

角膜交联疗法治疗真菌性角膜疾病的研究进展

李奇,付玲玲

作者单位:(230000)中国安徽省合肥市,普瑞眼科医院集团合肥普瑞眼科医院

作者简介:李奇,男,住院医师,研究方向:眼表疾病的临床诊断与治疗。

通讯作者:付玲玲,女,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病、白内障、青光眼。full@purui.cn

收稿日期:2017-02-24 修回日期:2017-05-25

Current advance in treatment of fungal keratitis by corneal collagen cross-linking

Qi Li, Ling-Ling Fu

Hefei Bright Eye Hospital, Hefei 230000, Anhui Province, China

Correspondence to: Ling-Ling Fu. Hefei Bright Eye Hospital, Hefei 230000, Anhui Province, China. full@purui.cn

Received:2017-02-24 Accepted:2017-05-25

Abstract

• Corneal collagen cross-linking (CXL) is a photochemotherapy for keratoconus, keratectasias and infectious keratitis. Corneal collagen fiber infiltrated with riboflavin, a photosensitizer which generates reactive oxygen species when activated by UVA at 370nm, was induced to form the crosslinks in corneal stroma. Corneal collagen cross-linking alone or combined with medicine therapy could be used to treat fungal keratitis, improve the cure rates, and reduce the complications and the demands of corneal transplantation surgery. The purpose of this paper is to review the basic principle, procedure, laboratory researches, clinical applications and the safety about this treatment.

• KEYWORDS: fungal keratitis; ultraviolet A; riboflavin; corneal collagen cross-linking

Citation: Li Q, Fu LL. Current advance in treatment of fungal keratitis by corneal collagen cross-linking. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(7):1258-1260

摘要

角膜交联疗法是一种治疗圆锥角膜、角膜扩张及感染性角膜疾病等的光化学疗法。使用370nm波长的紫外线A照射被感光剂核黄素浸润的角膜胶原纤维,诱导角膜胶原纤维发生一系列生物反应。通过阐述这一疗法的基本原理、实验研究、临床应用及相关安全性和副作用问题,提出角膜交联疗法可单独或者联合药物用以治疗真菌性角膜疾病,提高真菌性角膜疾病的治愈率,降低此类疾病并发症及角膜移植手术需求。

关键词: 真菌性角膜疾病; 紫外线; 核黄素; 角膜交联

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.7.14

引用:李奇,付玲玲. 角膜交联疗法治疗真菌性角膜疾病的研究进展. 国际眼科杂志 2017;17(7):1258-1260

0 引言

真菌性角膜疾病是由真菌直接感染角膜引起的致盲性角膜病,是目前我国感染性角膜病主要的致病因素,该疾病主要与农业外伤有关,所以也是发展中国家的主要致盲眼病^[1],目前针对真菌性角膜病治疗的主要问题是抗真菌药物效果不佳时,角膜移植手术的并发症较多,需要在药物治疗和角膜移植手术治疗之间寻求一种新的治疗手段。角膜交联疗法是近年来兴起的一种治疗圆锥角膜、准分子激光术后的角膜扩张及难治性角膜溃疡、角膜炎等角膜疾病的新疗法^[2-4]。它通过紫外线A激发光敏剂核黄素,产生活性氧族,诱导角膜基质内胶原纤维相互交联而提高角膜硬度,增强角膜基质的生物化学和力学稳定性,从而阻止圆锥角膜、角膜扩张、难治性角膜溃疡等角膜疾病的进展。

1 角膜交联疗法的原理与相关实验研究

1.1 角膜交联疗法的治疗原理 光聚合在工业上的应用有较长的历史,可使聚合物变硬,在生物工程中也用于硬化相类似的生物医学假体材料^[2-3]。角膜交联疗法的基本原理是利用370nm的紫外线激发感光剂核黄素,激发核黄素为三重态,并释放高活性氧,这些活性氧族与周围分子相互作用,诱导胶原纤维内部和之间通过共价键形成交联,从而增加胶原纤维对胶原酶的抵抗作用和其自身的应力-应变测试成绩(即生物力学强度)^[5]。以核黄素作为增敏剂,一方面是可以增强紫外线A的吸收率,另一方面也避免眼部更深层次的结构受到紫外线A的影响,而使用370nm的紫外线A则是因为其波长对应核黄素的吸收峰,从而无需使用过高能量的紫外线照射角膜^[6]。

1.2 真菌性角膜疾病的治疗

1.2.1 真菌性角膜疾病治疗现状 真菌性角膜疾病的发生取决于真菌毒力和宿主防御因素之间的相互作用^[1],真菌毒力因素包括黏附力、侵袭力、形态改变、毒素和水解酶等;宿主防御因素包括解剖屏障和免疫防御机制。角膜上皮损伤后,真菌孢子通过黏附进入角膜基质,在毒素和水解酶的作用下向角膜基质内侵袭。而对于真菌性角膜疾病而言,目前抗真菌药物种类较少,抗真菌药物全身使用存在相对较多的副作用。抗真菌药物的局部给药如点眼、球结膜下注射和角膜基质内注射^[7]是有效安全的。但单纯局部药物治疗真菌性角膜疾病普遍存在药物穿透能力较差,对真菌性角膜疾病治愈率相对较低^[8],且2~3mo的治疗周期也相对较长,患者依从性差,用药反复造成真菌耐药,病情更加难以控制。而对于药物治疗效果不佳的真菌性角膜疾病患者,行角膜移植手术存在创伤相对大和

一定的手术并发症,同时我国器官捐献意识没有广泛普及,供体角膜的紧缺也限制了及时角膜移植手术治疗真菌性角膜疾病患者,针对以上治疗现状,我们在保持现有的治疗基础上,可考虑将角膜交联治疗纳入到真菌性角膜疾病的治疗方式中。

1.2.2 角膜交联治疗真菌性角膜疾病的原理 角膜交联治疗真菌性角膜疾病主要原理为:(1)增加角膜对胶原酶的抗性^[9];(2)增强角膜组织生物力学强度,增强解剖屏障^[10];(3)紫外线杀死部分病原微生物^[11]。真菌可以产生水解酶等各种酶类,从而降解人的角膜胶原纤维,导致角膜溶解。Spoerl等^[5]学者在2008年发表对猪眼的对照实验研究结果,研究观察显示:经过紫外线核黄素交联处理的猪角膜对胃蛋白酶、胶原酶及胰蛋白酶的耐受性明显增强,降解时间显著延长。结果提示核黄素紫外线交联明显提高了角膜对酶降解的抵抗能力。Sauer等^[12]的研究团队在2010年发表了他们的临床试验结论,在琼脂平板实验多个治疗组和对照组中,使用紫外线核黄素交联处理过的加有两性霉素B的治疗组的真菌生长受到明显抑制,而其它单独使用1种处理或其它两种方式处理实验组和没有任何处理的对照组真菌生长相比,都没有得到明显的抑制,证明紫外线核黄素交联可以增强两性霉素B的抗真菌效果。Galperin等^[13]学者在兔眼上建立镰刀菌感染的真菌性角膜炎,不使用任何其它治疗,单纯使用紫外线核黄素交联治疗活体兔眼镰刀菌性角膜炎,显示临床症状评分降低以及菌丝和炎症细胞减少。

2 临床应用

自2000年首次报道紫外线核黄素角膜交联疗法在临床上应用于治疗感染性角膜病,并取得一定疗效后^[14],开始陆续有更多使用角膜交联治疗微生物性角膜疾病的病例报道,那么经过角膜交联治疗后的真菌性角膜疾病的发展是否得到控制呢?Tabibian等^[15]对1例真菌性角膜炎患者进行去上皮加速角膜交联疗法后,获得满意疗效。患者为27岁女性,既往有软性角膜接触镜配戴史7a,右眼眼红、眼痛伴流泪1d就诊,角膜刮片培养鉴定系出芽短梗霉菌。在未使用任何抗真菌及抗生素等药物情况下,单独使用去上皮核黄素紫外线角膜加速交联治疗后第1d,患者疼痛症状明显减轻,1wk后角膜感染灶开始逐渐出现正常角膜愈合,1mo后角膜感染灶消失,溃疡基本愈合,症状消失。Iseli等^[16]将角膜交联疗法用于不同病因的难治性角膜炎(真菌和细菌感染)患者,用以验证角膜交联疗法对于难治性角膜炎的疗效,结果发现所有5例患者全部达到临床治愈,并且在门诊随诊的9mo内,未见病情明显发展。国内闫媛媛等^[17]学者将73例感染性角膜疾病(包括真菌感染)患者分成实验组和对照组,对实验组使用角膜交联治疗,对对照组使用常规药物治疗,结果发现实验组的治疗有效率明显高于对照组,两组差异具有统计学意义。国内崔长霞等^[18]对21例真菌性角膜溃疡患者行角膜交联治疗后,继续使用抗真菌药物,取得可观疗效:所有患者经过角膜交联治疗后溃疡面积缩小,炎性信号强度减弱,其中5例1wk内痊愈,11例2wk内痊愈,4例1mo内痊愈,1例治疗无效,未见与交联相关并发症。

通过上述学者的研究表明,角膜交联治疗对于真菌性角膜疾病的预后具有积极的作用,但其做为真菌性角膜疾病的光动力疗法,不能取代抗真菌药物,而是作为抗真菌药物的辅助治疗,在真菌性角膜疾病出现角膜溶解和进展

性角膜溃疡后及时进行角膜交联治疗,可以在早期较好地控制病情。

3 角膜交联治疗真菌性角膜疾病的危险性和副作用

3.1 危险性 尽管有研究表明,在角膜交联治疗中,一方面核黄素的波峰能够对应370nm波长的紫外线A;另一方面,核黄素也能够防止过多紫外线A影响角膜基质层以下的眼部其它结构^[6]。但从长期的随访中,仍然有少量潜在并发症存在:(1)核黄素和紫外线A相关的问题:角膜中核黄素对紫外线A的吸收大大降低了角膜基质层以下的眼内结构的辐射吸收,所有残余紫外线A能量都小于1J/cm²,近似于日常户外活动所接受的日光吸收能量^[19]。(2)去除上皮和创面愈合的问题:包括角膜上皮再生延迟、感染和非感染性角膜基质浸润、角膜雾状混浊和瘢痕^[20]。(3)角膜内皮损伤:与角膜厚度分布异常有关^[6]。

3.2 副作用 目前各地学者都在研究角膜交联疗法在感染性角膜疾病上的应用,但与目的相矛盾的临床报道逐渐被报道;许多报道指出角膜交联治疗圆锥角膜后出现了角膜溶解、感染性角膜炎、诱发单纯疱疹病毒性角膜炎发作和弥漫性层间角膜炎等并发症^[21-25]。角膜交联疗法可使角膜硬度增加,并能显著阻止角膜扩张的发展。但是角膜硬度与生物力学性状的改变对于患者眼压状态有无影响?Romppainen等^[26]将10例角膜去除上皮组织后置于人工前房,使用Goldmann压平眼压计、动态眼压曲线测量计以及TonoPen XL眼压笔,在体外条件下分别测量了角膜交联疗法前后的眼压值,发现角膜交联疗法前3种眼压计测量的眼压值与实际设定眼压值基本相似,无明显变化。角膜交联疗法后,3种眼压计测量值均有小幅度升高,范围约1.8~3.1mmHg,显著低于角膜硬度增加330.0%后眼压升高的理论估计值。虽然眼压值升高有限,但对于角膜交联疗法后的患者就诊时仍应予以足够重视。角膜交联治疗对于术后的角膜组织有无远期的影响呢?Mazzotta等^[27]应用海德曼视网膜断层扫描仪II与共聚焦显微镜技术,对11例接受角膜交联疗法患者进行术前及术后角膜组织显微变化的统计,分别取术前和术后1、3、6mo,1、2、3a共7个时间点进行检查,未见角膜缘组织损伤,术后配戴软性角膜接触镜4d后,角膜上皮即可完全恢复。而上皮下的血管、淋巴、神经等组织完全恢复约需1a时间,术后1a时测量角膜知觉完全恢复正常;术后3a时所有患者角膜组织稳定,胶原纤维排列接近正常。

虽然,相对而言紫外线核黄素角膜交联治疗是一种安全的疗法,但个体的临床反应因人而异,在这种疗法做为常规治疗真菌性角膜疾病的手段开展前,务必有大规模的临床随机试验结果支持。

4 展望

目前认为,角膜交联术作为真菌性角膜疾病的一种新的治疗手段,临床反应可能是角膜耐酶性、真菌菌丝的清除、对抗真菌药物的增效作用的多种因素的协同作用,而对于真菌性角膜疾病而言,目前大多数药物作用因素较单一,而真菌性角膜疾病角膜移植术后失败率较高,因此这种光化学疗法可能会成为真菌性角膜疾病的主要治疗手段之一。

Paik等^[28]使用β硝基醇短链脂肪酸与紫外线对猪角膜及角巩膜缘组织进行交联治疗后发现,体外情况下β硝基醇短链脂肪酸可以同样达到硬化角膜、阻止圆锥角膜

进展的目的,效果优于核黄素。Alejandro 等分别使用玫瑰红和核黄素作为光敏剂使用光化学治疗半知菌瓜类腐皮镰孢菌、烟曲霉、白假丝酵母菌三种真菌菌属感染的角膜炎患者的真菌分离物,玫瑰红介导的光化学治疗成功抑制3种真菌的生长,而其他对照组(包括核黄素处理对照组)的真菌生长未见明显抑制^[29]。以上学者的研究为角膜交联治疗真菌性角膜疾病也提供了新的光敏剂选择。虽然在角膜交联治疗的过程中,光氧化作用主要发生在前部约300 μm 的基质^[30],对于真菌性角膜疾病来说,无法到达深部的角膜溃疡处,但是这种治疗角膜浅基质溃疡的新手段,依然有增加角膜耐酶解性等其它正面作用^[9]。角膜交联介导的生物反应不同于抗微生物药物,可以用以治疗耐药真菌菌属导致的感染性角膜疾病,如果角膜交联治疗的有效性和安全性得到更为广泛的验证,将极大改变真菌性角膜疾病的治疗方式。

总之,角膜交联疗法提高了真菌性角膜疾病的治愈率,降低了此类疾病并发症及角膜移植手术需求,为治疗此类疾病提供了新的方案,有望成为此类疾病治疗的标准方案之一,但其发生机制与安全性尚需进一步实验研究及长期的临床观察。

参考文献

- 1 谢立信. 真菌性角膜炎. 中华眼科杂志 2003;39(10):638-640
- 2 Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998;66(1):97-103
- 3 Spoerl E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg* 1999;15(6):711-713
- 4 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
- 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 Wollensak G, Spoerl E, Reber F, et al. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment *in vitro*. *Eye (Lond)* 2004;18(7):718-722
- 7 Prakash G, Sharma N, Goel M, et al. Evaluation of intrastromal injection of voriconazole as a therapeutic adjunctive for the management of deep recalcitrant fungal keratitis. *Am J Ophthalmol* 2008;146(1):56-59
- 8 O'Day DM, Head WS. Advances in the management of keratomycosis and Acanthamoeba keratitis. *Cornea* 2000;19(5):681-687
- 9 Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004;29(1):35-40
- 10 Wollensak G, Wilsch M, Spoefl E, et al. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004;23(5):503-507
- 11 Martins SA, Combs JC, Noguera G, et al. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) *in vitro* for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(8):3402-3408
- 12 Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, et al. *In vitro* efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(8):3950-3953

- 13 Galperin G, Berra M, Tau J, et al. Treatment of fungal keratitis from Fusarium infection by corneal cross-linking. *Cornea* 2012;31(2):176-180
- 14 Schnitzler E, Spörl E, Seiler T. Irradiation of cornea with ultraviolet light and riboflavin administration as a new treatment for erosive corneal processes, preliminary results in four patients. *Klin Monbl Augenheilkd* 2000;217(3):190-193
- 15 Tabibian D, Richoz O, Riat A, et al. Accelerated photoactivated chromophore for keratitis-corneal collagen cross-linking as a first-line and sole treatment in early-fungal keratitis. *J Refract Surg* 2014;30(12):855-857
- 16 Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, et al. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea* 2008;27(5):590-594
- 17 闫媛媛,刘平,王新,等. 紫外光核黄素诱导角膜交联治疗感染性角膜炎的临床研究. 中华医院感染学杂志 2014;24(24):6198-6199,6202
- 18 崔长霞,朱伟,张春晓,等. 核黄素/UVA 诱导的角膜交联术治疗真菌性角膜溃疡. 山东大学耳鼻喉眼学报 2013;27(5):68-70
- 19 Koller T, Mrochen M, Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(8):1358-1362
- 20 Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonis VF, et al. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(12):2135-2137
- 21 Sharma N, Maharana P, Singh G, et al. Pseudomonas keratitis after collagen crosslinking for keratoconus: case report and review of literature. *J Cataract Refract Surg* 2010;36(3):517-520
- 22 Rama P, Di Matteo F, 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
- 23 Pérez-Santonja JJ, Artola A, Javaloy J, et al. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(6):1138-1140
- 24 Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(3):588-589
- 25 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
- 26 Romppainen T, Bachmann LM, Kaufmann C, et al. Effect of riboflavin-UVA-induced collagen cross-linking on intraocular pressure measurement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(12):5494-5498
- 27 Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy *in vivo*: early and late modifications. *Am J Ophthalmol* 2008;146(4):527-533
- 28 Paik DC, Wen Q, Braunstein RE, et al. Initial studies using aliphatic beta-nitro alcohols for therapeutic corneal cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(3):1098-1105
- 29 Arboleda A, Miller D, Cabot F, et al. Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates. *Am J Ophthalmol* 2014;158(1):64-70
- 30 Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea* 2006;25(9):1057-1059