

Preprečevanje tanjšanja roženic

Preventing corneal ectasia

Mirna Štabuc Šilih

Očesna klinika,
Univerzitetni klinični
center Ljubljana,
Grablovičeva 46, 1525
Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

asist. dr. Mirna Štabuc
Šilih, dr. med.
Očesna klinika,
Univerzitetni klinični
center Ljubljana,
Grablovičeva 46, 1525
Ljubljana

Ključne besede:

keratokonus, roženica,
ektazija, križna vezava,
LASIK

Key words:

keratoconus, cornea,
ectasia, crosslinking,
LASIK

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010;
79: I-146–52

Prispelo: 8. apr. 2009,
Sprejeto: 15. jul. 2009

Izvleček

Izhodišča: Tanjšanje roženice lahko povzročijo različna očesna stanja in bolezni, med njimi keratokonus, pelucidna marginalna degeneracija, keratoglobus, posteriorni keratokonus in stanje po »laser-assisted in situ keratomileusis« (LASIK). Keratokonus je najbolj pogosta ektatična distrofija roženice z incidenco približno eden na dva tisoč.

Zaključki: Križna vezava (cross linking) roženičnega kolagena z riboflavinom in ultravijoličnimi A žarki je sorazmerno novo zdravljenje. Kolagena vlakna se kemično vežejo, tako da se poveča trdnost roženice in s tem zmanjša napredovanje keratokonusa. Ta način zdravljenja bo morda postal pomemben, vendar pa ostajajo še neodgovorjena vprašanja. Odgovore nanje naj bi dali rezultati večjih prospektivnih primerjalnih raziskav, ki trenutno potekajo.

Abstract

Background: Thinning of the cornea can be provoked by different disorders, such as ectatic dystrophies, keratoconus, pellucid marginal degeneration, keratoglobus, posterior keratoconus and corneal ectasia after laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). Keratoconus is the most common dystrophy of the cornea, affecting around one person in two thousands.

Conclusions: Corneal collagen crosslinking is a relatively new treatment in which collagen fibres are chemically bonded, using UVA and riboflavin, to increase corneal tensile strength and decrease the progression of keratoconus. It may become an important treatment modality, but as with all new therapies, unanswered questions remain. Larger, prospective comparative studies establishing the safety and efficacy of this treatment are currently underway.

Uvod

Tanjšanje roženice lahko povzročijo različna očesna stanja in bolezni, med njimi keratokonus (KC), pelucidna marginalna degeneracija, keratoglobus, posteriorni KC in stanje po »laser-assisted in situ keratomileusis« (LASIK). KC je najbolj pogosta ektatična distrofija roženice z incidenco približno en na dva tisoč. Prevalenca je 54,5 na 100 tisoč.^{1,2} KC imajo vse etnične skupine, ne da bi prevladoval ženski ali moški spol.¹ Za to bolezen ni enotno sprejetih diagnostičnih meril, tudi patogeneze ne poznamo. Čeprav vzrok za nastanek KC še vedno ni znan, študije kažejo na to, da na nastanek in potek bolezni vplivajo številni dejavniki, tako prirojeni (6 do 8 % bolnikov ima pozi-

tivno družinsko anamnezo) kot pridobljeni ter vplivi okolja.^{2,3}

Prve študije v fotobiologiji so se začele v zgodnjih 90. letih s poizkusi, da bi našli biološka lepila, ki bi jih lahko aktivirali s toploto ali svetlobo in s tem povečali odpornost stromalnega kolagena. Zamisel, da bi uporabili ta konservativni pristop za zdravljenje KC, je bila osnovana na Tehnični Univerzi v Dresdnu v Nemčiji. Leta 2003 so objavili prve rezultate pilotskih študij. Presenetljivo so našli ne samo zaustavitev napredovanja KC, ampak pri več kot polovici oči tudi regresijo proti bolj regularni roženici.^{4,5}

Biomehanske lastnosti roženice so odvisne od značilnosti kolagenih vlaken, interfibrilarnih vezi in njihove prostorske – strukturne razporeditve. Biomehanska

rezistenca roženice pri bolnikih s KC je za polovico nižja od normalne vrednosti in ima nižjo vrednost križnih vezav (corneal collagen cross linking, v literaturi se uporabljajo različne okrajšave: CCL, C3-R, CCCL in CXL). Teorija CCL je, da kolagenska vlakna roženice pri KC izgubijo sposobnost vezave ena na drugo. CCL povzroči več križnih vezav med vlakni in s tem poveča čvrstost in odpornost roženice. Iz tega sledi, da povečevanje teh križnih vezav lahko poveča biomehanično stabilnost roženice.⁴

Postopek

Po topični anesteziji se mehanično odstrani roženični epitelij v premeru 6–9 mm. 0,1 % raztopino riboflavina se kapa približno 20 minut. Riboflavin (vitamin B2) je voden topen in se deaktivira s svetlobo. Ima dvojno vlogo: pospešuje nastajanje prostih radikalov, ki povzročijo fizično križno vezavo kolagena, poleg tega pa absorbira ultravijolične A (UVA) žarke in preprečuje poškodbo globljih očesnih struktur, roženičnega endotela, leče in mrežnice. Penetracijo riboflavina v roženico in v sprednji prekat je potrebno nadzorovati z biomikroskopom. UVA žarčenje se izvaja z optičnim sistemom z izvorom svetlobe 365–370 nm, 3 mW/cm², 30 minut, kar ustreza površinskemu odmerku 5,4 J/cm². Med postopkom kapamo kapljice riboflavina vsakih 5 minut, da nasičimo roženico z riboflavinom, poleg tega pa vsaki 2 minuti vlažimo roženico s kapljicami fiziološke raztopine. Po posegu dobijo bolniki terapevtsko kontaktno lečo in lokalno antibiotik, dokler se roženični epitel popolnoma ne zaraste. Očesne kapljice dobivajo še 6 tednov po posegu.⁶

Varnost

Po posegu CCL se zmanjša število keratocitov do globine približno 300 mikronov, ponovna poselitev tega področja pa traja do 6 mesecev. Priporoča se, da je debelina roženice pred posegom najmanj 400 mikronov, saj v tem primeru ne bo prišlo do poškodbe endotela in globljih struktur. Izvor svetlobe pa mora zagotavljati homogeno žarčenje, brez vročih točk. V prisotnosti riboflavina

se 94 % UVA svetlobe absorbira v sprednjih 400 mikronih roženične strome, v odsotnosti pa samo 32 %.⁷ Globino mehanične stabilizacije so prikazali tudi biokemično na enukleiranih prašičjih očeh in ugotovili, da endotel ni prizadet. 65 % UVA svetlobe se absorbira v prvih 200 mikronih in samo 25–30 % v naslednjih 200 mikronih.⁸ Biomikroskopsko je v prvih 2 tednih opisana roženična stromalna demarkacijska linija, ki kaže na prehod med stromo, kjer je bil viden učinek CCL in tam, kjer ni bil.⁶ Drugi avtorji te demarkacijske linije niso videli.⁹ Meritve roženične površine z infrardečo termokamero so pokazale, da je CCL varen postopek, ki ne povzroča termalne poškodbe roženične površine.¹⁰ Na prašičjih očeh so tudi ugotovili, da je popolna odstranitev roženičnega epitela ključnega pomena pri križni vezavi.¹¹

Na Hauser-Ross Eye Institute, Kish Health System, Sycamore, IL, USA so na humanih *ex vivo* roženicah iz očesne banke preučevali morfološke spremembe, ki jih povzroči CCL, s pomočjo konfokalne, elektronske in svetlobne mikroskopije. S konfokalno mikroskopijo so bile hiperreflektivne strukture vidne do globine 300 mikronov. Ostala roženična stroma in endotel so izgledali normalno. Elektronska mikroskopija je pokazala apoptotične spremembe keratocitov tudi do globine 300 mikronov. Histološko niso videli nobenih patoloških sprememb. Z ozirom na klinične študije menijo, da je CCL obetajoče zdravljenje, ki se zdi varno in zaustavlja napredovanje roženične ektazije.¹²

Retrospektivne študije

Hoyer A in sod. zdravijo bolnike s progresivnim KC od leta 1998, najdaljše sledenje je bilo 7,5 let. Analizirali so 153 oči 111 bolnikov, minimalni čas sledenja je bil 12 mesecev. Keratektazija se je značilno zmanjšala. Vidna ostrina se je izboljšala oziroma ostala stabilna. Niso imeli resnih stranskih učinkov.¹³ Raiskup-Wolf F in sod. opisujejo najdaljše sledenje 6 let, ob tem pa majhno število bolnikov, ki jih sledijo več kot 3 leta. V retrospektivno študijo je bilo vključenih 480 oči 272 bolnikov, od tega so 241 očem

po posegu sledili najmanj 6 mesecev. Roženična zakrivljenost se je znižala za 2,68 dioptrij v prvem letu, 2,21 dioptrije v drugem letu in 4,84 dioptrije v tretjem letu. Najbolje korigirana vidna ostrina se je izboljšala ($>$ ali = 1vrstici) v 53 % od 142 oči v prvem letu, 57 % od 66 oči v drugem letu, oziroma je ostala stabilna brez izgube vrstic v 24 %. Pri dveh bolnikih so CCL ponovili. Tudi njihovi rezultati kažejo na dolgotrajno stabilizacijo in izboljšanje.¹⁴ Mazzotta C in sod. so s konfokalno lasersko mikroskopijo pregledali 44 roženic bolnikov s KC, ki so jih zdravili s CCL. Epitel se je popolnoma zarasel po 4 dneh. Polna roženična občutljivost se je obnovila po enem letu. Triletna stabilnost bi lahko bila povezana s povečanim številom križnih vezav, sintezo dobro strukturirane ga kolagena in novih lamelnih medsebojnih povezav.¹⁵

Prospektivne študije

Prospektivne randomizirane študije so se začele pred več kot enim letom v Evropi in Avstraliji. Merijo preživetje endotelnih celic po CCL. Predvidevajo, da se roženica ne stabilizira prej kot v 6 do 8 mesecih po posegu. Te študije bodo pokazale rezultate dolgotrajnega sledenja.^{16,17} Trenutno potekajo v svetu številne študije o križni vezavi roženičnega kolagena, v Franciji, Braziliji, Indiji, Singapurju... Tudi The U.S. Food and Drug Administration (FDA) je odobril začetek treh kliničnih preskusov. Merila za vključitev so bila: diagnoza KC z dokumentiranim napredovanjem v zadnjih 12 mesecih, diagnoza roženične ektazije, izključitveno merilo pa predhodni kirurški poseg na roženici pri KC in brazgotine roženice (<http://www.osnsupersite.com>, <http://clinicaltrials.gov>, <http://www.expresshealthcaregmt.com>).¹⁸ Iz "Centre for Eye Research Australia", East Melbourne, Australia poročajo o preliminarnih rezultatih prospektivne randomizirane kontrolirane študije, v katero je bilo vključenih 66 oči 49 bolnikov z dokumentiranim progresivnim KC. Poročajo o nižjih vrednostih maksimalne keratometrije, izboljšanju vidne ostrine in nespremenjenih vrednostih endotelnih celic po križni vezavi. Rezultati kažejo na začasno stabilizacijo

vseh oči po zdravljenju s CCL. Čeprav je še zgodaj, menijo, da so ti rezultati zelo spodbudni.^{19,20} Fotodinamični riboflavin UVA – povzročen CCL kolagena poveča biomehanično trdoto človeške roženice za približno 300 %. Wollensak G in Iomdina E sta s študijo, pri kateri sta na 9 levih očeh zajčjih samcev napravila CCL, kontralateralne oči pa so služile kot kontrola, želela opredeliti trajanje biomehaničnih učinkov. Po preteku do (!) 8 mesecev ugotavljata, da povečanje biomehanične togosti ostaja stabilno. Menita, da to daje upanje, da bi to novo zdravljenje lahko dokončno ustavilo napredovanje KC.²¹ V Mumbaju, Indija, so s CCL zdravili 68 oči pri 41 bolnikih. Rezultati kažejo na stabilizacijo in izboljšanje KC.²² V pravkar objavljeni prospektivni nerandomizirani študiji pa je bilo vključenih 28 oči s progresivnim napredovanjem KC. Po 12 mesecih ugotavljajo, da je bil CCL učinkovit pri izboljšanju nekorrigirane in korigirane vidne ostrine, s tem da je značilno znižal keratometrijo in aberacije.²³

Stranski učinki križne vezave

Herrmann in sod. poročajo o 41-letnem bolniku, pri katerem je bil CCL delan na enem očesu. Pooperativno je imel difuzno subepitelijsko opacifikacijo in paracentralno stanjšanje roženice. Ta povrhnja motnjava v smislu "meglice" je kljub intenzivnemu zdravljenju izginila šele postopoma.²⁴ Mazzotta in sod. pa poročajo o dveh primerih stromalne motnjave po CCL, ki so ju proučevali s konfokalno mikroskopijo *in vivo*.²⁵ Kymionis in sod. so zdravili 21-letno bolnico s CCL zaradi KC na desnem očesu. Pet dni po posegu je prišla na pregled zaradi geografičnega epitelialnega keratitisa in iritisa. Na podlagi tega primera avtorji sklepajo, da lahko CCL sproži herpetični keratitis z iritisom celo pri bolnikih, ki nimajo v anamnezi herpetične bolezni.²⁶

C. Koppen, ki je zaposlena na Department of Ophthalmology, University Hospital Antwerp, Antwerp University, Belgium, je na XXVI Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons v Berlinu lani septembra poročala o dveh primerih resnega keratitisa po zdravljenju s CCL, ki sta se končala s trajno izgubo vidne

ostrine. Do takrat ni bilo objavljenih poročil o resnih stranskih učinkih; ustna poročila so govorila o zamotnitvah in o omejenem številu težav v zvezi s celjenjem epitela in brazgotinah. Dva bolnika z napredujočim KC (s prozornima roženicama in minimalno debelino $> 400\mu$) so zdravili po Zürichovem protokolu za UV-A CCL. Ob prvem pregledu 24 ur po posegu so bile vse preiskave v mejah normale. Oba bolnika sta pod nujno klicala naslednje jutro, to je > 36 ur po posegu: skrbela sta jih poslabšanje vidne ostrine, povečana rdečina očesa in bolečina. Obe očesi sta bili resno vneti s celicami v sprednjem prekatu in precipitati; na mestu CCL so se pojavili številni beli infiltrati. Kortikosteroidi topično so vodili do začetnega izboljšanja simptomov in znakov. Opravljene preiskave konjunktivalnega brisa niso pokazale rasti niti bakterij niti virusov. Preiskave prekatne vodke in PCR so bile narejene pri enem bolniku, a so bili rezultati negativni. Pri prvem bolniku je površinsko stromalno brazgotinjenje zmanjšalo najboljše korigirano vidno ostrino z 1,0 na 0,6 in pri drugem bolniku z 0,7 na 0,1 in to brez znakov nadaljnjega izboljšanja po približno treh mesecih. Menijo, da bi bila možna razlaga za ta resni keratitis pretirani odziv na CCL poseg.²⁷

Potencialna uporaba križne vezave

Vstavljanje roženičnih obročkov je varen in učinkovit način zdravljenja KC.²⁸ Če poleg vstavljanja roženičnih obročkov naredimo še CCL, je izboljšanje KC še večje, kot bi bilo samo z obročki.²⁹

CCL lahko tudi zaustavi in delno popravi napredovanje jatrogene keratektazije, povzročene z LASIK.³⁰ Hafesi poroča tudi o bilateralni keratektaziji med prvo nosečnostjo 26 mesecev po LASIK. Narejen je bil CCL na obeh očeh in za 22 mesecev zaustavil napredovanje, vendar je med drugo nosečnostjo keratektazija ponovno eksacerbirala.³¹ Kamburoglu G in Ertan A poročata o 27-letnem moškem, pri katerem je prišlo po LASIK do ektazije. Vstavili so roženične obročke v obe očesi, nato pa napravili še CCL v razmiku enega meseca na desnem in levem očesu. Menijo, da je to možna alternativna metoda

zdravljenja ektazije po LASIK.³² Spremembe roženičnega tkiva po CCL so proučevali tudi z roženičnim konfokalnim mikroskopom pri 5 bolnikih (5 očeh) z jatrogeno keratektazijo po LASIK in pri 5 bolnikih (5 očeh) s progresivnim KC. Pregledali so tudi 3 zdrave roženice in 3 roženice brez ektazije po LASIK kot kontrole. Čas sledenja je bil eno leto. Apoptozo jeder keratocitov v sprednji in intermediarni roženični stromi s spremembami kolagena so opazovali v prvih 3 mesecih po posegu. V naslednjih mesecih je prišlo do postopne ponovne poselitve keratocitov. Spremembe roženice po CCL so bile podobne pri keratokoničnih in post-LASIK roženičnih ektazijah.³³

CCL bi se lahko uporabljal tudi za zdravljenje bolnikov z roženičnim edemom. Pri bulozni keratopatiji bi lahko CCL stabiliziral stromo in s tem preprečil novo nastajanje edema. Podobno bi lahko učinkoval na roženični edem pri keratoglobusu ali KC pri roženičnem hidropsu.^{34, 35} S CCL so zdravili 3 oči 3 bolnikov z bulozno keratopatijo. Menijo, da bi lahko postal CCL dodaten koristen pripomoček pri zdravljenju teh bolnikov, posebno, če imajo bolniki simptome bolečine, slabo napoved kakovosti vida ali če želimo podaljšati čas do presaditve roženice.³⁶ UVA CCL (15 mW/cm²) s femtosecond laserjem bi lahko bila varna (brez roženičnih brazgotin) in učinkovita (opazno znižanje edema) alternativna metoda za zdravljenje bulozne keratopatije.³⁷ Tudi na Department of Ophthalmology, Aarhus University Hospital, Aarhus C, Denmark, so želeli oceniti možnost, da bi s CCL kolagena zdravili roženični edem kot posledico dekompenzacije endotela. V študijo so vključili 11 bolnikov z roženičnim edemom, pri 10 bolnikih so ugotovili zmanjšanje roženične debeline. Večini se je tudi izboljšala vidna ostrina. Do učinka je prišlo v nekaj tednih in je trajal mesece. Študija je sicer pokazala možno aplikacijo CCL pri bolnikih z roženičnim edemom, vendar so po mnenju avtorjev potrebne še dodatne eksperimentalne in klinične študije, ki bi opredelile natančne indikacije za to vrsto zdravljenja.³⁸

CCL bi lahko bil tudi obetajoča možnost zdravljenja bolnikov z vnetnim keratitisom in mehčanjem roženice, s čimer bi preprečili

nujno keratoplastiko, saj so v študiji v 8 od 9 primerov s CCL ustavili proces mehčanja roženice.^{5,39} Opisan je tudi primer Gram-negativnega keratitisa *Escherichia coli* z roženičnim ulkusom pri 78-letni bolnici, ki se ni izboljšal po lokalnem in sistemskem antimikrobnem zdravljenju. Že prvi dan po CCL je bila roženična rana prekrita z brazgotinskim tkivom, bolnica pa je poročala o subjektivnem izboljšanju simptomov. Po enem mesecu je bil roženični edem skoraj popolnoma resorbiran, roženični ulkus se je pozdravil, boleči simptomi pa so izgini-li. Avtorji menijo, da je CCL uporaben pri zdravljenju roženičnega ulkusa v primeru, ko ni izboljšanja po zdravljenju z zdravili.⁴⁰

Križna vezava skleralnega kolagena z gliceraldehidom je pri zajcih povečala skleralno biomehanično togost. Gliceraldehid se z lahkoto aplicira s ponavljajočimi parabolarnimi injekcijami. Na mrežnici niso našli stranskih učinkov, tako da bi lahko ta nova metoda postala način zdravljenja za učvrstitve skleralnega tkiva kot preventiva napredovanja kratkovidnosti.⁴¹

Na prašičjih očeh proučujejo novo, hitro metodo CCL, imenovano »flash-linking« z uporabo običajnih fotoaktivnih agensov. Po 30 sekundah obsevanja z UVA svetlobo valovne dolžine 370 nm in 4,2 mW/cm² iradiacije na razdalji 1,2 cm metoda kaže, merjeno s površinsko elastometrijo, podobno učinkovitost pri učvrstitvi roženice.⁴²

Nedavne študije na Department of Ophthalmology, Edward S Harkness Eye Institute, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, New York 10032, USA, kažejo, da imajo lahko kratke verige »aliphatic beta-nitro« alkoholov učinek križne vezave kolagena korneo-skleralnega tkiva v fizioloških pogojih. Ugotavljajo ugodne in vitro toksične pragove. Še več, v primerjavi z nekaterimi agensi, ki se uporabljajo v oftalmologiji, kot na primer antibiotiki fluorokinoloni, anti-proliferativni agensi in benzalkonium chloride, so beta-nitro alkoholi manj toksični in vitro. Rezultati te študije spodbujajo nove raziskave topičnih farmakoloških agensov, ki bi delovali učvrščujoče pri spremenjeni korneoskleri.^{43,44}

Študija, ki so jo opravili Spoerl in sod., kaže na to, da naj bi bilo kajenje cigaret negativno povezano s KC. Vključili so 180 bolnikov s KC, od tega jih je bilo samo 9 (5 %) kadilcev, ki so pokadili najmanj 2 cigareti na dan več kot eno leto. Našli so značilno povezanost med nekadilci in KC. Menijo, da bi lahko stranski proizvod cigaretne dima vodili do CCL kolagena, kar bi v roženici delovalo preventivno na nastanek in napredovanje KC.⁴⁵

Zaključki

CCL v večini primerov vodi v zaustavitve napredovanja keratektazije. Kaže, da so zapleti redki, vendar zaenkrat še ni na razpolago dovolj podatkov, da bi lahko dokončno določili seznam indikacij in kontraindikacij. Ostajajo še neodgovorjena vprašanja, npr. Kako dolgo traja učinek? Preliminarni rezultati so pozitivni, vendar je sledenje še vedno kratko. CCL bo morda postal pomemben način zdravljenja, vendar bo šele čas pokazal, ali je metoda zares tako revolucionarna, kot se kaže sedaj. Za potencialno klinično sprejetje postopka pa so potrebni rezultati prospektivnih kontroliranih študij, ki so trenutno v teku.^{5,46-48}

Literatura

1. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 1998; 42: 297–319.
2. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer DA. A 48 year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 1986; 101: 267–73.
3. McMahon TT, Shin JA, Newlin A, Edrington TB, Sugar J, Zadnik K. Discordance for keratoconus in two pairs of monozygotic twins. *Cornea* 1999; 18: 444–51.
4. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C, et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea* 2007; 26: 390–7.
5. Koller T, Seiler T. Therapeutic cross-linking of the cornea using riboflavin/UVA. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2007; 224: 700–6.
6. Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea* 2006; 25: 1057–9.
7. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007; 26: 385–9.

8. Schilde T, Kohlhaas M, Spoerl E, Pillunat LE. Enzymatic evidence of the depth dependence of stiffening on riboflavin/UVA treated corneas. *Ophthalmologie* 2008; 105: 165–9.
9. Kanellopoulos AJ, Binder Perry S. Collagen cross-linking (CCL) with sequential topography-guided PRK: a temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea* 2007; 26: 891–5.
10. Mencucci R, Mazzotta C, Rossi F, Ponchietti C, Pini R, Baiocchi S, et al. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking: in vivo thermographic analysis of the corneal surface. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33: 1005–8.
11. Hayes S, O'Brart DP, Lamdin LS, Douth J, Samaras K, Marshall J, et al. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *Cataract Refract Surg* 2008; 34: 657–61.
12. Dhaliwal JS, Kaufman SC. Corneal collagen cross-linking: a confocal, electron, and light microscopy study of eye bank corneas. *Cornea* 2009; 28: 62–7.
13. Hoyer A, Raiskup-Wolf F, Spörl E, Pillunat LE. Collagen cross-linking with riboflavin and UVA light in keratoconus – results from Dresden. *Ophthalmologie* 2009; 106: 133–40.
14. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spörl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 796–801.
15. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi O, Bovone C, Sparano MC, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol* 2008; 146: 527–33.
16. Iovieno A, Oechsler RA, Yoo SH. Long-term results of collagen crosslinking with riboflavin and UVA in keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 1616–7.
17. Raiskup-Wolf F, Spoerl E. Reply: Long-term results of collagen crosslinking with riboflavin and UVA in keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 1617.
18. Tan DT, Por YM. Current treatment options for corneal ectasia. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 284–9.
19. Wittig C, Whiting M, Sullivan L, Snibson GR. Collagen crosslinking: clinical results. New Orleans: American Academy of Ophthalmology; 2007.
20. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *J Refract Surg* 2008; 24: S720–5.
21. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol* 2009; 87: 48–51.
22. Agrawal VB. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light for keratoconus: Results in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol* 2009; 57: 111–4.
23. Vinciguerra P, Albè E, Trazza S, Rosetta P, Vinciguerra R, Seiler T, et al. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. *Ophthalmology* 2009; 116: 369–78.
24. Herrmann CI, Hammer T, Duncker GI. Hazeformation (corneal scarring) after cross-linking therapy in keratoconus. *Ophthalmologie* 2008; 105: 485–7.
25. Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S, Traversi C, Caporossi A. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007; 35: 580–2.
26. Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, Suh LH, Pallikaris AI, Markomanolakis M, Yoo SH. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33: 1982–4.
27. C.Koppen, L. Gobin. Two cases of keratoconus with loss of visual acuity after corneal crosslinking with UV-A and riboflavin. The XXVI Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons; 2008 Sep 13–17; Berlin, Germany. Berlin: European Society of Cataract & Refractive Surgeons; 2008.
28. Colin J, Malet FJ. Intacs for the correction of keratoconus: two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33: 69–74.
29. Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33: 75–80.
30. 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* 2008; 34: 879.
31. Hafezi F, Iseli HP J. Pregnancy-related exacerbation of iatrogenic keratectasia despite corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 1219–21.
32. Kamburoglu G, Ertan A. Intacs implantation with sequential collagen cross-linking treatment in postoperative LASIK ectasia. *J Refract Surg* 2008; 24: S726–9.
33. Kymionis GD, Diakonis VF, Kalyvianaki M, Portaliou D, Siganos C, Kozobolis VP, 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: 774–8.
34. Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 549–51.
35. Bellini LP. New uses for collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 879–80.
36. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res* 2009; 41: 114–7.
37. Krueger RR, Ramos-Esteban JC, Kanellopoulos AJ. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *J Refract Surg* 2008; 24: S730–6.
38. Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 549–51.
39. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for

- infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea* 2008; 27: 590–4.
40. Micelli Ferrari T, Leozappa M, Lorusso M, Epifani E, Micelli Ferrari L. Escherichia coli keratitis treated with ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19: 295–7.
 41. Wollensak G, Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glyceraldehyde. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 651–6.
 42. Rocha KM, Ramos-Esteban JC, Qian Y, Herekar S, Krueger RR. Comparative study of riboflavin-UVA cross-linking and »flash-linking« using surface wave elastometry. *J Refract Surg* 2008; 24: S748–51.
 43. Paik DC, Wen Q, Braunstein RE, Airiani S, Trokel SL. Initial studies using aliphatic beta-nitro alcohols for therapeutic corneal cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 1098–105.
 44. Paik DC, Wen Q, Braunstein RE, Trokel SL. Short chain aliphatic beta-nitro alcohols for corneoscleral cross-linking: corneal endothelial toxicity studies. *J Refract Surg* 2008; 24: S741–7.
 45. Spoerl E, Raiskup-Wolf F, Kuhlisch E, Pillunat LE. Cigarette smoking is negatively associated with keratoconus. *J Refract Surg* 2008; 24: S737–40.
 46. Dean S. Corneal cross-linking, the how and why of vulcanising eyeballs. Annual Clinical Conference and Exhibition; 2008 May 29 – Jun 1; Birmingham, Great Britain. Birmingham: British Contact Lens Association; 2008.
 47. Kohnen T. Riboflavin-UVA corneal collagen crosslinking as an evolving surgical procedure for progressive ophthalmic tissue diseases. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 527.
 48. Kohlhaas M. Collagen crosslinking with riboflavin and UVA-light in keratoconus. *Ophthalmologie* 2008; 105: 785–93.