Hersh PS, Stulting RD, Muller D, et al. United States Multicenter Clinical Trial of Corneal Collagen Crosslinking for Keratoconus Treatment. *Ophthalmology* 2017;124(9):1259–70.
262. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal Healing After Riboflavin Ultraviolet-A Collagen Cross-Linking Determined by Confocal Laser Scanning Microscopy In Vivo: Early and Late Modifications. *Am J Ophthalmol* 2008;146(4).
263. Niederer RL, McGhee CNJ. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2010;29(1).
264. Alessio G, L'Abbate M, Furino C, Sborgia C, La Tegola MG. Confocal microscopy analysis of corneal changes after photorefractive keratectomy plus cross-linking for keratoconus: 4-Year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2014;158(3).
265. Kontadakis GA, Kymionis GD, Kankariya VP, Pallikaris AI. Effect of corneal collagen cross-linking on corneal innervation, corneal sensitivity, and tear function of patients with keratoconus. *Ophthalmology* 2013;120(5).
266. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, et al. Posterior linear stromal haze formation after simultaneous photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10).
267. Kymionis GD, Diakonis VF. Confocal microscopy analysis of corneal changes after photorefractive keratectomy plus cross-linking for keratoconus: 4-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2015;159(1).
268. Kolozsvári L, Nógrádi A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7).

269. Kymionis GD, Grentzelos MA, Klados NE, Xanthopoulou NA, Paraskevopoulos TA, Detorakis ET. Corneal collagen cross-linking mushroom shape demarcation line profile after limited Bowman's membrane removal by phototherapeutic keratectomy. *Open Ophthalmol J* 2015;9(1).
270. Kymionis GD, Portaliou DM, Kounis GA, Limnopoulou AN, Kontadakis GA, Grentzelos MA. Simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2011;152(5):748–55.
271. Naderan M, Shoar S, Kamaledin MA, Rajabi MT, Naderan M, Khodadadi M. Keratoconus Clinical Findings According to Different Classifications. *Cornea* 2015;34(9):1005–11.
272. Karakosta A, Vassilaki M, Plainis S, Elfadl NH, Tsilimbaris M, Moschandreas J. Choice of Analytic Approach for Eye-Specific Outcomes: One Eye or Two? *Am J Ophthalmol* 2012;153(3):571–579.e1.
273. Xia Y, Chai X, Zhou C, Ren Q. Corneal nerve morphology and sensitivity changes after ultraviolet A/riboflavin treatment. *Exp Eye Res* 2011;93(4).
274. Belmonte C. Eye dryness sensations after refractive surgery: Impaired tear secretion or “phantom” cornea? *J Refract Surg* 2007;23(6).
275. Belmonte C, Acosta MC, Schmelz M, Gallar J. Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO₂ esthesiometer. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(2).
276. Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C, Gallar J. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf* 2004;2(4).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Βιογραφικό

Georgios A. Kontadakis

•A. Kalvou 161, Athens, Greece, GR11522 • + 30 6944525329
• kontadakis@miami.edu, kontadas@yahoo.com, g.kontadakis@med.uoc.gr

Date of Birth: 14/05/1980

City of Birth: Chania, Crete,

EDUCATION- CERTIFICATIONS

20/12/2016	Board of Ophthalmology Examination Prefecture of Athens	Ophthalmology Specialist
01/2018	University of Crete Department of Medicine <i>"Manassaki" Scholarship of Excellence by University of Crete</i>	PhD (supervisor: Prof. Ioannis Pallikaris)
2006-2008	University of Crete Dep. of Medicine, Dep. of Mathematics and Dep. of Physics <i>Scholarship of Excellence by University of Crete Scholarship by Vardinoyannion Institute</i>	MSc "Optics and Vision" Grade 9.1/10 "Excellent"
1999-2006	University of Athens Medical School <i>Scholarship by Vardinoyannion Institute</i>	Doctor of Medicine Grade "Very Good"
09/2012-01/2013	Harvard University - edX Harvard School of Public Health	Online Course: "Health in Numbers: Quantitative Methods in Clinical & Public Health Research"
11/2008	Tracey Technologies, Houston, TX	Training course in iTrace Visual Function Analyzer

CLINICAL & RESEARCH APPOINTMENTS-EXPERIENCE

10/17-today	University of Crete Ophthalmology Department, Laboratory of Vision and Optics <i>Academic Fellow (Adjunct Lecturer)</i>
10/2016-7/17	Ophthalmiatreio Eye Hospital of Athens Extension of Residency Contract
10/2012- 09-2016	Ophthalmiatreio Eye Hospital of Athens <i>Resident in Ophthalmology</i>
17/06/2015- 29/11/15	University of Miami, Bascom Palmer Eye Institute , Cornea Service and Laboratory at McKnight Vision Research Center <i>Research Scholar</i>

02/2008-10/2012	University of Crete , Institute of Vision and Optics <i>Clinical and Research Pre-Resident Fellow</i>
08/2007 - 02/2008	University Hospital of Heraklion , Department of ophthalmology <i>Clinical and Research Pre-Resident Fellow</i>
09/2011 - 05/2012	Military Service <i>Camp Doctor</i>

AWARDS-GRANTS

2017	Scholarship “Spiros Georgaras” awarded by the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery to young Ophthalmologists based on a competitive process
2016	Residents and Fellows Program Honorable Mention Poster , at the ASCRS 2106 Annual Symposium and Congress, New Orleans, LA For the presentation: “Evaluation of corneal changes after upper eyelid blepharoplasty” N. Yesilirmak, M. Rodriguez, G. Kontadakis, D. Portaliou, M. Sayed, S. Yoo, W. Lee
2015	Observership Grant awarded by the European Society of Cataract and Refractive Surgery to residents and young ophthalmologists based on a competitive process
2014	Resident Excellence Award by the American Society of Cataract and Refractive Surgeons Foundation . Grant awarded to ophthalmology residents exhibiting exemplary performance in research, patient care, leadership and education, to attend ASCRS Annual Symposium.
2014	Best Paper at the Cornea Session in the 72th Annual Conference of the All India Ophthalmological Society, Agra, India For the presentation: “Simultaneous Topography-Guided PRK with CXL Versus CXL Alone in Konus: Prospective Comparative Study” V. Kankaryia, G. Kontadakis, G. Kymionis, M. Grentzelos, I. Pallikaris
2013	Travel Grant for the 17 th ESCRS Winter Meeting, Warsaw Poland 2013, awarded from the ESCRS for one Ophthalmology Resident from Greece, nominated by the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery based on Excellence
2012	Best Oral Presentation in the 26 th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery For the presentation: “Comparative study of stromal bed and cutting edge quality with IntraLase FS 150 and the WaveLight FS200 femtosecond lasers and by a mechanical microkeratome” G. Kontadakis, G. Kymionis, I. Naoumidi, S. Panagopoulou, V. Kankaria, I. Pallikaris
2010	Travel Grant for the meeting EVER 2010 awarded by the Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS), based on competitive process
2009	Best Oral Presentation in the session Keratoconus and corneal grafting, European Association for Vision and Eye Research (EVER) 2009 meeting, Portoroz, Slovenia For the presentation: “Effect of corneal collagen crosslinking on corneal sensitivity, tear function and innervation: a clinical and confocal microscopic study” Kontadakis G, Kymionis G, Portaliou D, Diakonis V, Pallikaris I.
2009	Second Prize for Cornea poster presentation , ESCRS meeting, Barcelona 2009

	For the presentation: "Simultaneous topoguided photorefractive keratectomy (PRK) followed by corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of keratoconus" G Kymionis, G Kontadakis, A Karavitaki, G Kounis, I. Pallikaris
2008	Best Poster Presentation in the 11 th Meeting of the Hellenic Society of Pathology For the presentation: "Immunohistochemical study of human skin from Egyptian mummies" Kontadakis G, Tiniakos D, Caldwell N.R., Zafiri V, Sakarellos A, Kittas C, Pitsios T
1998	1st Prize in the prefecture of Chania in the Panhellenic Mathematical Contest of the Hellenic Mathematical Society for students in the 3 rd grade of Senior High school
1996	1st Prize in the prefecture of Chania in the Panhellenic Mathematical Contest of the Hellenic Mathematical Society for students in the 3 rd grade of High school

PUBLICATIONS IN PEER REVIEWED JOURNALS [Scopus:62, CITATIONS:413, h-INDEX: 10]

1.	Kontadakis GA , Kankariya VP, Tsoulnaras K, Pallikaris AI, Plaka A, Kymionis GD Long term comparison of Simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy followed by corneal crosslinking (CXL) versus CXL. Ophthalmology, 2016 May;123(5):974-83
2.	Kontadakis GA , Kymionis GD, Kankariya VP, Pallikaris AI. Effect of Corneal Collagen Cross-Linking on Corneal Innervation, Corneal Sensitivity, and Tear Function of Patients with Keratoconus. Ophthalmology. 2013 May;120(5):917-22.
3.	Kontadakis GA , Palioura S, Yoo SH. Wavelike Interface Opacities After Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty: 7-Year Follow-up. Eye Contact Lens. 2015 Sep 21. [Epub ahead of print]
4.	Kontadakis GA , Karagiannis D, Kandarakis A. Macular injury with rapid onset of choroidal neovascularization from depilation laser JAMA Ophthalmol. 2015 Jan 29.
5.	Kontadakis GA , Chronopoulou K, Tsopouridou R, Tabibian D, Kymionis GD Nepafenac ophthalmic suspension 0.3% for the management of ocular pain after photorefractive keratectomy. J Refract Surg, accepted for publication
6.	Kontadakis GA , Kymionis GD, Kankariya VP, Papadiamantis A, Pallikaris AI. Corneal confocal microscopy findings in sporadic cases of pre-Descemet corneal dystrophy Eye Contact Lens. 2013 Feb 6. [Epub ahead of print]
7.	Kandarakis AS, Kontadakis GA , Kandarakis SA, Dimitriou C, Chatziangelidis I, Karagiannis D. Phacoemulsification in Eyes with Post-Trabeculectomy Choroidal Detachment. J Glaucoma. 2017 Nov 7.
8.	Karagiannis D, Kontadakis GA , Kaprinis K, Giarmoukakis A, Georgalas I, Parikakis E, Tsilimbaris MK. Treatment of myopic choroidal neovascularization with intravitreal ranibizumab injections: the role of age. Clin Ophthalmol. 2017 Jun 22;11:1197-1201.
9.	Kymionis GD, Kontadakis GA , Hashemi KK. Accelerated versus conventional corneal crosslinking for refractive instability: an update. Curr Opin Ophthalmol. 2017 Jul;28(4):343-347.
10.	Diakonis VF, Kontadakis GA , Anagnostopoulos A, Yesilirmak N, Waren DP, Cabot F, Yoo SH, Donaldson KE Effects of Short-term Preoperative Topical Ketorolac on Pupil Diameter in Eyes Undergoing Femtosecond Laser-Assisted Capsulotomy J Refract Surg, 2017 Apr 1;33(4):230-234.
11.	Diakonis V, Yoo S, Kontadakis GA , El Danasoury AM, Donaldson KE, Culbertson WW.

-
- Femtosecond Laser-Assisted Cataract Surgery in a Patient with Posterior Chamber Phakic Intraocular Lens
Am J Ophthalmol Case Reports. Volume 1, April 2016, Pages 11-12
-
12. Karagiannis D, **Kontadakis G**, Brouzas D, Moschos M, Damanakis A
Nonorganic visual loss in a child due to school bullying,
Am J Ophthalmol Case Reports. Volume 5, April 2017, Pages 90-91,
-
13. Kymionis, G. D., Liakopoulos, D. A., Grentzelos, M. A., Naoumidi, I., **Kontadakis, G. A.**, Tsoulnaras, K. I., & Petrelli, M. K.
Mini descemet membrane stripping (m-DMES) in patients with fuchs' endothelial dystrophy: A new method.
Saudi Journal of Ophthalmology, 2016, in press
-
14. Dimitroulis D, Moris D, Pikoulis E, Spartalis E, **Kontadakis G**, Vrugt B, Serena Valsami S, Kouraklis G
Variable Pringle maneuvers and effect on intestinal epithelium in rats. A pilot experimental study in rats.
PLoS One. 2015 Oct 23;10(10):e0140707
-
15. Tsilimbaris MK, Chalkia A, Tsika C, Anastasakis A, **Kontadakis GA**
Clinical and Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Findings of Patients with Incomplete Visual Recovery after Anatomically Successful Retinal Detachment Surgery
J Ophthalmol. 2015;2015: 420401.
-
16. Kymionis G, **Kontadakis G**
Re: Arora et al.: Role of corneal collagen cross-linking in pseudophakic bullous keratopathy: a clinicopathological study (Ophthalmology 2013;120:2413-8).
Ophthalmology. 2014 Nov;121(11):e61.
-
17. Halkiadakis I, **Kontadakis GA**, Tsiakou D, Patsea E, Mitropoulos P, Kandarakis AS.
Effect of Glaucoma Medication in Tear Film Osmolarity of Patients Without Symptoms of Ocular Discomfort.
J Ocul Pharmacol Ther. 2015;31:330-4.
-
18. Karagiannis D, **Kontadakis GA**, Klados N, Tsoumpris I, Kandarakis A, Parikakis E, Georgalas I, Tsilimbaris MK
Central Retinal Vein Occlusion and Pseudoexfoliation Syndrome
Clin Interv Aging. 2015 May 20;10:879-83
-
19. Karagiannis D, **Kontadakis GA**, Kandarakis AS, Markomichelakis N, Georgalas I, Parikakis EA, Kabanarou SA.
Acute zonal occult outer retinopathy with atypical findings.
Case Rep Med. 2014;2014:290696.
-
20. Kymionis GD, Grentzelos MA, Liakopoulos DA, **Kontadakis GA**, Stojanovic N.
Corneal collagen crosslinking failure in a patient with floppy eyelid syndrome.
J Cataract Refract Surg. 2014 Sep;40(9):1558-60.
-
21. Karavitaki AE, Pallikaris IG, Panagopoulou SI, Kounis GA, **Kontadakis G**, Kymionis GD.
Long-term visual outcomes after Crystalens(®) HD intraocular lens implantation.
Clin Ophthalmol. 2014 May 22;8:937-43.
-
22. Diakonis VF, Kankariya VP, Kymionis GD, Kounis G, **Kontadakis G**, Gkenos E, Grentzelos MA, Hajithanasis G, Yoo SH, Pallikaris IG.
Long term followup of photorefractive keratectomy with adjuvant use of mitomycin C.
J Ophthalmol. 2014;2014:821920.
-
23. Pallikaris IG, Kymionis GD, Plaka AD, Binder PS, **Kontadakis GA**, Tsoulnaras KI
Femtosecond Laser-Assisted Intra-Corneal Drug Delivery.
Semin Ophthalmol. 2014 Feb 7. [Epub ahead of print]
-
24. Kymionis GD, Diakonis VF, Kankariya VP, Plaka AD, Panagopoulou SI, **Kontadakis GA**, Grentzelos MA, Tsilimbaris MK, Pallikaris IG.
Femtosecond laser-assisted intracorneal biopolymer insertion for the symptomatic treatment of bullous keratopathy.
Cornea. 2014 May;33(5):540-3.
-

25. Kymionis GD, Karavitaki AE, Grentzelos MA, Liakopoulos DA, Tsoulnaras KI, **Kontadakis GA**. Topography-based keratoconus progression after corneal collagen crosslinking. *Cornea*. 2014 Apr;33(4):419-21.
26. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Plaka A, Kankariya VP. First bilateral pediatric Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty after Penetrating Keratoplasty *J AAPOS*. 2013 Jun;17(3):337-8.
27. Datseris I, **Kontadakis GA**, Diamanti R, Datseris I, Pallikaris IG, Theodossiadi P, Tsilimbaris MK. Prospective Comparison of Low-Fluence Photodynamic Therapy Combined with Intravitreal Bevacizumab versus Bevacizumab Monotherapy for Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Semin Ophthalmol*. 2013 Oct 11.
28. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Naoumidi I, Kankariya VP, Panagopoulou S, Manousaki A, Grentzelos MA, Pallikaris IG. Comparative study of stromal bed of LASIK flaps created with femtosecond lasers (IntraLase FS150, WaveLight FS200) and mechanical microkeratome. *Br J Ophthalmol*. 2014 Jan;98(1):133-7.
29. Detorakis ET, Karavitaki A, Stojanovic N, **Kontadakis G**, Pallikaris IG. Anterior chamber angle evaluation with ultrasound biomicroscopy and optical coherence tomography in eyes implanted with a Crystalens. *Int Ophthalmol*. 2013 Oct 29. [Epub ahead of print]
30. Kymionis GD, **Kontadakis GA**. Descemet stripping endothelial keratoplasty for a failed penetrating keratoplasty graft in a pseudophakic patient with a toric intraocular lens: a case report. *BMC Ophthalmol*. 2013 Oct 30;13:64.
31. Kymionis GD, Plaka AD, Diakonis VF, Grentzelos MA, **Kontadakis GA**, Mersinoglou AC, Detorakis ET, Topouzis F. Cross-linking as an adjuvant treatment for tectonic corneal lamellar graft preparation. *Open Ophthalmol J*. 2013 Oct 30;7:79-81.
32. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Grentzelos M, Panagopoulou S, Stojanowicz N, Kankariya VP, Henderson BA, Pallikaris IG. Thin-flap laser in situ keratomileusis with femtosecond-laser technology *J Cataract Refract Surg*. 2013 Sep;39(9):1366-71.
33. Kymionis GD, Klados N, **Kontadakis GA**, Mikropoulos D. Treatment of Superior Limbic Keratoconjunctivitis with Topical Tacrolimus 0,03% Ointment *Cornea*. 2013 Nov;32(11):1499-501.
34. Plainis S, **Kontadakis GA**, Feloni E, Giannakopoulou T, Tsilimbaris MK, Pallikaris IG, Moschandreas J. Comparison of Visual Acuity Charts in Young Adults and Patients with Diabetic Retinopathy *Optom Vis Sci*. 2013 Jan 9. [Epub ahead of print]
35. Poulere E, Moschandreas J, **Kontadakis GA**, Pallikaris IG, Plainis S. Effect of blur and subsequent adaptation on visual acuity using letter and Landolt C charts: differences between emmetropes and myopes. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2013 Jan 9. [Epub ahead of print]
36. **Kontadakis GA**, Kymionis GD, Kankariya VP, Pallikaris IG. Follow up of intraocular lens subluxation with a combined topographer/aberrometer. *Journal of Optometry*. 2012;5(3):147-9.
37. **Kontadakis GA**, Ginis H, Karyotakis N, Pennos A, Pentari I, Kymionis GD, Pallikaris IG. In vitro effect of corneal collagen cross-linking on corneal hydration properties and stiffness. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012 Jun 23. [Epub ahead of print]
38. Kymionis GD, **Kontadakis GA**. Ten Years with Detached Descemet Membrane *Arch Ophthalmol*. 2012 Nov;130(11):145
39. Tsilimbaris MK, **Kontadakis GA**, Tsika CS, Papageorgiou D, Charoniti M.

- Effect of panretinal photocoagulation treatment on vision-related quality of life of patients with proliferative diabetic retinopathy.
Retina. 2012 Nov 27. [Epub ahead of print]
-
40. Kymionis GD, Kankariya VP, **Kontadakis GA**.
Tacrolimus ointment 0.03% for treatment of refractory childhood phlyctenular keratoconjunctivitis. Cornea. 2012 Aug;31(8):950-2.
-
41. Kankariya V, Kymionis G, **Kontadakis G**, Yoo S.
Update on simultaneous topo-guided photorefractive keratectomy immediately followed by corneal collagen cross-linking for treatment of progressive keratoconus.
Int J Keratoconus and Ectatic Corneal Diseases. 2012 Sep;1(3):185-9.
-
42. Kymionis GD, Kankariya VP, **Kontadakis GA**, Ziakas N.
Isolated Corneal pseudodendrites as the initial manifestation of tyrosinemia II in monozygotic twins
J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 2012 May 8;49(3):e1-4.
-
43. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Plaka A, Pallikaris IG.
Persistent central posterior capsule bulging after cataract extraction for posterior lenticonus.
Eye (Lond). 2012 Mar 2. [Epub ahead of print]
-
44. Kymionis GD, Kankariya VP, **Kontadakis GA**.
Combined treatment with flap amputation, phototherapeutic keratectomy, and collagen crosslinking in severe intractable post-LASIK atypical mycobacterial infection with corneal melt.
J Cataract Refract Surg. 2012 Feb 23. [Epub ahead of print]
-
45. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Plaka AD, Tsilimbaris MK.
Treatment of inferior descemet membrane detachment secondary to cataract surgery with air injection and supine head position.
Semin Ophthalmol. 2012 Jan;27(1-2):22-4.
-
46. Kymionis GD, **Kontadakis GA**.
Severe corneal vascularization after intacs implantation and rigid contact lens use for the treatment of keratoconus.
Semin Ophthalmol. 2012 Jan;27(1-2):19-21.
-
47. Pallikaris IG, Karavitaki AE, Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Panagopoulou SI, Kounis GA.
Unilateral Sulcus Implantation of the Crystalens HD.
J Refract Surg. 2012 Feb 1:1-3. [Epub ahead of print]
-
48. Pallikaris IG, **Kontadakis GA**, Portaliou DM.
Real and pseudoaccommodation in accommodative lenses.
J Ophthalmol. 2011;2011:284961.
-
49. Kymionis GD, Plaka A, **Kontadakis GA**, Astyrakakis N.
Treatment of corneal dellen with a large diameter soft contact lens.
Cont Lens Anterior Eye. 2011 Dec;34(6):290-2.
-
50. Kymionis GD, Portaliou DM, Kounis GA, Limnopoulou AN, **Kontadakis GA**, Grentzelos MA.
Simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus.
Am J Ophthalmol. 2011 Nov;152(5):748-55.
-
51. Kymionis GD, Kankariya VP, **Kontadakis GA**.
Long-term presence of metallic particles in the DSAEK interface.
Eye (Lond). 2011 Oct;25(10):1382-3.
-
52. Tsika C, Tsilimbaris MK, Makridaki M, **Kontadakis G**, Plainis S, Moschandreas J.
Assessment of macular pigment optical density (MPOD) in patients with unilateral wet age-related macular degeneration (AMD).
Acta Ophthalmol. 2011 Nov;89(7):e573-8.
-
53. Kymionis GD, **Kontadakis GA**.
Corneal clarity restoration after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty with edematous corneal graft.
Eur J Ophthalmol. 2011 Nov-Dec;21(6):830-3

-
54. **Kontadakis GA**, Plainis S, Moschandreas J, Tsika C, Pallikaris IG, Tsilimbaris MK.
In vivo evaluation of blue-light attenuation with tinted and untinted intraocular lenses.
J Cataract Refract Surg. 2011 Jun;37(6):1031-7.
-
55. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Agorogiannis GI, Bennett M, Angelidou F.
Descemet stripping automated endothelial keratoplasty combined with phacoemulsification in Chandler syndrome.
Eur J Ophthalmol. 2011 Jul-Aug;21(4):495-7.
-
56. Kymionis GD, Grentzelos MA, Karavitaki AE, Kounis GA, **Kontadakis GA**, Yoo S, Pallikaris IG.
Transepithelial Phototherapeutic Keratectomy Using a 213-nm Solid-State Laser System Followed by Corneal Collagen Cross-Linking with Riboflavin and UVA Irradiation.
J Ophthalmol. 2010;2010:146543.
-
57. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, **Kontadakis GA**, Krasia MS, Papadiamantis AG, Coskunseven E, Pallikaris AI.
Posterior linear stromal haze formation after simultaneous photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Oct;51(10):5030-3.
-
58. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Yoo SH.
DSAEK graft evaluation using C:P ratio.
Ophthalmology. 2010 Mar;117(3):639.
-
59. Kymionis GD, Portaliou DM, Karavitaki AE, Krasia MS, **Kontadakis GA**, Stratos A, Yoo SH.
LASIK flap buttonhole treated immediately by PRK with mitomycin C.
J Refract Surg. 2010 Mar;26(3):225-8.
-
60. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Naoumidi TL, Kazakos DC, Giapitzakis I, Pallikaris IG.
Conductive keratoplasty followed by collagen cross-linking with riboflavin-UV-A in patients with keratoconus.
Cornea. 2010 Feb;29(2):239-43.
-
61. Kymionis GD, **Kontadakis GA**, Kounis GA, Portaliou DM, Karavitaki AE, Magarakis M, Yoo S, Pallikaris I.
Simultaneous topography-guided PRK followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus.
J Refract Surg. 2009 Sep;25(9):S807-11.
-

BOOK CHAPTERS [8]

1. Laser Technology (Excimer and Femto).
Kymionis GD, **Kontadakis GA**
In: Spaeth G, Danesh-Meyer H, Goldberg I, Kampik A, eds. Ophthalmic Surgery: Principles and Practice, 4th ed. Elsevier Inc; 2011
-
2. Clinical diagnosis of keratoconus.
Kymionis GD, Plaka A, **Kontadakis GA**
In: Barbara A. ed. Textbook on Keratoconus, New Insights: Jaypee Brothers Medical Publishers Inc; 2011
-
3. Cataract Surgery and Presbyopia.
Tsilimbaris MK, Detorakis ET, **Kontadakis GA**.
In: Pallikaris I, Plainis S, Charman N, eds. Presbyopia: Origins, Effects and Treatment; SLACK Inc; 2012
-
4. CXL in combination with surface ablation
Kymionis GD, **Kontadakis GA**
In: Randleman B, Hafezi F. eds. Corneal Collagen Cross Linking. SLACK Inc; 2014
-
5. Ocular biomarkers in diseases and toxicities
Kontadakis GA, Plaka A, Fragou D, Kymionis GD, Tsatsakis A.
In: Gupta C. ed. Biomarkers in Toxicology. Elsevier Inc; 2014
-
6. What should I do if my patient has a decentered flap?
Kymionis GD, **Kontadakis GA**
-

In: Chang D, Yoo SH, Henderson BA. eds. Curbside Consultation in Refractive and Lens-Based Surgery: 49 Clinical Questions. SLACK Inc; 2014

Surgical management of epiretinal membrane

7. Tsilimbaris MK, Tsika C, **Kontadakis GA**, Giarmoukakis A.

In: Patricio A. Pacheco PA, eds. Eye Surgery. InTech; in press

CXL in combination with surface ablation techniques

8. Kymionis GD, **Kontadakis GA**

In: Lee W. Mehta J, eds. Corneal Crosslinking. Thieme Medical Publishers; in press

COMMITTEE- EDITORIAL BOARD MEMBERSHIP

- Member of Organizing Committee (Secretary) of Aegean Cornea XIV Meeting
- Tear Film and Ocular Surface Society Young Investigator Committee (2013-2016)
- Tear Film and Ocular Surface Society Ambassador in Greece (2017)
- Lead Guest Editor, Special Issue of "Journal of Ophthalmology" (2017)
- Expert Board of "International Journal of Ophthalmology" (2013-2014)
- Member of the Scientific Committee (IRB) of "Ophthalmiatreio Eye Hospital" (2013-15)

REVIEWER

- Ophthalmology (IF:6.750)
- Oncotarget (IF: 6.359)
- Scientific Reports (IF: 5.578)
- Journal of Refractive Surgery (IF:3.314)
- British Journal of Ophthalmology (IF:3.036)
- Acta Ophthalmologica Scandinavica (IF:3.032)
- Journal of Cataract and Refractive Surgery (IF: 2.687)
- Molecular Vision (IF: 2.110)
- Current Eye Research (IF: 2.025)
- Cornea (IF: 1.833)
- Journal of Ophthalmology (IF: 1.463)
- BMC Ophthalmology (IF: 1.238)
- Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging (IF: 1.212)
- BioMed Research International (IF: 1.579)
- Eye and Vision

TEACHING EXPERIENCE

2017-2018 Lectures in the University of Crete, Medical School, Course "Ophthalmology"

2010-2016 Lectures in the University of Crete, MSc Course "Optics and Vision"

2012-2017 Participation in the educational program of "Ophthalmiatreio" Eye Hospital of Athens with lectures for residents and Faculty

2007 Teacher in IEK of Heraklion, School of Nursing

INVITED LECTURES

- 2017 “Early Keratoconus is Best Treated by Topography-Guided Laser Ablation and Cross-Linking”, in Focus Session “Controversies in Corneal Treatment”, 8th EuCornea Congress, Lisbon 2017
-
- 2017 “Phakic IOLs” in the Instructional Course: “Refractive surgery from Residents to Residents and not only”, in the 31th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2015 “Phakic IOLs” in the Instructional Course: “Refractive surgery from Residents to Residents”, in the 29th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2015 “IOLs for Cataract Surgery” in the Instructional Course: “Cataract surgery from Residents to Residents”, in the 29th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2014 “Phakic IOLs” in the Instructional Course: “Refractive surgery from Residents to Residents”, in the 28th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2013 “Premium IOLs: Principles of Performance” in the Instructional Course: “Premium IOLs” in the 27th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2013 “Preoperative Evaluation for Refractive Surgery” in the Instructional Course: “Refractive surgery from Residents to Residents”, in the 27th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2012 “Keratoconus and New Pathophysiology aspects”, in the 11th Aegean Summer School in Visual Optics
-
- 2012 “LASIK complications” in the Instructional Course: “Refractive surgery from Residents to Residents”, in the 26th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery
-
- 2009 “Refractive Surgery Techniques” in the 8th Aegean Summer School in Visual Optics
-
- 2008 “Refractive Surgery Techniques” in the 7th Aegean Summer School in Visual Optics
-

PAPER & POSTER PRESENTATIONS IN INTERNATIONAL MEETINGS

- George Kontadakis**, Christopher Smith, Daniel Kaitis, Rocio Bentivegna, Jordan Winegar, Sonia Yoo, Victor Perez, Mohamed Abou Shousha
1. Diagnostic performance of the Endothelial/Descemet’s membrane thickness versus endothelial cell density in the diagnosis of corneal graft rejection
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016
-
- Mohamed S. Sayed, **George Kontadakis**, Maria Paula Fernandez, Ta C. Chang, Kara M. Cavuoto, Sander R. Dubovy, Mohamed Abou Shousha
2. Anterior Segment Spectral Domain Optical Coherence Tomography and Histopathologic Study of Peters Anomaly
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016
-
- Yu-Cherng Chang, Marco Ruggeri, **Kontadakis George**, Sonia H. Yoo, Jean-Marie A. Parel, Fabrice Manns
3. Dynamic Changes of the Internal Structure of the Lens with Accommodation
-

-
- The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016
-
4. N. Yesilirmak, M. Rodriguez, **G. Kontadakis**, D. Portaliou, M. Sayed, S. Yoo, W. Lee
Evaluation of corneal changes after upper eyelid blepharoplasty
ASCRS -ASOA Symposium and Congress, New Orleans, LA, USA, 2016
-
5. Christopher Smith, Mohamed Abou Shousha, **George Kontadakis**, Rocio Bentivegna, Matthew Council, Sean Edelstein, Sonia Yoo, Victor Perez, Daniel Kaitis,, Jordan Winegar
Endothelial–Descemet Membrane Thickness Versus Endothelial Cell Count for the Diagnosis of Corneal Graft Rejection
ASCRS -ASOA Symposium and Congress, New Orleans, LA, USA, 2016
-
6. **George Kontadakis**, Christopher Smith, Daniel Kaitis, Rocio Bentivegna, Sonia Yoo, Victor Perez, Mohamed Abou Shousha
Diagnostic performance of the Endothelial/Descemet’s membrane thickness versus endothelial cell density in the diagnosis of corneal graft rejection
20th ESCRS Winter Meeting, Athens 2016
-
7. **George Kontadakis**, Konstantinos Kaprinis, Spiros Nikas, Efstratios Parikakis, Vasilios Peponis
Femtosecond assisted intracorneal segments implantation for mild to moderate keratoconus: Initial results
20th ESCRS Winter Meeting, Athens 2016
-
8. **G.Kontadakis**, G. Kymionis V. Kankariya A. Plaka I. Pallikaris
Simultaneous topography-guided PRK with CXL versus CXL alone: a long term comparative clinical and in vivo confocal microscopy study
19th ESCRS Winter Meeting, Istanbul 2015
-
9. **George Kontadakis**, George Kymionis, Vardhaman Kankariya, Argyro Plaka, Ioannis Pallikaris
Simultaneous topography-guided PRK with CXL versus CXL alone: a long term comparative clinical and in vivo confocal microscopy study
Refractive Surgery Subspecialty Day, AAO Annual Meeting, Chicago, IL, USA, 2014
-
10. **G. A. Kontadakis**, G. D. Kymionis, I Naoumidi, V. Kankariya, I. Pallikaris
Comparative Study of Stromal Bed of LASIK Flaps Created With Femtosecond Lasers and Mechanical Microkeratome
ASCRS -ASOA Symposium and Congress, Boston MA, USA, 2014
-
11. A. Kandarakis, **G. Kontadakis**, C. Dimitriou, S. Kandarakis, I. Chatziangelides, Karagiannis, D
Phacoemulsification in Eyes With Post-Trabeculectomy Choroidal Detachment
ASCRS -ASOA Symposium and Congress, Boston MA, USA, 2014
-
12. V. Kankariya, **G. Kontadakis**, G. Kymionis, M. Grentzelos, I. Pallikaris
Simultaneous Topography-Guided PRK with CXL Versus CXL Alone in KC: Prospective Comparative Study
72th Annual Conference of the All India Ophthalmological Society, Agra, India, 2014
-
13. Halkiadakis I, **Kontadakis G**, Patsea E, Kandarakis S, Tsiakou D. Kandarakis A.
Glaucoma Medication and Tear Film Osmolarity
Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, New Orleans, LA, USA, 2013
-
14. Halkiadakis I, **Kontadakis G**, Patsea E, Papakonstantinou D. Kandarakis A.
Glaucoma Medication and Tear Film Osmolarity
5th World Glaucoma Congress, Vancouver, Canada, 2013
-
15. **Kontadakis GA**, Tontos C, Tsilimbaris MK, Pallikaris IG, Plainis S
Normative Distance, Intermediate And Near Visual Acuity In Simulated Presbyopia
ASCRS-ASOA Symposium and Congress, San Francisco 2013
-
16. Pallikaris IG, Karavitaki A, Stojanovic N, **Kontadakis GA**, Detorakis ET.
Ultrasound Biomicroscopy and OCT Evaluation of Anterior Chamber Angle in Eyes implanted with Accomodating IOLs: Clinical Corelations
ASCRS-ASOA Symposium and Congress, San Francisco 2013
-
17. **Kontadakis G**, Kymionis GD, Naoumidi I, Kankariya V, Pallikaris IG
-

- Comparative Study Of Stromal Bed And Cutting Edge Quality With Intralase FS 150 And The Wavelight FS 200 Femtosecond Lasers And By A Mechanical Microkeratome
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2012
-
18. **Kontadakis G**, Kymionis GD, Kankariya V, Pallikaris AI, Pallikaris IG
Long-term effect of corneal collagen cross-linking on corneal innervation, corneal sensitivity and tear function of patients with keratoconus
XXX Congress of the ESCRS, Milan 2012
-
19. **Kontadakis G**, Kymionis GD, Kankariya V, Papadiamantis A, Pallikaris AI
Corneal confocal microscopy findings in unrelated cases of pre-descemet corneal dystrophy
16th ESCRS Winter Meeting, Prague 2012
-
20. **Kontadakis GA**, Kymionis GD, Diakonis VF, Plaka A
Femtosecond Laser Assisted Intra-Corneal Drug Delivery
Cornea Day, 16th ESCRS Winter Meeting, Prague 2012
-
21. **G. Kontadakis**, G. Kymionis, I. Naoumidi, S. Panagopoulou, V. Kankaria, I. Pallikaris
Comparative Study Of Stromal Bed And Cutting Edge Quality With Intralase FS 150 And The Wavelight FS 200 Femtosecond Lasers And By A Mechanical Microkeratome
26th International Meeting of the Hellenic Society of Intraocular Implant & Refractive Surgery, Athens 2012
-
22. **GA Kontadakis**, A Pennos, I Pentari, G Kymionis, IG Pallikaris², HS Ginis
Corneal Edema And Tonometry Errors: An In-vitro Comparative Evaluation Of Dynamic Contour Tonometry, Goldman Applanation Tonometry And Tonopen XI
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2011
-
23. MK Tsilimbaris, S Plainis, C Tontos, **G Kontadakis**, I Pallikaris
Normative Distance, Intermediate And Near Visual Acuity In Simulated Presbyopia
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2011
-
24. **GA Kontadakis**, G Kounis, GD Kymionis, A Stratos, IG Pallikaris
Comparative Evaluation of Photorefractive Keratectomy With Use of Excimer Laser and Solid-State Laser System
ASCRS-ASOA Symposium and Congress, San Diego 2011
-
25. **Kontadakis G**, Ginis H, Pennos A, Karyotakis N, Pentari I, Kymionis G, Pallikaris I
In vitro effect of corneal collagen cross-linking on corneal hydration properties
European Society Of Cataract And Refractive Surgeons Winter Meeting, Istanbul 2011
-
26. Ginis H, **Kontadakis G**, Karyotakis N, Pennos A, Pentari I, Kymionis G, Pallikaris I
Acute mechanical effect of riboflavin corneal cross-linking
European Society Of Cataract And Refractive Surgeons Winter Meeting, Istanbul 2011
-
27. **G. A. Kontadakis**, H. Ginis, N. Karyotakis, AI. Pennos, I. Pentari, G. D. Kymionis, I. G. Pallikaris In vitro effect of corneal collagen cross-linking on corneal hydration properties and stiffness
25th International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2011
-
28. GD Kymionis, MA Grentzelos, DM Portaliou, GA Kounis, AE Karavitaki. AN Limnopoulou, **GA Kontadakis**. SI Panagopoulou
Long-term results of simultaneous topo-guided photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus
25th International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2011
-
29. Plainis S, Tondos C, **Kontadakis G**, Tsilimbaris M, Pallikaris I
Normative distance, intermediate and near visual acuity in simulated presbyopia
European Society Of Cataract And Refractive Surgeons Winter Meeting, Istanbul 2011
-
30. H. Ginis, A. Pennos, I. Pentari, **G. Kontadakis**, I. Pallikaris
Evaluation of a novel biomaterial for the creation of customized intracorneal inlays
-

-
- 25th International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2011
-
31. **GA Kontadakis**, GD Kymionis, VF Diakonis, A Papadiamantis, AI Pallikaris
Keratocyte Density in Clinically and Topographically Normal Eyes of Patients With Unilateral Keratoconus
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2010
-
32. G. Kymionis, **G. Kontadakis**, A. Karavitaki, G. Kounis, I. Pallikaris
Simultaneous topoguided photorefractive keratectomy (PRK) followed by corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of keratoconus
23rd International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2010
-
33. **G Kontadakis**, G Kymionis, D Portaliou, V Diakonis, I Pallikaris
Effect of corneal collagen cross-linking on corneal sensitivity, tear function and innervation: a clinical and confocal microscopic study
23rd International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2010
-
34. **Kontadakis G**, Ginis H, Karyotakis N, Pennos A, Pentari H, Kymionis G, Pallikaris I
The effect of riboflavin mediated corneal crosslinking on corneal hydration
European Association for Vision and Eye Research Annual meeting, Hersonissos Crete, 2010
-
35. **Kontadakis G**, Kymionis G, Kounis G, Portaliou D, Grentzelos M, Limnopoulou A, Diakonis V, Pallikaris I
Results of corneal collagen crosslinking with riboflavin and UV-A radiation
European Association for Vision and Eye Research Annual meeting, Hersonissos Crete, 2010
-
36. BF Diakonis, GD Kymionis, D Portaliou, **G Kontadakis**, A Pallikaris
Posterior Linear Stromal Haze Formation After Simultaneous PRK Followed by Corneal Collagen Crosslinking
Refractive Surgery subspecialty Day of the Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, Chicago, IL, USA, 2010
-
37. **Kontadakis G**, Kymionis G, Diakonis V, Stratos A, Coskunseven E, Pallikaris I
Effect of Corneal Collagen Crosslinking on Corneal Sensitivity, Tear Function, and Innervation: A Clinical and Confocal Microscopic Study
Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, San Francisco, CA, USA, 2009
-
38. GD Kymionis, **G Kontadakis**, GA Kounis, DM Portaliou, A Karavitaki, IG Pallikaris
Simultaneous Topo-guided Photorefractive Keratectomy Followed by Corneal Collagen Crosslinking for Keratoconus
Refractive Surgery subspecialty Day of the Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, San Francisco, CA, USA, 2009
-
39. **G Kontadakis**, GD Kymionis, DM Portaliou, VF Diakonis, IG Pallikaris
Effect of Corneal Collagen Crosslinking on Corneal Sensitivity, Tear Function, and Innervation
Refractive Surgery subspecialty Day of the Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, San Francisco, CA, USA, 2009
-
40. **Kontadakis G**, Kymionis G, Portaliou D, Diakonis V, Pallikaris I
Effect of corneal collagen crosslinking on corneal sensitivity, tear function and innervation: a clinical and confocal microscopic study
European Association for Vision and Eye Research Annual meeting, Portoroz, Slovenia 2009
-
41. **Kontadakis G**, Kymionis G, Portaliou D, Kounis G, Karavitaki A, Pallikaris I
Simultaneous topo-guided photorefractive keratectomy (PRK) followed by collagen cross-linking (CXL) for the treatment of keratoconus
European Association for Vision and Eye Research Annual meeting, Portoroz, Slovenia 2009
-
42. **G Kontadakis**, GD Kymionis, MA Grentzelos, GA Kounis, DM Portaliou, E Coskunseven, ET Detorakis, VM Karamatakis. IG Pallikaris
IOP Measurements Following Corneal Collagen Crosslinking in Keratoconic Patients
-

-
- Refractive Surgery subspecialty Day of the Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, San Francisco, CA, USA, 2009
-
43. C. I. Tsika, **G. Kontadakis**, M. Makridaki, S. Plainis, J. Moschandreas, I. G. Pallikaris, and M. K. Tsilimbaris
Assessment of Macular Pigment Optical Density in Patients With Unilateral Wet Amd
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2009
-
44. **G. Kontadakis**, G. Kymionis, D. Bouzoukis, Aim. Stratos.
Flap amputation with phototherapeutic keratectomy (PTK) and adjuvant mitomycin C for severe post-LASIK epithelial ingrowth
23rd International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2009
-
45. G. Kymionis, **G. Kontadakis**
Diagnosis of donor graft partial displacement behind the iris after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty with anterior segment optical coherence tomography
23rd International Congress of Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2009
-
46. **G Kontadakis**, C Tsika, S Plainis, J Moschandreas, M Makridaki, MK Tsilimbaris
Blue Light Absorption of the Crystalline Lens and Tinted and Not Tinted IOLs
Annual meeting of the American Academy of Ophthalmology, Atlanta, Georgia, USA, 2008
-
47. **GA Kontadakis**, MK Tsilimbaris, S Charissis, SD Yarmenitis
A new method to quantify eye blood supply: Contrast-enhanced Ultrasound perfusion studies of the retinal-choroidal complex and the retrobulbar vascular complex
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2008
-
48. CI Tsika, **GA Kontadakis**, S Plainis , M Makridaki, MK Tsilimbaris
Blue Light Absorption Of The Crystalline Lens And Tinted And Not Tinted Intraocular Lenses
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2008
-
49. G.D. Kymionis, T. Ide, V. Diakonis, **G. Kontadakis**, M. Gretselos, D. Portaliou, S. Yoo, T. O'Brien, I. Pallikaris
Effect of Topical Beta-Blocker Eye Drops on Corneal Haze Formation After Photorefractive Keratectomy (PRK): An Experimental Study
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2008
-
50. **GA. Kontadakis**, CI. Tsika, S Plainis, MI Makridaki , I Moschandreas, MK Tsilimbaris
In vivo assessment of blue light absorption by tinted and not tinted IOLs and by the crystalline lens
European Association for Vision and Eye Research Annual meeting, Portoroz, Slovenia 2008
-
51. C. I. Tsika, **G. Kontadakis**, M. Makridaki, S. Plainis, J. Moschandreas, I. G. Pallikaris, and M. K. Tsilimbaris
Macular Pigment Optical Density in patients with wet AMD in one eye and dry AMD in the fellow eye.
European Association for Vision and Eye Research Annual meeting, Portoroz, Slovenia 2008
-
52. **GA. Kontadakis**, CI. Tsika, S Plainis, MI Makridaki , MK Tsilimbaris
Blue Light Absorption Of The Crystalline Lens And Tinted And Not Tinted Intraocular Lenses
22nd International Congress, Hellenic Society of Intraocular Implant and Refractive Surgery, Athens 2008
-
53. Tiniakos D, **Kontadakis G**, Zafiri V, Sakarellos A, Kittas C, Pitsios T
Immunohistochemical study of human skin from Egyptian mummies,
XXVII International Congress of the International Academy of Pathology, Athens 12-17 October 2008
-

OTHER ACTIVITIES

11/2014: Visiting physician in the Cornea Service, **Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami**

4/2014: Visiting physician in the Cornea Service, **Massachusetts Eye and Ear infirmary, Boston**

10/2009: Visiting physician in the Cornea Service, **Department of Ophthalmology, University of California San Francisco**

2008-today: Participation in voluntary ophthalmic examinations of elderly people and children in remote areas of Crete (more than 20 daily or two-day expeditions), organized by the non-profit organization "University of the Mountains" under the supervision of Prof. Ioannis Pallikaris

2008-2009: Secretary General of the Union of Postgraduate Students of the Medical School, University of Crete

2003-2005: Vice-President of the "Association of Cretan Students of Athens"

2002-2006: Founding and active member of the students association for voluntary blood donation of the University of Athens "Aimopetalio"

MEMBERSHIPS

- The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)
- American Academy of Ophthalmology (AAO)
- European Association for Vision and Eye Research (EVER)
- Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS)
- International Society of Refractive Surgery (ISRS)
- European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS)

Δημοσιεύσεις περιεχομένου διατριβής σε διεθνή περιοδικά με κριτές

Kontadakis GA et al. *Ophthalmology*. 2016;123(5):974-83

Kontadakis GA et al. *Ophthalmology*. 2013;120(5):917-22

Kontadakis GA et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013 Feb;251(2):543-7



Long-Term Comparison of Simultaneous Topography-Guided Photorefractive Keratectomy Followed by Corneal Cross-linking versus Corneal Cross-linking Alone

Georgios A. Kontadakis, MD, MSc,^{1,2} Vardhaman P. Kankariya, MD,¹ Konstantinos Tsoulnaras, MD,¹ Aristofanis I. Pallikaris, PhD,¹ Argyro Plaka, MD, MSc,¹ George D. Kymionis, MD, PhD^{1,2}

Purpose: To compare the results of corneal collagen cross-linking (CXL) alone with combined simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy plus CXL (tPRK-CXL) for progressive keratoconus for a 3-year interval.

Design: Prospective, comparative interventional case series.

Participants: Forty-eight patients (60 eyes) with progressive keratoconus.

Methods: Thirty eyes underwent combined tPRK with a solid-state laser (maximum ablation depth, 50 μm) followed by CXL, and 30 eyes underwent CXL alone. Groups were matched in terms of age and keratoconus stage.

Main Outcome Measures: Corrected distance visual acuity (CDVA), uncorrected distance visual acuity (UDVA), keratometry, and corneal confocal microscopy.

Results: Mean follow up was 39 ± 11 months. Mean age at operation was 28 ± 5.82 years. Before surgery, average CDVA in the tPRK-CXL group was 0.26 ± 0.17 logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR), and in the CXL group was 0.24 ± 0.18 logMAR ($P = 0.58$). At last follow-up, CDVA was 0.09 ± 0.10 logMAR in the tPRK-CXL group and 0.15 ± 0.12 logMAR in the CXL group ($P < 0.05$). In both groups, no patient lost more than 2 lines of Snellen visual acuity, whereas 19 eyes and 8 eyes in the tPRK-CXL group and in the CXL group, respectively, gained 2 or more lines of CDVA. Before surgery, average UDVA was 0.83 ± 0.54 logMAR in the tPRK-CXL group and 0.86 ± 0.62 logMAR in the CXL group ($P = 0.79$). At last follow-up, UDVA was 0.27 ± 0.25 logMAR in the tPRK-CXL group and 0.69 ± 0.58 logMAR in the CXL group ($P < 0.001$). Before surgery, steep and flat keratometry had no significant differences between groups, and at last follow-up, both steep and flat keratometry readings were significantly flatter in the tPRK-CXL group compared with the CXL group. Depth of CXL treatment, as evaluated by confocal microscopy, was 269.8 ± 31.8 μm in the CXL group and 299.7 ± 29.8 μm in the tPRK-CXL group ($P < 0.001$). No differences were found in endothelial cell density.

Conclusions: Simultaneous tPRK followed by CXL in this series of keratoconus patients offered significantly improved vision to treated patients in comparison with CXL alone, and similar results regarding postoperative stability. Safety concerns regarding corneal thickness were taken into account in treatment planning. *Ophthalmology* 2016;■:1–10 © 2016 by the American Academy of Ophthalmology.

Management of ectatic corneal disorders—keratoconus, pellucid marginal degeneration, and iatrogenic corneal ectasia—over the past decade has changed dramatically in comparison with the previous years. Previously, the treatment armamentarium mainly comprised rigid contact lenses and penetrating keratoplasty. Other treatments such as epikeratophakia and, later, lamellar keratoplasty also have been used. In the past decade, new treatment methods have evolved and changed our perspective in corneal ectasia management.¹ Corneal collagen cross-linking (CXL) is a surgical treatment that aims to stabilize the keratoconus, and intracorneal ring implantation offers the prospect of visual rehabilitation in more advanced stages. These new treatment

methods address the corneal biomechanical instability of ectasia and the optical inefficiency of the irregular cornea.^{1–5} Each patient's management can be customized depending on the stage and the progression of disease.

Laser refractive surgery also has emerged as a possible treatment for corneal ectasia in combination with CXL.⁶ In the past, excimer laser surface ablation has been studied for the visual rehabilitation of stable or forme fruste keratoconus with variable results, although it is a tissue removal technique that poses the danger of inducing progression of the disorder.^{7–9} The goal of combining surface ablation with CXL is to offer keratoconic patients both stability and functional vision.⁶ Improving functional vision

consists of improvement of uncorrected distance visual acuity (UCVA) and corrected distance visual acuity (CDVA) and normalization of corneal topography so that these patients are less dependent on rigid contact lenses to achieve satisfactory quality of vision. Early studies of the treatment combination show that simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy (tPRK) followed by CXL has the potential to offer patients both visual acuity rehabilitation and corneal stability.⁶ The purpose of this study was to compare the topographic and refractive results and the confocal microscopic findings in patients treated with simultaneous tPRK and CXL with those of patients treated with CXL alone.

Methods

In this prospective, comparative, interventional case series, we included subjects from a continuous cohort of patients with keratoconus who visited the Institute of Vision and Optics, University of Crete, seeking a consultation. Patients with progressive keratoconus, without any other systemic or ocular disease, were included in the study. The diagnosis of keratoconus was based on the axial topography map (iTrace; Tracey Technology, Houston TX). Patients were followed up at 6-month intervals, and keratoconus was described as progressive when there was an increase in the cone apex keratometry of 0.75 diopters (D) or myopic shift of 0.75 D in the spherical equivalent cycloplegic refraction. Exclusion criteria were central corneal thickness less than 400 μm , corneal scars, history of ocular trauma or burn, severe infections, and other corneal or ocular surface disorders. Also, we excluded patients with any systemic disease potentially affecting the corneal surface, such as diabetes mellitus and rheumatoid arthritis, and women who were pregnant or lactating. Patients included were 17 to 39 years of age. On confirmation of progression, patients were enrolled either in the group that underwent the combined tPRK plus CXL procedure as a treatment or in the group that underwent CXL alone. Patients were enrolled to receive the combined treatment with tPRK and CXL if their expected corneal thickness after tPRK was more than 400 μm . If this criterion was not fulfilled, patients were eligible for inclusion in the CXL only group. Patients included in the CXL only group were matched with the combined treatment group in terms of age and keratoconus stage according to Amsler-Krumeich classification for grading keratoconus. All patients were counseled thoroughly about the current clinical experience and about possible outcomes and complications of CXL and of the combined procedure. We obtained written informed consent from all subjects according to the institutional guidelines and the Declaration of Helsinki. Institutional review board/ethics committee approval was obtained.

Clinical Evaluation

The preoperative and postoperative evaluation included corneal topography (iTrace), UDVA, and CDVA assessment with manifest refraction, slit-lamp biomicroscopy, applanation tonometry, ultrasound pachymetry, and corneal confocal microscopy of the central cornea. Examinations were conducted at each visit with the reported order. We evaluated patients at 1, 3, 6, 9, and 12 months and then at 6-month intervals until the completion of the study. Patients were instructed to discontinue use of contact lenses at least 2 weeks before each visit to minimize possible effects on corneal topography measurements.

Confocal microscopy of the cornea was performed with a confocal scanning laser microscope (HRT II [Heidelberg

Engineering, Heidelberg, Germany], with the addition of the Rostock Cornea Module). After the instillation of local anesthetic (proparacaine hydrochloride 0.5%) and high-viscosity gel (carbomer 3.0 mg/g; Thilogel [Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX]), the instrument objective was brought into contact with the central cornea. Depth scans across the entire cornea were performed manually while an external camera kept track of the focal plane. The external interface of the polymethyl methacrylate cup was taken as the reference point for thickness measurements. The acquired images consisted of 384 \times 384 pixels over a 400 \times 400- μm field of view with a transversal resolution of approximately 1.04 μm and a longitudinal resolution of approximately 4 μm .

Qualitative and quantitative evaluation of corneal confocal microscopy images of corneal stroma was performed in both groups of patients. For quantitative evaluation, we measured endothelial cell density and CXL treatment depth. For the evaluation of endothelial cell density, the highest-quality image of the endothelial layer was selected by an experienced masked observer (G.A.K.) for each patient before surgery and at last follow-up. Images were analyzed quantitatively with a semiautomatic cell counting software offered by the instrument. During processing, the masked operator traced endothelial cells on a previously marked image region by using a simple point-and-click method, and the software calculated the cell count per surface area. For the evaluation of the CXL treatment depth, we used the first postoperative month examination. To avoid the effect of epithelial hyperplasia in the evaluation of treatment depth, we subtracted epithelial thickness from the total corneal CXL treatment thickness. We considered epithelial thickness to be the depth of the last image with epithelial cells and total corneal CXL treatment thickness to be the depth of the deepest corneal layer image with keratocyte desertification and characteristic lacunar or hyperreflective configuration in the central cornea, or both.¹⁰ Depth of CXL treatment was calculated by subtraction of epithelial thickness from total corneal CXL treatment thickness.

Surgical Procedure

All procedures were carried out at the Institute of Vision and Optics by the same surgeon (G.D.K.). The CXL procedure was same in both groups, with the addition of the tPRK procedure after epithelial debridement in the tPRK plus CXL group. After topical anesthesia with tetracaine 1% and oxybuprocaine 0.4% eye drops, the corneal epithelium was removed in an intended diameter of 8.0 to 9.0 mm.

Topography-Guided Photorefractive Keratectomy Procedure

A solid-state laser with a wavelength of 213 nm (Pulzar Z1; CustomVis, Perth, WA) was used for the tPRK procedure. The wavelength is generated using a major neodymium:yttrium–aluminum–garnet laser system of 1064 nm, and through special cultivated crystals, the 213 nm is finally used.^{11,12} Target correction reached up to 33% of refractive myopia and 66% of refractive astigmatism in the 5.5-mm ablation zone. Additional customization of correction was performed based on the corneal higher-order aberrations. System software allows the use of a percentage of customization from 0% to 100%. Using 0% is equivalent to a conventional laser treatment and 100% is equivalent to a full customized treatment. By adjusting this percentage and the attempted correction, we could lower the maximum depth of tissue removed to retain the safety limit of 400- μm stromal thickness after tPRK and before CXL. Maximum ablation depth was 50 μm .

Cross-linking Surgical Technique

After the tPRK procedure or immediately after epithelial debridement, commercially available riboflavin (riboflavin 0.1% isotonic eye drops with 20% dextran 500; Medicross [Medio-Haus, Behrensbrook, Neudorf, Germany]) was applied every 3 minutes for approximately 30 minutes. Ultraviolet A (UVA) irradiation then was performed with a commercially available UVA system (UV-X; Peschke Meditrade, Nürnberg, Germany) with Köhler illumination. Before treatment, the intended 3-mW/cm² surface irradiance (370 nm, 5.4 J/cm² surface dose after 30 minutes) was calibrated using the UVA meter YK-34UV (Lutron Electronic Enterprise Co., Ltd., Taipei, Taiwan). During UVA treatment, the riboflavin solution was applied every 5 minutes to ensure saturation.

At the end of the procedure, a combination of steroid and antibiotic drop (Tobradex; Alcon Laboratories, Inc.) was administered in all patients, and a silicon-hydrogel bandage contact lens (Lotrafilcon B, AirOptix [Ciba Vision, Duluth, GA]; 14.0 mm diameter, 8.6-mm base curvature, Dk = 140 barrers [contact lens oxygen permeability]) was kept in place until full corneal re-epithelialization occurred. After re-epithelialization, a course of fluorometholone 0.1% eye drops (FML; Allergan Pharmaceuticals, Westport, Ireland) with weekly tapering was applied for 1 month, and patients were advised to use preservative-free artificial tears for the first 6 postoperative months.

Statistical Analysis

Comparisons of preoperative to postoperative values and between groups at each time point were performed for keratometric values, UDVA, and CDVA. At the last follow-up, we also compared the endothelial cell density, the spherical equivalent refraction, and the defocus equivalent refraction in each group with the preoperative value and also between groups. In the first postoperative month, treatment depth was compared between groups. The differences between preoperative and postoperative values were assessed with the paired samples *t* test. Correlation of CDVA and UDVA with preoperative parameters (steep keratometry, attempted treatment depth with tPRK, corneal thickness, CXL treatment depth) was assessed in both groups separately. Subsequently, multiple linear regression was used to assess preoperative steep keratometry and attempted tPRK ablation depth (0 for patients in the CXL group, and attempted depth according to the software used for tPRK treatment planning in the tPRK plus CXL group) as possible predictors of postoperative CDVA. Preoperative CDVA and corneal thickness were not included in the model because they were correlated strongly with preoperative steep keratometry and attempted treatment depth, respectively. Both forward and backward stepwise selection procedures were applied to determine the statistically significant predictors. The percentage of patients with improvement of more than 2 lines of Snellen VA in each group was compared with the chi-square test. A *P* value of 0.05 was chosen as the limit of statistical significance. All data were collected in an Excel data sheet (Microsoft, Redmond, WA). The last observation carried forward method was used for missing postoperative data of patients who failed to attend a visit. The statistical package SPSS version 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for statistical analysis. A post hoc analysis to compute achieved power for the comparison of the UDVA improvement between groups was performed with the use of the G*Power statistical package (downloaded software from the University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany).¹³

Results

Forty-eight patients (60 eyes) with keratoconus were included in the study. Mean age at the time of the procedure was 28±5.82

years (range, 17–39 years). Mean follow-up was 39±11 months. Of 48 patients, 12 were treated bilaterally. Of 12 patients, 8 patients had 1 eye included in the CXL group and the other in the tPRK plus CXL group, and 4 patients underwent the same treatment in both eyes (2 underwent bilateral CXL and 2 received bilateral tPRK plus CXL).

Patient demographics and preoperative values are included in Table 1. In the CXL only group, 10 eyes had stage 1 keratoconus, 17 patients had stage 2 keratoconus, and 3 patients had stage 3 keratoconus. In the tPRK plus CXL group, 14 eyes had stage 1 keratoconus, 14 patients had stage 2 keratoconus, and 2 patients had stage 3 keratoconus (*P* = 0.56, chi-square test). Differences between groups in all parameters apart from central corneal thickness were not statistically significant.

Visual Acuity and Refractive Outcomes

The postoperative courses of UDVA and of CDVA in both groups are presented in Figures 1 and 2, respectively. In the CXL group at last follow-up, mean UDVA had improved by 9.1 letters (logarithm of the minimum angle of resolution [logMAR] visual acuity; standard deviation [SD], 20.84 letters), and in the tPRK plus CXL group, mean UDVA had improved by 26.9 letters of logMAR visual acuity (SD, 24.60 letters; *P* = 0.004, independent samples *t* test for the comparison of the 2 groups). Post hoc power analysis revealed that the power of the study regarding this comparison was 84.46%. Regarding CDVA, in the CXL only group at last follow-up, mean improvement was 4.7 letters of logMAR visual acuity (SD, 7.0 letters), and in the tPRK plus CXL group, mean improvement was 8.6 letters of logMAR visual acuity (SD, 6.9 letters; *P* = 0.034 independent samples *t* test for the comparison of the 2 groups). The percentage of patients who gained 2 or more Snellen lines of CDVA was significantly higher in the tPRK plus CXL group than in the CXL group (63% in the tPRK plus CXL group vs. 27% in the CXL group; *P* = 0.009, chi-square test). No eyes lost more than 2 Snellen lines of CDVA in both groups. Preoperative to postoperative changes in Snellen lines of CDVA (safety chart) are presented in Figure 3. Differences of mean UDVA and mean CDVA at last follow-up between groups also were statistically significant. Visual acuity results are presented in Table 2. Regarding refractive outcomes, the differences between groups in spherical equivalent refraction and defocus equivalent refraction at last follow-up were statistically significant (*P* = 0.018 and *P* = 0.022 respectively, independent samples *t* test). The difference between preoperative and postoperative spherical equivalent refraction was not statistically significant in the CXL group (*P* = 0.43, paired samples *t* test), and it was significant in the tPRK plus CXL group (*P* < 0.0001, paired samples *t* test). Similarly, the difference in preoperative to postoperative defocus equivalent refraction was not statistically significant in the CXL group (*P* = 0.45, paired samples *t* test), and it was statistically significant in the tPRK plus CXL group (*P* < 0.0001, paired samples *t* test). Results are included in the Table 2. Average ablation depth in the tPRK plus CXL group was 33.9 μm (SD, 8.9 μm). In the combined treatment group, the average attempted spherical equivalent refractive correction was -1.23 D and the average achieved spherical equivalent refractive correction was -2.32 D.

Topography and Corneal Thickness Outcomes

The postoperative course of steep and flat keratometry in both groups is presented in Figure 4. At last follow-up, both steep and flat keratometry had flattened in both groups. Differences in preoperative to postoperative values were statistically significant apart from flat keratometry in the CXL group. In the CXL group, the mean preoperative to postoperative difference in steep keratometry was 1.24 D (*P* < 0.001, paired samples *t* test) and that of flat

Table 1. Patient Demographics and Preoperative Values

	Total (n = 60)	Corneal Collagen Cross-linking Group (n = 30)	Topography-Guided Photorefractive Keratectomy plus Corneal Collagen Cross-linking Group (n = 30)	P Value*
Age (yrs)	28±5.82	28±3.99	27±7.24	0.53
Postoperative follow-up (mos)	39±10.89	39±9.34	39±12.41	0.95
Preoperative UDVA (logMAR)	0.85±0.58	0.86±0.62	0.83±0.54	0.79
Preoperative CDVA (logMAR)	0.25±0.17	0.24±0.18	0.26±0.17	0.58
Preoperative steep keratometry	49.34±3.61	49.48±3.55	49.19±3.73	0.75
Preoperative flat keratometry	45±2.49	45.14±2.73	44.85±2.26	0.66
Preoperative spherical equivalent	-3.94±3.55	-4.15±3.46	-3.73±3.69	0.65
Preoperative defocus equivalent	5.82±3.94	6±3.65	5.62±4.27	0.72
Preoperative CCT (μm)	468±42	448±35	490±38	<0.001
Preoperative ECD (cells/mm ²)	2643±237	2674±254	2612±217	0.31

CCT = central corneal thickness; CDVA = corrected distance visual acuity; ECD = endothelial cell density; logMAR = logarithm of the minimum angle of resolution; UDVA = uncorrected distance visual acuity.

Data are mean ± standard deviation unless otherwise indicated.

*Derived from independent samples *t* test for the comparison of corresponding values between groups.

keratometry was 0.65 D ($P = 0.06$, paired samples *t* test). In the tPRK plus CXL group, the mean difference in steep keratometry was 3.38 D ($P < 0.0001$, paired samples *t* test), and that of flat keratometry was 2.37 D ($P < 0.0001$, paired samples *t* test). Regarding the comparison between groups, at last follow-up, we found statistically significant differences in steep and in flat keratometry (Table 2). The difference in mean thinnest pachymetry of each group did not reach statistical significance at last follow-up. Both groups had statistically significant differences with the preoperative thickness, although in the tPRK plus CXL group, thinning was more prominent than in the CXL group (Table 2).

Regarding correlation analysis, improvement in CDVA in the CXL group was correlated significantly with the preoperative steep keratometry (Pearson's $r = 0.71$; $P < 0.0001$; Fig 5). None of the other parameters had a statistically significant correlation with the improvement in CDVA. Improvement in UDVA was not

correlated with any of the preoperative parameters. In the tPRK plus CXL group, improvement in CDVA was correlated with attempted tPRK ablation depth of the patients (Pearson's $r = 0.582$; $P = 0.001$) and with corneal thickness (Pearson's $r = 0.51$; $P = 0.006$). There was no correlation of CDVA improvement with steep keratometry in this group (Fig 5). Improvement in UDVA also was not correlated with the other tested parameters. Using regression analysis, it was found that significant predictors of CDVA improvement were the preoperative steep keratometry and the tPRK ablation depth ($R^2 = 0.221$).

Confocal Microscopy Outcomes (Qualitative–Quantitative)

Regarding qualitative results, we observed in both groups characteristic lacunar pattern or hyperreflectance and depopulation of

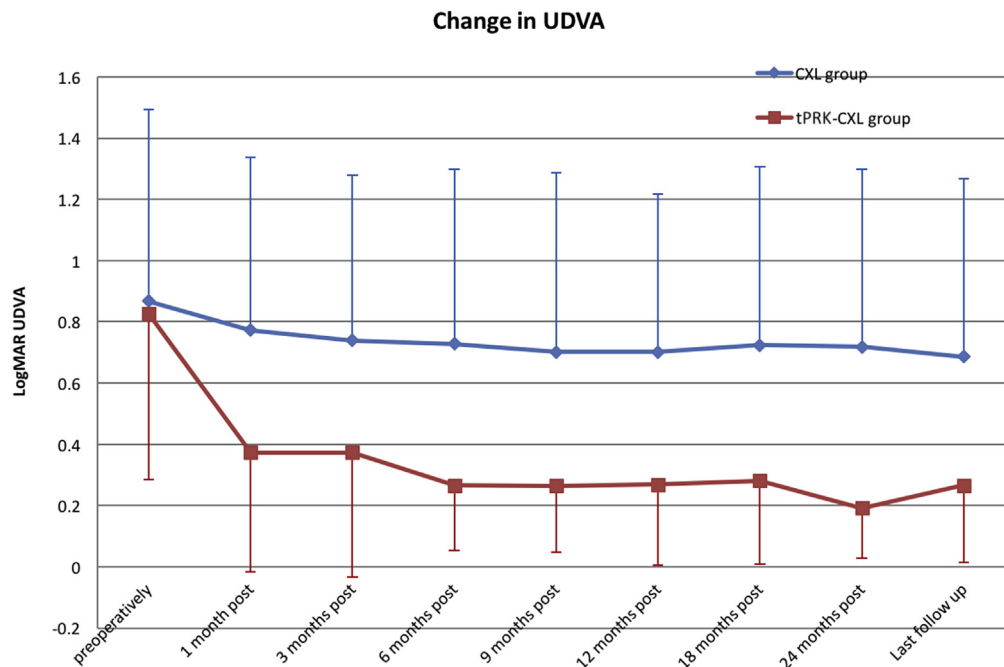


Figure 1. Graph demonstrating the course of uncorrected distance visual acuity (UDVA) after corneal collagen cross-linking (CXL) and after topography-guided photorefractive keratectomy (tPRK) followed by CXL. logMAR = logarithm of the minimum angle of resolution.

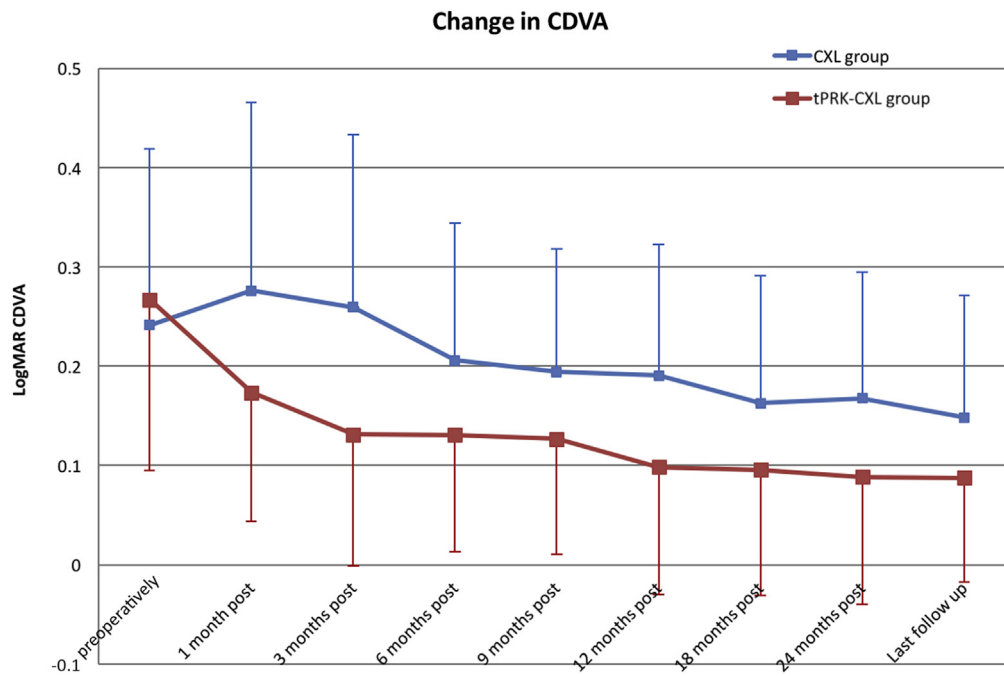


Figure 2. Graph demonstrating the course of corrected distance visual acuity (CDVA) after corneal collagen cross-linking (CXL) and after topography-guided photorefractive keratectomy (tPRK) followed by CXL. logMAR = logarithm of the minimum angle of resolution.

keratocyte nuclei in the anterior stroma as early as postoperative month 1. In the tPRK plus CXL group, the anterior stromal non-homogenous reflectance was markedly more significant than in the CXL group. The level of the posterior corneal stroma in 47% of the patients in the tPRK plus CXL group demonstrated bright, reflective, spindle-shaped areas and linear hyperreflective structures. Presence of keratocyte nuclei at the anterior stroma was evident in

the CXL group up to 1 year after surgery in all patients, whereas in the tPRK plus CXL group, 1 year after surgery there were still no keratocyte nuclei detected at the anterior stroma in 43% of eyes. At 2 years after surgery, 13% of tPRK plus CXL eyes still had keratocyte depopulation, and another 20% of eyes had a low density of keratocyte nuclei in anterior stroma. Similarly, there were no visible subbasal nerves in approximately 43% of eyes in the tPRK

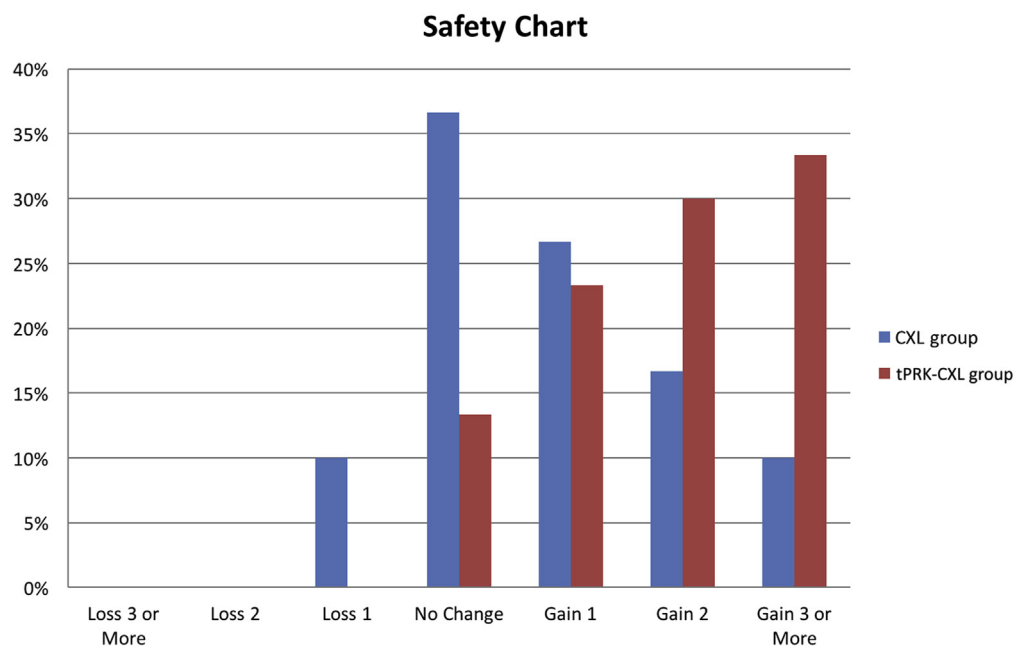


Figure 3. Bar graph showing preoperative to postoperative changes in Snellen lines of corrected distance visual acuity (CDVA; safety chart). CXL = corneal collagen cross-linking; tPRK = topography-guided photorefractive keratectomy.

Table 2. Postoperative Values and Comparisons

Values at Last Follow-up	Corneal Collagen Cross-linking Group (n = 30)	Topography-Guided Photorefractive Keratectomy plus Corneal Collagen Cross-linking Group (n = 30)	P Value*
UDVA (logMAR)	0.69±0.58	0.27±0.25	0.0008
P value [†]	0.0009	<0.0001	
CDVA (logMAR)	0.15±0.12	0.09±0.10	0.049
P value [†]	0.017	<0.001	
Steep keratometry	48.24±3.09	46.05±3.92	0.02
P value [†]	0.0004	<0.0001	
Flat keratometry	44.49±2.68	42.69±2.53	0.01
P value [†]	0.06	<0.0001	
Spherical equivalent	-3.79±3.73	-1.54±3.30	0.018
P value [†]	0.43	<0.0001	
Defocus equivalent	5.61±3.92	3.38±3.19	0.022
P value [†]	0.45	<0.0001	
CCT (μm)	428±52	444±24	0.17
P value [†]	0.004	<0.0001	
ECD (cells/mm ²)	2692±197	2611±205	0.12
P value [†]	0.56	0.98	

CCT = central corneal thickness; CDVA = corrected distance visual acuity; ECD = endothelial cell density; logMAR = logarithm of the minimum angle of resolution; UDVA = uncorrected distance visual acuity.

Data are mean ± standard deviation unless otherwise indicated.

*Derived from independent samples *t* test for the comparison of corresponding values between groups.

[†]Derived from paired samples *t* test for the comparison of corresponding preoperative to last follow-up values in each group.

plus CXL group 1 year after surgery, and in approximately 10% of eyes at 2 years after surgery, subbasal nerve plexus remained poorly visible or disrupted.

Regarding numerical results, the difference in CXL treatment depth between groups was statistically significant, reaching 269.8 μm (SD, 31.8 μm) in the CXL group and 299.7 μm (SD, 29.8 μm) in the tPRK plus CXL group ($P = 0.0008$, independent samples *t* test). Endothelial cell density showed no statistically significant differences between preoperative and postoperative values in each group, nor between groups after surgery (Table 1).

Discussion

Successful treatment of keratoconus needs to confront 2 distinct parameters of the disease: the optical inefficiency of the irregular cornea and the disease progression that may lead to the need for corneal transplantation. Recently, CXL has been established as an effective treatment for the stabilization of ectatic cornea, and excimer laser refractive surgery re-emerged as an additional treatment to CXL for

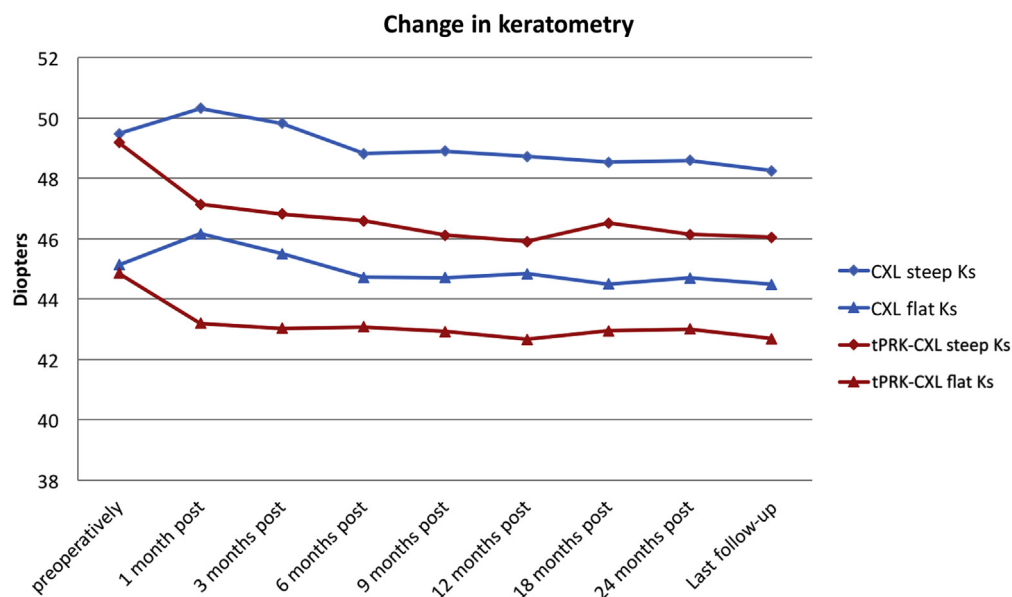


Figure 4. Graph demonstrating the postoperative course of steep (K1) and flat (K2) keratometry in both groups. CXL = corneal collagen cross-linking; tPRK = topography-guided photorefractive keratectomy.

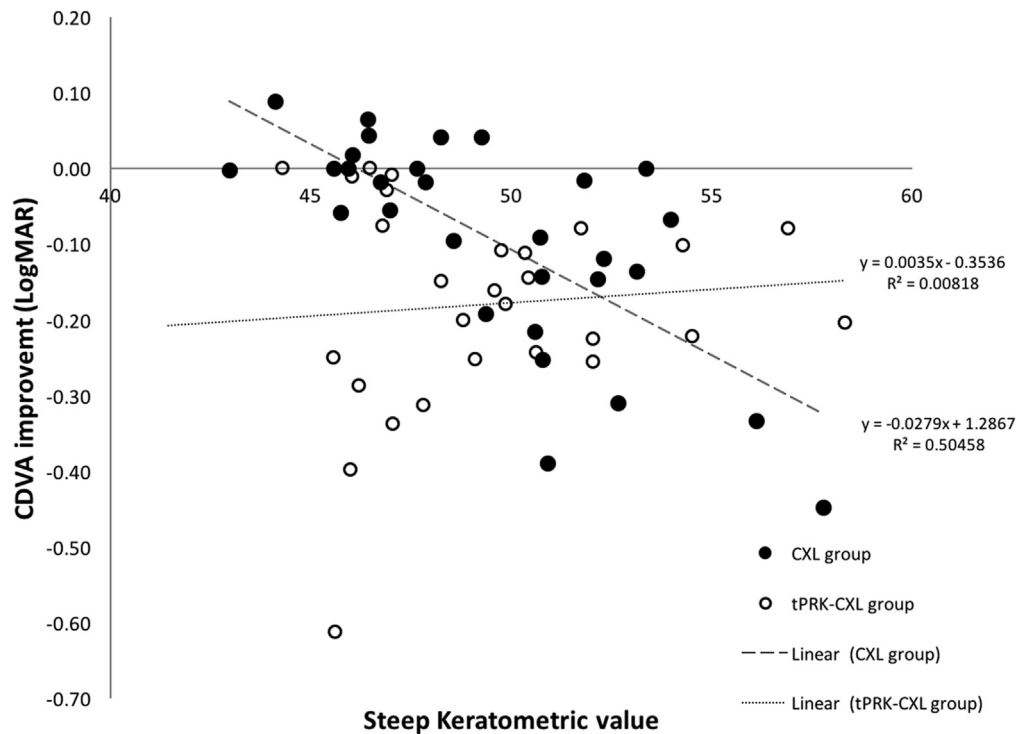


Figure 5. Scatter plot showing improvement in corrected distance visual acuity (CDVA) in each group by steep keratometric values. CXL = corneal collagen cross-linking; logMAR = logarithm of the minimum angle of resolution; tPRK = topography-guided photorefractive keratectomy.

the visual rehabilitation of such patients.^{1,6} Our study was designed to compare prospectively keratoconus patients undergoing CXL with patients undergoing simultaneous tPRK followed by CXL. The results of this study demonstrate beneficial outcomes of the combined procedure in comparison with CXL alone.

The application of excimer laser surface ablation has been introduced formerly for the correction of stable or forme fruste keratoconus,^{7–9} despite being a tissue-removing procedure. Alpíns and Stamatelatos⁷ reported a prospective case series of 32 eyes treated with customized photoastigmatic refractive keratectomy and followed up for up to 10 years with no evidence of keratoconic progression. Koller et al⁸ treated 11 eyes with customized PRK and reported improvement in refractive astigmatism, topography, and quality of vision in all the patients. Twenty-five eyes treated with topography-guided PRK reported by Cennamo et al⁹ in a prospective comparative series also showed improved topography and visual outcomes in comparison with baseline and also in comparison with nontreated control eyes. Despite those results, laser ablation of keratoconic corneas has never been widely accepted as standard treatment. However, the combination of laser ablation with CXL for keratoconus and ectasia occurring after LASIK has been validated lately by various clinical studies with favorable results in terms of visual acuity, keratometry, and also vision-related quality of life.^{14–23}

Our group originally reported the favorable results of combined tPRK with CXL in a previous noncomparative prospective cohort of patients with keratoconus and ectasia

occurring after LASIK. In our initial cohort of 14 eyes, we found a significant improvement in UDVA and CDVA in all eyes and stability, with a mean follow-up of 14 months.⁶ In another report of long-term results of 31 eyes with 19 months of follow-up, the mean improvement was 23 letters of UDVA and 4.2 letters of CDVA.¹⁹

Kanellopoulos and Binder¹⁴ previously demonstrated the favorable results of the combination of surface ablation with CXL in a single case report of a patient treated with CXL followed by a tPRK procedure after 1 year. Subsequently, the same authors published a retrospective comparison of same-day simultaneous collagen CXL and tPRK (Athens protocol) versus CXL sequentially followed by tPRK after 6 months for treatment of keratoconus.¹⁶ The authors report an average improvement in UDVA of 33 logMAR in the same-day group, which was superior to the results in the sequential group.

In this study, we performed a comparison between the standard Dresden CXL protocol and the simultaneous combination of customized tPRK with CXL. According to our study, both CDVA and UDVA show a more striking improvement in the combined treatment group in comparison with the CXL group, although patients treated with CXL also showed improvement. In terms of visual acuity, the advantageous effect of the tPRK treatment was more striking in UDVA, which improved by 9 logMAR in the CXL group and by 27 logMAR in the combined treatment group. The CDVA improved by 5 logMAR in the CXL group and by 9 logMAR in the combined treatment group. In both parameters, the results are similar to the previously reported studies of the combined procedure. According to

these results, patients treated even with a small ablation had a significant advantage in terms of vision in comparison with the patients treated with CXL only, without losing the benefit of stability after CXL. In this study, as in our previous initial cohort,⁶ we used the solid-state laser platform for the application of the topography-guided ablation. As demonstrated in the literature, this platform is safe and effective for the correction of myopia and also has similar tissue effects when compared with excimer laser.^{11,12} Alessio et al²³ performed a prospective, nonrandomized, comparative study of tPRK with an excimer laser and CXL versus CXL alone and also found more striking improvement in visual acuity in their group of patients treated with combined customized treatment in comparison with CXL alone.

Previous studies of patients treated with CXL alone have demonstrated that there is stability in UDVA after treatment or a small improvement. Raiskup-Wolf et al³ demonstrated an improvement in CDVA of 0.15 logMAR over 3 years in a long-term retrospective study, and Wittig-Silva et al²⁴ demonstrated an improvement in CDVA of 0.09 logMAR over 3 years and in UDVA of 0.15 logMAR in a prospective comparative study. In our study, corresponding with results of previous studies, the improvement was 0.09 logMAR and 0.18 logMAR in CDVA and in UDVA, respectively, of CXL-treated patients.

Regarding corneal topography and keratometry, both groups showed improvement, but in the combined treatment group, flattening was more prominent. Interestingly, in the CXL group, as can be seen in Figure 4, there is a marked steepening the first postoperative month that can be attributed to the epithelial hyperplasia or edema after the procedure. The marked ongoing flattening in the combined treatment from the first until the sixth postoperative month may be attributed to regression of epithelial hyperplasia. According to our results, there is a significant benefit in terms of flattening in eyes treated with the combined procedure in comparison with CXL-treated eyes that corresponds to the improvement in visual acuity. Improvement in CDVA and gain in lines of Snellen visual acuity in the tPRK plus CXL group also can be attributed to the customization of the PRK procedure and subsequent improvement in topographical irregularity.

Regarding stability of keratometry after the procedure, we found that 2 eyes in each group (6.7%) demonstrated a steepening of keratometry more than 0.75 D when comparing the last follow-up with the 6-month postoperative measurements, but both cases were flatter than preoperative in their last follow-up and also were stable in their most recent consecutive measurements. In a more specialized analysis, as of 6 months after surgery until last follow-up in CXL group, there was an average flattening in the steep keratometry of -0.6 D and in flat keratometry of -0.34 D, and in the combined treatment group, there was an average flattening in the steep keratometry of -0.42 D and in flat keratometry of -0.26 D. Corresponding differences between groups did not reach statistical significance. Consequently, in terms of topographic stability after treatment, we cannot identify any differentiation between eyes treated with CXL only and eyes treated with the combined procedure.

In our corneal confocal microscopy study, we found the characteristic depopulation of keratocyte nuclei and the lacunar hyperreflective pattern of the anterior stroma accredited to increased visibility of keratocyte cytoplasm and edema, which already has been described in previous studies.^{10,25–27} The keratocyte repopulation of the anterior stroma was more delayed in the tPRK plus CXL group than in the CXL group. Visibility of the subbasal nerve plexus also was poor or seemed disrupted, in contrast with that in the CXL group, in which the subbasal nerve plexus had been visible since 3 to 6 months after surgery, as described in previous studies.^{10,28} The anterior stromal hyperreflectance was more prominent in the tPRK plus CXL group. Additionally, we found in the posterior stroma of 47% of tPRK plus CXL eyes that there was an area with high reflectance that was characterized by spindle-shaped and linear structures. These structures were linked in a previous study with migration and activation of keratocytes and increased collagen deposition, collagen disorganization, and excessive production of extracellular material from the activated keratocytes of the posterior stroma.²⁹ Clinically, this can be recognized as mild haze in the posterior stroma on slit-lamp examination. Posterior haze gradually moved anteriorly and became less dense in most of the patients.

By quantitative evaluation of confocal microscopy results, we found that there is a significantly deeper effect of the CXL treatment in the eyes treated with the combined procedure in comparison with those treated with CXL alone. To our knowledge, such differences have not been reported previously. Additionally, we found that the effect of the combined procedure on corneal keratocytes was more prominent and long lasting than the effect of the CXL procedure. Those differences may be attributed to a more potent effect of CXL after the Bowman layer has been ablated. A deeper penetration of riboflavin into the cornea stroma resulting from absence of the Bowman layer has been implicated in this effect by Alessio et al²⁷ in their confocal microscopy study. Additionally, it has been stated that the absence of the Bowman layer after ablation may facilitate higher absorbance of UVA irradiation by the stroma because in the normal cornea, the Bowman layer absorbs a considerable part of incident ultraviolet irradiation.^{30–32} Endothelial cell density was not affected by either procedure, demonstrating that when safety precautions are taken (minimum stromal thickness before CXL, 400 μm), both procedures are safe for the endothelium.

The major consideration in the planning of the combined procedure was the postoperative corneal thickness. Photorefractive keratectomy treatment was planned based on the patients' corneal thickness. Restricted treatments of up to 50 μm were performed, whereas the ablation depth was mapped out by modifying the target correction in a limited fashion to remove the least possible amount of tissue. Undercorrection of sphere and cylinder was planned and the amount of customization also was adjusted. The results of this study indicate that the combination of treatments (tPRK and CXL) leads to an overcorrection of the planned PRK treatment. Most authors arbitrarily agree to the removal of a maximum of 50 μm of stromal tissue as soon as there is a

minimum of 400 μm of stromal thickness after the ablation to perform CXL with safety for the endothelium.^{6,19,23}

Because of the thickness restriction, we had a different thickness in our groups of patients, which is a potential limitation of our study. Despite that, both groups were matched in terms of age and keratoconus stage according to the Amsler-Krumeich classification, which is a widely accepted system for keratoconus staging typically used in the literature as a criterion for similarity between groups of keratoconus eyes.³³ Another limitation of our study is the lack of sample size calculation while performing the study design resulting from the lack of primary data in the literature at that time. Despite this, post hoc power analysis demonstrated the study was high powered regarding the main outcome of UDVA improvement comparison between groups.

In conclusion, according to the results of this comparative study, simultaneous tPRK followed by CXL seems to be a promising treatment resulting in a rapid and marked improvement in visual acuity and topography of the patients. A more potent effect of CXL when combined with tPRK was demonstrated by confocal microscopy. Performing this technique with careful observance of safety aspects may offer the patients the benefit of stability offered by CXL with the additional benefit of improved vision and topographic outcomes. Our study favors the use of customized limited topography-guided laser ablation in keratoconic corneas in combination with CXL as a standard treatment when applicable.

References

- Jhanji V, Sharma N, Vajpayee RB. Management of keratoconus: current scenario. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1044–50.
- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003;135:620–7.
- Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, et al. Collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008;34:796–801.
- Kymionis GD, Siganos CS, Tsiklis NS, et al. Long term follow up of Intacs in keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2007;143:236–44.
- Coskunseven E, Kymionis GD, Tsiklis NS, et al. One-year results of intrastromal corneal ring segment implantation (KeraRing) using femtosecond laser in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2008;145:775–9.
- Kymionis GD, Kontadakis GA, Kounis GA, et al. Simultaneous topography-guided PRK followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus. *J Refract Surg* 2009;25: S807–11.
- Alpins N, Stamatelatos G. Customized photoastigmatic refractive keratectomy using combined topographic and refractive data for myopia and astigmatism in eyes with forme fruste and mild keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33: 591–602.
- Koller T, Iseli HP, Donitzky C, et al. Topography-guided surface ablation for forme fruste keratoconus. *Ophthalmology* 2006;113:2198–202.
- Cennamo G, Intravaja A, Boccuzzi D, et al. Treatment of keratoconus by topography-guided customized photorefractive keratectomy: two-year follow-up study. *J Refract Surg* 2008;24:145–9.
- Kymionis GD, Diakonis VF, Kalyvianaki M, et al. One-year follow-up of corneal confocal microscopy after corneal cross-linking in patients with post laser in situ keratomileusis ectasia and keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2009;147:774–8. 778.e1.
- Tsiklis NS, Kymionis GD, Kounis GA, et al. Photorefractive keratectomy using solid state laser 213 nm and excimer laser 193 nm: a randomized, contralateral, comparative, experimental study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1415–20.
- Tsiklis NS, Kymionis GD, Kounis GA, et al. One-year results of photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for myopia using a 213 nm wavelength solid-state laser. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:971–7.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007;39:175–91.
- Kanellopoulos AJ, Binder PS. Collagen cross-linking (CCL) with sequential topography-guided PRK: a temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea* 2007;26:891–5.
- Kymionis GD, Karavitaki AE, Kounis GA, et al. Management of pellucid marginal corneal degeneration with simultaneous customized photorefractive keratectomy and collagen cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2009;35:1298–301.
- Kanellopoulos AJ. Comparison of sequential vs same-day simultaneous collagen cross-linking and topography-guided PRK for treatment of keratoconus. *J Refract Surg* 2009;25: S812–8.
- Stojanovic A, Zhang J, Chen X, et al. Topography-guided transepithelial surface ablation followed by corneal collagen cross-linking performed in a single combined procedure for the treatment of keratoconus and pellucid marginal degeneration. *J Refract Surg* 2010;26:145–52.
- Krueger RR, Kanellopoulos AJ. Stability of simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy and riboflavin/UVA cross-linking for progressive keratoconus: case reports. *J Refract Surg* 2010;26:S827–32.
- Kymionis GD, Portaliou DM, Kounis GA, et al. Simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2011;152:748–55.
- Labiris G, Giarmoukakis A, Sideroudi H, et al. Impact of keratoconus, cross-linking and cross-linking combined with photorefractive keratectomy on self-reported quality of life. *Cornea* 2012;31:734–9.
- Kanellopoulos AJ, Binder PS. Management of corneal ectasia after LASIK with combined, same-day, topography-guided partial transepithelial PRK and collagen cross-linking: the Athens protocol. *J Refract Surg* 2011;27:323–31.
- Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, et al. Management of post laser in situ keratomileusis ectasia with simultaneous topography guided photorefractive keratectomy and collagen cross-linking. *Open Ophthalmol J* 2011;5:11–3.
- Alessio G, L'abbate M, Sborgia C, La Tegola MG. Photorefractive keratectomy followed by cross-linking versus cross-linking alone for management of progressive keratoconus: two-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2013;155:54–65.e1.
- Wittig-Silva C, Chan E, Islam FM, et al. A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: three-year results. *Ophthalmology* 2014;121: 812–21.
- Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by

- confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol* 2008;146:527–33.
26. Niederer RL, McGhee CNJ. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retinal Eye Res* 2010;29:30–58.
 27. Alessio G, L'Abbate M, Furino C, et al. Confocal microscopy analysis of corneal changes after photorefractive keratectomy plus cross-linking for keratoconus: 4-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2014;158:476–484.e1.
 28. Kontadakis GA, Kymionis GD, Kankariya VP, Pallikaris AI. Effect of collagen crosslinking on corneal sensitivity, tear function and corneal innervation in patients with keratoconus: a clinical and confocal microscopic study. *Ophthalmology* 2013;120:917–22.
 29. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, et al. Posterior linear stromal haze formation after simultaneous photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5030–3.
 30. Kymionis GD, Diakonis VF. Confocal microscopy analysis of corneal changes after photorefractive keratectomy plus cross-linking for keratoconus: 4-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2015;159:203–4.
 31. Kolozsva'ri L, No'gra'di A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2165–8.
 32. Kymionis GD, Grentzelos MA, Klados NE, et al. Corneal collagen cross-linking mushroom shape demarcation line profile after limited Bowman's membrane removal by phototherapeutic keratectomy. *Open Ophthalmol J* 2015;9:17–9.
 33. Naderan M, Shoar S, Kamaleddin MA, et al. Keratoconus clinical findings according to different classifications. *Cornea* 2015;34:1005–11.

Footnotes and Financial Disclosures

Originally received: August 25, 2015.

Final revision: January 6, 2016.

Accepted: January 11, 2016.

Available online: ■■■■.

Manuscript no. 2015-1474.

¹ Institute of Vision and Optics, University of Crete, Heraklion, Greece.

² Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami, Miami, Florida.

Presented as a poster at: American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, October 2014, Chicago, Illinois.

Financial Disclosure(s):

The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

Author Contributions:

Conception and design: Kontadakis, Kankariya, Pallikaris, Kymionis

Analysis and interpretation: Kontadakis, Pallikaris, Plaka, Kymionis

Data collection: Kontadakis, Tsoularas, Pallikaris, Plaka

Obtained funding: none

Overall responsibility: Kontadakis, Kankariya, Kymionis

Abbreviations and Acronyms:

CDVA = corrected distance visual acuity; **CXL** = corneal collagen cross-linking; **D** = diopter; **logMAR** = logarithm of the minimum angle of resolution; **PRK** = photorefractive keratectomy; **SD** = standard deviation; **tPRK** = topography-guided photorefractive keratectomy; **UDVA** = uncorrected distance visual acuity; **UVA** = ultraviolet A.

Correspondence:

Georgios A. Kontadakis, MD, MSc, Institute of Vision and Optics, University of Crete Medical School, 71003 Heraklion, Crete, Greece. E-mail: kontadas@yahoo.com or g.kontadakis@med.uoc.gr.

Effect of Corneal Collagen Cross-Linking on Corneal Innervation, Corneal Sensitivity, and Tear Function of Patients with Keratoconus

Georgios A. Kontadakis, MD, MSc, George D. Kymionis, MD, PhD, Vardhaman P. Kankariya, MD, Aristophanis I. Pallikaris, MSc

Purpose: To evaluate the effect of corneal collagen cross-linking (CXL) on corneal innervation, corneal sensitivity, and tear function in patients with keratoconus.

Design: Prospective, interventional case series.

Participants: Twenty-four patients with bilateral keratoconus (30 eyes) who presented to the Institute of Vision and Optics, University of Crete, from May 2008 to October 2008.

Methods: Patients underwent CXL. Confocal microscopic analysis of corneal sub-basal nerve plexus (total nerve length per image), corneal sensitivity (assessed with the Cochet-Bonnet esthesiometer), basic tear secretion (assessed with Schirmer's I test with anesthesia), and tear film stability (evaluated by means of tear film break-up time [TFBUT]) were assessed preoperatively and at 1, 3, 6, 9, 12, 18, and 24 months postoperatively.

Main Outcome Measures: Comparisons between preoperative and each postoperative value of total nerve length per image, corneal sensitivity, Schirmer's I test results, and TFBUT.

Results: Total nerve length per image and corneal sensitivity were significantly decreased until postoperative month 6 (for both parameters: $P < 0.05$ paired-samples t test at 1, 3, and 6 months postoperatively). Total nerve length per image tended to increase up to 2 years postoperatively, when it reached the preoperative level, but differences with the preoperative values after the sixth post-CXL month were insignificant. The results of Schirmer's I test and TFBUT had no statistically significant difference at any time point.

Conclusions: A transient decrease in corneal innervation and corneal sensitivity can be observed up to 6 months after CXL. No significant effect of CXL could be detected on basic tear secretion and tear film stability in our group of patients.

Financial Disclosure(s): The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article. *Ophthalmology* 2013;120:917–922 © 2013 by the American Academy of Ophthalmology.

Corneal surgical procedures have been associated with loss of corneal sensitivity and dry eye symptoms in several studies.^{1–13} Ablation of corneal tissue in refractive surgery, flap creation in LASIK, and clear corneal incisions in cataract surgery are procedures that affect corneal innervation and reduce corneal sensation.^{13–17} Loss of corneal sensation diminishes the reflex that stimulates blinking and tear production (lacrima and mucus secretion). Because of these aspects, iatrogenic dry eye postsurgery is one of the main complications of corneal procedures. This affects patients' quality of life and may become severe in those with preoperative dry eye symptoms.¹⁸

Corneal collagen cross-linking (CXL) with the combination of riboflavin and ultraviolet A (UVA) radiation is a novel corneal surgical procedure to stabilize progressive keratoconus.^{19–21} The method is based on the absorption of UVA (370 nm) radiation by the cornea after the photosensitizer riboflavin is infused in the stroma. This procedure is considered to build up the bonds between the collagen molecules and therefore increase corneal rigidity and sta-

bility.^{21–25} Corneal confocal microscopic studies have demonstrated a reduction in subepithelial nerve plexus density after CXL, which seems to return to the preoperative status several months after the procedure.^{26,27} Reduction of nerve density is expected to adversely affect corneal sensitivity and tear function. This could be more prominent because keratoconic patients may already have tear film disorders and reduced corneal sensitivity as a result of the abridged and misshapen corneal nerves and the abnormal corneal shape in keratoconus.^{28–31} The purpose of the current study is to evaluate the alterations of corneal innervation, corneal sensitivity, and tear function in patients undergoing CXL for the treatment of progressive keratoconus.

Materials and Methods

In this prospective interventional case series, we included subjects from a continuous cohort of patients with keratoconus who sought consultation at the Institute of Vision and Optics of the University of Crete. Patients with progressive keratoconus, with corneal

thickness more than 400 μm , and with no other systemic or ocular disease were included in the study. Diagnosis of keratoconus was based on the axial topography map (iTrace, Tracey Technologies, Houston TX).³² Patients were followed at 6-month intervals, and keratoconus was described as progressive when there was an increase in the cone apex keratometry of 0.75 diopters or alteration of 0.75 diopters in the spherical equivalent refraction. On confirmation of progression, we proposed CXL as a treatment for keratoconus to halt its progression. Patients were thoroughly counseled about the current clinical experience and possible outcomes and complications of the procedure. We obtained written informed consent from all subjects according to the institutional guidelines and the Declaration of Helsinki. Institutional review board/ethics committee approval was obtained.

Clinical Evaluation

The preoperative and postoperative evaluations included corneal topography, uncorrected distance visual acuity and corrected distance visual acuity assessment with manifest refraction, assessment of corneal sensitivity (Cochet–Bonnet esthesiometer) and tear film break-up time (TFBUT), Schirmer's I test with anesthesia, slit-lamp biomicroscopy, applanation tonometry, ultrasound pachymetry, and corneal confocal microscopy of the central cornea (Heidelberg Retina Tomography [HRT] II; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Examinations were conducted at each visit with the reported order.

We repeated patient evaluation at postoperative follow-up intervals of 1, 3, 6, 9, 12, 18, and 24 months. Patients were instructed to discontinue use of contact lenses at least 8 weeks before each visit to avoid possible effects on corneal topography and sensitivity measurements.³³

Corneal sensitivity was measured using the Cochet–Bonnet esthesiometer.³⁴ The instrument consists of a nylon filament 60.0 mm long and 0.12 mm in diameter. The force exerted by the filament when it touches the cornea is inversely proportional to its length. The same experienced observer (G.A.K.) conducted all measurements at the central cornea. The filament was moved toward the cornea smoothly at a perpendicular angle. Contact was detected by slight bending in the filament. Subjects were asked to look straight ahead and indicate when the stimulus was felt. If there was no subject response to the first contact, the length of the filament was decreased by 5.0 mm to increase its rigidity, and the procedure was repeated until the subject reported sensation of corneal contact. The mean filament length, from a minimum of 3 stimulus applications that produced a positive response from the subject, was considered to be the corneal touch threshold.

We performed the standard TFBUT measurement to evaluate tear film stability. Moistened fluorescein strips were introduced to the conjunctival sac with minimal stimulation and were undetected by the patients. The subjects were then instructed to blink several times for a few seconds to ensure adequate mixing of fluorescein. The time interval between the last complete blink and the appearance of the first corneal black spot in the stained tear film was measured 3 times, and the mean value of the measurements was calculated.

For the evaluation of basic tear secretion, the standard Schirmer's I test with topical anesthesia (proparacaine hydrochloride 0.5%; Alcaine; Alcon Laboratories, Inc, Fort Worth, TX) was performed. The standardized strips of filter paper (Alcon Laboratories, Inc) were placed in the inferior conjunctival fornix near the lateral canthus away from the cornea and left in place for 5 minutes with the eyes closed. Readings were reported in millimeters of wetting for 5 minutes.

Confocal microscopy was performed with a modified confocal scanning laser ophthalmoscope (HRT II; Heidelberg Engineering) in

all patients. With the addition of the Rostock Cornea Module (Heidelberg Engineering), the HRT II was converted into a confocal corneal microscope that allowed the acquisition of 2-dimensional images of the various layers of the cornea by sequentially scanning a 670-nm laser beam over the cornea. After the instillation of a local anesthetic (1 drop of proparacaine hydrochloride 0.5%) and high-viscosity gel (carbomer 3.0 mg/g, Thilogel; Alcon Laboratories, Inc), patients were asked to fixate using an external fixation target. The instrument objective was then brought into optical contact with the cornea tissue by a disposable sterile polymethyl methacrylate cup and a high-viscosity gel (Thilogel). Depth scans across the whole cornea were performed manually while an external electronic unit kept track of the focal plane. The external interface of the polymethyl methacrylate cup was taken as the reference point for thickness measurements. Images of the various layers of the cornea were acquired at the optical center of the cornea. The acquired images consisted of 384 \times 384 pixels over a 400 \times 400- μm field of view with a transversal resolution of approximately 2 μm and a longitudinal resolution of approximately 4 μm . Three highest quality images of the sub-basal nerve plexus were selected by an experienced masked observer for each patient at each time point. Images were quantitatively analyzed with custom-made image processing software in MATLAB (MATLAB, MathWorks Inc, Natick, MA). During processing, the masked operator traced the outline of each nerve by using a simple point-and-click method, and the software calculated the total nerve length of all nerves per image. The mean value of the total nerve length of the 3 selected images per patient per time point was calculated and used for statistical analysis.

Corneal Collagen Cross-Linking Surgical Technique

After topical anesthesia with proparacaine hydrochloride 0.5% eyedrops was administered, the corneal epithelium was removed within only an 8.0-mm diameter. Next, commercially available riboflavin (riboflavin 0.1% isotonic eye drops with 20% dextran 500, Medicros, Medio–Haus, Behrensbrook, Neudorf, Germany) was applied every 3 minutes for approximately 30 minutes. Ultraviolet A irradiation was performed with a commercially available UVA system (UV-X, Peschke Meditrade, Nürnberg, Germany) with Köhler illumination. Before treatment, the intended 3 mW/cm² surface irradiance (370 nm, 5.4 J/cm² surface dose after 30 minutes) was calibrated using the UVA meter YK-34UV (Lutron Electronic Enterprise Co, Ltd, Taipei, Taiwan). During treatment, the riboflavin solution was applied every 5 minutes to ensure saturation.

At the end of the procedure, a combination of steroid and antibiotic drop (Tobradex; Alcon Laboratories, Inc.) was administered in all patients, and a silicon-hydrogel bandage contact lens (Lotrafalcon B, Air Optix; CIBA VISION, Duluth, GA; 14.0 mm diameter, 8.6 base curvature, Dk=140 barrers) was kept in place until full corneal re-epithelialization occurred. After re-epithelialization, a course of fluorometholone 0.1% eyedrops (FML, Allergan Pharmaceuticals, Westport, Ireland) with weekly tapering was applied for 1 month, and patients were advised to use preservative-free artificial tears for the first 6 postoperative months. All procedures were carried out at the Institute of Vision and Optics by the same surgeon (G.D.K.).

Statistical Analysis

We examined the distribution of continuous variables with the Shapiro–Wilk test for normality. Comparisons between preoperative and postoperative values at each time point were performed for corneal sensitivity, Schirmer's I test result, TFBUT, and nerve

Table 1. Mean Values of Test Results and Preoperative to Postoperative Comparisons

	Preoperative	1 Mo	3 Mos	6 Mos	9 Mos	12 Mos	18 Mos	24 Mos
Sensitivity	5.8 (5.0–6.0)	2.8 (0.5–5.5)	4.1 (1.0–6.0)	5.1 (2.0–6.0)	5.6 (4.0–6.0)	5.6 (5.0–6.0)	5.9 (5.5–6.0)	5.8 (5.5–6.0)
P value		<0.001	<0.001	0.003	0.581	0.290	0.129	0.679
Schirmer's I test	9.79±6.74	10.50±6.42	11.85±6.967	10.28±6.09	10.77±7.58	12.61±7.18	13.00±6.93	12.73±6.52
P value		0.900	0.144	0.835	0.293	0.430	0.139	0.410
TFBUT	5.78±2.87	6.17±4.70	6.43±4.31	5.04±2.34	5.92±3.58	6.53±2.97	6.00±1.57	7.42±1.97
P value		0.833	0.662	0.112	0.453	0.136	0.629	0.619
Nerve length	1697±670	163±371	663±788	919±549	1422±920	1356±756	1468±798	1685±601
P value		<0.001	<0.001	0.001	0.175	0.214	0.370	0.834

TFBUT = tear film break-up time.

Mean values of test results and P values for comparison of preoperative and postoperative results at each time point. Sensitivity is presented as mean (range), and other data are presented as mean ± standard deviation. Comparisons of sensitivity were performed with the Wilcoxon signed-rank test, and the remaining data were compared by means of paired-samples t test.

length. The differences between preoperative and postoperative values were assessed with the paired-samples t test if variables had a normal distribution and with the Wilcoxon signed-rank test if the variables did not have a normal distribution. The Statistical Package for the Social Sciences version 15.0 was used (SPSS Inc, Chicago, IL). A P value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Twenty-four patients (30 eyes) with keratoconus were included in the study. The mean age at the time of procedure was 25±4.7 years (range, 20–36 years).

The mean values of test results and P values for the comparison of the preoperative and the postoperative result at each time point are presented in Table 1. The total nerve length per image at each postoperative time point was compared with the preoperative values by means of paired-samples t test. The total nerve length per image had a statistically significant reduction at the first postoperative month, corresponding to complete corneal denervation for many of the patients. At the following postoperative months, the total nerve length per image tended to gradually increase until the second year postoperative visit when it was completely restored to the mean preoperative values (Fig 1). Despite this, there were no statistically significant differences from the preoperative values since the ninth postoperative visit. A statistically significant dif-

ference of total nerve length per image between preoperative and postoperative time intervals was found at 1 month (P<0.001), 3 months (P<0.001), and 6 months (P = 0.001) postoperatively (Table 1).

Corneal sensitivity was compared at each time point with the preoperative value by using the Wilcoxon signed-rank test. Corneal sensitivity had a significant reduction at the first postoperative month visit with gradual restoration of the preoperative values until postoperative month 9. Statistically significant differences were found at postoperative month 1 (P<0.001), postoperative month 3 (P<0.001), and postoperative month 6 (P = 0.003). At 9, 12, 18, and 24 months postoperatively, the mean corneal sensitivity was not significantly different compared with the preoperative values (Table 1, Fig 2).

For the comparisons of Schirmer's I test results and TFBUT at each time point postoperatively with the preoperative values, we used the paired-samples t test. There was no statistically significant difference at any time point between the preoperative and the postoperative values of both tests (Table 1, Figs 3 and 4).

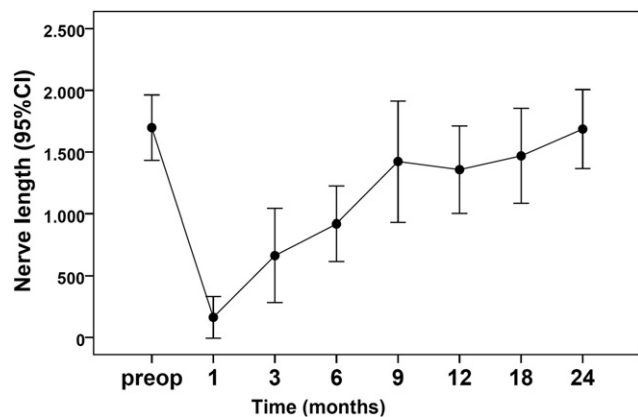


Figure 1. Mean value of nerve length per image preoperatively and at each postoperative visit (bars represent 95% CI). CI = confidence interval.

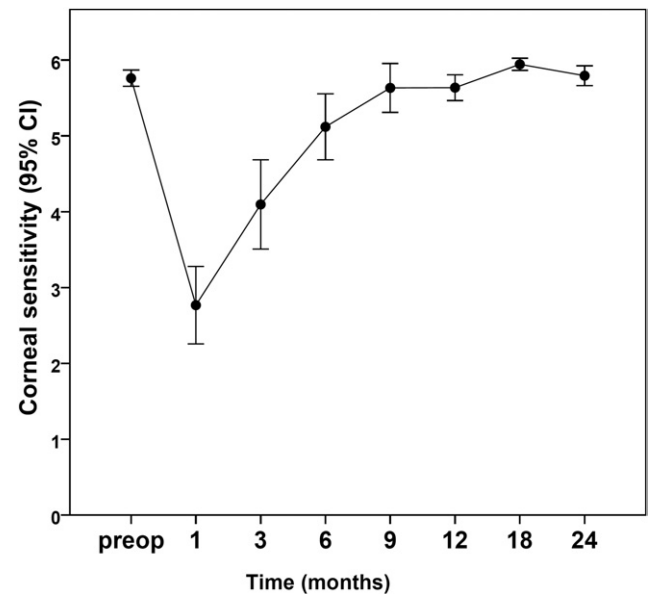


Figure 2. Mean value of corneal sensitivity preoperatively and at each postoperative visit (bars represent 95% CI). CI = confidence interval.

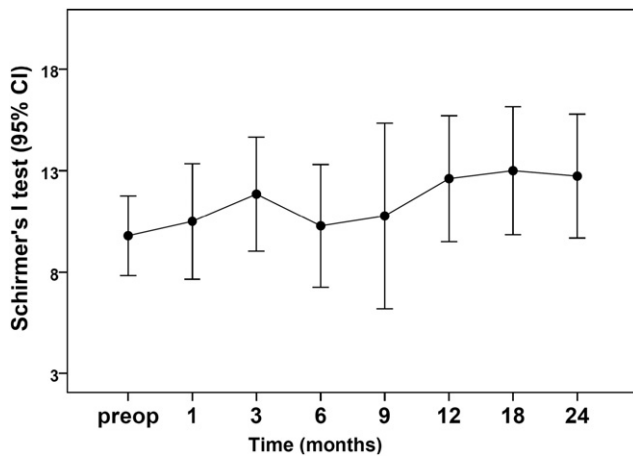


Figure 3. Mean result of Schirmer's I test preoperatively and at each postoperative visit (bars represent 95% CI). CI = confidence interval.

Discussion

Various corneal surgical procedures have been associated with reduction of corneal sensitivity due to amputation or laser ablation of corneal nerves.^{1,33} Corneal denervation plays a key role in the transient tear dysfunction that complicates the postoperative course of patients undergoing corneal surgery.

Corneal collagen cross-linking is a novel corneal procedure used to biomechanically stabilize corneas with ectatic disorders. The combined action of the photosensitizer riboflavin with the UVA radiation induces cross-linkage between the collagen fibrils through the generation of reactive oxygen species, leading to corneal stabilization.¹⁹⁻²³ Studies with qualitative evaluation of corneal confocal microscopy images after CXL demonstrate that anterior stromal structure, keratocyte density, and innervation are affected postoperatively.^{26,27}

In this study, quantitative analysis of sub-basal nerve plexus confocal images after CXL revealed that corneal innervation is significantly reduced at postoperative month 1 and is gradually restored to almost similar preoperative levels at postoperative month 9. Confocal images taken at each time point at the central cornea demonstrate the nerve density of the sub-basal plexus in this area, rather than the origin and course of specific sub-basal nerve regeneration. Our study findings correlate with those of previous qualitative studies on corneal confocal microscopy analysis of sub-basal nerve plexus in patients post-CXL. In a previous qualitative study, Kymionis et al²⁶ reported that reinnervation begins during the third month after CXL. They reported that, unlike in the first month, the nerves are visible at the 3-month follow-up but are not yet restored to the preoperative density. In another qualitative study, Mazzotta et al²⁷ reported a more rapid regeneration of subepithelial nerve fibers that begins at 1 month and is almost complete 6 months after the procedure, but does not return to the preoperative structure until 2 years after the procedure. In our quantitative study, the total nerve length per image tended to increase until postoperative month 24, whereas

restoration was almost complete up to month 9 and total nerve length had already reached a nonsignificant difference compared with the preoperative level.

In regard to sensitivity, our results demonstrate that CXL causes a significant transient hypoesthesia postoperatively, as expected because of the transient denervation. In our group of patients, we detected a prominent reduction in corneal sensitivity 1 month postoperatively that gradually recovered until 9 months postoperatively. The majority of patients had corneal sensation restored to the preoperative level at the 9-month follow-up visit and thereafter.

In a recent animal study of corneal sensitivity and innervation after CXL in rabbits, Xia et al³⁵ demonstrated that corneal sensitivity regained normal values 90 days after the treatment and corneal nerve fiber density appeared normal after 180 days. In the current study, the time course was similar for sensitivity restoration and corneal nerve regeneration; both took 9 months to restore to nonsignificant differences compared with the preoperative values.

In regard to other refractive surgery procedures, studies report variable periods of time for the restoration of sensory function and innervation after the procedure. In photorefractive keratectomy (PRK) and Epi-LASIK, sensitivity returns to preoperative values approximately 3 to 6 months after surgery. In LASIK, it takes 6 months to more than 1 year for the restoration of corneal sensation.^{3-6,12} It takes up to 2 years in PRK and 5 years in LASIK for the sub-basal nerves to fully recover.^{14,15} The differences in time course of neural rehabilitation among surgical techniques may be due to differences in both the cause and the extent of the initial neural injury.^{14,36}

Corneal denervation plays a causative role in dry eye, which is one of the most recognized complications of refractive surgery procedures. Patients report dryness and irritation, and the results of Schirmer's I test and TFBUT are lower than normal up to 3 to 6 months after the procedure. This finding is more prominent in patients post-LASIK than in patients undergoing surface ablation techniques.^{7,9-11} In a study of patients undergoing Epi-LASIK, Kalyvianaki et al⁸ reported that there is no decrease in Schirmer's I test

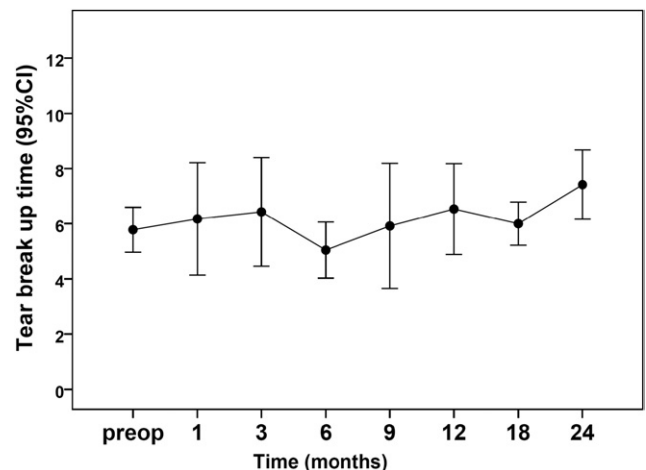


Figure 4. Mean value of tear film break-up time preoperatively and at each postoperative visit (bars represent 95% CI). CI = confidence interval.

values, but there is a small decrease in TFBUT in the first postoperative month. Nejima et al¹¹ observed a decrease in Schirmer's I test values but not in TFBUT in patients post-PRK.¹¹ In the current study, although sensitivity decreases, the results demonstrate that basic tear secretion and TFBUT are not affected by CXL. The patients included in the study were advised to use preservative-free artificial tears, which may have helped. On the other hand, the sensitivity of the peripheral unaffected part of the cornea may be sufficient to regulate basic tear secretion or the aberrant activity of the amputated corneal nerves may contribute to this.³⁷

An important safety aspect in CXL is that corneal innervation, sensitivity, and tear function are already disturbed in patients with keratoconus.^{28–31} Bleshoj³⁸ reported that sensitivity is decreased in all corneal zones of patients with keratoconus. This decrease depends on the severity of the condition. Dogru et al²⁸ reported that eyes with keratoconus have lower goblet cell density. Consistent with those findings, authors²⁸ found that patients with keratoconus have significantly lower TFBUT values, although there is not a decrease in their Schirmer's I test results. Tear film dysfunction also depends on the severity of keratoconus. In our group of patients, corneal sensitivity seemed to be within normal values, although it was not compared with a control group of normal corneas. However, this is expected because most of the patients in the current study group were in the early stages of keratoconus. Basic tear secretion seems to be similar to that reported^{8,9} in studies of patients undergoing refractive surgery, and the preoperative TFBUT of our patients was relatively low, consistent with the findings of Dogru et al.²⁸ Reduced sensitivity after CXL in patients with low tear break-up time theoretically could generate dry eye-related problems because of the decreased blinking rate and increased tear evaporation and exposure of corneal epithelium surface. The results of this study demonstrate that because TFBUT and Schirmer's I test results were not affected, dry eye does not seem to be a significant complication of CXL in patients with keratoconus.

According to confocal microscopic studies of corneal innervation in patients with keratoconus, the sub-basal nerves have abnormal patterns (thicker and more tortuous) and lower density than in normal subjects. The pattern abnormality of corneal nerves has been correlated with the severity of keratoconus.^{29–31} A causative role of these findings in the progression of keratoconus has been postulated in the literature.³⁹ Our results demonstrate that the sub-basal nerve plexus in keratoconus is able to return to the preoperative status after almost complete denervation caused by CXL.

Contact lens use also affects corneal sensitivity.³³ To minimize any effect on measurements, we asked the patients to discontinue contact lens use at least 8 weeks before each examination. Patients who use contact lenses continuously after CXL could have a somewhat different time course of nerve regeneration and sensitivity restoration than demonstrated in this study. At the same time, reduction of sensitivity and the effect of CXL on corneal topography may affect contact lens use in patients with keratoconus.

A significant limitation of this study is that we used only the Cochet–Bonnet esthesiometer to monitor corneal sensitivity. This instrument is a contact esthesiometer that produces mechanical stimuli exploring the response of mechanoreceptors. Consequently, recovery of corneal sensation for chemical and temperature stimuli is not monitored. Other instruments, such as gas esthesiometers, which use carbon dioxide as an acidic stimulus, and warmed or cooled air for high and low temperature stimuli also evaluate the responsiveness of polymodal and thermal receptors.^{40,41} In addition, the Cochet–Bonnet esthesiometer lacks the ability to detect subtle changes of sensitivity and hypersensitivity because it has a lower threshold detection limit that is similar to the normal threshold for most of the patients. However, most of the studies evaluating the effect of surgical procedures on corneal sensitivity use the Cochet–Bonnet esthesiometer and consequently have somewhat comparable results.

In conclusion, the results of our study indicate that CXL transiently affects corneal innervation and sensation. Our patients returned to preoperative sensitivity within the first 6 postoperative months, and their basic tear secretion test and tear break-up time were not affected. Thus far, studies demonstrate that CXL is a safe procedure, although complications similar to those of refractive surgery have been reported.^{42,43} Iatrogenic dry eye does not seem to be a major complication in CXL.

References

1. Ang RT, Dartt DA, Tsubota K. Dry eye after refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:318–22.
2. Kanellopoulos AJ, Pallikaris IG, Donnenfeld ED, et al. Comparison of corneal sensation following photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 1997;23:34–8.
3. Matsui H, Kumano Y, Zushi I, et al. Corneal sensation after correction of myopia by photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:370–3.
4. Kim WS, Kim JS. Change in corneal sensitivity following laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:368–73.
5. Perez-Santonja JJ, Sakla HF, Cardona C, et al. Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for low myopia. *Am J Ophthalmol* 1999;127:497–504.
6. Nassaralla BA, McLeod SD, Nassaralla JJ Jr. Effect of myopic LASIK on human corneal sensitivity. *Ophthalmology* 2003;110:497–502.
7. Battat L, Macri A, Dursun D, Pflugfelder SC. Effects of laser in situ keratomileusis on tear production, clearance, and the ocular surface. *Ophthalmology* 2001;108:1230–5.
8. Kalyvianaki MI, Katsanevaki VJ, Kavroulaki DS, et al. Comparison of corneal sensitivity and tear function following Epi-LASIK or laser in situ keratomileusis for myopia. *Am J Ophthalmol* 2006;142:669–71.
9. Yu EY, Leung A, Rao S, Lam DS. Effect of laser in situ keratomileusis on tear stability. *Ophthalmology* 2000;107:2131–5.
10. Lee JB, Ryu CH, Kim JH, et al. Comparison of tear secretion and tear film instability after photorefractive keratectomy and

- laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26:1326–31.
11. Nejima R, Miyata K, Tanabe T, et al. Corneal barrier function, tear film stability, and corneal sensation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2005;139:64–71.
 12. Matsui H, Kumano Y, Zushi I, et al. Corneal sensation after correction of myopia by photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27:370–3.
 13. Bragheeth MA, Dua HA. Corneal sensation after myopic and hyperopic LASIK: clinical and confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol* 2005;89:580–5.
 14. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol* 2005;140:1059–64.
 15. Calvillo MP, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Corneal reinnervation after LASIK: prospective 3-year longitudinal study. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2004;45:3991–6.
 16. Linna TU, Vesaluoma MH, Perez-Santonja JJ, et al. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2000;41: 393–7.
 17. Lee SJ, Kim JK, Seo KY, et al. Comparison of corneal nerve regeneration and sensitivity between LASIK and laser epithelial keratomileusis (LASEK). *Am J Ophthalmol* 2006;141: 1009–15.
 18. Konomi K, Chen LL, Tarko RS, et al. Preoperative characteristics and a potential mechanism of chronic dry eye after LASIK. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2008;49:168–74.
 19. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998;66:97–103.
 20. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003;135:620–7.
 21. McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF et al. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:129–38.
 22. Hafezi F, Kanellopoulos J, Wiltfang R, Seiler T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:2035–40.
 23. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34:796–801.
 24. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17:356–60.
 25. Kymionis G, Portaliou D. Corneal crosslinking with riboflavin and UVA for the treatment of keratoconus [letter]. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:1143–4, author reply 1144.
 26. Kymionis GD, Diakonios VF, Kalyvianaki M, et al. One-year follow-up of corneal confocal microscopy after corneal cross-linking in patients with post laser in situ keratomileusis ectasia and keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2009;147:774–8.
 27. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol* 2008;146:527–33.
 28. Dogru M, Karakaya H, Ozçetin H, et al. Tear function and ocular surface changes in keratoconus. *Ophthalmology* 2003; 110:1110–8.
 29. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2964–70.
 30. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: I. *Am J Ophthalmol* 1963;55:18–47.
 31. Mocan MC, Yilmaz PT, Irkeç M, Orhan M. In vivo confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Curr Eye Res* 2008;33:933–9.
 32. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 1998;42:297–319.
 33. Martin XY, Safran AB. Corneal hypoesthesia. *Surv Ophthalmol* 1988;c33:28–40.
 34. Beuerman RW, McCulley JP. Comparative clinical assessment of corneal sensation with a new aesthesiometer. *Am J Ophthalmol* 1978;86:812–5.
 35. Xia Y, Chai X, Zhou C, Ren Q. Corneal nerve morphology and sensitivity changes after ultraviolet A/riboflavin treatment. *Exp Eye Res* 2011;93:541–7.
 36. Chan KY, Jarvelainen M, Chang JH, Edenfield MJ. A cryo-damage model for studying corneal nerve regeneration. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1990;31:2008–21.
 37. Belmonte C. Eye dryness sensations after refractive surgery: impaired tear secretion or “phantom” cornea? *J Refract Surg* 2007;23:598–60.
 38. Bleshoy H. Corneal sensitivity in keratoconus. *J Br Contact Lens Assoc* 1986;1986:9–12.
 39. Brookes NH, Loh I, Clover GM, et al. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res* 2003; 77:515–24.
 40. Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, et al. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf* 2004;2:248–53.
 41. Belmonte C, Acosta MC, Schmelz M, Gallar J. Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO₂ esthesiometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:513–9.
 42. Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonios VF, et al. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:2135–7.
 43. Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:1982–4.

Footnotes and Financial Disclosures

Originally received: February 11, 2012.

Final revision: July 30, 2012.

Accepted: October 3, 2012.

Available online: January 21, 2013.

Manuscript no. 2012-199.

Institute of Vision and Optics, University of Crete, Heraklion, Greece.

Partially presented as a poster at: the American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, October 24–27, 2009, San Francisco, California.

Financial Disclosure(s):

The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

Correspondence:

Georgios A. Kontadakis, MD, MSc, Institute of Vision and Optics, University of Crete School of Health Sciences, GR 71 003 Voutes, Heraklion, Crete, Greece. E-mail: kontadas@yahoo.com.

In vitro effect of corneal collagen cross-linking on corneal hydration properties and stiffness

Georgios A. Kontadakis · Harilaos Ginis ·
Nikolaos Karyotakis · Alexandros Pennos · Iro Pentari ·
George D. Kymionis · Ioannis G. Pallikaris

Received: 6 December 2011 / Revised: 20 May 2012 / Accepted: 30 May 2012 / Published online: 23 June 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract

Background The purpose of this study is to evaluate in-vitro the immediate effect of corneal collagen cross-linking (CXL) on corneal hydration and stiffness.

Methods Forty-two corneal buttons from freshly enucleated porcine eyes were immersed in riboflavin 0.1% in dextran 20% dilution for 3 h in order for their hydration to reach equilibrium. Corneal buttons were divided into two groups; the first group was stored in dark conditions while the other group was irradiated with UV radiation (370 nm) for 30 min to simulate CXL according to the clinically applied protocol. After irradiation, all corneas were immersed in dextran 20% solution for 3 additional hours. Subsequently, each button underwent weighing, thickness measurement, and was mounted in a special device for the measurement of force versus deformation by compression. Finally, all corneal buttons were dehydrated for 48 h in a desiccating oven set at 62 °C and weighed again to obtain their dry mass. Hydration (%) of each button was calculated.

Results Mean corneal hydration in the irradiated and the non-irradiated group of corneas was 69.8 and 72.2%, respectively ($p < 0.001$). Differences in thickness and compressibility were not statistically significant. Thickness and hydration were positively correlated (Pearson's $r = 0.714$, $p < 0.001$).

Conclusions CXL causes corneal dehydration that can be detected immediately after the procedure. This phenomenon may contribute to increased mechanical stiffness of the

cornea. A change in stiffness by means of compressibility could not be detected in porcine corneas.

Keywords Cornea · Corneal collagen cross-linking · Keratoconus · Corneal hydration

Introduction

Manipulation of the mechanical properties of the cornea is a major goal of corneal and refractive surgery [1]. It is currently understood that corneal biomechanics are involved in corneal ectatic disorders such as keratoconus, and as a risk factor for the development of iatrogenic post-LASIK ectasia [2, 3]. These disorders lead to progressive thinning and protrusion of the cornea, resulting in high irregular astigmatism and decreased vision. Pathogenesis of both disorders is not yet clear, but loss of corneal biomechanical stability is considered to be involved in their development.

Corneal collagen cross-linking with UV-A radiation and the photosensitizer riboflavin (CXL) has been introduced in 2003 as a quasi-conservative technique for the management of keratoconus and iatrogenic post-LASIK corneal ectasia [4]. The technique is aiming to increase corneal rigidity and stability through the induction of cross-links in corneal tissue [5]. Results of CXL on corneal biomechanical properties have been studied in laboratory settings by means of stress-strain measurements on strips of corneas that underwent CXL and by means of eye inflation under Scheimpflug imaging [6–8]. Clinical studies of CXL demonstrate that it is a safe and effective technique for halting progression of ectatic disorders [9, 10]. Lately, CXL has also been used for the treatment of clinically important corneal edema, since it is theorized that the processes affect corneal swelling properties [11–15]. Until now, swelling behavior of cross-linked porcine corneas has

G. A. Kontadakis (✉) · H. Ginis · N. Karyotakis · A. Pennos ·
I. Pentari · G. D. Kymionis · I. G. Pallikaris
Institute of Vision and Optics (IVO), University of Crete,
Medical School,
71003 Heraklion, Crete, Greece
e-mail: kontadas@yahoo.com

been tested with indirect methods, showing a decrease in hydration [16].

The purpose of our study is to investigate *in vitro* the immediate effect of CXL on mechanical and hydration properties of porcine corneas. The effect on hydration is approached by direct calculation of the water content of the cornea, and on mechanical properties by means of measurement of compressibility of the treated corneas.

Methods

Corneal button preparation

Fifty porcine eyes enucleated from an equal number of hogs were obtained from a local abattoir within 24 h of slaughter. Eyes were conserved at -4°C until the experimental procedure. Each eye was carefully observed under a surgical microscope by a cornea specialist (GDK) in order to detect corneal abnormalities. A corneal scar was detected in one eye, epithelium defects in two eyes, and corneal edema in five eyes. Consequently, these eight eyes were excluded from the study. The corneas of the rest of the eyes appeared normal and were included in the study. Careful corneal epithelium debridement was performed with a rotating brush in the remaining 42 eyeballs. After debridement, corneal buttons were removed with a Barron Trephine with a diameter of 8.00 mm (Katena Products, Denville, NJ, USA) and immersed in riboflavin 0.1% in dextran 20% dilution for 3 h in order for their hydration to reach equilibrium. Afterwards, the corneal buttons were removed one by one sequentially, and alternatively assigned to one of two groups; one group was stored in dark conditions while the other group was irradiated with UV radiation (370 nm) for 30 min to simulate CXL according to the clinically applied protocol. After irradiation, all corneas were immersed in dextran 20% solution for 3 additional hours. Finally, the following measurements were conducted:

Corneal pachymetry

Corneal thickness of each button was measured by means of a digital caliper with an accuracy of $1\ \mu\text{m}$ (Mitutoyo, Aurora, IL, USA).

Mechanical measurements

Mechanical measurements were performed by means of a purposely developed device featuring a microstepping motor and a load cell (force sensor). The motor shaft has a spherical tip with radius of 1 mm that compresses the corneal button from the epithelial side against a flat surface mounted on the load cell (Fig. 1). The tip is moving towards the load cell in

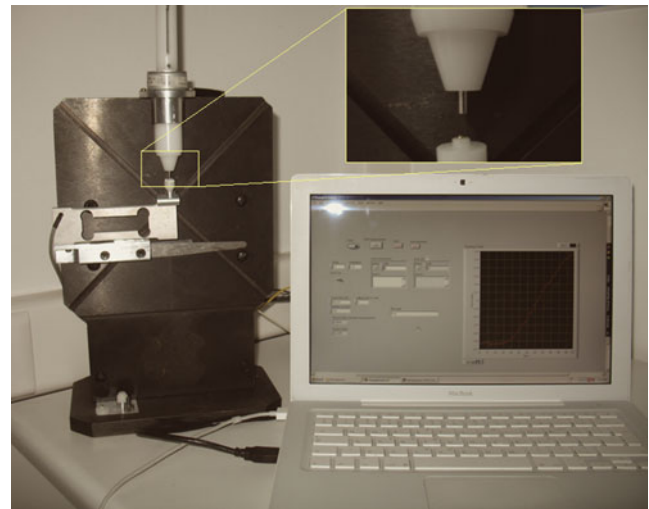


Fig. 1 Experimental setup for the compressibility measurements showing the tissue holder and the computer controlling the procedure. Magnified *insert* shows the spherical tip that compresses the corneal button against the flat surface creating a local indentation

steps of $20\ \mu\text{m}$. The slope of force versus deformation was calculated for each specimen.

Measurement of hydration

After immersion in dextran 20% solution, each corneal button was wiped with a surgical sponge to remove the dextran solution coating the surface of the button. Subsequently, each button was weighed by means of an electronic scale with an accuracy of 0.1 mg in order to obtain the total hydrated mass. After the experimental procedure, all buttons were dehydrated for 48 h in a desiccating oven set at 62°C . Their dry mass was obtained and tissue hydration (H%) was calculated for each button as follows:

$$H = (\text{wetmass} - \text{drymass}) / \text{wet mass}$$

Statistical analysis

The independent samples *t* test was used to compare variables between the two groups of corneal buttons. A one-way analysis of covariance (ANCOVA) was conducted with wet mass of the buttons as a dependent variable between the two groups. The dry mass of the buttons and the corneal thickness were included as covariates in the model. Linear correlation between pairs of quantitative variables was assessed using Pearson's correlation coefficient. A level of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant. The statistical package PASW Statistics 18.0 was used (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Distribution of all variables did not differ from normal. A statistically significant difference was found between the mean hydration in the irradiated and the non-irradiated group of corneal buttons (Fig. 2). Mean corneal hydration in the irradiated group of buttons was found to be 69.8% (standard error [SE] 0.4%), while in the non-irradiated group it was 72.2% (SE 0.3%), ($t=4.693$, degrees of freedom [df]:40, $p<0.001$, independent samples t test). The results of the ANCOVA model were statistically significant, indicating that there was a detectable difference in the wet (hydrated) mass of the corneas between the groups ($F=33.286$, $p<0.001$).

Mean corneal thickness of the buttons as measured with a digital caliper was 850 μm (SE 32 μm) in the irradiated group of corneas and 899 μm (SE 30 μm) in the non-irradiated group of corneas. The mean difference between the groups was not statistically significant ($t=1.111$, df: 40, $p=0.273$, independent samples t test), (Fig. 3).

Mean slope of the corneal compressibility of the buttons in the irradiated group was 0.11 $\text{mN}/\mu\text{m}$ (SE 0.01) and in the non-irradiated group was 0.08 $\text{mN}/\mu\text{m}$ (SE 0.01). The difference was not statistically significant ($t=1.721$, df: 40, $p=0.093$) (Fig. 4).

Corneal hydration was positively correlated with corneal thickness. Correlation was statistically significant (Pearson's $r=0.714$, confidence interval [CI]: 0.524 to 0.836, $p<0.001$), (Fig. 5). Correlation of corneal thickness with hydration was also statistically significant in each group of corneas separately (in the irradiated group: Pearson's $r=0.784$, CI 0.532 to 0.908, $p<0.001$, in the non-irradiated group: Pearson's $r=0.736$, CI 0.446 to 0.886, $p<0.001$). A statistically significant correlation was found neither between the slope of compressibility and hydration (Pearson's $r=-0.141$, CI -0.427 to 0.170 , $p=0.124$), nor between slope of compressibility and corneal thickness (Pearson's $r=-0.185$, CI -0.463 to 0.126 , $p=0.432$).

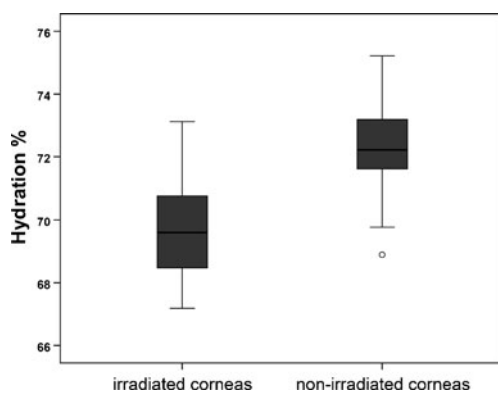


Fig. 2 Box plot of hydration for the two groups of corneal specimens

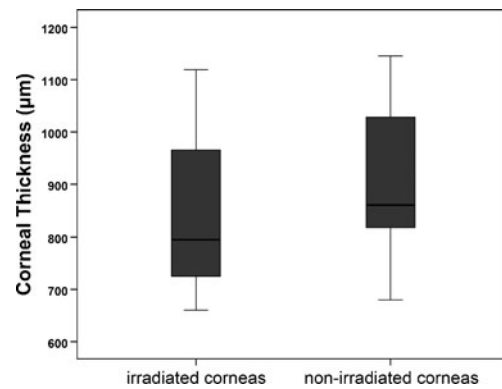


Fig. 3 Box plot of corneal thickness for the two groups of corneal specimens

Discussion

Corneal collagen cross-linking (CXL) is a novel procedure introduced for the biomechanical manipulation of the corneal stroma. It is considered to increase corneal rigidity and therefore halt the progression of ectatic disorders such as keratoconus and iatrogenic ectasia [4, 5]. The process of cross-linking occurs naturally in the human cornea during aging and also in diabetes mellitus [17]. It is based on the creation of intrafibrillar and interfibrillar crosslinks, although interfibrillar bonds are considered less possible to participate in corneal cross-linking [5, 18]. Except from cross-links between the collagen molecules, also proteoglycans contribute to increased stiffness with bonds in between them or between proteoglycans and collagen molecules [19]. Riboflavin-catalyzed photosensitization and photopolymerization involves the production of singlet oxygen after UVA irradiation, which then reacts with available groups nearby [18].

The results of our experiment demonstrate that CXL with riboflavin and UVA in vitro has a direct effect on corneal

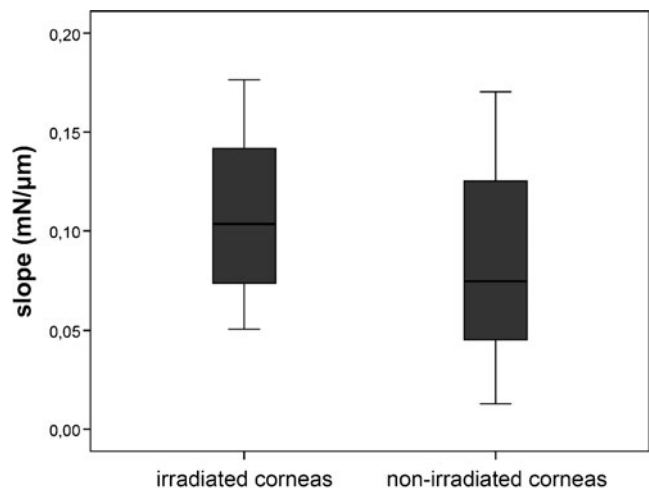


Fig. 4 Box plot of slopes ($\text{mN}/\mu\text{m}$) of the force-deformation diagrams for the two groups of corneal specimens

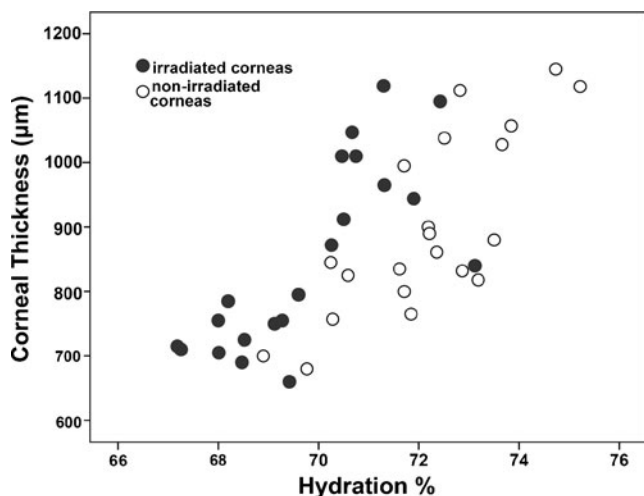


Fig. 5 Scatter plot of corneal thickness and corneal hydration of the specimens. *Filled dots* represent the irradiated corneas and *empty circles* represent the non-irradiated corneas

hydration immediately after the procedure. Normal corneal hydration in bovine corneas is 77.5% [20] and in our groups of irradiated and non-irradiated corneas 69 and 72%, respectively, after immersion in 20% dextran. It has already been shown by Wollensak et al. with the use of light microscopy that CXL has an effect on corneal swelling properties [16]. In the present study, the results demonstrate by direct *in vitro* measurement of corneal hydration that the procedure does not only affect the swelling properties of corneal tissue under induced edema but also its hydration under dehydrated conditions.

Corneal elasticity has already been demonstrated to be closely related to corneal hydration [21, 22]. Swollen corneas seem to have increased extensibility than normally hydrated cornea. Since a decrease in hydration may lead to a decrease in corneal elasticity, the decreased hydration of cross-linked corneas that we found could be a contributing factor, albeit minor, to the increased biomechanical stability caused by the procedure.

The results of CXL have been studied lately with increasing interest on edematous corneas suffering from endothelial decompensation [11–15]. Researchers report that after application of the treatment there is a primary marked improvement in corneal transparency and a reduction of corneal pachymetry, although it is speculated that this effect is temporary [13, 15]. The results of this experiment confirm the clinical observation that corneal hydration is reduced immediately after the procedure.

In keratoconus corneas treated with CXL, except for the improvement in visual acuity and topography, it is also stated by Vinciguerra et al. [23] that there is a decrease in total corneal volume and peripheral corneal pachymetry as measured by Scheimpflug imaging. On the contrary, central corneal thickness was not found to be reduced. Caporossi et al. [10] found no alteration in central corneal thickness after

the procedure as measured by ultrasound pachymetry and anterior segment OCT, but a difference as measured by optical tomography, which was attributed to reflectivity changes. In the present study, a reduction in corneal thickness was found in the treated corneal buttons that was not statistically significant. Corneal thickness was found to be strongly correlated with hydration as it has been already shown in the literature [24]. Consequently, a decrease of corneal thickness is expected postoperatively due to the decreased corneal hydration. Nevertheless, it is possible that this effect could be compensated by the increase in collagen fiber diameter after the procedure [25, 26].

The results of our experiment did not demonstrate a significant difference in corneal compressibility. In a previous study, Wollensak et al [6] found a significant increase in biomechanical stiffness of treated porcine and human corneas, as indicated by the increase in the calculated Young's modulus. The increase was significantly more in the human corneas than it was in the treated porcine corneas. This was attributed to the thickness of porcine corneas that is higher than the human, resulting to a smaller percentage of cross-linked cornea in comparison to the human cornea. In this study we calculated the slope of force versus deformation in the transverse direction (corneal compressibility). We found no statistically significant differences. Since CXL affects the anterior 300 µm of the cornea [27], the low percentage of cross-linked cornea in the porcine corneas could be responsible for this finding.

In a recent study of corneal interlamellar cohesive force in porcine eyes, it was demonstrated that there is no increase after CXL [28]. According to the authors, CXL changes the stiffness in the fibrils (only inter- and intrafibrillar stabilization) resulting in an increase in the tangential stiffness. Subsequently, stiffness in the transverse direction, as it was measured in our study, may not be increased immediately after CXL. In our experimental setup, a small spherical tip is used to create an indentation on the cornea. The stress in the cornea can be seen as having a compressive component (where crosslinking is not expected to have significant impact) and a tangential component associated to the differential bending of surface lamellas in respect to deeper ones. Acute changes in the force-displacement coefficients (that would be mostly associated to changes in the tangential stiffness after CXL) were not detected in this study.

In conclusion, the present study demonstrated *in vitro* the reduced hydration in porcine corneas directly after the CXL procedure. This effect has been measured by straight calculation of corneal hydration in treated and untreated porcine corneas. This phenomenon may contribute to the increased mechanical stiffness of the cornea and also to other previously demonstrated or speculated aspects of the procedure such as reduction in corneal volume, and usefulness in the treatment of corneal edema.

Acknowledgements We would like to thank Assistant Professor Joanna Moschandreas for her valuable comments in the statistical analysis of the results.

Financial support None.

Conflict of interest The authors have no proprietary or commercial interests in any material or methods discussed in this paper.

References

- Krueger RR (2009) Biomechanical manipulation: the next frontier in corneal refractive surgery. *J Refract Surg* 25:837–40
- Gefen A, Shalom R, Elad D, Mandel Y (2009) Biomechanical analysis of the keratoconic cornea. *J Mech Behav Biomed Mater* 2:224–36
- Binder PS (2007) Analysis of ectasia after laser in situ keratomileusis: risk factors. *J Cataract Refract Surg* 33:1530–8
- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T (2003) Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 135:620–7
- Spoerl E, Huhle M, Seiler T (1998) Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 66:97–103
- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T (2003) Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 29:1780–5
- Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE (2006) Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg* 32:279–83
- Kling S, Remon L, Pérez-Escudero A, Merayo-Llodes J, Marcos S (2010) Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:3961–8
- Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE (2008) Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 34:796–801
- Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T (2010) Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study. *Am J Ophthalmol* 149:585–93
- Ehlers N, Hjortdal J (2008) Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol* 86:549–51
- Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT (2009) Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res* 41:114–7
- Ghanem RC, Santhiago MR, Berti TB, Thomaz S, Netto MV (2010) Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *J Cataract Refract Surg* 36:273–6
- Cordeiro Barbosa MM, Barbosa JB Jr, Hirai FE, Hofling-Lima AL (2010) Effect of cross-linking on corneal thickness in patients with corneal edema. *Cornea* 29:613–7
- Bottós KM, Hofling-Lima AL, Barbosa MC, Barbosa JB Jr, Dreyfuss JL, Schor P, Nader HB (2010) Effect of collagen cross-linking in stromal fibril organization in edematous human corneas. *Cornea* 29:789–93
- Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C (2007) Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg* 33:516–21
- Reiser KM (1991) Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:17–29
- McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, Kidder GW, Lundquist RR, Bradshaw HE, Dedeic Z, Dionne MJ, Clement EM, Conrad GW (2010) Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:129–38
- Zhang Y, Conrad AH, Conrad GW (2011) Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *J Biol Chem* 286:13011–22
- Dougherty PJ, Wellish KL, Maloney RK (1994) Excimer laser ablation rate and corneal hydration. *Am J Ophthalmol* 118:169–76
- Hjortdal JO, Jensen PK (1995) In vitro measurement of corneal strain, thickness, and curvature using digital image processing. *Acta Ophthalmol Scand* 73:5–11
- Hjortdal JO (1995) Extensibility of the normo-hydrated human cornea. *Acta Ophthalmol Scand* 73:12–7
- Vinciguerra P, Albè E, Trazza S, Rosetta P, Vinciguerra R, Seiler T, Epstein D (2009) Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. *Ophthalmology* 116:369–78
- Hedbys BO, Mishima S (1966) The thickness-hydration relationship of the cornea. *Exp Eye Res* 5:221–8
- Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T (2004) Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 23:503–7
- Mencucci R, Marini M, Paladini I, Sarchielli E, Sgambati E, Menchini U, Vannelli GB (2010) Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin Exp Ophthalmol* 38:49–56
- Wollensak G (2006) Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol* 17:356–60
- Wollensak G, Spörl E, Mazzotta C, Kalinski T, Sel S (2011) Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. *Br J Ophthalmol* 95:876–80