

跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联的研究进展

伍腾飞, 彭秀军

作者单位: (100048) 中国北京市, 海军总医院眼科

作者简介: 伍腾飞, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼科学。

通讯作者: 彭秀军, 男, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 眼科学. PXJ1@vip.sina.com

收稿日期: 2012-01-12 修回日期: 2012-04-23

Progress of transepithelial corneal collagen cross-linking by Riboflavin/UVA

Teng-Fei Wu, Xiu-Jun Peng

Department of Ophthalmology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Correspondence to: Xiu-Jun Peng, Department of Ophthalmology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China. PXJ1@vip.sina.com

Received: 2012-01-12 Accepted: 2012-04-23

Abstract

• Corneal collagen cross-linking (CXL) is a new treatment for keratoconus. Based on the topical administration of riboflavin and irradiation with ultraviolet A (UVA) light of 370nm, this procedure can lead to photosensitive reaction and thus to induce cross-linking between and within collagen fibrils in order to increase rigidity and biomechanical stability of the cornea. This new approach has been also shown to be an effective treatment for some kinds of other corneal diseases. However, recently, adverse effects and complications related to epithelial removal have been reported. For this reason, researchers proposed the transepithelial corneal collagen cross-linking. The purpose of this paper is to review the basic principle, procedure, effect of epithelial removal and the laboratory and clinical researches about transepithelial corneal collagen cross-linking with Riboflavin/UVA.

• KEYWORDS: keratoconus; collagen cross-linking; ultraviolet rays; riboflavin

Wu TF, Peng XJ. Progress of transepithelial corneal collagen cross-linking by Riboflavin/UVA. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(6):1081-1084

摘要

角膜胶原交联 (CXL) 是一种用于治疗圆锥角膜的新技术, 其主要特点是利用 370nm 波长的紫外线 A 照射核黄素产生的光敏反应来诱导角膜胶原纤维间的交联, 以此提高角膜硬度, 增强角膜生物力学稳定性。该方法目前已被应用于多种角膜疾病的治疗, 并取得了较理想的临床疗效。但

最近也有文献报道经典交联方法术前去角膜上皮所引起的一些术后不良反应和并发症。针对去角膜上皮引起的术后不良反应和并发症有学者提出了跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联法。本文主要对角膜胶原交联的基本原理、操作方法、去角膜上皮的影响及近年来跨上皮交联方法的研究与应用情况进行综述。

关键词: 圆锥角膜; 胶原交联; 紫外线; 核黄素

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.21

伍腾飞, 彭秀军. 跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联的研究进展. *国际眼科杂志* 2012; 12(6): 1081-1084

0 引言

角膜胶原交联法是 20 世纪末由德国勒斯顿大学的研究小组首先提出的一种治疗进展性圆锥角膜的新方法, 因该方法诱导胶原交联后能提高角膜硬度和生物力学稳定性的特点, 自 21 世纪初期被应用于临床以来, 角膜胶原交联法已被推广到角膜扩张、透明性边缘性角膜变性、感染性角膜炎、大泡性角膜病、角膜溃疡等多种角膜疾病的治疗^[1], 并取得了较理想的临床疗效。但最近也有文献报道了经典方法中去角膜上皮引起的术后不良反应和并发症, 包括: 疼痛、感染、角膜溶解变薄、角膜上皮雾状混浊 (haze) 形成等, 针对去角膜上皮引起的术后不良反应和并发症有学者提出了跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联法。本文主要对角膜胶原交联的基本原理、操作方法、去角膜上皮的影响及近年来跨上皮交联方法的研究与应用情况进行综述。

1 经典角膜胶原交联法的原理及操作方法

1.1 原理 正常人角膜组织中胶原的存在是维持其张力的主要因素, 胶原的比例、分布及其空间结构决定了角膜的生物力学属性。因交联能提高聚合物材料硬度和组织稳定性, 其在聚合物工业和生物工程中有着广泛的应用, 如: 戊二醛交联在心脏瓣膜制备和紫外线诱导的物理交联在牙科填充材料固化中的应用等^[2]。核黄素是人体必需的一种水溶性维生素, 参与机体生物氧化和代谢过程中多种代谢酶的构成; 它无毒, 也被用作食品染料。在胶原交联中核黄素主要起两方面作用: (1) 作为光敏剂, 在紫外光照射下被激发到三线态产生以单线态氧为主的活性氧族 (SOS), 后者与各种分子相互反应, 诱导胶原纤维间氨基 (团) 的交联, 使胶原纤维的机械强度和抵抗角膜扩张的能力大大增加。(2) 核黄素能使角膜组织对紫外线的吸收率能从 32% 提高到 95%, 使其能量在通过角膜时得以衰减^[3,4]。

研究证实紫外线对人眼有潜在的损害作用, 如光热灼伤、光化性角膜炎、“雪盲”这些疾病通常与紫外线 B (波长 290 ~ 320nm) 暴露有关。选择 370nm 紫外线 A 是因为

在核黄素存在时仅有7%紫外光能通过角膜,且在370nm处核黄素有吸收峰,这样,在厚度大于400 μm 的角膜进行胶原交联时可有效降低紫外线对角膜内皮及眼内组织的影响^[2,5]。

1.2 操作方法 经典去上皮角膜胶原交联操作过程包括:在表面麻醉下小心去除术眼角膜中央直径5~9mm区域的上皮组织,用含1g/L核黄素的200g/L右旋糖酐眼药水滴于角膜表面,每3min 1次,持续30min。用裂隙灯钴蓝光照射观察,明确核黄素已进入前房后开始用波长为370 \pm 5nm,辐射度为3mW/cm²的紫外线A照射30min,相当于作用于角膜的总能量为3.4J(总辐射量为5.4J/cm²),紫外线A的光柱直径设为9mm,在照射过程中每5min用核黄素/右旋糖酐液和表面麻醉药冲洗角膜表面1次,以保持角膜表面温度和湿度,防止灼伤。在治疗结束后,用抗生素眼膏涂眼,并佩戴浸泡过3g/L氧氟沙星的接触镜直到角膜上皮愈合^[5-7]。

2 经典胶原交联法去角膜上皮的影响

2.1 增加核黄素在角膜中的弥散 在胶原交联过程中,角膜基质中核黄素必须达到一定的有效浓度($\geq 15\mu\text{g/g}$)才能使交联顺利进行。核黄素被吸收进入角膜与弥散过程的时间长短和角膜表面的核黄素浓度有关,而完整上皮的屏障作用(分子量:376.37g/mol)有屏障作用,减慢了核黄素在角膜中的弥散,使其不能完全渗入到角膜中,术前去上皮这一步骤能够有效地去除角膜上皮对核黄素弥散的屏障作用,加速了其在角膜基质中达到饱和的进程,且去上皮后使核黄素在角膜内弥散分布更为均匀^[5,8,9]。

2.2 术后疼痛和感染性角膜炎 Kymionis等^[10]报道了1例21岁女性患者在交联术后第5d出现角膜虹膜炎,通过对泪液样品的聚合酶链反应分析确诊为疱疹性角膜虹膜炎;Pollhamme等^[11]报道1例患者在交联术后第3d出现眼红、痛,检查发现角膜多处基质浸润和轻度的前房炎症,角膜刮片病原学检查证实为肠杆菌感染,积极治疗后炎症得以控制,但遗留了角膜瘢痕和不可逆性视力减退;Rama等^[12]报道1例32岁圆锥角膜患者在交联术后第5d出现角膜溶解,角膜刮片提示阿米巴感染,最后因继发角膜穿孔进行了角膜移植;Zamora等^[13]报道了1例32岁男性患者在胶原交联术后因佩戴了被污染过的接触镜,第3d出现术眼眼红眼痛,检查见术眼角膜直径约8mm范围的上皮缺损和360°的环形浸润,接触镜残留物培养证实为链球菌和葡萄球菌混合感染;Pérez-Santonja等^[14]报道在1例29岁女性患者交联术后出现了严重的角膜中周部上方的浸润,微生物学检查证实为表皮葡萄球菌感染,术后5mo行裂隙灯检查,术眼角膜中周部上方仍可见残余haze。在这些学者看来经典胶原交联法过程中去除角膜上皮后,形成创面,角膜上皮的屏障作用遭到破坏,可能成为某些细菌感染的诱发因素;并且因为去除上皮后患者需要佩戴角膜接触镜,这可能对微生物产生储积作用,而增加感染的机会。

2.3 Haze形成和角膜变薄 Mazzotta等^[15]报道了2例患者在交联术后2~3mo时出现了角膜上皮下雾状混浊(haze);Haze的形成机制目前尚不清楚,可能与交联后角膜细胞凋亡及再增殖有关^[16]。Herrmann等^[17]报道了1

例41岁男性在交联术后出现弥漫性haze形成和中周部角膜变薄的并发症,用类固醇药物强化治疗后角膜haze逐渐消失。Wollensak等^[18]把34只新西兰白兔分为2组,观察单纯去角膜上皮和去角膜上皮后胶原交联角膜细胞凋亡情况发现,在单纯去角膜上皮组,术后4h在角膜基质前部50 μm 内即有细胞凋亡存在,而交联组在术后24h才发现细胞凋亡。角膜上皮损伤是细胞凋亡的一个重要的诱导因素,而细胞凋亡能引起角膜细胞数目大大减少,这可能是去角膜上皮胶原交联使角膜变薄的重要原因^[19,20]。

2.4 角膜溶解 Eberwein等^[21]报道了1例45岁患者交联术后发生过敏和单纯疱疹病毒感染性角膜炎,随后出现角膜溶解,最终进行了穿透性角膜移植,这可能与去上皮激发潜在单纯疱疹病毒感染和过敏反应有关。

3 跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联

针对去角膜上皮引起的术后不良反应和并发症,有学者提出了跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联法。

3.1 角膜基质环植入联合角膜胶原交联 Chan等^[22]对21例圆锥角膜患者进行角膜基质环植入术,术后随即对其中12例患者的13只患眼进行角膜胶原交联(corneal collagen cross-linking with riboflavin, C3-R),其余9个患者的12只患眼只进行了基质环植入,值得指出的是两组患者术中均未去角膜上皮,术后再检测术眼的柱镜度、视力、角膜曲率及L-U比率(lower-upper ratio),结果提示基质环植入术后进行C3-R的患者在柱镜度数、角膜曲率、L-U比例上的减低程度明显大于只进行了基质环植入的患者($P < 0.05$),这可能是术中基质环周边部位胶原发生变化而引起生物力学耦合的结果,因为他们发现C3-R术中角膜基质环植入部位有核黄素聚集并向基质环周围角膜组织内弥散,这一变化可能增加了该区域的胶原交联效果,最终使角膜基质环植入部位的角膜强度增加和角膜扁平化程度加深。

Ertan等^[23]对17例圆锥角膜患者施行角膜基质环植入术,平均随访3.98mo后,进行角膜胶原交联(C3-R),比较了两种术式后的裸眼视力、最佳矫正视力、角膜曲率K值(K峰值、平均K值),发现在C3-R术后裸眼视力和最佳矫正视力有明显提高,并且C3-R术后平均K值和最佳矫正视力与基质环植入术后相比差异有统计学意义($P < 0.05$),该结果证实基质环植入联合角膜胶原交联治疗圆锥角膜是有效的,并且角膜胶原交联术有加强角膜基质环植入术效果的作用。

3.2 飞秒激光建立角膜基质隧道联合角膜胶原交联

Kanellopoulos^[24]利用飞秒激光在10例早期圆锥角膜患者角膜基质内建立环形隧道,并用导管向隧道内灌注0.1mL 1g/L核黄素溶液,2min后用能量密度7mW/cm²的紫外线A照射15min。该方法无需去角膜上皮,并可避免核黄素在角膜前表面的集聚和对紫外能量的吸收。术后裂隙灯显微镜观察无角膜上皮缺损和基质混浊,1d后患者便恢复了日常活动。平均随访26mo后,患者平均裸眼视力从20/40.5提高到20/32.5,最大平均角膜曲率(K)由48.70D降至47.90D,平均球镜和柱镜度数分别下降0.50D,0.90D,无进展性角膜扩张及角膜内皮细胞计数变

化。该研究表明这种保留角膜上皮、角膜基质内核黄素快速灌注和高能量密度紫外线 A 照射的胶原交联方法是安全有效的。

Dong 等^[25]利用该方法对 10 只新西兰白兔进行了角膜胶原交联,结果角膜厚度在术后 1d 内达到峰值,并在接下来的 1mo 内下降到最小值,到第 3,6mo 时又恢复到较高值,统计显示除在术后第 1mo 时外($P>0.05$),术后角膜厚度明显比术前增厚。另外,术后 1wk 内角膜术区由第 1d 开始的前部变陡迅速恢复,且在接下来的随访时间内术区逐渐变得扁平。在 Scheimpflug 图像中其中 8 只兔的角膜基质内可以见到线样的分界线,微观形态学检查也证实了界限的存在。晶状体的透明度在所有观察时间内没有变化。该研究表明联合飞秒激光的跨上皮胶原交联法是安全的,且较经典方法恢复更快,而基质内的分界线则可作为早期检测角膜交联术后效果的临床标志。

3.3 促渗剂联合核黄素/紫外线跨上皮角膜胶原交联

Wollensak 等^[26]对 14 只金吉拉兔分别施行跨上皮角膜胶原交联(transsepithelial corneal collagen cross-linking, TECXL)和经典去角膜上皮胶原交联,其中跨上皮角膜胶原交联分为滴促渗剂(苯扎氯铵)和不滴促渗剂两组,结果显示 Yong 氏模量的增加在去角膜上皮组(Group1)增加 102.45% 和苯扎氯铵组(Group2)增加 21.30%,差异有统计学意义,而在不滴促渗剂组(Group3)生物力学无变化;组织形态学显示在 Group1 角膜全层都存在细胞和内皮的缺失,而 Group2 在接近 200 μm 内有角膜细胞不均匀的缺失,Group3 未观察到变化。该结果表明促渗剂-跨上皮胶原交联改变角膜生物力学的效果是经典去上皮胶原交联的近 1/5,这可能与核黄素在角膜内弥散程度有关。尽管该方法不推荐作为圆锥角膜的常规治疗方案,但却适合于角膜厚度小于 400 μm 的患者,因促渗剂-跨上皮胶原交联的细胞损伤作用发生在基质前 200 μm ,可以避免经典方法引起的角膜内皮损伤。Filippello 等^[27]对双眼发病的 20 例年龄 12~42 岁,角膜厚度 380~444 μm 的患者双眼对照进行跨上皮角膜胶原交联(transsepithelial corneal collagen cross-linking, TECXL),在该方法中,他们设计了角膜表面硅胶环,以加长核黄素溶液在角膜表面的滞留时间和避免使用开睑器,并以氨基丁三醇和 EDTA 作为核黄素促渗剂。在随访的前 9mo 内术眼角膜地形图逐步得到改善,并且没有出现角膜基质混浊和副作用,比较术前和术后角膜 OCT 检查结果发现,Bowman 氏膜以下的基质增厚了近 100 μm ,至术后 18mo,术眼的裸眼视力、最佳矫正视力、模拟角膜 K 值、角膜顶点屈光力以及高阶像差明显改善与术前相比差异有统计学意义($P<0.05$),而在对照眼以上指标则呈现恶化趋势。该临床结果表明 TECXL 法对延缓圆锥角膜的进展是有效的,且患者依从性好,提示了该方法可能应用于角膜厚度低于 400 μm 及年龄较小患者。Leccisotti 等^[16]对 51 例圆锥角膜患者实施了 TECXL,该方法联合 3g/L 庆大霉素-0.1g/L 苯扎氯铵-0.01g/L 乙二胺四乙酸(EDTA)作为核黄素的渗透促进剂,术后随访 12mo,TECXL 组平均裸眼视力提高 0.036logMAR,对照眼则下降 0.039logMAR($P<0.05$);安全指数在 TECXL 组为 1.05,对照组为 0.96;TECXL 组术

后平均等效球镜下降 0.35D,对照组增加 0.83D($P<0.05$);平均模拟角膜曲率 K 值(mean average simulated keratometry, simK)在 CXL 组下降 0.10D,对照组增加 0.88D($P<0.05$);平均表面方差指数在 TECXL 组上升 0.9,对照组上升 5.3($P<0.05$);平均角膜内皮细胞计数无明显变化。该临床研究表明跨上皮胶原交联法控制圆锥角膜进展的效果虽有限但却是有利的,因其不会有去上皮带来的并发症发生。Kissner 等^[28]将 16 只兔 32 眼分为 4 组,对第 1 组滴不含苯扎氯铵(BAC)核黄素溶液,2,3 组分别滴含 0.2g/L 和 0.4g/L BAC 的核黄素溶液进行跨上皮胶原交联,第 4 组则进行经典的去上皮胶原交联。术后结果,第 2,3,4 组核黄素平均吸收系数分别为 30.2 \pm 8.6, 35.0 \pm 7.9,42.4 \pm 14.1,明显高于 1 组的 8.4 \pm 2.4;平均应力应变值在 2,3,4 组分别为 1460.7 \pm 578.9kPa,1614.6 \pm 545.8kPa,1665.5 \pm 478.3kPa,明显大于 1 组的 739.0 \pm 136.8kPa;平均 Yong 氏模量 2,3,4 组分别为 36.5 \pm 4.5MPa,48.9 \pm 26.2MPa,54.0 \pm 21.8MPa 较 1 组 11.1 \pm 3.2MPa 明显增加;耐酶消化力 2,3,4 组也明显强于 1 组。比较核黄素吸收系数和钢化效果在 2,3,4 组间无明显差异。该研究结果表明 0.2g/L BAC 能使上皮对核黄素产生足够的通透,增加其在角膜基质内弥散,在此基础上的跨上皮交联能增加角膜强度。

4 结语

经典去角膜上皮胶原交联对大多数患者来说是安全的,通过此方法的治疗可以有效控制圆锥角膜的进展及角膜扩张,但随着实验研究的深入和临床应用范围的拓展,该方法存在的一些不足也逐步显露,由于去上皮这一操作破坏了保护角膜深层组织的表层结构,使得其对病原体的抵抗力下降,而增加了感染发生的风险;同时,去上皮还可能激发过敏反应和细胞凋亡,导致角膜溶解变薄及 haze 形成。通过对经典方法的改进,人们发现虽然跨上皮胶原交联所引起的角膜组织变化大多局限在角膜前部的 200 μm 以内,其产生的交联效果可能也只有不到经典方法的 1/5,但各种跨上皮胶原交联法却能有效的避免去上皮引起的术后疼痛和并发症的发生,且通过对疗效和损伤的综合评估,对一些角膜厚度偏薄(角膜厚度<400 μm)的患者,跨上皮胶原交联可能是更适宜的治疗方法^[22,26]。

总之,随着角膜胶原交联方法在临床的开展应用,其为进展性圆锥角膜、角膜扩张等许多角膜疾病的治疗提供了新的有效方案,降低了角膜移植的几率,可能成为治疗此类疾病的重要方法,而跨上皮胶原交联则可能取代经典去角膜上皮胶原交联法应用于一些特殊条件的患者。对于跨上皮胶原交联方法的有效性和适应性仍需进一步实验研究和临床观察。

参考文献

- Xia Y, Tao C, Zhou C, et al. Synergistic effects of ultraviolet A/riboflavin and glucose on corneal collagen cross-linking. *J Refract Surg* 2011;27(3):216-222
- Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17(4):356-360
- Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, et al. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg* 2003;29(9):1786-1790

- 4 Samaras KE, Lake DB. Corneal collagen cross linking (CXL): a review. *Int Ophthalmol Clin* 2010;50(3):89-100
- 5 Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007;26(4):385-389
- 6 Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, et al. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg* 2006;32(5):837-845
- 7 Xia Y, Chai X, Zhou C, et al. Corneal nerve morphology and sensitivity changes after ultraviolet A/riboflavin treatment. *Exp Eye Res* 2011;93(4):541-547
- 8 Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, et al. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(5):893-899
- 9 Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003;29(9):1780-1785
- 10 Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(11):1982-1984
- 11 Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(3):588-589
- 12 Rama P, Di MF, Matuska S, et al. Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(4):788-791
- 13 Zamora KV, Males JJ. Polymicrobial keratitis after a collagen cross-linking procedure with postoperative use of a contact lens: a case report. *Cornea* 2009;28(4):474-476
- 14 Perez-Santonja JJ, Artola A, Javaloy J, et al. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(6):1138-1140
- 15 Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S, et al. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: *in vivo* confocal microscopic evaluation. *Clin Exper Ophthalmol* 2007;35(6):580-582
- 16 Leccisotti A, Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg* 2010;26(12):942-948
- 17 Herrmann CI, Hammer T, Duncker GI. Hazeformation (corneal scarring) after cross-linking therapy in keratoconus. *Ophthalmologe* 2008;105(5):485-487
- 18 Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, et al. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* 2004;23(1):43-49
- 19 Wilson SE, Kim WJ. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(2):220-226
- 20 Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, et al. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(2):276-283
- 21 Eberwein P, Auw-Hadrich C, Birnbaum F, et al. Corneal melting after cross-linking and deep lamellar keratoplasty in a keratoconus patient. *Klin Monbl Augenheilkd* 2008;225(1):96-98
- 22 Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(1):75-80
- 23 Ertan A, Karacal H, Kamburoglu G. Refractive and topographic results of transepithelial cross-linking treatment in eyes with intacs. *Cornea* 2009;28(7):719-723
- 24 Kanellopoulos AJ. Collagen cross-linking in early keratoconus with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket: initial clinical results. *J Refract Surg* 2009;25(11):1034-1037
- 25 Dong Z, Zhou X. Collagen cross-linking with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket in rabbit corneas: 6-month results. *Am J Ophthalmol* 2011;152(1):22-27
- 26 Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(3):540-546
- 27 Filippello M, Stagni E, O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: Bilateral study. *J Cataract Refract Surg* 2012;38(2):283-291
- 28 Kissner A, Spoerl E, Jung R, et al. Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin corneal collagen cross-linking. *Curr Eye Res* 2010;35(8):715-721