

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

Rezumatul tezei de doctorat

Nivelul crescut de citokine inflamatorii în filmul lacrimal:

factor de

risc suplimentar în declanșarea keratoconusului la pacienții

cu antecedente familiale

Conducător științific:

PROF. LILIANA MARY VOINEA

Doctorand:

IOANA-CĂTĂLINA IONESCU

CUPRINS

LISTA DE ABREVIERI.....	4
Introducere	5
PARTEA GENERALĂ	7
1. Noțiuni generale de anatomie și fiziologie a corneei.....	7
1.1. Embriologia corneei.....	7
1.2. Anatomia corneei	8
1.3. Filmul lacrimal.....	12
2. Aspecte generale în keratoconus.....	16
2.1. Date epidemiologice	16
2.2. Aspecte histopatologice în keratoconus	17
2.3. Etiopatogeneza keratoconusului	18
2.3.1. Factorul genetic în keratoconus	18
2.3.2. Factori de mediu	20
2.4. Proteomica în keratoconus	22
2.4.1. Introducere în imunologie.....	22
2.4.2. Implicații în keratoconus.....	25
2.5. Dezechilibrul statusului oxidativ în keratoconus	30
3. Diagnostic clinic și paraclinic în keratoconus	34
3.1. Clasificarea keratoconusului.....	34
3.2. Semne clinice în keratoconus.....	36
3.3. Examinarea paraclinică în keratoconus	37
3.3.1. Topografia corneană	37
3.3.2. Pahimetria	42
3.3.3. Analiza biomecanicii corneene	44
3.3.4. Analiza frontului de undă al ochiului.....	49
3.3.5. Microscopia confocală corneană.....	49
4. Tratamentul în keratoconus	52
4.1. Corecția optică aeriană și cu lentile de contact.....	52
4.2. Crosslinking cornean fotooxidativ	53

4.2.1. Generalități și protocolul standard	53
4.2.2. Crosslinking accelerat	55
4.3. Chirurgia în keratoconus	56
4.3.1. Inele intrastromale corneene	56
4.3.2. Keratoplastia	57
4.4. Inovații terapeutice în keratoconus	57
CONTRIBUȚIE PERSONALĂ	59
5. Scopul și obiectivele	59
6. Metodologia de lucru	60
7. Studiul: Evaluarea citokinelor inflamatorii în filmul lacrimal.....	61
7.1. Ipoteza de lucru.....	61
7.2. Material și metode.....	61
7.2.1. Selecția pacienților.....	61
7.2.2. Metode de examinare clinice și paraclinice	62
7.2.3. Recoltarea probelor biologice	63
7.2.4. Analiza statistică.....	66
7.3. Rezultate	68
8. Discuții.....	145
9. Concluzii.....	149
Lista figurilor	151
Lista tabelor.....	154
Lista figurilor	156
Bibliografie	157
Anexa 1	166

Partea generală este structurată în patru părți. Prima parte a acestuia sintetizează noțiuni generale de anatomie și fiziologie a corneei. Astfel, în această parte sunt sumarizate date despre embriologia corneei, anatomia corneei și filmul lacrimal. A doua parte din stadiul cunoașterii reliefează aspectele generale în keratoconus privind date epidemiologice, histopatologice în primul rând dar și accentuând problema etiopatogenezei a keratoconusului cu prezentarea factorilor genetic, de mediu dar și a proteomicii în keratoconus. Aspectele prezentate în prima parte a lucrării constituie o bază justificativă pentru studiul care face obiectul celei de-a doua părți a tezei, cea a contribuției personale.

Din acest punct de vedere, lucrarea de față abordează o temă de actualitate din domeniul distrofiilor corneene și își propune să cerceteze particularitățile clinice și paraclinice ale indivizilor incluși în studiu. Prin studierea celor trei loturi (eșantion din populația cu keratoconus, eșantion din populația rudelor pacienților cu keratoconus și lot selectat din populația generală) mi-am propus măsurarea biomarkerilor inflamatori lacrimali cu evaluarea comparativă a statusului inflamator local. Mai mult, pornind de la teoria genetică care clasifică rudele pacienților cu keratoconus drept indivizi cu risc de a dezvolta boala, lucrarea și-a propus investigarea implicării suplimentare ale citokinelor de fază acută locale în urmărirea atât a pacienților deja diagnosticați cu keratoconus cât și a subiecților susceptibili din punct de vedere genetic, fiind un potențial factor de risc în declanșarea sau progresia bolii.

Contribuția personală descrie la început ipoteza de lucru generală, obiectivele studiului și metodologia generală a acestora. Se menționează obținerea aprobării Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București, precum și cea a consimțământului informat al subiecților incluși. Scopul cercetării doctorale a constat în studierea în primul rând a statusului inflamator la pacienții cu keratoconus și la rudele de gradul I ale acestora, precum și analiza corelațiilor între pacienții cu keratoconus și un lot normal ales din populația generală.

Obiectivele principale ale cercetării mele doctorale au fost următoarele:

- evaluarea concentrațiilor citokinelor proinflamatorii în lacrimile pacienților cu keratoconus comparativ cu ale unui lot de control

- compararea statusului inflamator între pacienții diagnosticați cu keratoconus și rudele de gradul I ale acestora

- analiza comparativă a celor 3 loturi a unor parametrii indispensabili în urmărirea progresiei și detecției ectaziei corneene precum studiul biomecanicii corneene în vivo, indicii topografici și pahimetria corneană

S-a efectuat un studiu prospectiv, observațional, nerandomizat desfășurat pe o perioadă de 17 luni (ianuarie 2016 – iulie 2017) pe un număr de 48 de pacienți incluși din rândul subiecților din cadrul clinicii oftalmologice Oftaclinic din București. În perioada ianuarie 2016 - mai 2017 s-au recrutat participanții iar perioada iunie-iulie 2017 a fost dedicată recoltării probelor și studierea acestora în cadrul Institutului Național Victor Babeș.

Au fost incluși 48 de participanți, împărțiți astfel :

1. Primul lot (lotul 0 codificat în baza de date) format din 17 pacienți diagnosticați cu keratoconus
2. Al doilea lot (Lotul 1 codificat în baza de date) format din 16 pacienți , rude de grad I al pacienților cu diagnosticul keratoconus
3. Al treilea lot (lotul 2 codificat în baza de date): control, format din 15 subiecți din punct de vedere clinic și paraclinic normali.

Selectia participantilor

Criteriile de includere pentru lotul 0 (pacienti cu keratoconus) au fost reprezentate de:

- Topografie corneană bazată pe discuri Placibo sugestivă pentru keratoconus
- Subțiere corneana
- Examen ORA modificat
- Semne clinice corneene (inel Fleischer, linii Vogt, filete nervoase, subțiere apicală etc)
- În urma investigațiilor s-a stabilit stadiul bolii conform clasificării Amsler- Krumreich.

Criteriile de includere pentru lotul 1 (rudele pacientilor cu keratoconus) au fost urmatoarele:

- apartenența familială

- examenul biomicroscopic normal
- examenul topografic în limite normale

Criteriile de includere pentru lotul martor au fost reprezentate de:

- examen biomicroscopic al polului anterior normal
- topografie normală
- examen ORA în parametrii normali

Criterii de excludere valabile pentru toți participanții

- alergii sistemice sau locale oculare
- portul lentilelor de contact
- antecedente de orice intervenție la nivel ocular (chirurgie refractivă, crosslinking cornean fotooxidativ, operație de cataractă/ptorigion/ glaucom)
- patologii autoimune cunoscute
- subiecți ce au urmat terapie antiinflamatorie și biologică topică sau sistemică în ultima lună

sindrom de ochi uscat

Metode de examinare clinice și paraclinice

Toți participanții au fost supuși unui examen oftalmologic clinic și paraclinic complet și complex în urma unei anamneze detaliate a tuturor (antecedente personale de alergii, intervenții oculare, afecțiuni autoimune, inflamații locale oculare recente):

- acuitate vizuală cu corecție și fără
- examenul biomicroscopic al polului anterior (urmărirea modificărilor corneene ce pot apărea la pacienții cu keratoconus: reflexul endotelial al conului, opacități corneene, filete nervoase, inel Fleischer, striuri Vogt, subțierea corneană la nivelul vârfului conului)

- examinarea topografică și citirea hârții topografice (keratometria maximă- Kmax, indice de predictibilitate a keratoconusului- KPI), stabilirea stadiului bolii conform clasificării Amsler Krumreich

- măsurarea proprietăților biomecanice corneene cu ajutorul Ocular response analyzer® (ORA, Reichert Ophthalmic Instruments, Depew, NY, UȘA) cu analiza histerezisului (CH) și factorului de rezistență corneană (CRF) ce evaluează vâscoelasticitatea corneană, precum și urmărirea indicelui de keratoconus (KMI). S-au efectuat pentru fiecare participant al studiului 4 măsurători pentru a o alege pe cea mai bună cu un scor al undelor mai mare de 7.

- măsurarea grosimii corneene (CCT, pahimetria) efectuată ori prin contact direct – pahimetria ultrasonică (Alcon®, Ocuscan®, RxP Ophthalmic Ultrasound System) sau pahimetria non-contact cu ajutorul tomografiei prin coerență optică (Optical Coherence Tomography 3D OCT-2000 Series) bazată pe interferometria în coerență optică joasă.

- Probele de lacrimi au fost colectate din fundul de sac conjunctival inferior și din cântușul extern fără anestezie topică și cu mare atenția pentru a evita atingerea conjunctivei și implicit lăcrimarea reflexă și lezarea țesutului conjunctival. Pentru recoltare s-au folosit microcapilare din sticla de 50 sau 100 ul Hirschmann® care atrag lacrimile respectând principiul capilarității. Lacrimile au fost apoi transferate în microtubuli Eppendorf și congelate în decurs de o ORA din momentul recoltării la -80 grade Celsius până la analiză. Determinarea nivelului interleukinelor în lacrimi s-a efectuat în laboratorul Institutului Național “Victor Babeș” în colaborare cu Institutul de Chimie Fizică "Ilie Murgulescu". Pentru protocolul de lucru Milliplex® HUMAN CYTOKINE/CHEMOKINE MAGNETIC BEAD PANEL (7 plex: IL-1beta, IFNgamma, IL-10, IL-4, IL-6, RANTES, TNFalfa) s-au respectat pașii conform instrucțiunilor producătorului Merck Millipore

Analiza statistică

Datele colectate de la pacienți au fost introduse într-o bază de date OpenOffice Calc versiunea 4.1.1 Copyright © 2014 The Apache Software Foundation. Analiza statistică a fost făcută cu ajutorul programului SAS University Edition versiunea 9.3, (c) SAS Institute Inc. 100 SAS Campus Drive Cary, NC 27513-2414, UȘA și R - versiunea 3.4.0 (2017-04-21) -- "You Stupid Darkness" Copyright (C) 2017 The R Foundation for Statistical Computing Platform R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for

Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, Inc. Pe lângă pachetele standard R s-a mai folosit și pachetul `dunn.test` (c) Alexis Dinno (2017). `dunn.test`: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>.

Statistica descriptivă :

Pentru fiecare variabilă de interval s-au măsurat următoarele statistici :

- media aritmetică și deviația standard
- mediană și IQR
- minimul, maximul precum și diferența între ele (range-ul)

Pentru variabilele categoricale (de exemplu sexul pacientului / subiectului), s-au determinat frecvența absolută (număr vs număr total) și cea relativă (procentele).

Pentru variabilele continue, s-a determinat inițial dacă distribuția variabilei poate fi aproximată cu ajutorul distribuției normale, determinând skewnessul (simetria distribuției, pentru distribuția gaussiană valoarea fiind 0), kurtosisul (întinderea distribuției, valoarea pentru distribuția normală fiind 0), testând variabilele cu ajutorul testelor de normalitate Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer – Von Mises, Anderson-Darling și folosind următoarele ploturi : histograma, plotul de probabilitate normală și boxplotul.

Comparațiile între variabilele continue, pe cele 3 loturi au fost făcute după următoarea procedură: dacă variabila de interes a avut la toate cele 3 loturi o distribuție ce a putut fi aproximată cu ajutorul distribuției gaussiene, s-a folosit inițial un test ANOVA. Dacă testul ANOVA a evidențiat diferențe cu semnificație statistică, s-a folosit o procedură post-hoc post ANOVA cu ajutorul unor teste Tukey HSD. Dacă variabila de interes nu a avut o distribuție ce a putut fi aproximată cu ajutorul distribuției normale, s-a folosit inițial un test Kruskal-Wallis urmat, dacă testul a evidențiat diferențe cu semnificație statistică, de un test Dunn (procedura post-hoc post Kruskal-Wallis).

Corelațiile între variabile au fost investigate determinând fie indicele de corelație r Pearson (dacă distribuțiile variabilelor au fost apropiate de distribuția normală), fie indicele de corelație ρ Spearman (dacă distribuțiile au fost depărtate de normalitate).

Testele au fost considerate cu semnificație statistică pentru o valoare $p \leq 0.05$.

Rezultate

În urma rezultatelor găsite privind analiza descriptivă, comparativă între cele două loturi putem concluziona prin:

- Analizând acuitatea vizuală fără corecție, constatăm că pacienții din lotul 0 au avut o deficiență importantă a vederii, la loturile celălalte vederea fiind cvasinormală. Vederea medie în lotul pacienților cu keratoconus este scăzută, $0.23 (\pm 0.23)$ în timp ce la loturile 1 și 2 acuitatea vizuală este neafectată, $0.93 (\pm 0.09)$, respectiv $0.91 (\pm 0.09)$.
- Se constată că valorile medii pahimetrice sunt inferioare în lotul 0 comparativ cu celelalte două. Pahimetria în keratoconus reprezintă un parametru clinic urmărit cu mare acuratețe în dinamica progresiei a bolii. Așadar, diferențe cu semnificație statistică au fost între lotul pacienților cu keratoconus și al rudelor acestora dar și între pacienți comparativ cu lotul de control. Rezultatul testului ANOVA ($F = 42.90$, $gl = (2, 41)$, $p < 0.01$) ne permite să interpretăm că există diferențe cu semnificație statistică între cele 3 loturi de pacienți dar se mai folosește un set de test post-hoc post-ANOVA, care evidentiaza ca exista diferențe cu semnificație statistică au fost între loturile 0 și 1 ($p < 0.01$, IC95% nu conține 0) dar și între loturile 0 și 2

Pahimetrie	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie ($\pm DS$)	451.25 (± 50.40)	545.64 (± 21.11)	552.61 (± 10.65)
Mediana (IQR)	455.00 (80.00)	550.00 (27.00)	550.00 (12.00)
Min la Max (Range)	336.00 la 512.00 (176.00)	500.00 la 580.00 (80.00)	539.00 la 576.00 (37.00)

- În cazul keratometriei maxime determinate de topografia corneană, se observă că mediile valorilor în lotul pacienților cu keratoconus sunt superioare celor din lotul rudelor și cel martor. Rezultatul testului Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 28.08$ $gl = 2$, $p < 0.01$) ne sugerează că sunt diferențe cu semnificație statistică între cele 3 loturi

K Max	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	53.83 (\pm 8.56)	43.27 (\pm 1.15)	43.72 (\pm 1.43)
Mediana (IQR)	52.00 (5.43)	43.16 (1.34)	43.00 (2.34)
Min la Max (Range)	44.26 la 78.74 (34.48)	40.88 la 45.04 (4.16)	41.32 la 46.34 (5.02)

- Valoarea medie a CRF-ului cea mai scăzută este înregistrată în lotul 0, urmată de lotul 1 în timp ce lotul 2 prezintă valorile cele mai mari. Rezultatul testului ANOVA ($F = 33.28$, $gl = (2, 45)$, $p < 0.01$) și testul post-hoc post-ANOVA ne permite să inferăm că există diferențe cu semnificație statistică între cele 3 loturi de pacienți. Au fost diferențe semnificative între toate cele 3 loturi, susținând astfel prezența unor modificări din punct de vedere biomecanic atât la pacienții diagnosticați cu keratoconus cât și la rudele acestora în raport cu participanții din lotul martor

CRF	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	7.40 (\pm 2.14)	10.21 (\pm 1.78)	12.95 (\pm 1.79)
Mediana (IQR)	7.50 (2.90)	9.90 (2.45)	13.10 (2.50)
Min la Max (Range)	3.70 la 12.10 (8.40)	7.20 la 13.60 (6.40)	9.00 la 16.30 (7.30)

- în cazul histerezistului cornean, situația este identică: lotul 0 prezintă mediile cele mai mici iar lotul 2 cele mai ridicate, lotul 1 fiind intermediar. Rezultatul testului Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 26.92$, $gl = 2$, $p < 0.01$) și testul Dunn post-hoc Kruskal-Wallis ne sugerează că sunt diferențe cu semnificație statistică între cele 3 loturi.

CH	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	8.27 (\pm 1.97)	10.36 (\pm 1.75)	13.05 (\pm 1.41)
Mediana (IQR)	7.80 (2.10)	9.85 (3.05)	13.40 (2.30)
Min la Max (Range)	6.10 la 13.40 (7.30)	8.20 la 13.30 (5.10)	10.40 la 15.60 (5.20)

- KMI prezintă în urma studiului valori medii scăzute în rândul pacienților cu keratoconus în contrast cu celelalte două loturi. Rezultatul testului ANOVA ($F = 60.80$, $gl = (2, 39)$, $p < 0.01$) ne permite să inferăm că există diferențe cu semnificație statistică între cele 3 loturi de pacienți între loturile 0 și 1 ($p < 0.01$, IC95% nu conține 0) dar și între loturile 0 și 2 ($p < 0.01$, IC95% nu conține 0)

KMI	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 13)	Lot 2 (n = 12)
Medie (\pm DS)	0.07 (\pm 0.22)	0.69 (\pm 0.15)	0.78 (\pm 0.16)
Mediana (IQR)	0.07 (0.26)	0.71 (0.19)	0.76 (0.19)
Min la Max (Range)	-0.30 la 0.54 (0.84)	0.44 la 0.94 (0.50)	0.54 la 1.09 (0.54)

- Privind nivelul lacrimal de IFN gamma, rezultatul testului ANOVA ($F = 3.54$, $gl = (2, 44)$, $p < 0.05$) ne permite să inferăm că există diferențe cu semnificație statistică între cele 3 loturi de pacienți. Media la lotul 0 a fost cu 51.68 mai mare față de cea de la lotul 2, efectul fiind semnificativ statistic (p ajustat < 0.05 , IC95% care nu conține 0). Celelalte diferențe nu au avut semnificație statistică (p ajustat > 0.05 , IC95% conține 0). Trebuie remarcat că există o diferență de 38.52 între loturile 1 și 2, valoarea p fiind sub 0.20.

INF gamma	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	157.75 (\pm 69.68)	144.59 (\pm 63.61)	106.07 (\pm 19.93)
Mediana (IQR)	163.00 (125.30)	126.40 (126.80)	102.60 (20.76)
Min la Max (Range)	69.20 la 282.30 (213.10)	59.90 la 244.60 (184.70)	72.66 la 142.25 (69.58)

- Privind rezultatele IL-10 se observă medii mai ridicate în loturile pacienților cu keratoconus și al rudelor în contrast cu lotul martor. Media la lotul 0 a fost cu 58.05 mai mare față de cea de la lotul 2, efectul fiind semnificativ statistic (p ajustat < 0.05 , IC95% care nu conține 0). Celălalte diferențe nu au avut semnificație statistică (p ajustat > 0.05 , IC95% conține 0), deși diferența între lotul 1 și 2 a fost de 40.03

IL-10	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 15)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	181.61 (\pm 78.55)	163.60 (70.97)	123.56 (\pm 30.96)
Mediana (IQR)	199.10 (122.00)	135.70 (127.80)	127.90 (48.04)
Min la Max (Range)	43.70 la 292.70 (249.00)	62.10 la 263.50 (201.40)	80.51 la 173.34 (92.82)

- Analizând rezultatele IL1 beta înscrise în tabelul nr. 30 observăm medii ale citokinei de 113.52 (\pm 34.86) în lotul 0, în proporție relativ egală cu cea din lotul 1 însă în proporție crescută fără de lotul martor (83.45 (\pm 18.07)). Diferențe cu semnificație statistică au fost între loturile 0 și 2 ($p < 0.01$, IC95% nu conține 0) dar și între loturile 1 și 2, deși în acest caz p a fost marginal nesemnificativ ($p < 0.10$)

IL-1beta	Lot 0 (n = 16)	Lot 1 (n = 15)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	113.52 (\pm 34.86)	107.06 (\pm 24.71)	83.45 (\pm 18.07)

Mediana (IQR)	123.00 (57.40)	104.20 (48.50)	88.00 (23.68)
Min la Max (Range)	55.30 la 157.40 (102.10)	71.50 la 141.30 (69.80)	54.36 la 111.33 (56.97)

- În cazul citokinei IL-4, se observă o valoare de 3 ori mai mare în lotul pacienților cu keratoconus fără de lotul normal respectiv de 2 ori mai mare când comparăm lotul rudelor cu cel martor. Diferențele pentru indicatorul IL-4 au fost semnificative statistic atât între loturile 0 și 1, cât și între 1 și 2 ($p < 0.01$, respectiv $p < 0.05$ și IC95% care nu conține 0)

IL-4	Lot 0 (n = 15)	Lot 1 (n = 13)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	461.67 (\pm 283.20)	378.37 (\pm 242.48)	159.21 (\pm 99.72)
Mediana (IQR)	506.30 (529.00)	288.90 (446.10)	173.28 (163.55)
Min la Max (Range)	69.40 la 875.60 (806.20)	81.10 la 735.50 (654.40)	36.68 la 325.38 (288.69)

- Diferențe cu semnificație statistică au existat doar între loturile 0 și 2 ($p < 0.01$, IC95% conține 0), dar și între loturile 1 vs 2 valoare p este sub 0.20

IL-6	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	122.32 (\pm 18.63)	112.41 (\pm 20.38)	100.31 (\pm 14.13)
Mediana (IQR)	123.20 (21.70)	119.55 (30.15)	97.24 (15.17)
Min la Max (Range)	83.60 la 156.50 (72.90)	70.70 la 146.60 (75.90)	80.76 la 124.05 (43.28)

- Mediile variabilei RANTES sunt similare între cele 3 loturi fără a exista vreo diferență semnificativă între acestea.

RANTES	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 16)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	185.37 (\pm 38.73)	169.61 (\pm 37.95)	174.14 (\pm 65.67)
Mediana (IQR)	200.60 (68.70)	166.55 (66.50)	155.40 (43.58)
Min la Max (Range)	113.30 la 236.10 (122.80)	110.30 la 225.20 (114.90)	95.91 la 301.02 (205.10)

- Se constată o medie superioară în lotul 0 și 1 (131.80 (\pm 34.29) respectiv 125.33 (\pm 28.08) în comparație cu 108.07 (\pm 15.84) înregistrată la subiecții din lotul martor.

TNF alfa	Lot 0 (n = 17)	Lot 1 (n = 15)	Lot 2 (n = 15)
Medie (\pm DS)	131.80 (\pm 34.29)	125.33 (\pm 28.08)	108.07 (\pm 15.84)
Mediana (IQR)	142.80 (51.00)	133.10 (46.60)	111.30 (31.38)
Min la Max (Range)	56.30 la 171.10 (114.80)	62.90 la 156.30 (93.40)	86.40 la 129.86 (43.46)

- Au existat corelații medii (coeficientul de corelație între 0.40 și 0.60) și puternice (coeficientul de corelație peste 0.60), pozitive între citokine
- Au existat corelații slabe și una medie pozitivă între K-max și citokine, dar una singură cu semnificație statistică. În cazul citokinei IL-6 s-a calculat un coeficient de corelație Spearman întrucât distribuția a fost depărtată de normalitate, ceea ce a indicat o valoare de 0,556, o corelație pozitivă, semnificativă din punct de vedere statistic.
- Au existat corelații slabe, medii și puternice, negative între cele de pachimetrie și citokine, una singură fiind nesemnificativă dar cu o valoare $p < 0.20$. corelația cea mai puternică cu semnificație statistică s-a evidențiat în cazul IL-6 (-0,648), ceea ce scoate la lumină faptul că o valoare scăzută a grosimii corneene este însoțită de o valoare ridicată a biomarkerilor inflamatori locali.
- Am aflat că au existat corelații medii și puternice, negative între CH și citokine, precum și între CRF și citokine, toate cu semnificație statistică, ceea ce semnifică faptul că valori

scăzute ale histerezisului cornean și ale factorului de rezistență corneană însoțesc valori crescute ale interleukinelor. S-au repetat corelațiile și în rândul rudelor pacienților și s-a constatat o situație asemănătoare cu cele din lotul pacienților cu keratoconus.

Discuții

Inițial descrisă ca o ectazie corneană neinflamatorie, multiple studii recente din literatură de specialitate dezbate posibilitatea unei componente inflamatorii în etiopatogenia keratoconusului. Rolul inflamației prin interacțiunile dintre citokine, proteaze și stresul oxidativ capătă din ce în ce mai multă amploare întrucât prezența mediatorilor inflamatori în filmul lacrimal al pacienților cu keratoconus pot fi una dintre cauzele degradării tisulare stromale și implicit ale progresiei bolii (68, 75, 84, 161).

Pacienții cu keratoconus sunt monitorizați din punct de vedere clinic și paraclinic prin examenul oftalmologic complet, topografia corneană și examenul biomecanicii corneene. În plus, studiile noi arată că pe lângă acești parametri deja bine cunoscuți, dozarea citokinelor lacrimale ar putea aduce informații suplimentare și ar putea explica o altă latură a bolii (81, 85, 94).

Studiul de față și-a propus analiza activității citokinelor inflamatorii atât la pacienții diagnosticați cu keratoconus cât și la rudele de gradul I ale acestora. Studiul a pornit de la ipoteza că rudele pacienților au un risc crescut de a dezvolta boala conform teoriei genetice care precizează că boala este cu transmitere autozomal dominantă cu penetranță variabilă, explicând posibilitatea apariției afecțiunii la două sau mai multe generații (31).

Bazându-ne pe factorul genetic, am luat în considerare posibilitatea unui profil inflamator local alterat în cazul rudelor pacienților cu keratoconus comparativ cu un lot din populația generală iar în urma rezultatelor și analizei statistice s-au evidențiat valori crescute la pacienții diagnosticați și la rudele acestora în contrast cu lotul martor. Studiul efectuat a confirmat încă o dată rolul citokinelor inflamatorii în patogeneza keratoconusului (86). În urma analizei rezultatele studiului au evidențiat valori crescute ale IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ și TNF α atât în lacrimile pacienților cu keratoconus cât și în ale rudelor comparativ cu lotul martor.

În următoarele paragrafe vom trece în revistă cele mai relevante studii din literatura de specialitate care subliniază importanța inflamației în keratoconus.

În ceea ce privește disfuncția keratocitelor în keratoconus, Poliquen și colaboratorii au constatat prezența unei expresii crescute ale receptorilor IL-1 la nivel cornean la pacienții cu keratoconus comparativ cu subiecți normali (163). Familia de citokine IL-1 are proprietăți puternice proinflamatorii iar efectele se propagă la nivel cornean prin activarea colagenazelor, metaloproteinazelor și a fibroblaștilor ce duc la alterarea structurii tisulare (164). Într-un studiu condus de Wilson și colaboratorii s-a observat că IL-1 alfa și IL-1 beta sunt responsabile de inducerea apoptozei celulare la nivel stromal, fapt ce predispune la dezorganizarea arhitecturii corneene (165). În studiul de față s-a constatat un nivel crescut de IL-1 beta în loturile pacienților cu keratoconus și rudelor, în concordanță cele ale lui Sorkhabi și colaboratorii însă referitor la citokine IL-10, rezultatele sunt contradictorii, Sorkhabi arătând un nivel scăzut în timp ce studiul actual a marcat prezența unei concentrații crescute (84). Pannebaker și colaboratorii au publicat în 2010 rezultate cu diferențe statistice nesemnificative în ceea ce privește concentrația citokinelor la pacienții cu keratoconus comparativ cu subiecți sănătoși însă niveluri crescute lacrimale ale metaloproteinazelor 1 cu semnificație statistică în lotul de keratoconus (75). Un alt studiu în contradicție cu cel de față este cel condus de Jun și colaboratorii care au măsurat niveluri scăzute de TNF-alfa, IFN gamma, IL-4 și CCL5 în grupul de keratoconus în comparație cu lotul martor (67). În urma analizei statistice expuse însă, măsurătorile concentrațiilor în filmul lacrimal confirmă o creștere a citokinelor menționate mai sus. Nivelul crescut al interleukinei IL-6 se regăsește în ambele studii. Ipoteze posibile pentru diferențele atât de mari între cele două studii conduse pot fi pe de o parte utilizarea diferitelor kituri multiplex iar pe cealaltă parte diferența semnificativă în ceea ce privește vârsta medie a pacienților cu keratoconus, Jun și colaboratorii având vârsta medie de 38+/- 10 în timp ce pentru studiul de față s-au inclus pacienți cu vârsta medie de 23+/- 11. Pornind de la aceste date, putem pune în discuție dacă vârsta influențează răspunsul imun și implicit progresia bolii, sugerând că odată cu înaintarea în vârstă poate scădea statusul inflamator local.

În cazul studiilor publicate de Balasubraminian și colaboratorii, s-au prezentat niveluri crescute ale IL-4, IL-5, TNF-alfa, IL-10 și IL-6 în filmul lacrimal al pacienților cu keratoconus, fiind similare cu rezultatele noastre. Mai mult, atât studiul lui Balașubramanian cât și cel de față au arătat o corelație directă între nivelul de citokine proinflamatorii și parametrii topografici (166). Totodată, un alt studiu care ne demonstrează legătura dintre severitatea keratoconusului și interleukine este acela condus de Koložsvári și colaboratorii, sugerând o corelație pozitivă între

RANTES și IL-6 și keratometria, rezultate care concordă cu ale noastre potrivit cărora s-au arătat corelații directe între IL-1b, IL-4, IL-6 și stadiu bolii și care evidențiază că odată cu progresia ectaziei se accentuează și profilul inflamator lacrimal (86). Un alt studiu în concordanță cu al nostru este cel publicat de Lemă și colaboratorii, care au arătat niveluri lacrimale ridicate de IL-6 și TNF-alfa la pacienții cu keratoconus comparativ cu lotul normal (68).

Trecând în revista studiile cu accentul pe biomecanica corneană în keratoconus, se constată o multitudine de rezultate ce sugerează că pacienții diagnosticați cu boala au valori scăzute ale histerezisului cornean și ale factorului de rezistență corneană comparativ cu subiecții sănătoși (121, 125, 129). Experimentul nostru este în concordanță cu constatările celorlalți autori, evidențind încă o dată că pacienții cu keratoconus prezintă o corneă mai slabă din punct de vedere biomecanic. Studiul de față evaluează și statusul biomecanic la rudele pacienților cu keratoconus. În urma analizei statistice s-a constatat o scădere a valorilor medii ale CH și CRF atât în lotul pacienților cu keratoconus cât și în rândul rudelor comparativ cu lotul martor. Într-un studiu realizat de Kara și colaboratorii, comparând CH și CRF între un lot de rude sănătoase (din punct de vedere topografic) ale pacienților cu keratoconus și un lot martor s-au observat valori scăzute în rândul rudelor. Pornind de la aceeași premisă că incidența bolii este mai crescută la rudele de gradul I față de populația generală, atât studiul lui Kara cât și cel prezent sugerează că o instabilitate biomecanică discretă la rudele pacienților cu keratoconus poate fi un indicator precoce capabil de a detecta modificări corneene chiar înaintea celor topografice (128, 167).

Grosimea corneană este un alt parametru important în urmărirea keratoconusului. Multiple studii au demonstrat corelații pozitive între grosimea corneană și CH respective CRF și explică faptul că ușurința de a deforma corneea este dependentă de grosimea centrală corneană astfel încât cu cât CCT este mai mare, cu atât țesutul cornean devine mai rigid prin fibrele de colagen și matricea extracelulară mai dense, ducând deci la o valoare crescută a parametrilor biomecanici (168).

În keratoconus este valabil același principiu conform căruia o grosime corneană scăzută atrage după sine valori mici ale CH și CRF. Odată cu progresia bolii, grosimea și volumul cornean diminuează, fapt observat și în cazul studiului prezent efectuat, în concordanță cu cele din literatura de specialitate (169, 170).

Prin analizele statistice am comunicat relația puternică semnificativă între concentrația interleukinelor din filmul lacrimal al pacienților cu keratoconus și stadiul bolii, pahimetria respectiv cu biomecanică corneană, în toate cazurile fiind vorba de corelații negative. Nu s-au înregistrat însă corelații semnificative privind parametrii menționați anterior în lotul rudelor pacienților.

9. Concluzii

1. În lacrimile pacienților cu keratoconus s-a observat o concentrație crescută a tuturor citokinelor inflamatorii (exceptând nivelul RANTES) comparativ cu rudele acestora iar nivelurile biomarkerilor la aceștia mai mari decât la indivizii ce au constituit lotul de control. Prin urmare, concentrațiile biomarkerilor în rândul rudelor au fost mai scăzute comparativ cu pacienții diagnosticați cu boala însă mai crescute față de lotul martor. Diferențe cu semnificație statistică importantă s-au constatat în cazul IL-1 beta și IL-4, precum și în cazul IFN-gamma și IL-6 cu o semnificație mai slabă din punct de vedere statistic ($p < 0.05$). Aceste rezultate relevă ipoteza semnalizării inflamatorii în etiopatogeneza keratoconusului. Mai mult, nivelul crescut de citokine inflamatorii poate constitui un factor de risc suplimentar în declansarea keratoconusului la pacienții cu antecedente familiale.

2. De asemenea, rezultatele au arătat medii scăzute ale grosimii corneene, histerezisului cornean, factorului de rezistență corneană și al indicelui KMI când am comparat pacienții cu keratoconus cu lotul martor dar și în urma comparației între rudele pacienților cu indivizii sănătoși.
3. Studiul nostru a arătat corelații negative semnificative ale parametrilor biomecanici (CH, CRF) cu nivelul biomarkerilor lacrimali numai în lotul pacienților cu keratoconus.
4. În ceea ce privește grosimea corneană centrală, s-au constatat corelații negative medii și puternice cu semnificație statistică între valorile pahimetrice și concentrația nivelului citokinelor din lacrimile pacienților cu keratoconus.
5. Întrucât am studiat șapte citokine diferite din lacrimile subiecților, am analizat interacțiunea dintre citokine, rezultând corelații semnificative din punct de vedere statistic. Astfel scoatem în evidență interdependența intensă între citokine ce are loc la nivelul suprafeței oculare, o interleukină stimulând la rândul ei pe alta, potențând în așa fel acțiunea acestora. Acest mecanism intricat de stimulare reciprocă s-a întâlnit în studiul nostru atât la pacienții diagnosticați cu keratoconus cât și la rudele acestora.
6. Efectuarea analizei citokinelor lacrimale poate constitui un parametru important în evaluarea progresiei keratoconusului. Mai mult, în completarea opțiunilor terapeutice deja cunoscute (crosslinking fotooxidativ), ne punem întrebarea dacă o altă linie de tratament antiinflamator poate fi instituită în cazul pacienților cu un status inflamator lacrimal alterat în vederea modulării răspunsului inflamator și implicit în stoparea sau încetinirea progresiei bolii.
7. Totodată, analiza citokinelor lacrimale poate constitui un parametru suplimentar în urmărirea rudelor cu risc crescut de a dezvolta keratoconus în scopul detecției precoce a ectaziei.
8. Trebuie avut în vedere însă că studiul de față prezintă o serie de limite. Întrucât la acest experiment a participat un număr mic de subiecți, rolul mediatorilor inflamatori de la nivel lacrimal trebuie confirmat și definit pe loturi mai mari de pacienți pentru a putea fi acceptați ca și factori de risc suplimentări în etiopatogeneza keratoconusului. De asemenea, pornind de la studiul publicat de Jun și colaboratorii conform căruia nu s-au

detectat diferențe semnificative ale concentrațiilor citokinelor serice între pacienții cu keratoconus și indivizii sănătoși, infirmând astfel asocierea bolii cu inflamații sistemice, s-a hotărât ca pentru studiul de față să se analizeze strict citokinele lacrimale.

Bibliografie

1. Yanoff M, Duker JS. Ophthalmology: Expert Consult: Online and Print: Elsevier Saunders; 2013.
2. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1988;86:178-207.
3. Duane TD, Jaeger EA, Tasman W. Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology: Harper & Row; 1992.
4. Ophthalmology AAo. External Disease and Cornea: American Academy of Ophthalmology; 2012.
5. Dumitrache M. *Tratat de Oftalmologie*: Editura Medicala; 2012.
6. Snell RS, Lemp MA. *Clinical Anatomy of the Eye*: Wiley; 1997.
7. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2010.
8. Smolin G, Thoft RA. *The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice*: Little, Brown; 1994.
9. Kaufman PL, Alm A, Adler FH. *Adler's Physiology of the Eye: Clinical Application*: Mosby; 2003.
10. Foulks GN, Bron AJ. Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading. *Ocul Surf.* 2003;1(3):107-26.
11. McCulley JP, Shine WE. Meibomian gland function and the tear lipid layer. *Ocul Surf.* 2003;1(3):97-106.
12. Gipson IK, Argueso P. Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol.* 2003;231:1-49.
13. Gorskova EN, Sevost'ianov EN. [Epidemiology of keratoconus in the Urals]. *Vestn Oftalmol.* 1998;114(4):38-40.

14. 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):760-5.
15. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1986;101(3):267-73.
16. Millodot M, Shneor E, Albou S, Atlani E, Gordon-Shaag A. Prevalence and associated factors of keratoconus in Jerusalem: a cross-sectional study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2011;18(2):91-7.
17. Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneor E, Liu Y. The genetic and environmental factors for keratoconus. *Biomed Res Int.* 2015;2015:795738.
18. Assiri AA, Yousuf BI, Quantock AJ, Murphy PJ. Incidence and severity of keratoconus in Asir province, Saudi Arabia. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(11):1403-6.
19. Ihalainen A. Clinical and epidemiological features of keratoconus genetic and external factors in the pathogenesis of the disease. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1986;178:1-64.
20. Nielsen K, Hjortdal J, Aagaard Nohr E, Ehlers N. Incidence and prevalence of keratoconus in Denmark. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007;85(8):890-2.
21. Georgiou T, Funnell CL, Cassels-Brown A, O'Connor R. Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asians and white patients. *Eye (Lond).* 2004;18(4):379-83.
22. Khaled ML, Helwa I, Drewry M, Seremwe M, Estes A, Liu Y. Molecular and Histopathological Changes Associated with Keratoconus. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7803029.
23. Mocan MC, Yilmaz PT, Irkec M, Orhan M. In vivo confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Curr Eye Res.* 2008;33(11):933-9.
24. Weed KH, MacEwen CJ, Cox A, McGhee CN. Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising in vivo confocal microscopy. *Eye (Lond).* 2007;21(5):614-23.
25. Patel DV, McGhee CN. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1348-51.
26. van Dijk K, Liarakos VS, Parker J, Ham L, Lie JT, Groeneveld-van Beek EA, et al. Bowman layer transplantation to reduce and stabilize progressive, advanced keratoconus. *Ophthalmology.* 2015;122(5):909-17.
27. Scroggs MW, Proia AD. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea.* 1992;11(6):553-9.
28. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Downregulation of beta-actin gene and human antigen R in human keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(7):4032-41.
29. Corbu CG. Keratoconus: diagnostic și tratament: Editura Universitară "Carol Davila; 2014.
30. Ucakhan OO, Kanpolat A, Yilmaz N, Ozkan M. In vivo confocal microscopy findings in keratoconus. *Eye Contact Lens.* 2006;32(4):183-91.
31. 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):403-9.
32. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmol Clin North Am.* 2003;16(4):607-20, vii.
33. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol.* 2000;84(8):834-6.

34. Kaya V, Utine CA, Altunsoy M, Oral D, Yilmaz OF. Evaluation of corneal topography with Orbscan II in first-degree relatives of patients with keratoconus. *Cornea*. 2008;27(5):531-4.
35. Karimian F, Aramesh S, Rabei HM, Javadi MA, Rafati N. Topographic evaluation of relatives of patients with keratoconus. *Cornea*. 2008;27(8):874-8.
36. Weed KH, MacEwen CJ, McGhee CN. The variable expression of keratoconus within monozygotic twins: dundee University Scottish Keratoconus Study (DUSKS). *Cont Lens Anterior Eye*. 2006;29(3):123-6.
37. Bechara SJ, Waring GO, 3rd, Insler MS. Keratoconus in two pairs of identical twins. *Cornea*. 1996;15(1):90-3.
38. 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):444-51.
39. Harrison RJ, Klouda PT, Easty DL, Manku M, Charles J, Stewart CM. Association between keratoconus and atopy. *Br J Ophthalmol*. 1989;73(10):816-22.
40. Heon E, Greenberg A, Kopp KK, Rootman D, Vincent AL, Billingsley G, et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum Mol Genet*. 2002;11(9):1029-36.
41. Semina EV, Mintz-Hittner HA, Murray JC. Isolation and characterization of a novel human paired-like homeodomain-containing transcription factor gene, VSX1, expressed in ocular tissues. *Genomics*. 2000;63(2):289-93.
42. Atilano SR, Coskun P, Chwa M, Jordan N, Reddy V, Le K, et al. Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(4):1256-63.
43. 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):19294-308.
44. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(3):341-51.
45. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brannstrom T, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(10):2293-6.
46. Maumenee IH. The cornea in connective tissue diseases. *Ophthalmology*. 1978;85(10):1014-7.
47. McMonnies CW. Mechanisms of rubbing-related corneal trauma in keratoconus. *Cornea*. 2009;28(6):607-15.
48. Romero-Jimenez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010;33(4):157-66; quiz 205.
49. Weed KH, MacEwen CJ, Giles T, Low J, McGhee CN. The Dundee University Scottish Keratoconus study: demographics, corneal signs, associated diseases, and eye rubbing. *Eye (Lond)*. 2008;22(4):534-41.
50. Boger WP, 3rd, Petersen RA, Robb RM. Keratoconus and acute hydrops in mentally retarded patients with congenital rubella syndrome. *Am J Ophthalmol*. 1981;91(2):231-3.
51. Gritz DC, McDonnell PJ. Keratoconus and ocular massage. *Am J Ophthalmol*. 1988;106(6):757-8.
52. McMonnies CW, Boneham GC. Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing and hand-dominance. *Clin Exp Optom*. 2003;86(6):376-84.

53. Kaya V, Karakaya M, Utine CA, Albayrak S, Oge OF, Yilmaz OF. Evaluation of the corneal topographic characteristics of keratoconus with orbscan II in patients with and without atopy. *Cornea*. 2007;26(8):945-8.
54. Nemet AY, Vinker S, Bahar I, Kaiserman I. The association of keratoconus with immune disorders. *Cornea*. 2010;29(11):1261-4.
55. Sharma N, Rao K, Maharana PK, Vajpayee RB. Ocular allergy and keratoconus. *Indian J Ophthalmol*. 2013;61(8):407-9.
56. Lema I, Duran JA, Ruiz C, Diez-Feijoo E, Acera A, Merayo J. Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic subjects. *Cornea*. 2008;27(7):758-63.
57. Fodor M, Kolozsvari BL, Petrovski G, Kettesy BA, Gogolak P, Rajnavolgyi E, et al. Effect of contact lens wear on the release of tear mediators in keratoconus. *Eye Contact Lens*. 2013;39(2):147-52.
58. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). *Am J Ophthalmol*. 2002;134(5):689-95.
59. Cristina Kenney M, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye*. 2003;26(3):139-46.
60. R. Schnetler WDHG, G. Koorsen. Immunological and antimicrobial molecules in human tears: a review and preliminary report*. *African Vision and Eye Health | South African Optometrist*. 2012
71(3):10.
61. Ionescu R. Essential in reumatologie: Amaltea 2007. 684 p.
62. Nicola NA. Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells*. 1994;12 Suppl 1:3-12; discussion -4.
63. Wisse RP, Kuiper JJ, Gans R, Imhof S, Radstake TR, Van der Lelij A. Cytokine Expression in Keratoconus and its Corneal Microenvironment: A Systematic Review. *Ocul Surf*. 2015;13(4):272-83.
64. Sagoo P, Chan G, Larkin DF, George AJ. Inflammatory cytokines induce apoptosis of corneal endothelium through nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(11):3964-73.
65. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21 e1-70.
66. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus. *Exp Eye Res*. 2012;96(1):132-7.
67. Jun AS, Cope L, Speck C, Feng X, Lee S, Meng H, et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One*. 2011;6(1):e16437.
68. Lema I, Sobrino T, Duran JA, Brea D, Diez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(6):820-4.
69. Mak TW, Saunders ME, Tamminen WL, Chaddah MR. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*: Elsevier Science; 2005.
70. Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett*. 1995;363(1-2):85-9.
71. Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ, Ljubimov AV. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea*. 1997;16(3):345-51.

72. Collier SA. Is the corneal degradation in keratoconus caused by matrix-metalloproteinases? *Clin Exp Ophthalmol.* 2001;29(6):340-4.
73. Kao WW, Vergnes JP, Ebert J, Sundar-Raj CV, Brown SI. Increased collagenase and gelatinase activities in keratoconus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107(3):929-36.
74. Brew K, Dinakarparandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1-2):267-83.
75. Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis.* 2010;16:1949-57.
76. Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(2):147-53.
77. Seppala HP, Maatta M, Rautia M, Mackiewicz Z, Tuisku I, Tervo T, et al. EMMPRIN and MMP-1 in keratoconus. *Cornea.* 2006;25(3):325-30.
78. Mackiewicz Z, Maatta M, Stenman M, Kontinen L, Tervo T, Kontinen YT. Collagenolytic proteinases in keratoconus. *Cornea.* 2006;25(5):603-10.
79. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Tran A, Carballo M, Saghizadeh M, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(3):823-32.
80. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom.* 2013;96(2):214-8.
81. Lema I, Brea D, Rodriguez-Gonzalez R, Diez-Feijoo E, Sobrino T. Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Mol Vis.* 2010;16:2055-61.
82. Chaerkady R, Shao H, Scott SG, Pandey A, Jun AS, Chakravarti S. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics.* 2013;87:122-31.
83. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42(4):297-319.
84. Sorkhabi R, Ghorbanihaghjo A, Taheri N, Ahoor MH. Tear film inflammatory mediators in patients with keratoconus. *Int Ophthalmol.* 2015;35(4):467-72.
85. Lema I, Duran JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2005;112(4):654-9.
86. Kolozsvari BL, Petrovski G, Gogolak P, Rajnavolgyi E, Toth F, Berta A, et al. Association between mediators in the tear fluid and the severity of keratoconus. *Ophthalmic Res.* 2014;51(1):46-51.
87. Pasztor D, Kolozsvari BL, Csutak A, Berta A, Hassan Z, Kettesy BA, et al. Scheimpflug Imaging Parameters Associated with Tear Mediators and Bronchial Asthma in Keratoconus. *J Ophthalmol.* 2016;2016:9392640.
88. Li H, Lu X, Xiong R, Wang S. High Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Cardiovascular Mortality in Chronic Hemodialysis Patients. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9327136.
89. Chua W, Charles KA, Baracos VE, Clarke SJ. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011;104(8):1288-95.
90. Karaca EE, Ozmen MC, Ekici F, Yuksel E, Turkoglu Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio may predict progression in patients with keratoconus. *Cornea.* 2014;33(11):1168-73.

91. Kolozsvari BL, Berta A, Petrovski G, Mihaltz K, Gogolak P, Rajnavolgyi E, et al. Alterations of tear mediators in patients with keratoconus after corneal crosslinking associate with corneal changes. *PLoS One*. 2013;8(10):e76333.
92. Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(1):62-9.
93. Arnal E, Peris-Martinez C, Menezo JL, Johnsen-Soriano S, Romero FJ. Oxidative stress in keratoconus? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8592-7.
94. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: an inflammatory disorder? *Eye (Lond)*. 2015;29(7):843-59.
95. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye (Lond)*. 2014;28(3):285-9.
96. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(8):1047-55.
97. Olofsson EM, Marklund SL, Pedrosa-Domellof F, Behndig A. Interleukin-1alpha downregulates extracellular-superoxide dismutase in human corneal keratoconus stromal cells. *Mol Vis*. 2007;13:1285-90.
98. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res*. 1999;69(5):475-81.
99. Nelidova D ST. Keratoconus layer by layer - pathology and matrix metalloproteinases. *Advances in Ophthalmology InTech*. 2012;pp 105–18.
100. Wojcik KA, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta Biochim Pol*. 2014;61(1):55-62.
101. Chwa M, Atilano SR, Hertzog D, Zheng H, Langberg J, Kim DW, et al. Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(10):4361-9.
102. Amsler M. Kératocône classique et kératocône fruste; arguments unitaires. *Ophthalmologica*. 1946;111(2-3):96-101.
103. Duncan JK, Belin MW, Borgstrom M. Assessing progression of keratoconus: novel tomographic determinants. *Eye Vis (Lond)*. 2016;3:6.
104. D G. Keratoconus- a clinical update. 2005.
105. Barbara A. Textbook on Keratoconus: New Insights: Jaypee Brothers,Medical Publishers Pvt. Limited; 2011.
106. Cavas-Martinez F, De la Cruz Sanchez E, Nieto Martinez J, Fernandez Canavate FJ, Fernandez-Pacheco DG. Corneal topography in keratoconus: state of the art. *Eye Vis (Lond)*. 2016;3:5.
107. Pinero DP, Nieto JC, Lopez-Miguel A. Characterization of corneal structure in keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(12):2167-83.
108. Alió JL. Keratoconus: Recent Advances in Diagnosis and Treatment: Springer International Publishing; 2016.
109. Rabinowitz YS, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in keratoconus. *Refract Corneal Surg*. 1989;5(6):400-8.
110. Amar Agarwa AA, Soosan Jacob. Dr. Agarwal's Textbook on Corneal Topography (Including Pentacam and Anterior Segment OCT). 2010:1-21.
111. Ucakhan OO, Ozkan M, Kanpolat A. Corneal thickness measurements in normal and keratoconic eyes: Pentacam comprehensive eye scanner versus noncontact specular microscopy and ultrasound pachymetry. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(6):970-7.

112. Tam ES, Rootman DS. Comparison of central corneal thickness measurements by specular microscopy, ultrasound pachymetry, and ultrasound biomicroscopy. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(6):1179-84.
113. Li Y, Shekhar R, Huang D. Corneal pachymetry mapping with high-speed optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2006;113(5):792-9 e2.
114. Khurana RN, Li Y, Tang M, Lai MM, Huang D. High-speed optical coherence tomography of corneal opacities. *Ophthalmology.* 2007;114(7):1278-85.
115. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science.* 1991;254(5035):1178-81.
116. Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea.* 2006;25(9):1057-9.
117. Avitabile T, Marano F, Castiglione F, Reibaldi A. Keratoconus staging with ultrasound biomicroscopy. *Ophthalmologica.* 1998;212 Suppl 1:10-2.
118. Owens H, Watters GA. An evaluation of the keratoconic cornea using computerised corneal mapping and ultrasonic measurements of corneal thickness. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1996;16(2):115-23.
119. Binder PS, Lindstrom RL, Stulting RD, Donnenfeld E, Wu H, McDonnell P, et al. Keratoconus and corneal ectasia after LASIK. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(11):2035-8.
120. B Yavorsky AD. *Handbook of physics.* Moscow: Mir; 1975.
121. Garcia-Porta N, Fernandes P, Queiros A, Salgado-Borges J, Parafita-Mato M, Gonzalez-Meijome JM. Corneal biomechanical properties in different ocular conditions and new measurement techniques. *ISRN Ophthalmol.* 2014;2014:724546.
122. Nash IS, Greene PR, Foster CS. Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res.* 1982;35(5):413-24.
123. Luce DA. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(1):156-62.
124. Chen MC, Lee N, Bourla N, Hamilton DR. Corneal biomechanical measurements before and after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34(11):1886-91.
125. Shah S, Laiquzzaman M, Bhojwani R, Mantry S, Cunliffe I. Assessment of the biomechanical properties of the cornea with the ocular response analyzer in normal and keratoconic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(7):3026-31.
126. Kirwan C, O'Malley D, O'Keefe M. Corneal hysteresis and corneal resistance factor in keratoectasia: findings using the Reichert ocular response analyzer. *Ophthalmologica.* 2008;222(5):334-7.
127. Saad A, Lteif Y, Azan E, Gatinel D. Biomechanical properties of keratoconus suspect eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):2912-6.
128. Kara N, Altinkaynak H, Baz O, Goker Y. Biomechanical evaluation of cornea in topographically normal relatives of patients with keratoconus. *Cornea.* 2013;32(3):262-6.
129. Vellara HR, Patel DV. Biomechanical properties of the keratoconic cornea: a review. *Clin Exp Optom.* 2015;98(1):31-8.
130. Castillo JH HR, Berkowitz E, Tiosano B. Wavefront Analysis for Keratoconus. *Int J Kerat Ect Cor Dis* 2014:76-83.
131. Gordon-Shaag A, Millodot M, Ifrah R, Shneur E. Aberrations and topography in normal, keratoconus-suspect, and keratoconic eyes. *Optom Vis Sci.* 2012;89(4):411-8.

132. Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2007;35(1):71-88.
133. Wygledowska-Promienska D, Rokita-Wala I, Gierek-Ciaciura S, Piatek-Koronowska G. [The alterations in corneal structure at III/IV stage of keratoconus by means of confocal microscopy and ultrasound biomicroscopy before penetrating keratoplasty]. *Klin Oczna*. 1999;101(6):427-32.
134. Efron N, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Hollingsworth J. Confocal microscopy of the normal human cornea. *Cont Lens Anterior Eye*. 2001;24(1):16-24.
135. Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Efron N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci*. 2001;78(10):706-11.
136. Hollingsworth JG, Bonshek RE, Efron N. Correlation of the appearance of the keratoconic cornea in vivo by confocal microscopy and in vitro by light microscopy. *Cornea*. 2005;24(4):397-405.
137. Andreanos KD, Hashemi K, Petrelli M, Droutsas K, Georgalas I, Kymionis GD. Keratoconus Treatment Algorithm. *Ophthalmol Ther*. 2017;6(2):245-62.
138. Katsoulos C, Karageorgiadis L, Vasileiou N, Mousafeiropoulos T, Asimellis G. Customized hydrogel contact lenses for keratoconus incorporating correction for vertical coma aberration. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2009;29(3):321-9.
139. Pilskalns B, Fink BA, Hill RM. Oxygen demands with hybrid contact lenses. *Optom Vis Sci*. 2007;84(4):334-42.
140. Picot C, Gauthier AS, Campolmi N, Delbosc B. [Quality of life in patients wearing scleral lenses]. *J Fr Ophtalmol*. 2015;38(7):615-9.
141. Gomes JA, Tan D, Rapuano CJ, Belin MW, Ambrosio R, Jr., Guell JL, et al. Global consensus on keratoconus and ectatic diseases. *Cornea*. 2015;34(4):359-69.
142. Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(1):149-60.
143. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103.
144. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):620-7.
145. Wollensak G. Corneal collagen crosslinking: new horizons. *Expert Review of Ophthalmology*. 2010;5(2):201-15.
146. 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):13011-22.
147. Vinciguerra P, Albe 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(3):369-78.
148. Hashemi H, Seyedian MA, Miraftab M, Fotouhi A, Asgari S. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet a irradiation for keratoconus: long-term results. *Ophthalmology*. 2013;120(8):1515-20.
149. Sherif AM. Accelerated versus conventional corneal collagen cross-linking in the treatment of mild keratoconus: a comparative study. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:1435-40.
150. Ng AL, Chan TC, Cheng AC. Conventional versus accelerated corneal collagen cross-linking in the treatment of keratoconus. *Clin Exp Ophthalmol*. 2016;44(1):8-14.

151. Alnawaiseh M, Rosentreter A, Bohm MR, Eveslage M, Eter N, Zumbach L. Accelerated (18 mW/cm²) Corneal Collagen Cross-Linking for Progressive Keratoconus. *Cornea*. 2015;34(11):1427-31.
152. Mazzotta C, Traversi C, Paradiso AL, Latronico ME, Rechichi M. Pulsed Light Accelerated Crosslinking versus Continuous Light Accelerated Crosslinking: One-Year Results. *J Ophthalmol*. 2014;2014:604731.
153. Park YM, Kim HY, Lee JS. Comparison of 2 Different Methods of Transepithelial Corneal Collagen Cross-Linking: Analysis of Corneal Histology and Hysteresis. *Cornea*. 2017;36(7):860-5.
154. Kymionis GD, Grentzelos MA, Portaliou DM, Kankariya VP, Randleman JB. Corneal collagen cross-linking (CXL) combined with refractive procedures for the treatment of corneal ectatic disorders: CXL plus. *J Refract Surg*. 2014;30(8):566-76.
155. 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(5):323-31.
156. Hosny M, Nour M, Azzam S, Salem M, El-Mayah E. Simultaneous intratunnel cross-linking with intrastromal corneal ring segment implantation versus simultaneous epithelium-off cross-linking with intrastromal corneal ring segment implantation for keratoconus management. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:147-52.
157. Heikal MA, Abdelshafy M, Soliman TT, Hamed AM. Refractive and visual outcomes after Keraring intrastromal corneal ring segment implantation for keratoconus assisted by femtosecond laser at 6 months follow-up. *Clin Ophthalmol*. 2017;11:81-6.
158. Alio JL, Artola A, Hassanein A, Haroun H, Galal A. One or 2 Intacs segments for the correction of keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31(5):943-53.
159. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology*. 2006;113(9):1633-8.
160. Fung SS, Aiello F, Maurino V. Outcomes of femtosecond laser-assisted mushroom-configuration keratoplasty in advanced keratoconus. *Eye (Lond)*. 2016;30(4):553-61.
161. Shetty R, Ghosh A, Lim RR, Subramani M, Mihir K, Reshma AR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(2):738-50.
162. Milipore E. HCYTOMAG-60K | MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay.
163. Pouliquen Y, Bureau J, Mirshahi M, Mirshahi SS, Assouline M, Lorens G. [Keratoconus and inflammatory processes]. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 1996;262:25-8.
164. Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(9):2441-54.
165. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*. 1996;62(4):325-7.
166. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Are proteinases the reason for keratoconus? *Curr Eye Res*. 2010;35(3):185-91.
167. Moshirfar M, Edmonds JN, Behunin NL, Christiansen SM. Corneal biomechanics in iatrogenic ectasia and keratoconus: A review of the literature. *Oman J Ophthalmol*. 2013;6(1):12-7.

168. Shah S, Laiquzzaman M, Cunliffe I, Mantry S. The use of the Reichert ocular response analyser to establish the relationship between ocular hysteresis, corneal resistance factor and central corneal thickness in normal eyes. *Cont Lens Anterior Eye*. 2006;29(5):257-62.
169. Ucakhan OO, Cetinkor V, Ozkan M, Kanpolat A. Evaluation of Scheimpflug imaging parameters in subclinical keratoconus, keratoconus, and normal eyes. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(6):1116-24.
170. Ambrosio R, Jr., Alonso RS, Luz A, Coca Velarde LG. Corneal-thickness spatial profile and corneal-volume distribution: tomographic indices to detect keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(11):1851-9.

Lucrări elaborate/publicate pe tema tezei de doctorat

1. Catalina Ionescu, Catalina Gabriela Corbu, Cristiana Tanase, et al., “Inflammatory Biomarkers Profile as Microenvironmental Expression in Keratoconus,” *Disease Markers*, vol. 2016, Article ID 1243819, 8 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1243819>.
2. Ionescu Ioana Catalina, Corbu Catalina Gabriela et al. “The importance of corneal biomechanics in assessing first degree family members of keratoconus patients”, *Romanian Journal of Ophthalmology* 2018; 62(2): 149-154; doi:10.22336/rjo.2018.22