

Crosslinking kezelés hatása a szaruhártya hámosodására

Gyenes Andrea dr.¹ ■ Szentmáry Nóra dr.^{1,2} ■ Tóth Gábor dr.¹
Kiss Huba dr.¹ ■ Szekrényesi Csaba dr.³ ■ Achim Langenbucher dr.⁴
Nagy Zoltán Zsolt dr.¹

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szemészeti Klinika, Budapest

²Klinik für Augenheilkunde, Universität des Saarlandes, UKS, Homburg/Saar

³Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar, Budapest

⁴Experimentelle Ophthalmologie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Bevezetés és célkitűzés: A crosslinking kezelés szaruhártya-hámosodásra gyakorolt hatásának vizsgálata. *Betegek és módszer:* Vizsgálatunkba 39 keratoconusos beteget vontunk be crosslinking kezelés után, és 11 pácienset fotorefraktív keratectomiát követően (kontroll) crosslinking kezelést követően 21, 45 és 69 órával. A festődő szaruhártyahámhiány területét a fotorefraktív keratectomiát követően 16, 37 és 61 órával meghatároztuk. A fotorefraktív keratectomia kezeléseket utáni kontrollok időpontja nem egyezett a crosslinking kezelést követő kontrollidőpontokkal, így a fotorefraktív keratectomiás csoportnál a hámhiány feltehető méretét a crosslinking kezelési csoport mérési időpontjaira számítottuk, és χ^2 -teszt segítségével hasonlítottuk össze a két csoportban a hámhiány méretét. *Eredmények:* A cornea crosslinking kezelést követően a szaruhártya hájának záródása a kezeléstől számított három napon belül, fotorefraktív keratectomiát követően négy napon belül következett be. 45 és 69 óra elteltével a két csoport között szignifikáns különbség igazolódott a hámhiány méretében ($p = 0,005$ és $p < 0,001$). *Következtetés:* A crosslinking kezelést követően a szaruhártya hámosodása gyorsabb, mint fotorefraktív keratectomiát követően. Vizsgálatunk a crosslinking kezelés hámgógyulásra kifejtett kedvező hatását igazolta. *Orv. Hetil., 2017, 158(10), 376–379.*

Kulcsszavak: crosslinking, fotorefraktív keratectomia, hámgógyulás

Impact of crosslinking on corneal epithelial healing

Introduction and aim: To analyse the effect of crosslinking (CXL) on corneal epithelial healing. *Patients and method:* 39 keratoconus patients following CXL and 11 patients following PRK were enrolled in this study. 21, 45 and 69 hours after CXL and 16, 37 and 61 hours following PRK slitlamp photographs were taken using fluorescein staining and the size of the epithelial defect and the time of epithelial closure was determined. As the observation time-points differed in both groups, the size of the epithelial defect following PRK was calculated for the time points used for analysis of CXL patients. These data were compared using chi-quadrat test. *Results:* Following crosslinking, epithelial closure occurred within 3, following PRK within 4 days. In the area of epithelial erosion 45 and 69 hours after CXL or PRK treatment statistically significant difference ($p = 0.005$ and $p < 0.001$) was verified. *Conclusion:* Our results show beneficial effect of crosslinking on corneal epithelial healing.

Keywords: crosslinking, photorefractive keratectomy, corneal epithelial healing

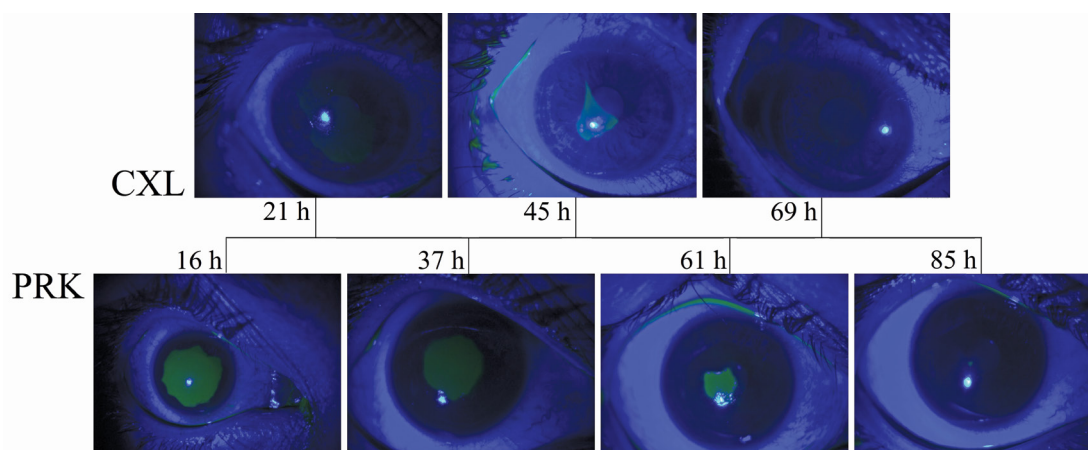
Gyenes, A., Szentmáry, N., Tóth, G., Kiss, H., Szekrényesi, Cs., Langenbucher, A., Nagy, Z. Zs. [Impact of crosslinking on corneal epithelial healing]. *Orv. Hetil., 2017, 158(10), 376–379.*

(Beérkezett: 2016. november 14.; elfogadva: 2016. december 8.)

Rövidítések

CXL = crosslinking kezelés; PRK = fotorefraktív keratectomia;
SE = szférikus ekvivalens; UVA = ultraviola sugárzás A

A crosslinking (CXL) technika a keratoconus progresszióját megállító eljárás. A módszert a drezdai Technische Universitätten fejlesztették ki. Elsőként Wollensak, Spoerl és Seiler alkalmazták humán corneákon [1].



1. ábra | Réslámpával készített szaruhártya-felvétel fluoreszcens festést követően, kobaltkék filter használatával a vizsgálati időpontokban crosslinking (CXL) és fotorefraktív keratectomia (PRK) után. A felső és az alsó sor is egy-egy kezelt szemről készült sorozatfelvételt mutat be

A crosslinking kezelés a szaruhártya stromájában elhelyezkedő kollagénrostok között növeli a kovalens kötések számát, így a kezelt corneák rigiditása kezeletlen szaruhártyákkal összevetve 70%-kal nagyobb [2]. Crosslinking kezelés során a keresztkötések (crosslink) képződését fotokémiai reakció hozza létre. Az alkalmazott riboflavin fotoszenzibilizáló szer UVA-besugárzása oxigén-szabadgyökök keletkezéséhez vezet, és ennek hatására létesülnek a stromális kollagénrostok között kovalens kötések. A folyamat a polimerek fotopolimerizációjához hasonló [3].

Bár a CXL-kezelés elsődleges alkalmazási területe a progresszív keratoconus, a CXL-kezelések indikációs köre az utóbbi időben jelentősen bővült. Refraktív kezelés után kialakult keratectasiában [4], bullosus keratopathiában és pellucid marginális degenerációban [5] is történt ilyen kezelés.

Emellett mintegy tíz éve terápiarezisztens keratitisben és esetenként szaruhártyafekélyeknél is alkalmazzák, kihasználva antimikrobás és feltételezett hámosodást támogató hatását [6–10].

A CXL szaruhártya-hámosodást segítő hatásáról esettanulmányok születtek, azonban több beteget vizsgáló klinikai tanulmány ez ideig, tudomásunk szerint, nem található az irodalomban.

Jelen vizsgálatunkban célul tűztük ki a crosslinking kezelés szaruhártya-hámosodásra gyakorolt hatásának vizsgálatát klinikánk betegeinél.

Betegek és módszer

Vizsgálatunkba 39 keratoconusos (átlagéletkor: $31,92 \pm 8,43$ év) és 11 látásjavító célú, PRK (fotorefraktív keratectomia) kezelés előtt álló páciens (átlagéletkor: $41,73 \pm 13,93$ év) vontunk be. A keratoconusos betegeknél topo- és tomográfiával igazolt progresszió miatt végeztünk CXL-kezelést. Kontrollcsoportnak a PRK-kezelésen átesett szemeket választottuk. A 11 PRK-keze-

lésből tíz esetben myop kezelést végeztünk (szférikus ekvivalens: $SE = -5,08 \pm 3,08$), egy esetben hypermetrop kezelést történt ($SE = +3,5$ D). Sem a crosslinkinggel kezelt, sem a látásjavító refraktív kezelt betegcsoportban nem volt ismert egyéb szembetegség, illetve korábbi szemműtét sem történt.

A hámtávoltítás CXL és PRK esetén is 9,0 mm átmérőjű területen történt hokikés segítségével, oxybuprocain-hidrokloriddal történő felszíni érzéstelenítést követően.

Ezután a crosslinkinggel kezelt szemeken 0,1%-os riboflavinoldatot (Ricolin, Sooft Italia, Olaszország) cseppentettünk a corneára 2–5 percenként 30 percen keresztül. A szaruhártyára ezután 370 ± 5 nm hullámhosszú UV-fényt bocsátottunk, amelynek teljesítménye 3 mW/cm^2 , a besugárzás időtartama pedig 30 perc volt. Így a corneára eső összes energia $3,4 \text{ J}$, a teljes sugárexpozíció $5,4 \text{ J/cm}^2$ volt (CSO Vega CMB X Linker, CSO Scandicci, Firenze, Olaszország). A PRK-csoportban a hámbraabrásiót követően 6,0 mm átmérőben a Meditec MEL 80 excimer lézerrel (Zeiss, Jéna, Németország) történt a fotoablatio.

CXL- és PRK-kezelést követően a betegeknél kontaktlencsét nem illesztettünk, és a betegek posztoperatív lokális antibiotikum-kezelése nem különbözött (napi 5×1 levofloxacin hét napon át).

CXL-kezelést követően 21, 45 és 69 órával, PRK-t követően 16, 37 és 61 órával a szaruhártyáról nátrium-fluoresceinnel történt festést követően réslámpás felvételt készítettünk (1. ábra). A készített felvételen meghatároztuk a festődő terület nagyságát a teljes corneafelülethez viszonyítva, illetve rögzítettük a hám megfigyelt záródási idejét. A hámszűrés területét az átlagos cornea-átmérőből (11,5 mm) számolt teljes felszín területéből számoltuk ki a hámszűrés területére illesztett rácsminta segítségével. A corneafelületre egyforma négyzetekből álló négyzetrácsos mintázatot illesztettünk, az így kapott teljes felszínhez tartozó négyzetek számát a hámszűrés területének megfelelő négyzetrácsot alkotó négy-

1. táblázat | A hámsiány mérete a vizsgált csoportokban az egyes időpontokban (mm²)

		A hámsiány mérete (mm ²)						
		16 óra	21 óra	37 óra	45 óra	61 óra	69 óra	85 óra
CXL	Átlag		15,57		2,93		0	0
	SD		7,93		3,94		0	0
	Medián		16,07		1,35		0	0
PRK	Átlag	46,02	26,74*	15,72	11,7*	3,88	4,68*	0,53
	SD	12,54	9,59*	8,59	6,92*	4,17	4,98*	1,22
	Medián	43,75	27,84*	18,75	13,89*	3,55	4,44*	0,0
χ^2 -teszt			p>0,05		p = 0,005		p<0,001	

*Számított értékek.

CXL = crosslinking kezelés; PRK = fotorefraktív keratektomia; SD = standard deviáció

zetek számával összevetve megkaptuk a hámsiány területét a cornea teljes felszínéhez viszonyítva. A hányadost az átlagos corneaátmérőből (11,5 mm) számolt teljes corneafelszínnel megszorozva kaptuk meg a hámsiány területét.

Mivel a két betegcsoportban a hámsiány méret meghatározásának posztoperatív időpontja nem egyezett, a PRK-kezelte betegek csoportjában a hámsiány feltehető méretét a CXL-kezelte betegek időpontjainak megfelelően kalkuláltuk. Az így kapott adatokat χ^2 -teszt segítségével hasonlítottuk össze a két vizsgált csoportban.

Eredmények

A hámsiány méretét a vizsgált időpontokban, valamint a számított hámsiány méreteket a PRK-csoportban az 1. táblázat tartalmazza. Az első posztoperatív napon, 21 óra elteltével még mindkét csoportban az összes szemén hámsiány volt megfigyelhető. A második posztoperatív napon, 45 óra elteltével a CXL-csoportból 13 esetben záródott a hám, a PRK-csoportban még továbbra is minden esetben volt hámsiány. A harmadik posztoperatív napon, 69 óra elteltével a CXL-csoportban minden szaruhártya behámosodott, a PRK-csoportból három szem behámosodott, nyolc szem továbbra is volt hámsiány. A CXL-csoportban a harmadik posztoperatív napra (69 óra), a PRK-csoportban a negyedik posztoperatív napra (85 óra) következett be a hám záródása minden esetben. A statisztikai számításához alkalmazott χ^2 -teszt a két csoport között 45 óra és 69 óra elteltével szignifikáns különbséget igazolt a hámsiány méretében ($p = 0,005$ és $p < 0,001$).

Megbeszélés

Vizsgálatunk célja volt, hogy a CXL-kezelés hámsiánygyulladásra kifejtett hatását értékeljük.

A szaruhártya hámsiánygyulladása három egymással összefüggő fázisból tevődik össze [11–14]. Cornealis hámsiány keletkezésekor a gyógyulási folyamat első 4–6 órájában

ban játszódik le a latens fázis, amelynek során a basalis epithelsejtek migrációja zajlik a sebszélről [15]. A sebfelszínen lévő sejttermelékeket a könnyfilmből származó polimorfonukleáris leukocyták távolítják el [16]. Ezt követi a migrációs fázis, amely monolayer sejtréteg kialakulásával és sejtkecskés elemek képződésével jár [17]. A corneaeróziók utáni hámsiánygyulladást vizsgálva megállapították, hogy a szimmetrikusan létrejövő kétoldali hámsiány záródás sebessége a sebszél minden pontján egyformának tekinthető [15, 18]. A folyamat végén a proliferációs fázisban épül ki a végleges hámsiányvastagság. A hámsiánygyulladást befolyásoló faktorok közül kiemelendő a hámsiány mérete és mélysége, illetve a felszínen lévő egyenetlenségek [19]. Emellett a könnyfilm minősége és integritása is meghatározó tényezői a sebsiánygyulladás folyamatának [20].

A hámsiánygyulladást különböző faktorok befolyásolják, ezek közül a seb paraméterei közül annak nagysága, mélysége és a sebalap felszíni minősége kiemelendő [21, 22]. A hámsiány záródás sebessége fajoként is eltér. Vizsgálatunkban a két összehasonlított csoport a felszín morfológiájában, valamint a Bowman-membrán meglétében különbözött egymástól, amelyek a felszíni hámsiánygyulladásra befolyást gyakorolnak. A kontrollcsoportként választott PRK-csoportban fotoablatio is történt, míg CXL során csak a felszíni hámsiányréteg került eltávolításra. A Bowman-membrán sebsiánygyulladásban betöltött szerepe jelen álláspont szerint nem egyértelmű [23]. Egyes esetekben PRK-kezeléseket követően megfigyelték a Bowman-membránhoz hasonló réteg újraképződését [23].

Jelen eredményeink szerint a CXL-t követően a hámsiány eltávolítást követő harmadik napra következik be a szaruhártya epitheliumának záródása, és a teljes behámosodás gyorsabban történik, mint PRK-t követően. Egy korábbi tanulmányban Khan szintén a szaruhártyahámsiánygyulladásáról számolt be crosslinking kezelést követően, terápiaerezisztens Acanthamoeba-keratitisben [24]. Al-Sabai a szaruhártya beolvadásában tapasztalta a gyulladáshoz hasonló jelek megszűnését és a szaruhártya behámosodását [25], valamint Tóth és mtsai Boston keratoproté-

zis körüli szaruhártya-beolvadás sikeres crosslinking kezeléséről számoltak be [26].

Ezzel szemben egy kísérletes tanulmányban a CXL hatását humán sejtvonalon vizsgálva a riboflavinkoncentráció és UVA-sugárzás cornealis epithelsejtek proliferációját és migrációját nem befolyásolta [27]. Ugyanakkor az *in vitro* vizsgálati eredmények nem minden esetben vehetők össze a klinikai tapasztalattal. Jelen eredményeink alapján felmerül a CXL pozitív hatása akár egyes, a sebgyógyulás zavarával járó kórállapotokban is.

Következtetés

A gyorsabb hámggyógyulás korábban helyreálló látóélességgel, kevesebb diszkomforttal és hamarabb helyreálló barrierfunkcióval jár együtt, amit elősegíthet a CXL-kezelés alkalmazása. Mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek olyan esetekben, ahol abrázió igen, ablatio viszont nem történik.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: Gy. A.: Adatgyűjtés, vizsgálat lefolytatása, vizsgálati adatok feldolgozása, kézirat megszüvegezése. Sz. N.: Hipotézis kidolgozása, vizsgálat lefolytatása, vizsgálati adatok feldolgozása, statisztikai elemzések, kézirat megszüvegezése. T. G., K. H., Sz. Cs.: Adatgyűjtés. A. L.: Vizsgálati adatok feldolgozása, statisztikai elemzések. N. Z. Zs.: Hipotézis kidolgozása, crosslinking kezelések elvégzése, vizsgálat lefolytatása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Wollensak, G., Spoerl, E., Seiler, T.: Riboflavin/ultraviolet-A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am. J. Ophthalmol.*, 2003, 135(5), 620–627.
- [2] Spoerl, E., Schreiber, J., Hellmund, K., et al.: Studies on the stabilization of the cornea in rabbits. [Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen.] *Ophthalmologie*, 2000, 97(3), 203–206. [German]
- [3] Hettlich, H. J., Lucke, K., Kreiner, C. F.: Light-induced endocapsular polymerization of injectable lens refilling materials. *Ger. J. Ophthalmol.*, 1992, 1(5), 346–349.
- [4] Hafezi, F., Kanellopoulos, J., Wiltfang, R., et al.: Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract Refract. Surg.*, 2007, 12(12), 2035–2040.
- [5] Kymionis, G. D., Portaliou, D. M., Bouzoukis, D. I., et al.: Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J. Cataract Refract. Surg.*, 2007, 33(11), 1982–1984.
- [6] Makdoui, K., Mortensen, J., Crafoord, S.: Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea*, 2010, 29(12), 1353–1358.
- [7] Morén, H., Malmjö, M., Mortensen, J., et al.: Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking of the cornea for the treatment of keratitis. *Cornea*, 2010, 29(1), 102–104.
- [8] Iseli, H. P., Thiel, M. A., Hafezi, F., et al.: Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea*, 2008, 27(5), 590–594.
- [9] Panda, A., Krishna, S. N., Kumar, S.: Photo-activated riboflavin therapy of refractory corneal ulcers. *Cornea*, 2012, 31(10), 1210–1213.
- [10] Zhang, Z. Y.: Corneal cross-linking for the treatment of fungal keratitis. *Cornea*, 2013, 32(2), 217–218.
- [11] Ren, H., Wilson, G.: The cell shedding rate of the corneal epithelium – a comparison of collection methods. *Curr. Eye Res.*, 1996, 15(10), 1054–1059.
- [12] Daniels, J. T., Dart, J. K., Tuft, S. J., et al.: Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen.*, 2001, 9(6), 483–494.
- [13] Gaffney, E. A., Maini, P. K., Sherratt, J. A., et al.: The mathematical modelling of cell kinetics in corneal epithelial wound healing. *J. Theor. Biol.*, 1999, 197(1), 15–40.
- [14] Zieske, J. D., Gipson, I. K.: Agents that affect corneal wound healing: modulation of structure and function. In: Albert, D. M., Jacobiec, F. A. (eds.): Principles and practice of ophthalmology. 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, 2000, 364–372.
- [15] Crosson, C. E., Klyce, S. D., Beuerman R. W.: Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1986, 27(4), 464–473.
- [16] Lu, L., Reinach, P. S., Kao, W. W.: Corneal epithelial wound healing. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 2001, 226(7), 653–664.
- [17] Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S. J., Tisdale, A. S.: Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *Dev. Biol.*, 1988, 126(2), 253–262.
- [18] Estil, S., Kravik, K., Haaskjold, E., et al.: Pilot study on the time course of apoptosis in the regenerating corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. Scand.*, 2002, 80(5), 517–523.
- [19] Steele, C.: Corneal wound healing: A review. Part I. *Optometry Today*, 1999, 24, 28–32.
- [20] Klenkler, B., Sheardown, H., Jones, L.: Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. *Ocul. Surf.*, 2007, 5(3), 228–239.
- [21] Lombardo, M., Serrao, S.: Smoothing of the ablated porcine anterior corneal surface using the Technolas Keracon 217C and Nidek EC-5000 excimer lasers. *J. Refract. Surg.*, 2004, 20(5), 450–453.
- [22] Steele, J. G., Johnson, G., McLean, K. M., et al.: Effect of porosity and surface hydrophilicity on migration of epithelial tissue over synthetic polymer. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, 50(4), 475–482.
- [23] Wilson, S. E., Hong, J. W.: Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea*, 2000, 19(4), 417–420.
- [24] Khan, Y. A., Kashiwabuchi, R. T., Martins, S. A., et al.: Riboflavin and ultraviolet light a therapy as an adjuvant treatment for medically refractive *Acanthamoeba* keratitis: report of 3 cases. *Ophthalmology*, 2011, 118(2), 324–331.
- [25] Al-Sabai, N., Koppen, C., Tassignon, M. J.: UVA/riboflavin crosslinking as treatment for corneal melting. *Bull. Soc. Belge Ophthalmol.*, 2010, 315, 13–17.
- [26] Tóth, G., Bucher, F., Siebelmann, S., et al.: In situ corneal crosslinking for recurrent corneal melting after Boston Type 1 keratoprosthesis. *Cornea*, 2016, 35(6), 884–887.
- [27] Wu, M. F., Stachon, T., Wang, J., et al.: Effect of keratocyte supernatant on epithelial cell migration and proliferation after corneal crosslinking (CXL). *Curr. Eye Res.*, 2016, 41(4), 466–473.

(Gyenes Andrea dr.,
Budapest, Mária utca 39., 1085
e-mail: gyenesandi@gmail.com)