POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica Tesi di Laurea Magistrale



ANALISI CLINICA SUGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON CROSS-LINKING CORNEALE MEDIATO DA RIBOFLAVINA E RAGGI UV-A PER LA STABILIZZAZIONE DEL CHERATOCONO

Relatore:	Candidato:
Prof. Umberto Lucia	Mattia Giovanni Zoda

Correlatore:

Dott.ssa Mariarosa Astori

Ing. Giulia Grisolia

Anno Accademico 2021/2022



Indice

PREFAZIONE	1
ABBREVIAZIONI	3
CAPITOLO 1	5
ANATOMIA E BIOMECCANICA DELL'APPARATO VISIVO	5
1.1 Il bulbo oculare e la visione	5
1.2 Fisiologia e visione dei colori	11
1.3 Difetti di rifrazione oculare	15
CAPITOLO 2	19
BIOMECCANICA DELLA CORNEA	19
2.1 Anatomia della cornea	19
2.2 Componente cruciale della cornea: il collagene	24
2.3 Funzioni corneali	26
2.4 La cornea e le sue caratteristiche fisiche	26
2.5 La cornea e le sue caratteristiche meccaniche	33
2.6 Patologie corneali	39
2.7 Come diagnosticare una malattia della cornea?	42
CAPITOLO 3	45
CHERATOCONO E CROSS-LINKING CORNEALE	45
3.1 Cheratocono	45
3.2 Principi base del Cross-Linking corneale	53
3.3 Procedure di intervento	56
3.4 Modello matematico alla base del CXL	64
3.5 Modello termico della cornea: equazione di Pennes	65
3.6 Rischi ed effetti collaterali dopo il CXL corneale	66
CAPITOLO 4	69
ANALISI CLINICA E RISULTATI NUMERI	69
4.1 Materiali e metodi	69
4.2 Trattamento	78
4.3 Classificazione sulla base dell'età	78
4.4 Classificazione sulla base dello stadio evolutivo del cheratocono	79

	4.5	Valutazione degli effetti del CXL su base strumentale	81
	4.6	Valutazione degli effetti del CXL su base soggettiva	88
	4.7	Analisi degli effetti del CXL: andamento generale	90
	4.7	Conclusioni analisi	95
	4.8	Dati analisi	97
CAI	PITO	LO 5	101
Q	UEST	IONI IRRISOLTE SUL CXL E SVILUPPI FUTURI	101
	5.1	Il ruolo dell'ossigeno nel CXL corneale	101
	5.2	CXL custom fast	102
	5.3	Conclusione sul CXL	103
APF	PEND	ICE	105
	I.	Tavola riassuntiva delle caratteristiche fisiche del diottro oculare emmetrope	105
	II.	Malattie riportate in associazione al cheratocono	106
	III.	Segni clinici del cheratocono	108
BIB	LIOC	GRAFIA	109

Prefazione

La complessità dell'apparato visivo fa sì che le alterazioni che esso possa subire siano molte e diverse. Esistono disturbi della vista, estremamente comuni, dovuti a cause genetiche, che determinano una inadeguata funzione dell'occhio (i cosiddetti disturbi di rifrazione) che possono essere corretti con l'uso di occhiali o di lenti a contatto.

Esistono tuttavia altri tipi di alterazioni che arrecano deficienze visive notevoli, ma ai quali si pone rimedio, attualmente, con procedimenti chirurgici sempre più efficaci. È questo il caso del cheratocono, patologia di carattere degenerativo della cornea che può danneggiare uno o, in alcuni casi, entrambi gli occhi. Tale patologia comporta una deformazione progressiva della cornea (disco trasparente situato al polo anteriore dell'occhio), che si allunga, assumendo, come indica il nome, una forma conica. Risulta necessario, dunque, un tempestivo intervento al fine di arrestare la progressione della patologia e far fronte ai difetti di rifrazione oculare che essa comporta. Attualmente esistono procedure più conservative che puntano a preservare l'integrità della cornea del paziente ed approcci più invasivi qualora il cheratocono non venisse trattato in tempo - come il trapianto di cornea. Tra gli approcci conservativi si annovera il "Cross-Linking Corneale" (CXL), che per mezzo di una reazione fotodinamica tra la Riboflavina (vitamina B2) e i raggi ultravioletti UV-A (370 nm), è in grado di creare nuove connessioni tra le fibre di collagene e dunque aumentare la rigidità della cornea e renderla meno soggetta al processo di sfiancamento, caratteristico del cheratocono. La reazione fotochimica porta alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che, a loro volta, reagiscono ulteriormente con altre molecole inducendo la formazione di nuovi ponti di reticolazione tra le fibrille di collagene dello stroma corneale.

Le procedure per l'esecuzione del Cross-Linking Corneale sono due: tecnica Epi-off e tecnica Epi-on. La prima prevede l'asportazione dell'epitelio corneale prima dell'installazione della Rf al fine di favorire una sufficiente penetrazione della molecola nello stroma, accelerandone la sua saturazione. Al contrario, nel protocollo Epi-on non si procede all'asportazione dell'epitelio, consentendo un recupero più rapido e ridotto dolore post-operatorio, ma determinando una minor profondità della reazione ossidativa.

Nel presente lavoro si vuole investigare i principi bio-fisici alla base del Cross-Linking corneale, con particolare attenzione alle attuali tecnologie esistenti, agli eventuali problemi aperti relativi al sistema di erogazione ultravioletta e alla comprensione dello sfiancamento corneale. Per una maggiore comprensione del fenomeno, si pone l'attenzione sulle proprietà viscoelastiche della cornea e si analizza come le possibili alterazioni delle sue proprietà biomeccaniche siano associate a patologie corneali, come, appunto, nel caso del cheratocono. Inoltre con la seguente analisi clinica – svolta su 22 pazienti – l'obiettivo è valutare criticamente questo trattamento, esplorare i suoi benefici, evidenziare i limiti in termini di efficacia e sicurezza a lungo termine ed infine identificare nuove aree per la ricerca futura.

Abbreviazioni

- 1. A-CXL: Accelerated Cross-Linking
- 2. AFM: Atomic Force Microscope
- 3. BCVA: Best corrected visual acuity
- 4. BFS: Best Fit Sphere
- 5. CH: Corneal Hysteresis
- 6. CORVIS ST: Corneal Visualization Scheimpflug Technology
- 7. CF-CXL: Custon Fast Corneal Cross-Linking
- 8. CXL: Cross-Linking Corneale
- 9. ECM: Matrice extracellulare
- 10. FDA: Food and Drug Administration
- 11. FEM: Finite Element Method
- 12. IOP: Pressione intraoculare
- 13. KC: Keratoconus
- 14. LASEK: Laser Epithelial Keratomileusis
- 15. LASIK: Laser-assisted in situ Keratomileusis
- 16. ORA: Ocular Response Analyzer
- 17. PRK: Cheratectomia fotorefrattiva
- 18. SMILE: Small Incision Lenticule Extraction
- 19. TE-CXL: Ttransepithelial Cross-Linking
- 20. THKMIN: Minimum Thickness
- 21. PA-CXL: Pulsed-Light Accelerated Cross-Linking
- 22. OCT: Tomografia a coerenza ottica
- 23. VAR: Visual Acuity Rating

Capitolo 1

Anatomia e biomeccanica dell'apparato visivo

L'occhio è un fondamentale mezzo di esplorazione dell'ambiente esterno. La sua particolare organizzazione e le sue connessioni con l'encefalo, lo rendono atto a trasmettere ai centri nervosi un complesso di segnali che ripetono fedelmente le immagini del mondo esterno [1]. Ne deriva, dunque, che la funzione più importante dell'apparato visivo è quella di percepire gli stimoli luminosi proveniente dall'esterno e convertirli in immagini coscienti.

Questo capitolo si pone come obiettivo quello di fornire, in prima battuta, una breve introduzione sull'apparato visivo dal punto di vista anatomico e strutturale, ed in secondo luogo vuole delineare i principali difetti che coinvolgono la vista.

1.1 Il bulbo oculare e la visione

L'apparato visivo è composto da una serie di formazioni che hanno una relazione anatomica e funzionale complessa, ma che nell'insieme si comporta come un'unità. Fondamentalmente esso è composto da: un organo recettore pari, l'occhio o globo o bulbo oculare, che riceve stimoli luminosi dall'esterno e li trasforma in impulsi nervosi; una serie di formazioni nervose che costituiscono le vie ottiche, come il nervo ottico; alcune formazioni annesse che intervengono nella protezione dell'occhio, quali palpebre e apparato lacrimale.

Pertanto l'occhio rappresenta l'organo recettore dell'apparato visivo. Si tratta di un organo pari e simmetrico, situato per la massima parte nella regione anteriore della testa, al di sotto della fronte e ai lati della radice del naso [1]. I bulbi oculari sono accolti all'interno di due cavità simmetriche situate nella parte anteriore del cranio, le orbite oculari. L'apparato visivo, oltre ai bulbi oculari, comprende ulteriori organi accessori dell'occhio, i quali si possono raggruppare in un apparato motore (conferiscono all'occhio motilità) e in un apparato protettore (difendono l'occhio da eventuali agenti dannosi) [2].

Il meccanismo di funzionamento dell'apparato visivo può essere così descritto: l'occhio umano (e degli organismi superiori) raccoglie la luce proveniente dall'ambiente, ne regola l'intensità attraverso un diaframma (l'iride), la focalizza attraverso un sistema regolabile di lenti per formarne un'immagine sulla retina. Tale immagine viene trasformata dall'occhio in una serie di segnali elettrici che, attraverso il nervo ottico, vengono convogliati al cervello per l'elaborazione e l'interpretazione [3].

1.1.1 Anatomia generale dell'occhio

L'occhio è un organo dalla forma sferoidale, alloggiato nella cavità orbitaria, protetto dalle palpebre e da altri annessi oculari [4]. Presenta un diametro medio di circa 24 mm. Presenta un peso che varia tra i 7 e i 7.8 g e un'apprezzabile consistenza dovuta alla pressione intraoculare corrispondente a circa 15 mmHg. Nell'adulto le misure approssimative sono di 24.3 mm in direzione antero-posteriore, 23.6 mm in direzione verticale e 23.5 mm in direzione trasversale [3]. Pertanto, la geometria del globo oculare risulta ancora più complessa in quanto la vera forma del globo ricalca un ellissoide triassiale piuttosto che una sfera (Figura 1.1).

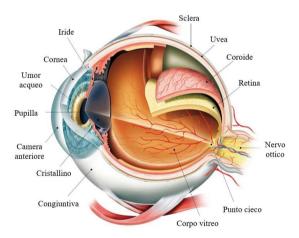


Figura 1.1: L'occhio è l'organo recettore del sistema visivo e ha la funzione di ricevere trasformare gli stimoli luminosi provenienti all'esterno in impulsi nervosi. Il disegno illustra le diverse parti del bulbo oculare.

Schematicamente le diverse strutture oculari si organizzano in due parti, ovvero quelle che costituiscono gli involucri e quelle che rappresentano il contenuto. In ciascun bulbo oculare, infatti, è possibile individuare due cavita: la cavità posteriore, più ampia, definita anche camera vitrea vista la presenza del corpo vitreo; la cavità anteriore, più piccola della precedente, riempita dall'umor acqueo.

L'umor vitreo, ampiamente distribuito nel bulbo oculare, ne costituisce il mezzo diottrico¹ più esteso. Gli involucri si dispongono in un guscio formato da tre strati (o tuniche) concentrici che, dall'esterno verso l'interno, sono (Figura 1.2):

- Tonaca esterna (fibrosa): formata dalla sclera e dalla cornea
- Tonaca media (vascolare) detta anche uvea: formata dalla coroide, dal corpo ciliare e dall'iride.
- Tonaca interna (nervosa): la retina.

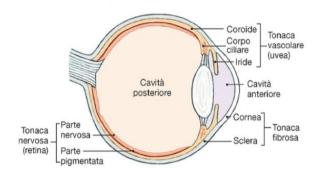


Figura 1.2: Sezione orizzontale del bulbo oculare. L'occhio consta di una parete (formata da tre tonache) e di un contenuto: il cristallino, l'umor acqueo e l'umor vitreo. Questi ultimi insieme alla cornea rappresentano i mezzi di rifrazione attraversati dalla luce e costituiscono l'apparato diottrico dell'occhio.

1.1.2 Tonaca esterna fibrosa

Lo strato più esterno del bulbo oculare (tonaca fibrosa) è composto da sclera e cornea, che insieme formano uno strato robusto e resistente che agisce come un vero scheletro dell'occhio e ne mantiene la forma malgrado le sollecitazioni meccaniche che hanno luogo durante i movimenti oculari. Tale porzione funge da attacco per i muscoli estrinseci del bulbo oculare, quelli cioè che permettono la sua rotazione.

La sclera è la componente presente in maggiore quantità e copre tutta la parte posteriore del globo oculare. È costituita da fibrille di collagene immerse in un tessuto connettivo fibroso e denso, formando in questo modo un vero e proprio "guscio" che stabilizza la forma dell'occhio. È caratteristico il suo colore bianco (motivo per cui viene gergalmente chiamata "bianco dell'occhio") [5].

¹ Diottria: in ottica è l'unità di misura (in m⁻¹) del potere di rifrazione di un sistema ottico o di una semplice lente. Esprime la sua capacità di modificare le direzioni dei raggi paralleli di un fascio di luce entrante nella lente per focalizzarli in modo da formare un'immagine ad una certa distanza dal centro del sistema ottico stesso. Esprime quindi la potenza della lente della quale il paziente ha

La **cornea** è la membrana che ricopre la parte anteriore dell'occhio, attraverso la quale è possibile intravedere l'iride e la pupilla [6]. La caratteristica principale della cornea consiste nella sua trasparenza, indispensabile alla penetrazione dei raggi luminosi all'interno del bulbo oculare. La trasparenza è dovuta alla disposizione parallela delle sue fibre, all'elevato contenuto acquoso (circa il 75%) e all'assenza di vasi sanguigni [7]. Poiché non dispone di irrorazione sanguigna, la sua nutrizione dipende dal liquido lacrimale che la bagna anteriormente, e dall'umore acqueo che viene a contatto con lo strato endoteliale nella faccia posteriore.

1.1.3 Tonaca media vascolare

La tonaca vascolare dell'occhio, o anche detta uvea, è composta da strutture quali l'iride, il corpo ciliare e la coroide.

L'iride è la parte anteriore della tonaca media e ha la forma di un disco, al centro del quale si trova una piccola apertura arrotondata, la pupilla. L'iride, che si intravede attraverso la trasparenza della cornea, contiene numerose fibre muscolari che si organizzano in due muscoli: lo sfintere della pupilla, la cui contrazione provoca un restringimento della pupilla o miosi, e il dilatatore della pupilla, la cui contrazione produce un aumento del diametro della pupilla o midriasi (Figura 1.3).

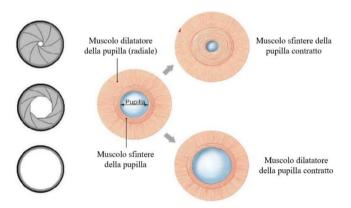


Figura 1.3: Muscoli sfintere e dilatatore della pupilla

Lo strato più interno dell'iride è costituito da uno strato di cellule pigmentate (le quali conferiscono il caratteristico colore degli occhi), che ha la funzione di impedire il passaggio dei raggi luminosi e regolare la quantità di luce entrante nel bulbo oculare. Pertanto la luce può penetrare all'interno dell'occhio soltanto attraverso la pupilla [9].

Il **corpo ciliare** è una formazione situata alla periferia dell'iride ed è collegata alla coroide. È costituita da numerose fibre muscolari che vanno ad organizzarsi tra loro formando il muscolo ciliare, che consente quell'insieme di movimenti necessari per mettere a fuoco

l'immagine osservata (processo accomodativo) [8]. Questo muscolo prosegue con il legamento sospensore o zonula di Zinn, che lo unisce al cristallino e ha la funzione di regolare la curvatura di questa lente. Il cristallino è una lente trasparente che svolge la funzione di focalizzare sulla retina la luce proveniente dagli strati superiori.

La **coroide** è la parte posteriore della tonaca media e rappresenta la parte più estesa. È composta in prevalenza da vasi sanguigni e ha la funzione di nutrire altri costituenti del bulbo oculare che non sono vascolarizzati, in particolare gli elementi nervosi sensoriali della retina. Lo strato più interno della coroide, la membrana di Bruch, è molto sottile e permette la diffusione di sostante nutritive agli strati più esterni della retina, con i quali è collegato.

1.1.4 Tonaca interna nervosa

La tonaca interna dell'occhio, la retina, è la parte essenziale del bulbo oculare. Essa funziona come un fototrasduttore, cioè riceve gli stimoli luminosi proveniente dall'esterno e li trasforma in impulsi nervosi che vengono successivamente trasmessi al cervello attraverso le fibre del nervo ottico [9]. La retina è formata da due strati ben distinti: lo strato pigmentato, strato più esterno, e lo strato nervoso, che è lo strato più interno.

La **retina pigmentata** è costituita, nel suo versante più esterno, da un unico strato di cellule epiteliali contenenti un pigmento di colore scuro. Giustapposto a questo epitelio si trova uno strato formato dai fotorecettori, cioè cellule sensoriali che captano gli stimoli luminosi e li convertono in segnali bioelettrici: i coni e i bastoncelli. I primi sono sensibili agli stimoli ad alta intensità e consentono la visione dei colori, mentre i secondi sono sensibili agli stimoli luminosi a bassa intensità e sono responsabili della visione in bianco e nero. I coni sono più numerosi nella parte centrale e i bastoncelli predominanti nella periferia.

La **retina nervosa** è composta dai restanti strati retinici, posti più in profondità. Questi sono trasparenti, infatti lasciano passare i raggi luminosi in modo da stimolare i fotorecettori della retina pigmentata. Tale parte nervosa della retina è costituita da cellule bipolari, cellule gangliari. I prolungamenti delle cellule gangliari sono le fibre nervoso che vanno a costituire il nervo ottico (Figura 1.4).

La retina pigmentata e la retina nervosa sono separate da uno spazio virtuale, che diventa reale soltanto quando si verifica il distacco della retina. L'unione dei due strati avviene lungo una linea detta *ora serrata*. Sulla superficie interna della retina si distingue una zona, *macula lutea* o macchia gialla, che ha il compito di proteggere i fotorecettori di questa zona da un'entrata massiva di luce nell'occhio. All'interno della macula, si trova una depressione, detta *fovea*. In questa zona non si trovano bastoncelli, ma soltanto coni, che risultano

numerosi e ravvicinati. A causa di questa elevata concentrazione di coni, la macula lutea corrisponde all'area di massima acuità visiva² nella retina e, quindi, la funzione delle altre formazioni oculari ha lo scopo di dirigere verso questa zona i raggi luminosi provenienti dall'esterno [10].

In totale sulla retina si trovano circa 130 milioni di fotorecettori e un milione di fibre ottiche, ciò significa che su una sola cellula gangliare convergono molti fotorecettori [11].

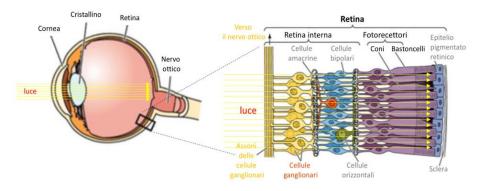


Figura 1.4: La retina, la tonaca più interna dell'occhio, costituisce la parte essenziale del bulbo oculare. Essa è formata da 10 strati ognuno con una funzione. La freccia nella parte sinistra dello schema indica la direzione dei raggi luminosi.

1.1.5 Il contenuto dell'occhio: umor acqueo, umor vitro e cristallino

Le tre tonache, che delimitano esternamente l'occhio, mantengono una conformazione ovoidale grazie al fatto che circondano un contenuto che riempie i bulbi oculari. La caratteristica fondamentale di tutti i componenti del contenuto è la trasparenza; essi, infatti, possono essere attraversati dai raggi luminosi che devono raggiungere la retina.

L'elemento principale della parte interna è il **cristallino**. Si tratta di una lente biconvessa, situata subito dietro l'iride, che consente la messa a fuoco degli oggetti sulla retina variando il suo potere accomodativo³ [12]. A seconda dell'azione del muscolo ciliare, il cristallino può assumere una forma più appiattita o più arrotondata, e può modificare in tal modo la direzione dei raggi luminosi che lo attraversano per metterli a fuoco sulla macula lutea. Quando i muscoli ciliari si contraggono il cristallino si comprime (risulta "spanciato") e si

_

² Acuità visiva: capacità di discriminazione di punti o oggetti vicini tra loro (tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera).

³ Accomodazione: in oftalmologia, è il meccanismo autonomo dell'apparato visivo, attuato attraverso l'aumento della curvatura della superficie anteriore del cristallino tramite il muscolo ciliare, che permette di creare sulla retina immagini a fuoco di oggetti posti a distanza inferiore rispetto al punto remoto o infinito nella visione emmetrope (tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera).

dice che il cristallino sta accomodando. Questo meccanismo si traduce in un aumento dello spessore al centro e di conseguenza in un aumento del potere diottrico di tale lente, che determina una più netta deviazione della luce (Figura 1.5).

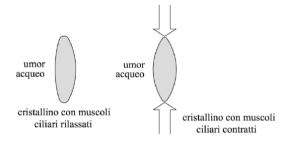


Figura 1.5: Il disegno illustra a sinistra il cristallino rilassato e a destra il cristallino che incurva le sue facce.

Lo spazio tra la cornea e il cristallino (detto camera anteriore) è occupato da un liquido trasparente, l'**umore acqueo**, prodotto dai processi ciliari contenuti nei corpi ciliari. Tale liquido ha il compito di mantenere la tensione interna dell'occhio entro determinati valori. Inoltre fornisce sostanze nutritive e ossigeno alla cornea, all'iridi e al cristallino, e asporta le sostanze di rifiuto.

Lo spazio compreso tra il cristallino e la retina si presenta come una cavità che occupa il 65% del contenuto del bulbo oculare (camera vitrea). Questa cavità contiene circa 4 ml di un liquido viscoso, trasparente, avascolare, sprovvisto di vasi e di nervi, detto appunto **umore vitreo** o corpo vitreo. Si tratta di un materiale molto elastico e ciò è dovuto al fatto che risulta costituito da un involucro di fibre di collagene sostenute da uno strato di molecole di acido ialuronico. Grazie alla sua organizzazione, il corpo vitreo mantiene una forma costante ed è in gran parte responsabile della forma globosa dell'occhio; mentre la sua elasticità permette di ammortizzare le vibrazioni dei bulbi oculari e di proteggere la retina. Molteplici sono le funzioni del vitreo: metabolica e nutrimento; filtraggio e selezione delle molecole che lo attraversano, impedendo la trasmigrazione cellulare al suo interno essendo anelastico ed impermeabile; diottrica essendo perfettamente trasparente; funzione antinfiammatoria in quanto possiede capacità degenerative e proliferative [12].

1.2 Fisiologia e visione dei colori

L'apparato visivo presenta una serie di componenti la cui funzione, in modo del tutto semplificato, può essere approssimata alle parti di una macchina fotografica. La sclera funge da telaio; l'iride è paragonabile al diaframma in quanto regola l'apertura e chiusara della pupilla, consentendo quindi di lasciar penetrare all'interno dell'occhio una maggiore o

minore quantità di raggi luminosi; il cristallino funge da obiettivo poiché è in grado di modificare la direzione dei raggi e consentire, di conseguenza, una messa a fuoco più nitida; il corpo vitreo funziona come una camera oscura e la retina può essere approssimata alla pellicola essendo in grado di registrare gli stimoli luminosi.

1.2.1 Adattamento alla luce e al buio

Il colore non è una proprietà fisica dell'ambiente, ma una proprietà psico-fisica. L'occhio umano, infatti, è in grado di percepire i raggi luminosi aventi lunghezza d'onda compresa tra i 780 e i 360 nm circa; ciò corrisponde allo spettro visibile⁴ della luce (Figura 1.7).

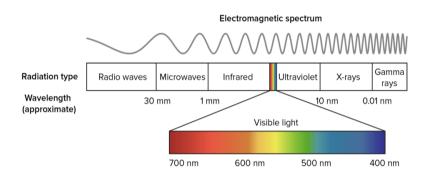


Figura 1.7: Lo spettro elettromagnetico (abbreviato spettro EM) è l'insieme di tutte le possibili frequenze della radiazione elettromagnetica. L'intero spettro è convenzionalmente suddiviso nella parte di spettro visibile, che ne occupa la sezione centrale e costituisce la luce, e in quelle a frequenza minore e maggiore (rispettivamente a lunghezza d'onda maggiore e minore) dello spettro visibile [13].

Se con un prisma si scompone la luce solare si produce una gamma di colori diversa a seconda della lunghezza dei raggi luminosi. In questo modo i raggi con lunghezza d'onda più lunga corrispondono al rosso e quelli con lunghezza d'onda minore corrispondo al viola nello spettro visibile. I raggi luminosi che vanno oltre questi limiti, gli infrarossi e gli ultravioletti, sono invisibili per l'occhio umano.

Quando un qualunque oggetto viene investito da un fascio luminoso, le radiazioni elettromagnetiche che compongono il fascio interagiscono con la materia che costituisce l'oggetto stesso. La luce viene in parte assorbita ed in parte riflessa, cosicché che la vista percepisca i diversi colori. In tal modo, gli oggetti appaiono del colore corrispondente al colore che i raggi luminosi riflettono: di colore bianco quando vengono riflessi tutti e di colore nero se vengono assorbiti tutti. In sostanza, il colore percepito è il complementare di quello assorbito, in quanto la luce che arriva all'occhio manca del colore assorbito [14], [1].

⁴ Lo spettro visibile, in fisica, è quella parte dello spettro elettromagnetico che cade tra il rosso e il violetto includendo tutti i colori percepibili dall'occhio umano che danno vita, dunque, al fenomeno della luce (tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera [77])

I raggi luminosi provenienti dagli oggetti esterni quando raggiungono la retina provocano una stimolazione dei fotorecettori che la compongono: i coni e i bastoncelli, le cui differenze strutturali sono correlate ad importanti caratteristiche funzionali. I fotocettori sono costituiti da fotopigmenti, delle sostanze che cambiano la loro struttura quando assorbono la luce (Figura 1.8) [15].

Di fronte allo stimolo luminoso i pigmenti si degradano, provocando una modificazione metabolica nei recettori corrispondenti, che produce uno stimolo elettrico, in tal modo uno stimolo luminoso diventa impulso nervoso. Lo stimolo viene trasmesso alle cellule bipolari e, attraverso esse, alle cellule gangliari, le cui fibre formano il nervo ottico. Dopo la loro degradazione i pigmenti si rigenerano e possono essere nuovamente stimolati. I fotopigmenti dei coni si rigenerano più rapidamente di quelli dei bastoncelli e quindi possono essere nuovamente stimolati in un tempo minore. I bastoncelli sono quindi molto più sensibili dei coni, avendo un maggior numero di fotopigmenti, ma l'evoluzione temporale della fotorisposta dei coni è circa 10 volte più veloce di quella dei bastoncelli [16].

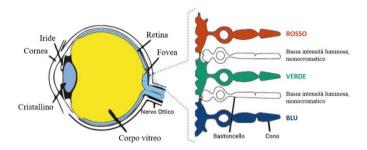


Figura 1.8: Schema della struttura dei coni e bastoncelli. Queste cellule costituiscono i fotorecettori della retina; la loro funzione è quella di trasformare gli stimoli luminosi in impulsi nervosi che vengono trasmessi alle cellule bipolari. L'impulso nervoso è prodotto in seguito alla trasformazione dovuta alla luce in alcuni pigmenti contenuti nei fotorecettori.

Per adattarsi a favorire la visione di fronte a stimoli luminosi molto poco intensi, la pupilla modifica il proprio diametro in modo riflesso. Dunque quando la luminosità è intensa la pupilla si restringe lasciando passare meno luce, che si concentra sulla macula lutea. Nell'oscurità, invece, la pupilla si dilata per lasciare passare un maggior numero di raggi luminosi, che arrivano alla periferia e stimolano i bastoncelli.

1.2.2 Cenni di ottica fisiologica: rifrazione, emmetropia e adattamento

Affinché le immagini si formino è necessario che i raggi luminosi, attraversino la cornea e l'umore acqueo, passino per la pupilla e penetrino il cristallino e l'umore vitreo. Pertanto è fondamentale che tutti gli elementi attraversati dalla radiazione luminosa siano trasparenti. Qualora tale condizione non si manifesti, i raggi luminosi verrebbero arrestati, lungo il loro

tragitto, e non arriverebbero alla retina. Si ricordi, infatti, che è indispensabile che la luce giunga fino alla retina per generare le immagini degli oggetti, processo che prende il nome di **rifrazione oculare**⁵ (o rifrazione ottica). Tuttavia alcune formazioni oculari non sono appositamente trasparenti, proprio per evitare il passaggio della luce (come nel caso della sclera e dell'iride). I raggi luminosi, che giungono sull'occhio, provengono da diverse angolature e lungo il loro percorso si incrociano tra loro costituendo un'immagine invertita sulla retina che il cervello è in grado di interpretare nella sua posizione originaria (Figura 1.9).

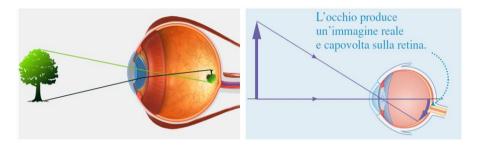


Figura 1.10: Formazione dell'immagine sulla retina: l'occhio produce un'immagine reale e capovolta sulla retina

Tutte le porzioni della retina non sono ugualmente sensibile, ma gli oggetti proiettati sulla macula lutea sono percepiti con maggiore nitidezza (area di massima acuità visiva). È necessario, dunque, che i raggi luminosi siano concentrati in questa zona. Affinché questo avvenga, l'occhio deve agire come un sistema dotato di potere di rifrazione, cioè la proprietà che hanno alcuni elementi trasparenti di deviare i raggi luminosi che incidono su di essi. Pertanto, i mezzi trasparenti del bulbo oculare sono capaci di deviare i raggi luminosi in modo da farli convergere soprattutto sulla macula lutea.

La maggior parte della rifrazione necessaria per produrre un'immagine avviene nella cornea, appena la luce entra nell'occhio. La ragione di ciò è dovuta al fatto che la differenza tra gli indici di rifrazione è maggiore sulle superfici di separazione aria-cornea rispetto a tutte le altre superfici all'interno dell'occhio. Il cristallino interviene solo per un quarto della rifrazione totale prodotta dall'occhio, ciononostante il suo contributo è determinante. Modificando l'aspetto del cristallino, attraverso i muscoli ciliari, varia l'entità della rifrazione prodotta dal cristallino, che, a sua volta, varia la sua lunghezza focale. In particolare, quando osserviamo un oggetto lontano, i muscoli ciliari sono rilassati, facendo sì che il cristallino sia relativamente piatto. In questo modo viene causata una piccola rifrazione

⁵ La rifrazione oculare (a volte detta refrazione come inglesismo), o rifrazione ottica, è il processo di formazione di un'immagine ottica sulla retina, messa a fuoco attraversando le zone più esterne e trasparenti dell'occhio: cornea e cristallino (tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera, 10/01/2021)

e la lunghezza focale è al suo massimo. Quando invece osserviamo un oggetto vicino, il cristallino deve accorciare la sua distanza focale e causare una maggiore rifrazione: perciò i muscoli ciliari si tendono per dare al cristallino una maggiore curvatura. Il processo di cambiamento dell'aspetto del cristallino, e quindi la regolazione della distanza focale, viene detto **accomodamento** [17] (Figura 1.11).

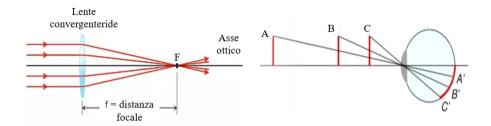


Figura 1.11: le lenti convergenti ricevono i raggi paralleli e li fanno convergere in un punto sull'asse ottico, chiamato fuoco: la distanza tra il fuoco e il centro di una lente è chiamata distanza focale f della lente.

Il funzionamento normale della rifrazione oculare viene chiamato **emmetropia**. Qualsiasi modificazione della capacità di rifrazione delle formazioni oculari, o del diametro anteroposteriore dell'occhio, provoca un difetto di rifrazione o ametropia, come si verifica nella miopia e nell'ipermetropia.

1.3 Difetti di rifrazione oculare

L'occhio umano è un sistema ottico costituito da diversi mezzi diottrici, collocati uno di seguito all'altro, il più potente dei quali è la cornea (circa 41-45 diottrie). Le malattie dall'apparato visivo si manifestano principalmente attraverso sintomi, cioè alterazioni soggettive che corrispondono a disturbi del sistema sensoriale. Esistono diversi esami che vengono condotti abitualmente come: esame dell'acuità visiva; esame del campo visivo; oftalmoscopia; tonometria, ovvero la misurazione della pressione endooculare.

1.3.1 Miopia

La miopia è un difetto della rifrazione oculare che si manifesta con una visione annebbiata degli oggetti situati a distanza dall'occhio, senza che la visione da vicino risulti alterata. Nella maggior parte dei casi la miopia è dovuta al fatto che il diametro antero-posteriore dell'occhio è superiore al normale, per cui i raggi luminosi provenienti dagli oggetti lontani vengono messi a fuoco davanti alla retina (lo strato sensoriale del bulbo oculare), e non possono essere percepiti nitidamente. Il termine miopia deriva dalla parola greca "myopos" che vuol dire "occhio socchiuso": il miope, infatti è conosciuto per l'estrema facilità con cui

strizza gli occhi quando vuol guardare in lontananza. In compenso non ci sono problemi a vedere bene gli oggetti da vicino [18].

Il trattamento della miopia viene effettuato con l'uso di lenti sferiche concave dal potere divergente negativo, che separano i raggi luminosi che le attraversano. Le lenti (collocate davanti agli occhi) separano i raggi luminosi in modo tale che gli elementi di rifrazione dell'occhio, con il loro potere di convergenza, riescano a metterli a fuoco correttamente sulla superficie della retina (Figura 1.12).

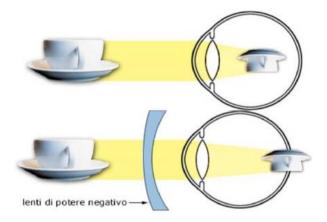


Figura 1.12: In alto si noti come l'immagine si forma prima della retina in un occhio miope; in basso occhio miope corretto con lente concava negativa.

1.3.2 Ipermetropia

L'ipermetropia è un difetto della rifrazione oculare generalmente dovuto al fatto che il diametro antero-posteriore dell'occhio è inferiore alla norma; ciò produce una visione annebbiata soprattutto degli oggetti posti vicino all'occhio. Teoricamente gli ipermetropi dovrebbero vedere male sia da lontano che da vicino, dal momento che l'immagine si focalizza dietro la retina. Il trattamento dell'ipermetropia si basa sull'utilizzo di lenti sferiche convesse positive che fanno convergere i raggi luminosi, in modo tale che l'occhio possa mettere a fuoco adeguatamente le immagini (Figura 1.13).

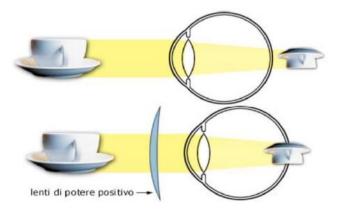


Figura 1.13: In alto si nota come l'immagina in un soggetto ipermetrope si forma dietro la retina; in basso l'occhio ipermetrope è corretto con una lente convessa positiva.

1.3.3 Astigmatismo

L'astigmatismo è un difetto della rifrazione oculare dovuto ad un'alterazione nella curvatura della cornea la quale, poiché non ha la forma emisferica normale, non permette a tutti i raggi luminosi di essere messi a fuoco sullo stesso piano provocando così una visione distorta delle immagini. Generalmente il difetto è congenito ed è causato da un'alterazione genetica ereditaria, ma può anche essere dovuto a deformazioni corneali prodotte da cicatrici in seguito a un trauma o un'infezione della cornea. Il difetto visivo colpisce sia la visione da vicino che quella da lontano. Spesso, però, l'astigmatismo si presenta associato a un altro difetto di rifrazione, quali l'ipermetropia o la miopia, e allora si rende più evidente la difficoltà visiva da vicino o da lontano.

L'astigmatismo può essere corretto con lenti cilindriche, montate sia su occhiali che direttamente a contatto. Se esso è accompagnato da ipermetropia o miopia si devono utilizzare lenti sferocilindriche che correggono entrambi i difetti (Figura 1.14).

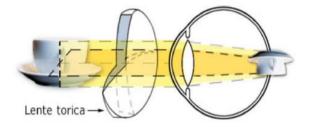


Figura 1.14: Occhio astigmatico corretto con lente sferocilindrica

1.3.4 Presbiopia

La presbiopia è un difetto dalla rifrazione oculare dovuto a una diminuzione progressiva della capacità dell'occhio di mettere a fuoco gli oggetti vicini, e si manifesta con una visione da vicino annebbiata. Il difetto visivo compare in seguito ai cambiamenti che, con il passare degli anni, subisce il cristallino; pertanto, questo disturbo è molto comune. Normalmente la difficoltà di vedere nitidamente da vicino si presenta verso i 40 anni, ma può anche manifestarsi prima e, raramente, più tardi.

Capitolo 2

Biomeccanica della cornea

La cornea è una membrana trasparente convessa collocata nella parte anteriore dell'occhio, attraverso la quale è possibile intravedere l'iride e la pupilla. Le funzioni che essa assolve sono: protezione delle componenti interne dell'occhio e focalizzazione dei raggi luminosi sulla retina con dispersione e degradazione ottica minime.

Questo capitolo si pone come obiettivo quello di evidenziare la *biomeccanica* dei componenti cellulari del più importante elemento refrattivo del nostro sistema oculare, la cornea. Con il termine "biomeccanica" si vuole delineare l'applicazione della meccanica nello studio della fisiologia, al fine di migliorare i processi diagnostici e terapeutici delle patologie. Ad oggi, è disponibile un numero limitato di tecniche diagnostiche per la caratterizzazione delle proprietà biomeccaniche corneali *in vivo*, che verranno successivamente esaminate.

2.1 Anatomia della cornea

La cornea è la porzione anteriore della tonaca fibrosa, di cui ne costituisce circa 1/6. È costituita da tessuto connettivo avascolare e trasparente, e rappresenta la primaria barriera strutturale dell'occhio e la prima "lente" che la radiazione luminosa incontra nel suo percorso verso il cervello. Anteriormente è coperta da un film lacrimale, mentre posteriormente è separata dalla sclera per mezzo di una zona di transizione, il *limbus sclerocorneale*. La cornea, strutturalmente, presenta una forma leggermente ellittica, con diametro orizzontale di circa 11.5-12.0 mm e diametro verticale di circa 10.5-11.0 mm. Lo spessore è, approssimativamente, circa 0.5 mm al centro e tende ad aumentare gradualmente procedendo verso la parte periferica (circa 0.7 mm) [19]. La sua relativa trasparenza, con indice di rifrazione medio di 1.3375, e il raggio di curvatura anteriore centrale di 7.8 mm rende questo tessuto responsabile di tre quarti del potere di rifrazione totale dell'occhio umano [20] (Figura 2.1).

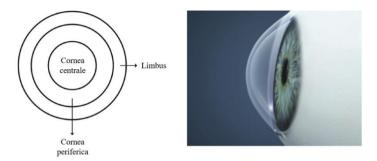


Figura 2.1: La cornea è la lente più esterna del bulbo oculare e la sua trasparenza permette il passaggio delle radiazioni luminose. A sinistra è raffigurata una sezione frontale cornea con in evidenza la sua porzione centrale e periferica.

La caratteristica principale della cornea consiste nella sua trasparenza, indispensabile alla penetrazione dei raggi luminosi all'interno del bulbo oculare. La trasparenza è dovuta alla disposizione parallela delle sue fibre, all'elevato contenuto acquoso (circa il 75%) e all'assenza di vasi sanguigni [2]. Poiché non dispone di irrorazione sanguigna, la sua nutrizione dipende dal liquido lacrimale che la bagna anteriormente, e dall'umore acqueo che viene a contatto con lo strato endoteliale nella faccia posteriore.

La cornea è composta da cinque strati successivi (Figura 2.2), che dall'esterno all'interno sono: uno strato epiteliale; una lamina resistente nota come membrana di Bowman; uno stroma formato da fibre connettivali disposte parallelamente con elevato contenuto acquoso; una lamina sottile ed elastica denominata la membrana di Descemet; un sottile strato endoteliale che separa la cornea dalla camera anteriore dell'occhio.

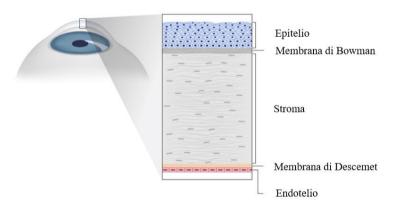


Figura 2.2: Sezione della cornea e rappresentazione dei suoi cinque strati: epitelio; membrana di Bowman; tessuto connettivo; membrana di Descemet; strato endoteliale.

Solo il primo strato (epitelio corneale) ha la capacità di rigenerare il tessuto originario in caso di traumi o processi infiammatori. Tutti gli strati successivi non hanno possibilità di rigenerare e quindi il tessuto originario viene sostituito da una cicatrice che, a seconda del livello di opacità e del punto in cui è collocata rispetto alla pupilla, può interferire nel processo visivo [21].

2.1.1 L'Epitelio

L'epitelio corneale rappresenta la prima barriera verso l'ambiente esterno ed è parte integrante dell'interfaccia film lacrimale-cornea, fondamentale per il potere refrattivo dell'occhio. Si tratta di un epitelio stratificato, squamoso e non cheratinizzato, spesso circa 50-60 µm e formato da 5-6 strati di cellule che hanno una vita brevissima e vengono continuamente sostituite, rigenerando costantemente il tessuto [22]. Nell'epitelio si possono distinguere: un singolo strato di cellule basali, dotate di elevata capacità replicativa; due o tre strati di cellule alari; due strati di cellule squamose di superficie [23]. Tali cellule, dalla forma otticamente perfetta, sono unite tra loro da giunzioni serrate [22].

L'epitelio è coperto da un film lacrimale, che è il principale protettore della superficie corneale contro invasioni microbiche, danni chimici-tossici e corpi estranei. Il film lacrimale fornisce anche fattori immunologici e di crescita che sono fondamentali per la salute, la proliferazione e la riparazione dell'epitelio. Essendo dotato di una eccellente capacità riparativa, l'epitelio raramente forma cicatrici [19].

2.1.2 Lo strato di Bowman

Lo **strato di Bowman** (o membrana limitante anteriore) forma il secondo strato e consiste in una sottile membrana posta sotto l'epitelio corneale, avente spessore variabile tra 8 e 14 μm. Le sue funzioni principali sono: agevolare la cornea a mantenere la sua forma, resistendo a traumi ed infezioni, e partecipare al processo di idratazione dello stroma [19]. In realtà, lo strato di Bowman non è una vera e propria membrana, ma piuttosto un condensato acellulare formato da fibre di collagene (prevalentemente di tipo I e V), senza un'evidente organizzazione, immerse in una matrice di proteoglicani. Non avendo possibilità di rigenerazione, un'abrasione corneale presente al suo livello determina un leucoma⁶, ovvero una cicatrice permanente che può danneggiare il processo visivo [24]. Dunque se danneggiata da un trauma o da una malattia, la sua riparazione con recupero completo, è meno probabile.

2.1.3 Lo stroma

Lo **stroma** corneale è il terzo strato della cornea e costituisce, con uno spessore di circa 500 μm, la componente principale della cornea stessa: rappresenta 1'80-85% dello spessore complessivo della cornea. Lo stroma è un tessuto connettivo che differisce dalle altre

⁶ Leucoma: Opacità biancastra della cornea, che compare, come esito cicatriziale, in caso di lesioni traumatiche o infiammatorie (tratto da Enciclopedia Italiana Treccani).

strutture corneali per la sua trasparenza, determinata da una precisa organizzazione della sua matrice extracellulare (ECM) e delle sue fibre collagene. Tali fibre stromali sono disposte in fasci paralleli, detti *fibrille*, le quali sono imballate in strati disposti parallelamente o in lamelle. Lo stroma dell'occhio umano contiene un numero di lamelle compreso tra i 200 e i 250. Tra le fibre di collagene (in particolare il collagene di tipo I), si trovano cellule specializzate mesenchimali, dette *cheratociti*, le quali formano una sorta di rete a maglie larghe tra uno strato lamellare e il successivo [25]. Questa rete altamente organizzata riduce la dispersione della luce e contribuisce alla trasparenza e alla resistenza meccanica della cornea. Quando questa regolarità viene persa, a causa di un trauma o di una malattia, la cornea diventa opaca e la capacità visiva si riduce permanentemente. Dunque, lo stroma fornisce sia supporto strutturale alla cornea che trasparenza, in quanto agevola il passaggio della luce attraverso la struttura delle fibrille di collagene evitando la dispersione della luce. Infatti, per una corretta funzione stromale nel passaggio della luce, la cornea deve superare lo scattering dei cheratociti, dai quali si apprezza chiaramente la dispersione della luce durante la microscopia confocale in vivo [20].

2.1.4 La membrana di Descemet

La membrana di Descemet (o membrana limitante posteriore) costituisce il quarto strato della cornea. Essa è situata sulla faccia posteriore della cornea, tra stroma ed endotelio, ed è composta da fibrille di collagene non orientate, disposte a raggiata, che formano un reticolato sottile. Presenta uno spessore compreso tra gli 8 e 14 µm (tende ad ispessirsi proporzionalmente all'età) [6]. Allo stesso modo della membrana di Bowman, la membrana di Descemet è acellulare in quanto risulta composta solo da fibre collagene (di tipo IV e di tipo VIII) che forniscono elasticità. Un significativo danno a questa membrana può richiedere un trapianto di cornea [26].

2.1.5 L' endotelio

L'endotelio corneale è il quinto e il più profondo strato della cornea e presenta uno spessore di 5 µm. Esso è composto da un singolo strato di cellule piatte e dalla forma esagonale, con nuclei allungati orizzontalmente [22]. Tali cellule, che nell'insieme viste superiormente appaiono come una sorta di mosaico (Figura 2.3), sono ricche di mitocondri e sono collegate da desmosomi e addensamenti intercellulari (si tratta di cellule ad alta attività metabolica). Le cellule dell'endotelio sono importantissime per il mantenimento della trasparenza corneale e la loro densità non deve scendere al di sotto di determinati valori, poiché ciò comporterebbe gravi rischi per il mantenimento di una giusta acuità visiva.

Procedendo dall'esterno verso l'interno, gli strati che compongono la cornea perdono progressivamente la capacità di rigenerazione; pertanto, l'endotelio è lo strato che presenta capacità riparativa inferiore. Ad esempio, in seguito ad una lesione che comporta perdita cellulare, l'endotelio reagisce dilatando le cellule sopravvissute, in modo che occupino gli spazi lasciati vacanti da quelle morte. Un'altra soluzione alternativa per massimizzare le limitate capacità riparative dell'endotelio è quella di stimolare la migrazione delle sue cellule periferiche, che sono più numerose e dense rispetto a quelle localizzate nell'area centrale. Le cellule periferiche hanno la funzione di servire da "deposito" di cellule per le necessità.

Inoltre essendo a contatto con l'umor acqueo, ovvero il tessuto liquido che riempie la camera anteriore del globo oculare, l'endotelio regola il passaggio di sostanze fra questo e gli strati superiori della cornea [25].

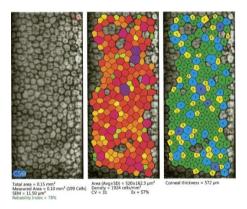


Figura 2.3: Immagine acquisita per mezzo di un esame di microscopia endoteliale, che consente l'osservazione in tempo reale dell'endotelio corneale, avvalendosi del microscopio ottico speculare.

2.1.6 Approvvigionamento sanguigno e nervoso della cornea

Sebbene la cornea umana normale sia avascolare, il rifornimento di sangue è fornito da minuscoli vasi collocati sul bordo più esterno della cornea, nonché da componenti forniti da rami terminali delle arterie facciali e oftalmiche attraverso l'umore acqueo e il film lacrimale. La cornea è uno dei tessuti più innervati e più sensibili del corpo: i nervi corneali derivano dal ramo nasociliare della prima divisione (oftalmica) del nervo trigemino [19]. Nella cornea superficiale, i nervi entrano radialmente nello stroma in tronchi spessi, formando disposizioni plessiformi, che alla fine perforano la membrana di Bowman per fornire un ricco plesso sotto lo strato basale-epiteliale.

2.2 Componente cruciale della cornea: il collagene

Le fibrille di collagene sono il principale componente meccanico della matrice extracellulare della cornea, la cui particolare struttura proteica conferisce circa il 70% del potere refrattivo totale dell'occhio. Il collagene è costituito da amminoacidi legati insieme per formare una tripla elica di fibrilla allungata. La composizione amminoacidica del collagene è atipica rispetto alle altre proteine corporee, soprattutto per l'alto contenuto di idrossiprolina [27]. L'unità strutturale del collagene è rappresentata dal tropocollagene, proteina formata da tre catene polipeptidiche che si associano a formare una tripla elica (Figura 2.4).

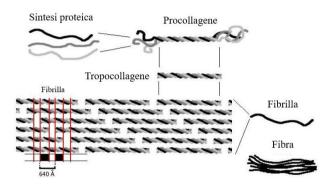


Figura 2.4: Schema riassuntivo della biosintesi del collagene

Esistono numerosissimi tipi di collagene propriamente detto e diverse proteine che hanno struttura polipeptidica largamente assimilabile al collagene [27]; in particolare, tra tutti i tipi di collagene, quelli maggiormente presenti nella cornea dei mammiferi sono il collagene di tipi I e II.

Diverse molecole di collagene fibrillare appena sintetizzate, possono essere associate tra loro e con altre proteine come i proteoglicani, per formare un'entità supra-molecolare con la fibrilla di collagene. Questo mostra come i diversi tipi di collagene possono essere presenti all'interno della stessa fibrilla e come le proporzioni di questi diversi tipi di collagene nella fibrilla sono all'origine delle sue specifiche proprietà biomeccaniche. La rottura di queste proporzioni porta a una disfunzione o a una malformazione del tessuto/organo considerato [28, 13].

Le fibrille sono prevalentemente collagene di tipo I o prevalentemente collagene di tipo II. Anche se le fibrille sono copolimeri di collageni, il collagene di tipo I e quello di tipo II non sembrano assemblarsi nella stessa fibrilla e la base meccanicistica di questa esclusività è sconosciuta [29]. Le fibrille di collagene prevalentemente di tipo I hanno spesso anche quantità minori di collageni di tipo III e V (oltre al collagene di tipo I) e si presentano in tessuti fibrosi, vascolari e calcificati. Le fibrille di collagene prevalentemente di tipo II si

trovano nei tessuti cartilaginei e spesso contengono piccole quantità di collageni di tipo IX e XII, oltre al collagene di tipo II (Figura 2.5).

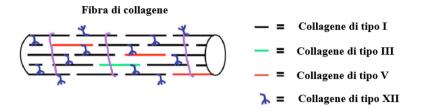


Figura 2.5: Organizzazione schematica di una fibra di collagene nello stroma corneale di un topo (microscopia elettronica a trasmissione).

L'intricata organizzazione e disposizione delle fibrille di collagene giocano un ruolo importante nel determinare il potere diottrico e la trasparenza della cornea, oltre a definire la forma e le proprietà meccaniche del tessuto corneale [28]. Per questo motivo, la struttura delle fibrille di collagene all'interno della cornea è stata studiata attraverso l'utilizzo di diverse tecniche, quali: diffrazione a raggi X, microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione (SEM), microscopia confocale, microscopia a forza atomica (AFM) e microscopia a trasmissione elettronica (TEM) [30]. Tra queste, però quella maggiormente utilizzata è la diffrazione a raggi X, ovvero una tecnica che è in grado di interagire con la materia e di dare informazioni tridimensionali sulla densità elettronica e sui moti termici di ogni atomo costituente solidi cristallini [31].

L'importanza dell'orientamento delle fibre di collagene è stata investigata anche tramite osservazioni al microscopio, in uno studio di Meek et al. [32]. Essi hanno rilevato la presenza di due direzioni preferenziali, in particolare nella metà posteriore della cornea, delle fibrille di collagene, le quali sono disposte ortogonalmente tra di loro lungo i meridiani superiore-inferiore (SI) e nasale-temporale (NT). Inoltre, essi hanno osservato nel *limbus* (dove la cornea e la sclera bianca si fondono) che le fibrille di collagene sono allineate in modo circonferenziale in modo da formare chiaramente un anello di rinforzo, importante per mantenere la forma della cornea [30] [33] (Figura 2.6).

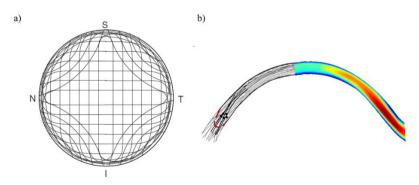


Figura 2.6: Modello semplificato dei principali orientamenti lamellari nella cornea umana basati su dati a raggi X. In a) è rappresentata la faccia anteriore della cornea

2.3 Funzioni corneali

La cornea assolve tre funzioni principali:

- Protezione e sostegno delle strutture oculari da traumi abrasivi e patogeni come virus e batteri;
- Filtrazione di alcune lunghezze d'onda ultraviolette: la cornea permette ai raggi luminosi di passare attraverso il tessuto senza essere assorbiti o riflessi sulla sua superficie;
- Rifrazione della luce: la cornea è responsabile del 65-75% della capacità dell'occhio di far convergere i raggi luminosi provenienti da un oggetto esterno sulla fovea (regione centrale della retina).

L'occhio umano ha un potere di convergenza di circa 60 diottrie, in virtù del quale i raggi luminosi che arrivano parallelamente sulla superficie si proiettano in un punto della superficie della retina, la fovea, situato a 24 mm alla cornea. La cornea, per sua curvatura, agisce come una lente fissa, con un potere refrattivo di circa 43 diottrie: la superficie anteriore (convessa) ha un potere diottrico di +48 diottrie, mentre la faccia interna (concava) ha un potere diottrico di -5 diottrie [22]. Altre caratteristiche fisiologiche della cornea sono la specularità, legata all'integrità epiteliale, e la permeabilità, funzione essenziale per il ricambio idrico e la penetrazione dei farmaci [6].

2.4 La cornea e le sue caratteristiche fisiche

2.4.1 Trasparenza

La trasparenza della cornea è la proprietà fondamentale della cornea. Essa è determinata da aspetti fisici, chimici e biologici e permette ai raggi luminosi di passare attraverso il tessuto senza essere assorbiti o rifratti. La trasparenza comincia ad essere acquisita dalla cornea verso il quarto mese della vita fetale per realizzarsi compiutamente dopo il sesto mese [34]. La perfetta trasparenza della cornea è resa possibile da:

- Avascolarizzazione: nella sua struttura, infatti, sono assenti i vasi sanguigni. Tuttavia la cornea si nutre e si ossigena poiché il film lacrimale rifornisce gli strati superiori, e l'umor acqueo rifornisce gli strati più profondi;
- Disposizione del collagene: le fibre stromali di collagene sono disposte secondo una geometria regolare e complessa che assicura la trasparenza al passaggio dei raggi luminosi. I singoli elementi fibrillari costituenti la cornea hanno spessore così ridotto

- e sono fra loro così distanziati da non interferire sul passaggio delle radiazioni ottiche [34].
- Deturgescenza⁷ corneale: ovvero una serie di meccanismi fisiologici che assicurano il ricambio idrico e ne impediscono l'imbibizione (il normale tasso di idratazione corneale è di circa il 78%) [6]. Quando l'equilibrio idrico della cornea si altera, il rischio è l'accumulo di liquidi (edema corneale), che causa l'opacizzazione del tessuto e la riduzione della capacità visiva [25].

La deturgescenza corneale deriva essenzialmente dall'integrità anatomo-funzionale dell'epitelio e soprattutto dell'endotelio che svolgono una fondamentale funzione di membrane semipermeabili e selettive in grado di regolare la diffusione degli elettroliti ed il flusso di acqua. Oltre a tale ruolo di barriere passiva, questi due strati, specie l'endotelio, sono dotati di una funzione attiva di trasporto, capace di contrastare la normale idrofilia del tessuto corneale. Si tratta di un meccanismo a "pompa ionica" che favorisce l'escrezione di ioni (Na+, Ca++ bicarbonato), l'ipertonia⁸ dei liquidi esterni e conseguentemente la fuoriuscita di acqua [35].

Quando la luce incontra un materiale, può interagire con esso in modi differenti. Essa, infatti, può essere: assorbita o trasmessa, diffusa, ritardata, divisa in due raggi ecc.. Queste interazioni dipendono dalla natura della luce (la sua lunghezza d'onda, frequenza, energia, ecc.) e la natura del materiale. Alcuni materiali, come nel caso della cornea, consentono a gran parte della luce che vi cade sopra di essere trasmessa con poca riflessione; tali materiali sono definiti otticamente *trasparenti* e l'assenza di assorbimento da parte delle loro molecole è responsabile dell'eccellente *trasmissione* ottica. Per cui nella cornea la radiazione ottica viene maggiormente trasmessa, mentre la restante radiazione ottica non trasmessa viene in percentuale minore assorbita, in massima parte riflessa.

La misura quantitativa della trasmissione della luce corneale consiste in due step: 1. il passaggio di un definito fascio di luce attraverso il tessuto; 2. il rilevamento della quantità di luce trasmessa (ovvero quella che non è stata né assorbita e né dispersa). È importante evitare gli effetti di rifrazione e riflessione e questo può essere ottenuto circondando il tessuto con un mezzo avente un indice di rifrazione simile a quello della cornea. È anche importante assicurarsi che la cornea sia mantenuta sotto tensione, poiché di solito è necessario rimuovere la cornea dal globo oculare per effettuare la misurazione della

_

⁷ Deturgescenza: stato di relativa disidratazione necessario per mantenere la trasparenza della cornea dell'occhio (tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera).

⁸ Ipertonia: aumento del tono muscolare, che si traduce nell'aumentata resistenza ai movimenti passivi, nell'incapacità di frazionare l'esecuzione di un movimento, nell'inappropriata attività dei muscoli antagonisti (tratto da l'Enciclopedia Italiana Treccani).

trasmissione. Altrimenti, quando la tensione dovuta alla pressione intraoculare viene rilasciata, sembra che le ondulazioni risultanti delle lamelle portino ad un aumento della dispersione della luce [36].

Le due tecniche più comunemente usate per misurare la trasparenza corneale ex vivo sono sistemi ottici da banco basati sul laser e la spettrofotometria. Uno dei primi tentativi di misurare la trasparenza delle cornee umane isolate è stato fatto da Boettner e Wolter [36], usando la spettrofotometria. Hanno esaminato la trasmissione da 220 nm nella regione dell'ultravioletto (UV), fino a 2800 nm nella regione dell'infrarosso. La trasmissione dei raggi UVB e UVC attraverso la cornea è stata molto ridotta, perché l'epitelio e lo stroma contengono proteine e vitamine specializzate che si pensa assorbano gran parte di queste radiazioni e quindi proteggano la cornea e il contenuto interno dell'occhio. Questo aspetto è essenziale in quanto un eventuale aumento del contenuto di acqua a livello stromale è una delle cause di deterioramento della trasparenza del tessuto. Inoltre Boettner e Wolter trovarono che la trasmittanza corneale aumentava rapidamente tra i 300 e i 380 nm, raggiungendo un massimo in trasmittanza pari l'80%, e tra i 500 nm e 1300 nm raggiungeva più del del 90% in trasmittanza. Due cali di intensità di trasmissione infrarossa sono stati notati a 1430 nm e 1950 nm, che sono causati dall'assorbimento dell'acqua (Figura 2.7).

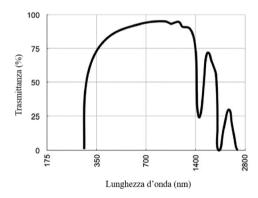


Figura 2.7: Trasmissione attraverso la cornea umana in funzione della lunghezza d'onda.

Anche se Boettner e Wolter hanno dimostrato che pochi UV penetrano nella cornea, alcuni raggiungono lo stroma più profondo, danneggiando potenzialmente le sensibili cellule endoteliali [36]. La trasmissione UV attraverso la cornea diminuisce dal centro alla periferia, e ciò può essere attribuito ad una combinazione di dispersione e assorbimento. In questo contesto è degno di nota il fatto che le cellule endoteliali nei 3 mm centrali della cornea subiscono un maggiore danno ossidativo legato all'età (probabilmente indotto dagli ultravioletti) rispetto alle cellule più esterne.

2.4.2 Potere di rifrazione

Sulla base di quanto detto, l'occhio è un sistema formato da un insieme di lenti convergenti con indici di rifrazione differenti che hanno lo scopo di portare i raggi luminosi a fuoco sulla retina. Ciascuna di queste lenti (o diottri) è costituita da una superficie rifrangente delimitante due "sostanze" o "tessuti" con indici di rifrazione diversi. Un raggio luminoso proveniente dall'esterno attraversa in ordine: aria, film lacrimale, cornea, umor acqueo, cristallino e umor vitreo.

Sulla base di tale concetto, si introduce la legge di rifrazione di Snell secondo la quale un raggio luminoso viene deviato quando passa da un mezzo con indice di rifrazione n_1 ad un altro con indice di rifrazione n_2 . L'angolo di rifrazione θ_2 dipende dall'angolo di incidenza θ_1 e dagli indici di rifrazione n_1 e n_2 dei due mezzi (Figura 2.8).

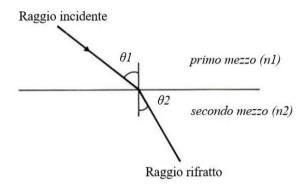


Figura 2.8: Le leggi della rifrazione di Snell ci dicono che la luce subisce una deviazione passando attraverso l'interfaccia tra due materiali a differente indice di rifrazione

mezzi	indice di rifrazione
aria	1,00
film lacrimale	1,336
cornea	1,376
umor acqueo	1,336
cristallino	1,406
umor vitreo	1,336

Tabella 2.1: Indici di rifrazione oculari

Il potere di rifrazione di una lente si esprime in diottrie D, espresse in m-1. Queste rappresentano la capacità di una lente, quale ad esempio la cornea, di piegare la luce, e sono l'inverso della distanza focale. Si utilizzano diottrie positive (+) per le lenti convergenti (convesse), diottrie negative (-) per le lenti divergenti (concave).

Il sistema (o apparato) diottrico dell'uomo ha un potere diottrico di 60 diottrie ed è costituito da: cornea, umor acqueo, cristallino e corpo vitreo.

- 1. La cornea è il primo dei mezzi diottrici che la luce incontra e il suo contributo alla convergenza delle immagini sulla retina è pari al 65-75% del totale [25]. Filtrando alcune lunghezze d'onda dello spettro UV, permette ai raggi luminosi di passare attraverso il tessuto senza essere assorbiti o riflessi sulla sua superficie. Il suo potere di lente è di circa 43 diottrie: la superficie anteriore (convessa) ha un potere diottrico di +48 diottrie, mentre la faccia interna (concava) ha un potere diottrico di -5 diottrie [22].
- 2. Il cristallino che agisce come una lente con la capacità di modificare il proprio potere di rifrazione, in situazione di riposo ha un potere rifrattivo di circa 15 diottrie.
- 3. Le diottrie che mancano per raggiungere le 60 diottrie complessive del globo oculare sono date dall'umore acqueo e dall'umor vitreo.

Applicando la formula derivata dall'equazione dei punti coniugati, è possibile calcolare il potere diottrico a livello dei vari passaggi da un mezzo all'altro, cioè in ogni diottro semplice componente il sistema refrattivo dell'occhio [37]. Nel caso di una superficie sferica, nell'ipotesi di angoli piccoli, il potere rifrattivo è dato dalla seguente equazione:

$$D = \frac{n_2 - n_1}{R}$$

Dove D è la misura del potere diottrico, n_1 è l'indice di rifrazione del primo mezzo, n_2 è l'indice di rifrazione del secondo mezzo ed R è il raggio di curvatura della superficie sferica.

Considerando le caratteristiche geometriche della cornea (Figura 2.9), è possibile calcolare il suo potere diottrico; non tutta la superficie corneale è coinvolta nel meccanismo refrattivo, ma solo la zona centrale di 4 mm (detta zona ottica) con raggio di curvatura medio fisiologico di 7.7 mm [18].

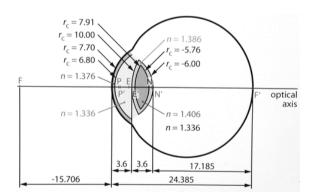


Figura 2.9: parametri geometrici e indici di rifrazione dei diottri trasparenti del bulbo oculare.

Il primo salto di indice lo si riscontra nel passaggio dall'aria alla cornea anteriore.

 $n_1 = 1,000$ Indice di rifrazione dell'aria

 $n_2 = 1,376$ Indice di rifrazione della cornea

 $R = 7.7 \, mm = 0.0077 \, m$ Raggio di curvatura corneale

$$D_1 = \frac{1,375 - 1,000}{0,0077} = 48,831 D$$

Il secondo salto di indice avviene nel passaggio dalla cornea posteriore all'umor acqueo. L'umore acqueo è un liquido con il medesimo indice di rifrazione del film lacrimale.

 $n_1 = 1,376$ Indice di rifrazione della cornea

 $n_2 = 1,336$ Indice di rifrazione dell'umor acqueo

R = 6,8 mm = 0,0068 m Raggio di curvatura posteriore della cornea

$$D_2 = \frac{1,336 - 1,376}{0,0068} = -5,882 D$$

Il potere diottrico della cornea è ottenuto come la somma dei poteri diottrici delle due superfici (interna ed esterna):

$$D_{cornea} = D_1 + D_2 = 48,831 - 5,882 \approx 43 \, m^{-1}$$

Il potere diottrico di una lente risulta essere direttamente proporzionale alla differenza degli indici di rifrazione dei due materiali attraverso i quali passa la radiazione. In particolare, una differenza degli indici maggiore comporta un potere diottrico D maggiore, come nel caso della cornea anteriore in cui la differenza tra gli indici di aria-cornea anteriore è di 0.376; viceversa essendo la differenza tra gli indici cornea posteriore e umore acqueo pari 0.04 (ovvero 9,4 volte più piccola rispetto a quella aria-cornea) si ha un potere diottrico inferiore nella zona posteriore (Figura 2.10).

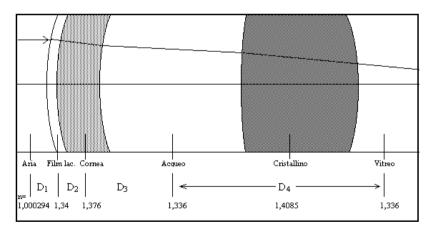


Figura 2.10: È possibile calcolare il potere diottrico a livello dei vari passaggi da un mezzo all'altro, cioè in ogni diottro semplice componente il sistema refrattivo dell'occhio. Per quanto riguarda i parametri dei mezzi diottrici si considereranno i valori dell'occhio esatto di Allvar Gullstrand.

Dai vari valori dei diottri dell'occhio presi in considerazione (cornea 43 D, umor acqueo, cristallino 15 D e umor vitreo) si evince che il potere convergente della cornea è maggiore (43 D) rispetto a tutti gli altri mezzi oculari. Ciò dipende principalmente dal fatto che, il cristallino presenta un indice di rifrazione poco diverso da quello del liquido che lo circonda, mentre la cornea si trova fra due mezzi aventi indici di rifrazione molto diversi [37] [18].

Il bulbo oculare può modificare il suo potere diottrico, mettendo a fuoco anche oggetti posti a varie distanze dall'apice corneale. Questo meccanismo è chiamato accomodazione e consiste in un aumento della curvatura della superficie anteriore del cristallino (a carico della contrazione del muscolo ciliare) che consente di mettere a fuoco sulla retina immagini di oggetti posti a distanza inferiore rispetto al punto remoto o infinito nella visione emmetrope [38]. In un occhio otticamente normale, ad accomodazione rilassata (in condizione cioè di rifrazione statica), i raggi paralleli, provenienti cioè da un punto oggetto posto all'infinito, convergono sulla retina a formare un punto immagine, che in questo caso coincide con il fuoco principale del sistema ottico oculare (Figura 2.11).

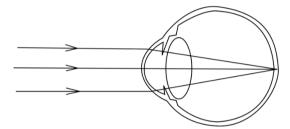


Figura 2.11: Rappresentazione di un occhio emmetrope nella quale si raggiunge la rifrazione ideale di un occhio, che quindi non presenta anomalie di rifrazione (anche dette ametropie).

2.4.3 Permeabilità

Un'altra caratteristica física essenziale della cornea è la sua permeabilità, attraverso la quale si rende possibile la somministrazione locale di farmaci nell'occhio. La maggior parte dei farmaci devono, infatti, penetrare attraverso le barriere dell'occhio – quali cornea, sclera e congiuntiva – al fine di raggiungere i target terapeutici all'interno del globo oculare. I fattori che influenzano il trasporto dei farmaci attraverso i tessuti oculari sono la struttura cornale in primis (che ne determinano la sua permeabilità), ma anche le proprietà del farmaco, come la massa molecolare e il coefficiente di ripartizione.

Da studi clinici è emerso come la cornea risulti permeabile a diverse sostanze ed in particolare consente il passaggio di piccole componenti idrofile [39]. Ciò può essere ulteriormente analizzato sulla base della comprensione dell'anatomia corneale, poiché la cornea contiene tre strati primari, impilati in modo sequenziale dalla superficie esterna a quella interna: epitelio, stroma ed endotelio. L'epitelio contiene 5-7 strati di cellule collegate da giunzioni strette e fornisce una barriera ai composti lipofili di dimensioni maggiori. Lo stroma, invece, è uno spesso tessuto acellulare fibroso (450 μm), composto principalmente da acqua, che non fornisce una barriera lipofila e viene attraversato facilmente da composti polari. Infine, l'endotelio, essendo ricco di lipidi – così come l'epitelio – favorisce l'attraversamento di composti non polari.

La resistenza al trasporto attraverso l'intera cornea può essere pensata come una somma delle resistenze al trasporto attraverso ciascuno dei singoli strati corneali, dove la resistenza al trasporto (R) è l'inverso della permeabilità (P):

$$R_{cornea} = R_{epitelio} + R_{stroma} + R_{endotelio}$$

$$\frac{1}{P_{cornea}} = \frac{1}{P_{epitelio}} + \frac{1}{P_{stroma}} + \frac{1}{P_{endotelio}}$$

L'uso di questo approccio, ovvero somma delle resistenze, permette di determinare quali strati della cornea forniscono barriere limitanti e di confrontare la permeabilità della cornea piena con la permeabilità della cornea in assenza di uno o più dei suoi strati. Per esempio, se la permeabilità della cornea piena risultasse inferiore a quella della cornea disepitelizzata, ciò suggerirebbe che l'epitelio risulti una barriera significativa al trasporto di sostanze. Al contrario, se la permeabilità della cornea piena fosse uguale a quella della cornea disepitelizzata, ciò suggerirebbe che l'epitelio non presenti una barriera significativa al trasporto.

Ne consegue che, l'epitelio è generalmente la barriera che limita il trasporto transcorneale, dipende favorevolmente dalla lipofilia delle molecole ed esclude quasi completamente le macromolecole (r > 10 Å). L'endotelio ed in modo particolare lo stroma possono giocare un ruolo significativo per le piccole molecole sufficientemente lipofile in grado di attraversare facilmente l'epitelio; per le macromolecole, invece, lo stroma può fornire una barriera maggiore dell'endotelio.

2.5 La cornea e le sue caratteristiche meccaniche

I postulati di base della meccanica – la conservazione della massa, della quantità di moto e dell'energia – possono essere applicati anche ai tessuti biologici (in tal caso si parla di biomeccanica⁹) – così come alcuni concetti di base, come ad esempio la sollecitazione, la deformazione e l'elasticità entropica [40]. Negli ultimi anni c'è stato un forte interesse nella caratterizzazione delle proprietà biomeccaniche della cornea nella pratica clinica; tuttavia, esiste ancora un numero limitato di tecniche predisposte a ciò. In ambito clinico, due dispositivi atti a valutare le caratteristiche meccaniche corneali in vivo sono: *Ocular*

_

⁹ La biomeccanica è definita come l'applicazione della meccanica nello studio della fisiologia e fisiopatologia, al fine di migliorare i processi diagnostici e terapeutici delle malattie e delle lesioni [40].Essa studia il comportamento delle strutture biologiche sottoposte a sollecitazioni esterne, statiche o dinamiche.

Response Analyzer (ORA) basato sulla tonometria ad applanazione bidirezionale e CorVis ST basato sulla misurazione della deformazione corneale mediante imaging.

Recenti studi hanno dimostrato che le alterazioni delle proprietà biomeccaniche della cornea sono associate a patologie corneali [28]. Per questo motivo, la comprensione della risposta biomeccanica della cornea ai diversi disordini corneali è di grande importanza clinica. Questo compito, tuttavia, è reso difficile dalla struttura a strati della cornea, dalla sua mancanza di omogeneità e dal suo comportamento non-lineare osservato sperimentalmente.

2.5.1 Viscoelasticità e modulo elastico corneale

La cornea è una struttura che presenta proprietà viscoelastiche. In generale, le proprietà meccaniche di un tessuto biologico dipendono dall'organizzazione strutturale delle fibre, delle cellule e della sostanza intercellulare [41]. Nella cornea umana le lamelle di collagene, l'elastina e i glicosaminoglicani dello stroma corneale sono organizzati in una complessa rete tridimensionale che contribuiscono alla forma corneale e conferiscono caratteristiche principalmente elastiche. Al contrario, la matrice costituita da proteoglicani, cheratociti e fibroblasti ne determinano il comportamento viscoso.

Tutti i fattori che cambiano la struttura della cornea possono influenzare la biomeccanica corneale, la quale è stata soprattutto investigata per mezzo di studi in vitro, misurando tensioni e deformazioni e modulo di Young in cornee sane di maiale.

Il modulo elastico E, noto come modulo di Young, è usato per descrivere la capacità dei diversi materiali di resistere alle deformazioni elastiche [28]. Nei limiti del comportamento elastico, la legge di Hooke ($F = K\Delta$) può essere riformulata introducendo i concetti di deformazione ε e tensione σ . Infatti, la deformazione ε di una struttura elastica è direttamente proporzionale alla tensione σ , secondo la seguente relazione:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

Il modulo di Young *E* fornisce una misura indiretta della durezza del materiale elastico in esame, poiché maggiore è il suo valore, più è alta la resistenza che offre alla deformazione tensile.

La cornea è un materiale anisotropo, con caratteristiche meccaniche differenti in ogni suo punto, le cui proprietà elastiche non rispondono alla legge di Hooke. Il modulo di Young della cornea può essere misurato tramite test di striscia, microscopia a forza atomica (AFM) e metodi ultrasonici (metodi che hanno come presupposto l'omogeneità della struttura corneale). Esso è stato misurato e varia, secondo studi differenti, tra 0,1 e 57 MPa (valori ampi, giustificati in parte dai diversi metodi in vitro utilizzati [41]).

A causa della diversa struttura interna della cornea, ogni strato corneale può contribuire, in misura maggiore o minore, alla resistenza biomeccanica complessiva (Tabella 2).

Layer corneale	Modulo elastico	Metodo di misura
Epitelio		
Membrana basale anteriore	$7.5 \pm 4.2 \text{ kPa}$	AFM
Layer di Bowman	$109.8\pm13.2~kPa$	AFM
Stroma anteriore (AS)	$281 \pm 214 \; kPa$	AFM/ARFEM
Stroma posteriore (PS)	$89.5 \pm 46.1 \text{ kPa}$	AFM/ARFEM
Membrana di Descemet	$2.57 \pm 0.37 \; MPa$	Creep Testing
Endotelio		

Tabella 2.2: Moduli elastici degli strati corneali negli esseri umani utilizzando diversi metodi analitici metodi. AFM=microscopio a forza atomica; ARFEM= microscopio a forza elastica a radiazione acustica.

Nel corso degli anni sono stati compiuti diversi sforzi per comprendere il contributo nella biomeccanica corneale dell'epitelio e dell'endotelio. In generale, si ritiene che essi abbiano un ruolo biomeccanico scarso o nullo, poiché essendo strati puramente cellulari non conferiscono rigidità al tessuto ma contribuiscono indirettamente alla determinazione della resistenza biomeccanica corneale regolandone l'idratazione [42]. Infatti, il livello di idratazione influenza il modulo elastico corneale per mezzo di una proporzionalità inversa poiché all'aumentare dell'idratazione del tessuto corneale, il modulo elastico E diminuisce. Usando la AFM, in studio di un gruppo di ricerca [43], è stato valutato il modulo elastico della membrana basale con valori compresi nel range tra 2 e15 kPa e una media di $7,5 \pm 4,2$ kPa.

La membrana di Bowman è costituita da fibrille di collagene densamente imballate e disposte in modo casuale, che stabilizzano la curvatura corneale. Da dati presenti in letteratura, il valore del modulo elastico dello strato di Bowman in una cornea umana è circa 109.8 ± 13.2 kPa.

È generalmente riconosciuto che lo stroma corneale contribuisce maggiormente al comportamento meccanico complessivo della cornea perché costituisce circa il 90% dello spessore corneale. La quantità relativa di fibre di collagene e di matrice extracellulare (ECM) nello stroma e la loro organizzazione sono strettamente correlate alle proprietà biomeccaniche dello stroma, compresa la forza fisica, la forma e la trasparenza. La ramificazione interlamellare è più estesa nello stroma anteriore che in quello posteriore. Sulla base di questa considerazione strutturale, infatti in uno studio di ricerca condotto da Dias e colleghi, è stata caratterizzata l'elasticità delle regioni stromali anteriori e posteriori della cornea umana usando l'AFM, che ha mostrato come il modulo elastico dello stroma anteriore (281 ± 214 kPa) fosse significativamente superiore a quello dello stroma posteriore (89,5 ± 46,1 kPa). Questa differenza si è verificata perché la cornea anteriore possiede una

struttura di collagene altamente intrecciata rispetto alla relativa omogeneità nello stroma corneale posteriore.

Le prove in vitro effettuate per la caratterizzazione meccanica sono le prove di trazione uniassiale e le prove di pressurizzazione; le prime permettono di studiare le caratteristiche tempo-dipendenti, il comportamento a rottura e l'eventuale anisotropia; mentre le seconde permettono di caratterizzare il comportamento a breve termine del materiale in risposta a variazioni di pressione intraoculare (IOP) [1]. Ma il metodo più efficace per misurare la resistenza biomeccanica è lo stress-strain test, che prevede la preparazione di campioni di tessuto corneale ai quali viene applicato un carico predefinito e ne viene misurata la deformazione.

2.5.2 Isteresi corneale (CH)

La cornea, come tutti i materiali biologici, essendo viscoelastica per natura presenta un comportamento intermedio tra un solido elastico (che genera al suo interno uno sforzo normale σ) e un fluido viscoso (che genera al suo interno uno sforzo tangenziale τ). In Figura 2.12 si noti il diverso tragitto per il ciclo di carico e scarico (loading/unloading) proprio di un materiale viscoelastico, in cui lo spazio tra le due curve è conosciuto come *isteresi H*.

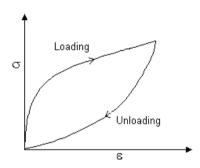


Figura 2.12: Ciclo di carico-scarico per un materiale viscoelastico.

L'isteresi corneale (CH, Corneal Hysteresis) è una misura indiretta della resistenza corneale alla deformazione esternamente indotta – ad esempio tramite un soffio d'aria – così come avviene con il tonometro ORA. ORA misura, nel senso del vettore del flusso d'aria, due valori della IOP, P1 e P2 nei due tempi di passaggio della cupola corneale nella posizione di applanazione media, per cui dall'iniziale convessità di riposo fino alla concavità raggiunta dal profilo corneale nella fase di ritorno. Le due misurazioni sono differenti per valore rilevato: la loro media costituisce il valore di IOP Goldmann-correlato (IOP_G), mentre la loro differenza temporale individua la CH (CH=P1-P2), parametro correlato alle caratteristiche biomeccaniche della cornea in esame (Figura 2.13) [41].

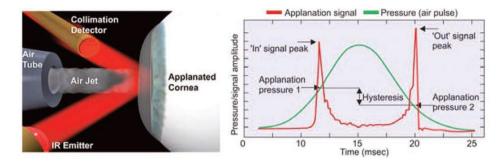


Figura 2.13: Sistema ottico dell'analizzatore (a sinistra) e isteresi corneale (a destra) di ORA.

In diversi studi è stato evidenziato come un valore basso di CH è correlato ad un maggiore rischio di progressione di patologie quali cheratocono e glaucoma, che mostrano una scarsa capacità ad assorbire l'energia (damping). Il valore della CH varia, con la IOP e diminuisce con l'età. Con un'alta CH di partenza il paziente ha un rischio più basso di progressione; al contrario, con una bassa CH il paziente è più a rischio.

2.5.3 Caratterizzazione *in vivo* della biomeccanica corneale

Un approccio classico per ottenere una stima del modulo di elasticità della cornea umana *in vivo* è l'algoritmo definito da Orssengo e Pye [44] che richiede solo la misurazione della pressione intraoculare (IOP) con la tecnica di applanazione di Goldmann e la misurazione dello spessore corneale centrale (CCT). Con questo approccio, la IOP vera e il modulo di elasticità sono determinati dalle seguenti espressioni:

$$IOP_{true} = {^{IOP_G}/_{k_1}}$$

$$E = k_2 \times IOP_{true}$$

dove IOP_G è la pressione intraoculare misurata con il tonometro di Goldmann; E è il modulo di elasticità; k1 e k2 sono fattori di correzione che dipendono dallo spessore corneale, dal raggio corneale anteriore, dal rapporto di Poisson (v = 0,49) e dall'area di cornea applanata.

I lavori di ricerca presenti in letteratura mostrano tutti un comportamento non lineare del tessuto corneale, con un significativo irrigidimento in corrispondenza di valori di pressione elevati. In modo particolare, si è osservato un comportamento lineare per valori di IOP compresi tra 2 e 4 kPa, ma sopra tale valore il modulo di elasticità cresce improvvisamente (Figura 2.14).

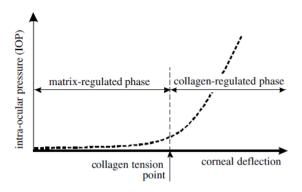


Figura 2.14: Comportamento corneale con una fase iniziale regolata dalla matrice seguita da una fase regolata da collagene di maggiore rigidità.

Questo comportamento strutturale suggerisce che la relazione sforzo-deformazione sia divisa in due fasi distinte: una fase regolata dalla matrice extracellulare (ECM) con bassa rigidità seguita da una fase regolata dal collagene con una rigidità molto più elevata. Nella prima fase, il comportamento è dominato dalla matrice corneale, in particolare nello strato dello stroma. Come risultato, l'innalzamento apicale della cornea aumenta quasi linearmente con la pressione ad una bassa rigidità. Gli strati di fibrille di collagene in questa fase rimangono sciolti e incapaci di contribuire notevolmente alla performance. Successivamente, con l'inizio della seconda fase, ci si aspetta che gli strati di fibrille diventino tesi e, a causa alla loro rigidità molto più elevata, iniziano a influenzare il comportamento biomeccanico complessivo e portano rapidamente ad un aumento della rigidità corneale. Si noti anche che queste due fasi di comportamento sono precedute da una breve fase in cui il campione corneale è inizialmente rilassato e gradualmente viene gonfiato (in virtù di un aumento di pressione) per assumere la sua naturale topografia curva [45].

2.5.4 Modellazione numerica e costitutiva del materiale

Il comportamento non lineare – ricavato da osservazioni sperimentali presenti in letteratura – potrebbe essere studiato per mezzo di un'analisi matematica volta a sviluppare una relazione costitutiva del materiale, che potrebbe essere incorporata nel modello ad elementi finiti. Per semplicità, l'analisi matematica potrebbe assumere che la cornea venga approssimata come una struttura sferica omogenea con uno spessore costante.

La modellazione numerica dei modelli biomeccanici si basa sul metodo degli elementi finiti (FEM, Finite Element Method). Con tale metodo il corpo di cui si vuole studiare la deformazione è suddiviso in un certo numero di elementi di dimensioni finite, interconnessi attraverso nodi, ovvero punti atti a garantire la continuità fisica del corpo. All'interno di questi elementi le equazioni differenziali che governano il problema sono risolte in maniera

approssimata per la ricerca di soluzioni con più variabili [46]. In ambito oculistico, la FEM viene utilizzata per prevedere accuratamente le prestazioni delle cornee suine e per fornire un resoconto dettagliato della loro risposta a varie azioni meccaniche. Numerosi studi hanno tentato questo approccio con vari gradi di successo. Ad esempio, Buzard (1992) e Bryant & McDonnell (1996) hanno sviluppato un modello ad elementi finiti in cui le cornee sono state modellate usando elementi assialsimmetrici bidimensionali. Il loro lavoro ha confermato l'efficacia della modellazione numerica nella biomeccanica corneale, ma non è stato in grado di modellare gli effetti asimmetrici come le malattie o le lesioni. Un modello tridimensionale più dettagliato è stato utilizzato da Pinsky & Datye (1991) (Figura 2.15) per prevedere il cambiamento immediato della topografia corneale dopo la chirurgia refrattiva. Questo modello era basato su un modello di comportamento elastico lineare, nonostante la forte evidenza che conferma il comportamento visco-elastico e non lineare del materiale corneale.

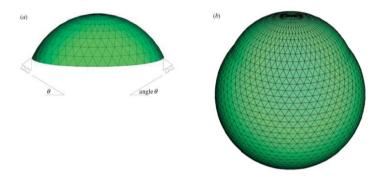


Figura 2.15: Modelli ad elementi finiti (FEM): (a) modello corneale con supporti a rullo di bordo, l'angolo θ compreso tra 35° e 45° che meglio approssima il modello della sola cornea; (b) modello oculare completo.

2.6 Patologie corneali

La cornea può essere sede di diversi processi patologici che ne alterano la forma, lo spessore e la trasparenza. I sintomi che suggeriscono un coinvolgimento corneale comprendono il coinvolgimento unilaterale, il dolore (sensazione di corpo estraneo e malessere) in particolare con l'esposizione alla luce (fotofobia), e la diminuzione dell'acuità visiva [8]. Le patologie corneali possono avere diversa natura ed essere classificate sulla base della loro patogenesi:

• Patologie infiammatorie (cheratiti): possono avere origine batterica (batterio, virus o fungo) o essere una conseguenza della presenza di una patologia sistemica (ad esempio l'artrite reumatoide o altre patologie). In molti casi le cheratiti possono essere causate da fattori ambientali o traumi (scorretto uso di lenti a contatto).

- Patologie ectasiche: si tratta di dilatazioni della cornea e rappresentano un gruppo di patologie congenite, dovute a diversi fattori e caratterizzate dall'alterazione della normale curvatura corneale. Le più frequenti patologie ectasiche corneali sono: cheratocono e cheratoglobo (più raro).
- Patologie degenerative: sono eterogenee e spesso su base ereditaria. Le più frequenti sono il gerontoxon e la cheratopatia a bandelletta.
- **Distrofie corneali:** gruppo eterogeneo di malattie genetiche non infiammatorie che colpiscono la cornea; sono caratterizzate dalla formazione di opacità che causa un deficit visivo variabile (Figura 2.16).

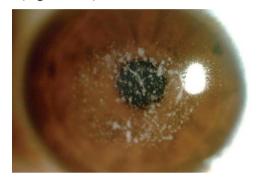


Figura 2.16: Occhio affetto da distrofia corneale

 Malformazioni congenite: sono rare, comprendono la megalocornea e la microcornea quando il diametro corneale è rispettivamente molto superiore o molto inferiore alla media, e la sclerocornea (rara) legata ad un deficit dello sviluppo tissutale.

I disturbi corneali più comuni sono i seguenti:

Cheratocono: malattia degenerative che causa una progressiva distorsione della superficie corneale, che si allunga assumendo, come indica il nome, una forma conica. Generalmente vengono colpiti entrambi gli occhi. L'alterazione produce un difetto di rifrazione oculare; infatti, la deformazione irregolare della cornea fa sì che i raggi luminosi vengano messi a fuoco sulla superficie della retina in modo disuguale, provocando un astigmatismo. Pertanto il cheratocono si manifesta con una distorsione delle immagini (Figura 2.17).



Figura 2.17: Occhio affetto da cheratocono

- Abrasione corneale: lesione superficiale della cornea provocata dal contatto con polvere, sabbia, trucioli di legno, particelle di metallo o altri materiali che possono graffiare o tagliare la cornea. In caso di abrasione corneale, si può avvertire un aumento della lacrimazione, arrossamento congiuntivale, fotofobia, offuscamento visivo e mal di testa.
- O Ulcera corneale: grave lesione della cornea che deriva solitamente da un processo infettivo, traumi meccanici, danno chimico, anomalie palpebrali, gravi reazioni allergiche o carenze nutrizionali. È simile a una ferita aperta ed è caratterizzata dall'interruzione dello strato epiteliale (superficiale), con coinvolgimento dello stroma ed infiammazione sottostante.
- Edema corneale: presenza di un eccesso di contenuto acquoso all'interno della cornea.
- Leucoma: opacizzazione della cornea per il processo di cicatrizzazione conseguente ad alcuni traumi e ad infiammazioni (ad esempio una cheratite). L'epitelio è l'unico strato che ha la capacità di rigenerare il tessuto originario; gli strati successivi non hanno possibilità di rigenerazione e quindi il tessuto originario viene sostituito da una cicatrice che, a seconda del livello di opacità e del punto in cui è collocata rispetto alla pupilla, può interferire nel processo visivo.
- Neovascolarizzazione corneale: invasione vascolare della cornea a causa dell'eccessiva crescita dei vasi sanguigni a partire dal limbus (zona tra stroma e sclera-congiuntiva). La crescita dei vasi sanguigni all'interno del tessuto corneale può condurre all'opacizzazione ed alla riduzione della capacità visiva.

2.7 Come diagnosticare una malattia della cornea?

Nel corso della visita oculistica, lo specialista valuta le condizioni della cornea e studia eventuali lesioni grazie all'utilizzo di metodiche diagnostiche specifiche.

2.7.1 Pachimetria

La pachimetria è un esame che consente di misurare lo spessore della cornea, attraverso il quale è possibile definire l'affidabilità della misurazione della pressione oculare. L'esame viene effettuato anche per diagnosticare alcune patologie corneali – quali cheratocono, edema corneale e glaucoma – e permette di valutare correttamente l'ipertono oculare. Quest'esame viene impiegato anche nei pazienti che devono sottoporsi ad un intervento di chirurgia corneale (come il cross-linking), correzione refrattiva o trapianto.

Il paziente fissa una sorgente luminosa in modo continuo per pochi secondi, durante i quali lo strumento esegue una serie di scansioni della cornea. Un computer dedicato esegue le analisi morfologiche e morfometriche, estrae il valore pachimetrico rilevato in svariati punti della superficie corneale e il valore di spessore corneale minimo rilevato.

Il valore numerico che si ottiene per mezzo della pachimetria è espresso in micrometri (µm). Al centro della cornea, lo spessore è di circa 520-540 µm; tuttavia, sono considerati normali anche valori compresi tra 460 e 620 µm (anche se tale riscontro risulta più raro). Le persone che presentano una cornea più sottile sono maggiormente predisposte a sviluppare alcune malattie, tra cui cheratocono, cheratite, edema ed ulcera corneale. Le persone con una cornea spessa, invece, sarebbero più protette da questo rischio.

La pachimetria fornisce delle mappe, dette *mappe pachimetriche*, che evidenziano lo spessore della cornea in ogni sua area e permettono, dunque, di individuare la localizzazione ed il valore del punto più sottile [47].

2.7.2 Tomografia corneale

La tomografia corneale è un esame che analizza la forma e alcune caratteristiche ottiche della cornea, misurando curvatura, forma e dimensioni di tutte le strutture della parte anteriore dell'occhio (la parte visibile dell'occhio). In particolare, serve a misurare curvatura ed elevazione della superficie anteriore e posteriore della cornea, spessore della cornea, profondità della camera anteriore (lo spazio compreso tra cornea e iride) e angolo iridocorneale (la struttura che drena i liquidi nell'occhio).

Permette di diagnosticare precocemente forme di ectasia corneale e di cheratocono sospetto o scarsamente evoluto. Il confronto dei dati raccolti in più esami successivi consente di studiare l'evoluzione delle patologie.

Durante la tomografia corneale il paziente, seduto su uno sgabello con fronte e mento appoggiati ad apposite strutture, deve fissare per pochi secondi una sorgente luminosa. Nel frattempo una telecamera esegue una serie di scansioni luminose della cornea e un computer elabora le informazioni ricevute in base al tipo di patologia in esame o di diagnostica necessaria a ogni paziente. La tomografia corneale è un esame non invasivo e privo di rischi. È adatta a pazienti di qualsiasi età, anche ai bambini, purché siano in grado di collaborare. È indicata in tutti i pazienti affetti da patologie corneali e prima di alcuni interventi [48].

2.7.3 Topografia corneale

La topografia corneale è l'esame diagnostico non invasivo con cui si ottiene la mappa topografica della cornea. Più nel dettaglio, l'esecuzione della topografia corneale permette lo studio della forma e delle caratteristiche della cornea (ad esempio la sua curvatura), consentendo in questo modo l'individuazione di eventuali difetti o patologie che interessano questa regione dell'occhio. Esso è dotato di un proiettore di un'immagine luminosa costituito da una serie di cerchi concentrici (disco di Placido) e di una componente che rileva ed acquisisce il riflesso sulla cornea dei cerchi luminosi proiettati scattando delle fotografie. Le immagini così raccolte vengono poi inviate al computer dotato di apposito software di elaborazione. Dopodiché, quest'ultimo genererà la mappa topografica della cornea riproducendola sul monitor dello strumento (Figura 2.18).



Figura 2.18: Esame di topografia corneale

I moderni topografi - oltre a determinare la curvatura della cornea - riescono perfino a determinarne il potere rifrattivo.

2.7.4 Conta endoteliale

La conta endoteliale è l'esame con cui si analizza lo strato di cellule più profondo della cornea (endotelio corneale), indispensabile per la salute e per la trasparenza della cornea stessa. Con la conta endoteliale si misura il grado di salute delle cellule dell'endotelio corneale con una duplice finalità: per predisporre azioni protettive in vista di interventi chirurgici e, dal punto di vista della prevenzione, per contrastare le patologie che potrebbero interessare la cornea. Con questo esame, in particolare, si misura la vitalità, la forma, la densità, le dimensioni e la variabilità di queste cellule. Il paziente deve fissare per alcuni secondi una sorgente luminosa mentre una telecamera computerizzata scatta una serie di fotografie della cornea.

2.7 5 Microscopia confocale

Il microscopio confocale è un microscopio ottico, uno strumento scientifico che si basa su una tecnologia volta ad accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato. È una tecnica ottica che consente di esaminare singolarmente tutti gli strati corneali anche in presenza di opacità, quando le altre metodiche disponibili non sono indicate. Consente di osservare: architettura del tessuto, densità delle cellule, eventuale presenza di parassiti, infiammazioni, infezioni e cicatrici.

Capitolo 3

Cheratocono e Cross-Linking corneale

Il cheratocono (KC) è l'ectasia primaria più comune, i cui segni e sintomi oculari variano a seconda della gravità della malattia. Esso comporta un assottigliamento corneale e si manifesta con una perdita di acuità visiva (visus). Le forme precoci normalmente passano inosservate, a meno che non venga eseguita una topografia corneale. Nei paesi occidentali il cheratocono è la prima causa di trapianto di cornea. Tuttavia il trapianto – essendo più invasivo – viene al giorno d'oggi sempre più spesso evitato, prediligendo invece un trattamento parachirurgico "a bassa invasività" noto come Cross-Linking corneale (CXL). Il CXL consiste in una proceduta atta ad aumentare la resistenza biomeccanica della cornea inducendo la formazione di nuovi legami molecolari tra le fibrille e le lamelle di collagene corneale tramite la combinazione di riboflavina e radiazione UV-A. Studi sperimentali hanno riportato come la rigidità corneale sia aumentata significativamente dopo il CXL.

Il suddetto capitolo fornisce in prima battuta una revisione sull'epidemiologia, istopatologia ed eziologia del cheratocono, e in secondo luogo si concentra sull'infrastruttura del CXL nel delineare un trattamento ottimale per fermare la progressione del cheratocono. La biomeccanica della cornea è una chiave di volta in questa infrastruttura, e viene discussa in termini di future applicazioni in vitro e in vivo per osservare i cambiamenti di forma della cornea nel KC in modo diagnostico e computazionale.

3.1 Cheratocono

Il termine cheratocono deriva dalle parole greche "keratos" (cornea) e "konos" (cono). Si tratta infatti di una patologia ectasica – ovvero congenita, prevalentemente a trasmissione ereditaria – che causa una progressiva deformazione della cornea, la quale si allunga assumendo, come indica il nome, una forma conica con l'apice posto eccentricamente. La cornea, infatti, normalmente rotonda, perde rigidità e resistenza e il suo tessuto si assottiglia e si deforma nella parte centrale protrudendo in modo anomalo (Figura 3.1).

La deformazione della cornea può colpire uno o entrambi gli occhi, anche se la malattia può presentarsi in forma bilaterale asimmetria. Inoltre tale deformazione tende a svilupparsi in età adolescenziale (tra i 10 e i 20 anni) e tipicamente progredisce fino alla terza o quarta decade di vita (30-40 anni), in cui di solito si stabilizza. L'origine della malattia non è ben conosciuta, sebbene si sappia che intervengono fattori genetici, ambientali o disfunzionali ormonali [49] [50].

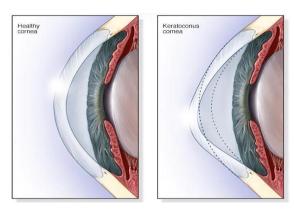


Figura 3.1: Cornea sana (destra) e cornea affetta da ectasia corneale (sinistra).

L'assottigliamento corneale si verifica normalmente sia nella cornea inferiore-temporale che in quella centrale, sebbene siano state descritte anche localizzazioni superiori. Essendo la cornea la componente refrattiva più potente del sistema diottrico oculare, una sua anomalia anatomica comporta inevitabilmente un grave deficit visivo (in genere diminuzione del visus, astigmatismo e miopia spesso elevata). Infatti la deformazione irregolare della cornea fa sì che i raggi luminosi vengano messi a fuoco sulla superficie della retina in modo disuguale, motivo per cui il cheratocono si manifesta con una distorsione delle immagini e una visione confusa sia da vicino che da lontano.

Tra i principali sintomi vi sono: affaticamento della vista, dolore e/o bruciore oculare, diplopia¹⁰, fotofobia, lacrimazione alterata, cefalea e senso di abbagliamento persistente dovuto alle eventuali cicatrici corneali [50].

3.1.1 Epidemiologia

_

Il cheratocono colpisce circa una persona su 2000. Generalmente è binoculare (96% dei casi) anche se inizialmente la malattia può colpire un solo occhio, che, nelle fasi avanzate, risulterà il più grave dal punto di vista clinico [50]. Il cheratocono colpisce entrambi i sessi, anche se non è chiaro se esistano differenze significative tra maschi e femmine. Alcuni studi

¹⁰ La diplopia è la percezione di due immagini di un singolo oggetto (Tratto da MSD, Versione per professionisti).

non hanno trovato differenze nella prevalenza tra i generi; altri hanno trovato una maggiore prevalenza nelle femmine; mentre altri ricercatori hanno trovato una maggiore prevalenza nei maschi [51].

Il cheratocono è anche noto per colpire tutti i gruppi etnici. In uno studio di ricerca condotto nel Regno unito, è stata riscontrata una prevalenza con un rapporto di 4:1 e un'incidenza con un rapporto di 4,4:1 nell'etnica asiatica rispetto all'etnica caucasica [52]. Pertanto, rispetto ai pazienti bianchi, gli asiatici hanno un'incidenza di quattro volte superiore e i sintomi tendono a manifestarsi in età più precoce. Tale constatazione è stata confermata anche in ulteriori studi clinici successivi.

Raramente il cheratocono può essere congenito e dunque presente fin dalla nascita; al contrario, è comunemente una condizione isolata, nonostante molteplici siano i rapporti singolari di coesistenza con altri disturbi (Appendice II). Sono frequenti associazioni con altre malattie come: atopia (predisposizione ereditaria alle malattie allergiche), l'amaurosi congenita di Leber, distrofie corneali, trisomia 21 (sindrome di Down), malattia della tiroide, malattia del collagene (lassità dei legamenti articolari), ecc [53].

3.1.2 Caratteristiche cliniche

I sintomi e i segni oculari del cheratocono dipendono dallo stadio di progressione del disturbo. Nelle fasi iniziali, infatti, il cheratocono non produce normalmente alcun sintomo e quindi può passare inosservato all'oftalmologo, a meno che non vengano effettuati test specifici (ad esempio la topografia corneale). La progressione della malattia si manifesta con una significativa perdita di acuità visiva che non può essere compensata con occhiali [51].

Inoltre i segni clinici che identificano il cheratocono variano anche a seconda della gravità della malattia. Nei casi moderati e avanzati di cheratocono, attraverso un'analisi con lampada a fessura (o biomicroscopio) è possibile visualizzare la cornea e individuare eventuali segni clinici predittivi della patologia cheratoconica, quali:

- Assottigliamento stromale (para-centralmente, o più comunemente nella zona inferotemporale) negli stadi avanzati. si pensa sia dovuto ad una riduzione di lamelle stromali durante un processo di assottigliamento totale [46].
- Abrasioni corneali: si manifestano a causa di rotture nella membrana di Bowman, la quale si riempie di tessuto connettivo. È anche stato riportato che una applicazione di lenti a contatto piatte può produrre od accelerare abrasioni corneali.
- Anelli di Kayser-Fleischer: linee di color giallo-brunastro che circondano parzialmente o infero-temporalmente la base del cono (Figura 3.2). Questi anelli

consistono in un accumulo di deposito ferroso come risultato di gravi cambiamenti della curvatura corneale indotti dalla malattia.



Figura 3.2: Anello di Kayser-Fleischer visibile alla periferia della cornea.

• *Strie di Vogt*: sottili linee verticali situate a livello della membrana di Descemet e parallele all'asse del cono, le quali scompaiono transitoriamente alla digitopressione (Figura 3.3).

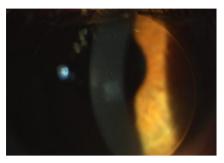


Figura 3.3: Strie di Vogt

- Segno di Munson: deformazione a forma di V della palpebra inferiore prodotta dalla cornea ectasica rivolgendo lo sguardo verso il basso; può essere notato anche senza usare la lampada a fessura.
- Segno di Rizzuti: è un fascio di luce fortemente focalizzato vicino al limbus nasale, prodotto dall'illuminazione laterale della cornea nei pazienti con cheratocono avanzato.
- Idrope (Hydrops): si manifesta nel caso di pazienti con cheratocono in stadio avanzato e grave e consiste nella rottura della membrana di Descemet con conseguente imbibizione di umor acqueo nello stroma della cornea; nei pazienti con acuti episodi di idrope corneali si evidenzia un'improvvisa perdita del visus e dolore significativo.
- Pressione intraoculare ridotta come conseguenza dell'assottigliamento corneale e/o della riduzione della rigidità sclerale.

• Nervature corneali: ispessimento delle nervature corneali rende le stesse maggiormente visibili nel cheratocono. Le fibre prominenti formano una rete di linee grigie con punteggiature bianche leggere, talvolta visibili [52] (Figura 3.4).





Figura 3.4: A sinistra l'immagine rappresenta la maggiore visibilità dei nervi corneali in un cheratocono. A destra l'immagine presenta cicatrici corneali significative indotte dall'uso di lenti a contatto.

3.1.3 Istopatologia

Dal punto di vista istopatologico¹¹ sono tre le caratteristiche riscontrare nel cheratocono: assottigliamento dello stroma corneale; rotture dello strato di Bowman; depositi di ferro all'interno dello strato basale dell'epitelio corneale.

In particolare nella cornea con cheratocono l'epitelio può mostrare una degenerazione delle sue cellule basali, rotture accompagnate da una ricrescita di cellule epiteliali nello strato di Bowman sottostante e accumulo di particelle di ferritina all'interno e tra le cellule epiteliali, in modo più evidente nello strato basale dell'epitelio [54].

Nello strato di Bowman è possibile individuare: rotture riempite dal sottostante collagene stromale, noduli periodici acido Schiff-positivi ed interruzioni a forma di Z (possibilmente dovute alla separazione di fasci di collagene e cicatrici reticolari).

Le caratteristiche notate nello stroma sono la perdita di disposizione delle fibrille, diminuzione di lamelle di collagene e numero di cheratociti. La riduzione è tanto maggiore, quanto più avanzata è la patologia (Figura 3.5).

La membrana di Descemet è solitamente inalterata, tranne nei casi di rottura di questo tessuto (idrope acuto), e anche l'endotelio è generalmente inalterato dalla malattia. Tuttavia, sono state riportate alcune anomalie, quali pleomorfismo e allungamento delle cellule

-

¹¹ Istopatologia: si riferisce all'esame microscopico dei tessuti per studiare le manifestazioni della malattia (tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera).

endoteliali con il loro asse orientano nella stessa direzione in cui si sviluppa il cono cheratoconico [51].

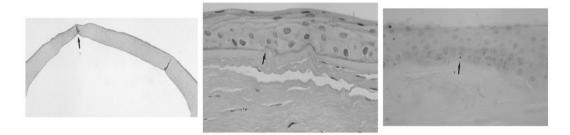


Figura 3.5: Caratteristiche istopatologiche classiche viste nel cheratocono. A sinistra: assottigliamento stromale con artefatto di piegatura comunemente visto nelle cornee assottigliate. Al centro: Rotture nello strato di Bowman (freccia). A destra: Deposito di ferro nell'epitelio basale (freccia).

3.1.4 Eziologia e patogenesi

Negli anni sono state proposte diverse ipotesi per individuare le cause e i possibili meccanismi che determinano lo sviluppo del cheratocono. Osservazioni cliniche e studi topografici hanno portato ad ipotizzare che la componente genetica giochi un ruolo importante nell'eziologia del cheratocono. Un recente studio ha stimato che i familiari di un soggetto cheratoconico abbiano un rischio di 15-67 volte maggiore di sviluppare la patologia, rispetto a coloro che non hanno parenti con cheratocono [54].

Alcuni fattori biomeccanici, quali lo sfregamento degli occhi e l'uso di lenti a contatto, che potrebbero causare un trauma oculare continuato nel tempo, si annoverano tra le principali cause dello sviluppo del cheratocono in individui geneticamente suscettibili.

Inoltre, recenti saggi biochimici e studi istologici suggeriscono che la perdita dello stroma corneale potrebbe essere causata da fattori biochimici ed in particolare da un aumento dei livelli di proteasi e di altri enzimi catabolici. È dimostrato che i cheratociti delle cornee nel cheratocono hanno un numero quattro volte maggiore di recettori interleuchina-1 (IL-1) rispetto alle cornee normali; Wilson et al suggeriscono che l'aumentata espressione del recettore IL-1 sensibilizza i cheratociti all'IL-1 rilasciata dall'epitelio o dall'endotelio, causando una perdita di cheratociti attraverso l'apoptosi e una diminuzione della massa stromale nel tempo [55].

3.1.5 Diagnosi e classificazione

Per contrastare o fermare la patologia prima che raggiunga stadi di sviluppo preoccupanti è fondamentale una diagnosi tempestiva. Pertanto, sono disponibili diversi esami che permettono di individuare la malattia ancora prima della comparsa dei sintomi, quali:

- Topografia corneale (gold standard): consente di ottenere una mappa di curvatura e una mappa altitudinale della superficie corneale anteriore, per mezzo delle quali è possibile evidenziare il follow up del cheratocono e definire se la patologia si trova in uno stadio iniziale (lieve), intermedio (moderato) o avanzato (Figura3.6).
- Tomografia corneale: studia curvatura, elevazione e spessore della cornea a più livelli e per mezzo di opportuni indici (Belin-Ambrosio) permette di individuare anche le forme più lievi di ectasia corneale e documentarne l'evoluzione.
- Pachimetria: misura lo spessore della cornea e, grazie ad una mappa che evidenzia lo spessore corneale in ogni suo punto, di individuare e localizzare il punto più sottile [53].

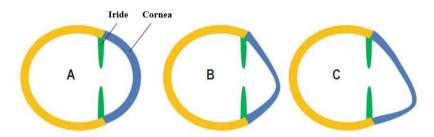


Figura 3.6: Rappresentazione schematica del decorso progressivo del cheratocono: A: Forma corneale normale; B: Cheratocono al primo stadio con aumento del potere refrattivo sulla superficie corneale anteriore che si aggira intorno alle 50/55 diottrie e assottigliamento corneale; C: Cheratocono all'ultimo stadio con deformazione marcata diretta verso il basso, aumento del potere refrattivo sulla superficie corneale anteriore superiore alle 55 diottrie e assottigliamento corneale al di sotto di 400 μ m.

Comunemente a seconda del quadro clinico e dei dati ottenuti dagli esami strumentali (mappe topografiche), la progressione della malattia viene suddivisa in stadi. Esistono diverse classificazioni per valutare lo stadio di evoluzione del cheratocono. Le tre classificazioni di norma più utilizzate sono quella di Amsler, quella di Rama e quella di Krumeich.

Classificazione di Amsler

Tale classificazione avanzata da Amsler consente di dividere la patologia in quattro stadi evolutivi, prendendo in considerazione la curvatura, l'angolo di Amsler – ovvero l'inclinazione degli assi delle mire dell'oftalmometro – e l'eventuale correzione del cheratocono per ogni stadio (Tabella 1). Il primo e il secondo stadio evolutivo risultato essere quelli più evidenti; procedendo verso stadi più elevati la gravità della patologia [56].

Stadio	Curvatura [D]	Angolo di Amsler [°]	Vizi di rifrazione	Correzione
1	45 - 48	1 - 3	Astigmatismo	Occhiali
2	48 -53	3 -9	Astigmatismo e miopia	Lenti a contatto
3	> 53	Mal definibile	Mal definibile	Lenti a contatto
4	Non definibile	Mal definibile	Mal definibile	Mal definibile

Tabella 3.1: Classificazione di Amsler

Classificazione di Rama

La classificazione di Rama si basa sulla possibilità di correggere il difetto di vista provocato dal cheratocono ed è utile per valutare l'indicazione all'intervento chirurgico [56]:

- Cheratocono in fase rifrattiva: nelle prime fasi è presente un astigmatismo sufficientemente regolare, eventualmente associato a una miopia lieve, e l'ametropia può essere corretta con occhiali; se l'astigmatismo diventa più irregolare e l'ametropia aumenta, la correzione con occhiali non è più possibile e sarà necessario ricorrere all'uso delle lenti a contatto;
- Cheratocono in fase evolutiva: non è più possibile ottenere un visus soddisfacente né
 con occhiali né con lenti a contatto oppure le lenti a contatto non sono più tollerate,
 per cui si dovrà programmare l'intervento chirurgico

Classificazione di J. Krumeich

La classificazione di Krumeich divide la patologia in quattro stadi clinici ed evolutivi, sulla base di astigmatismo, potere diottrico, trasparenza e pachimetria corneale (Tabella 3.2).

STADIO	GRAVITÀ	CURVATURA CORNEALE [D]	SPESSORE CORNEALE [MM]	STATO DELLA SUPERFICIE	RIFRAZIONE
I	Lieve	Kreading max < 48 D	Lievemente ridotto (fino ad un minimo di 500 µm)	Assenza di leucomi	Miopia e/o astigmatismo < 5 D;
II	Moderato	Kreading max < 53 D	Ridotto (>400 μm)	Assenza di leucomi	Miopia e/o astigmatismo >5
III	Avanzato	Kreading max > 53 D	Molto ridotto (tra i 300 e i 400 μm)	Assenza di leucomi	Miopia e/o astigmatismo indotto > 8 D < 10 D;
IV	Severo	Kreading max > 56 D	Rischio di perforazione (circa 200 μm)	Presenza di leucomi	Refrazione non misurabile

Tabella 3.3 Classificazione secondo Krumeich e collaboratori.

3.1.6 Terapia e procedure chirurgiche

Il trattamento del cheratocono varia a seconda della stadiazione, dell'evoluzione della patologia e dell'età del paziente. Tradizionalmente, i casi incipienti sono gestiti con gli occhiali, i casi lievi e moderati con lenti a contatto (LAC) e i casi gravi – che conducono a uno sfiancamento e assottigliamento eccessivo della cornea – possono essere trattati con la cheratoplastica. Il Cheratocono rappresenta la maggiore causa di Trapianto di Cornea in Italia ed in Europa e la seconda negli USA. Il numero di trapianti di cornea effettuati in Italia è oggi in continua crescita e si stima che il fabbisogno annuo per la popolazione italiana sia di circa 120-130 trapianti/anno per milione di popolazione (circa 6.000 interventi annui in Italia secondo i dati della SITRAC: Società Italiana Trapianto di Cornea) [57].

Un'alternativa al trapianto è il Cross-Linking Corneale, una terapia chirurgica a bassa invasività che consente di rinforzare la superficie corneale, creando nuove connessioni tra le fibre collagene dello stroma, aumentandone la resistenza meccanica. Il Cross-Linking Corneale permette, quindi, di contrastare e/o arrestare l'evoluzione della malattia [49].

La tecnica del Cross-Linking è l'oggetto principale di questo lavoro di analisi clinica e verrà ampiamente discussa nei prossimi capitoli.

3.2 Principi base del Cross-Linking corneale

Il Cross-Linking (CXL) è una terapia chirurgica ideata a Dresda, in Germania, nel 1997 da parte di un gruppo di ricercatori dell'Università Tecnica di Dresda guidati da Gregor Wollensak, Theo Seiler ed Eberhard Spoerl. Il CXL approvata nel 2016 dalla Food and Drug Administration (FDA) in grado di stabilizzare il tessuto corneale al fine di arrestare o almeno rallentare la progressione del cheratocono. Una cornea affetta da KC è nota per avere un modulo di Young e proprietà viscoelastiche inferiori rispetto ad una cornea sana, come conseguenza della riduzione dei legami covalenti tra le fibre di collagene presenti nello stroma. Tale riduzione dei legami causa i due sintomi più comuni del KC: aumento focale della curvatura e riduzione progressiva dello spessore corneale [58].

Il trattamento del KC accettato a livello mondiale è il CXL, una procedura parachirurgica "a bassa invasività" che, per mezzo di una reazione fotodinamica tra la Riboflavina (vitamina B2) e i raggi ultravioletti di tipo A (363 nm), è in grado di creare nuove connessioni tra le fibre collagene e quindi aumentare la rigidità della cornea e renderla meno soggetta al processo di sfiancamento, caratteristico del cheratocono [7] [58].

Il KC una malattia a carattere progressivo – che tende a stabilizzarsi intono alla 3-4 decade di vita del paziente – motivo per cui la procedura di CXL è consigliata a pazienti giovani, colpiti recentemente dalla malattia e nei quali la progressione del KC sembra essere più pronunciata.

Il Cross-Linking Corneale prevede fondamentalmente due fasi:

- I. Impregnazione della cornea: si ottiene con l'installazione di gocce di collirio a base di riboflavina, vitamina (B2) fotosensibile che, concentrandosi nello stroma della cornea, è in grado di assorbire i raggi UV.
- II. Irradiazione: il tessuto corneale viene esposto ad un fascio laser di raggi ultravioletti di tipo A (UVA) a basso dosaggio. I raggi UV rendono più rigido il tessuto corneale mediante la creazione di ponti di legame fra le fibre collagene dello stroma, le quali diventano più spesse, più ordinate e più resistenti a stimoli meccanici e chimici (Figura 3.7).

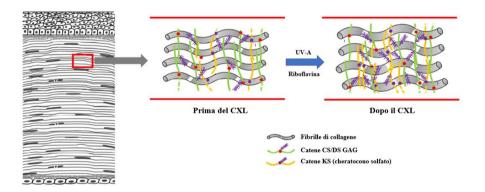


Figura 3.7: Il cambiamento delle fibre di collagene prima e dopo il CXL: A destra è un modello di strutture corneali, dove il riquadro rosso è ingrandito nella parte centrale. Dopo il CXL, si formano legami incrociati tra i terminali amminici delle catene laterali del collagene; un aumento degli epitopi di cheratocono solfato (KS) nello stroma corneale così come un aumento del diametro delle fibre di collagene.

3.2.1 Riboflavina: formulazione e farmacocinetica nel CXL

Le reazioni di 'cross-linking' si ottengono utilizzando una sostanza – detta *cross-linker* – che induce la formazione di legami incrociati interfibrillari disposti in modo ordinato. Nel caso del CXL corneale, il cross-linker è la Riboflavina-5'-fosfato o vitamina B2. Si tratta di una sostanza di colore giallo poco solubile in acqua e fotosensibilizzante che, se sottoposta ad una radiazione UVA, è in grado di generare un effetto foto-polimerizzante del collagene corneale [59] [60]. L'alto assorbimento dell'energia di irradiazione da parte della riboflavina è ottenuto usando una radiazione UV con lunghezza d'onda di circa 365-370 nm, ovvero il

valore in corrispondenza del quale si ha un picco nello spettro di assorbimento della cornea contenente riboflavina [61].

Durante il CXL corneale, gli UV-A portano la Rf da uno stato eccitato di riboflavina singoletto (¹Rf*) ad uno stato tripletto della riboflavina (3Rf*), più stabile e duraturo. Nel suo stato tripletto, la riboflavina genera numerosi radicali liberi dell'ossigeno (ROS) – principalmente ossigeno singoletto (¹O₂) ed in misura minore radicali anione superossido – i quali possono reagire ulteriormente con varie molecole inducendo la formazione di legami chimici covalenti tra i gruppi amminici delle fibrille di collagene (Figura 3.8). Tali reazioni comportano un aumento della rigidità della cornea ed in alcuni casi anche una riduzione della curvatura di almeno 2 diottrie.

Osservazioni, presenti in letteratura, hanno suggerito come l'effetto post-operatorio del CXL possa essere valutato con la cosiddetta Linea di demarcazione (Demarcation Line, DL).

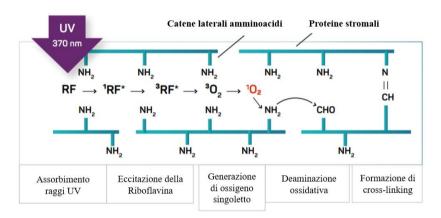
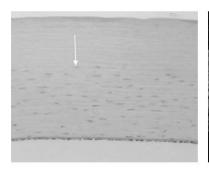


Figura 3.8: Reazione della fototerapia corneale

La DL di solito compare nei primi 15 giorni dopo il trattamento di CXL, e consiste in una sorta di "linea di confine" tra lo stroma corneale reticolato e quello non reticolato. È istologicamente dimostrato che il CXL causi la comparsa di edema corneale e morte cellulare (apoptosi) dei cheratociti presenti nella porzione anteriore dello stroma. Questo cambiamento *site-specific* è responsabile dell'aumento della densità della matrice extracellulare a livello dello stroma profondo (300-350 µm) non trattato, mentre nello stroma anteriore reticolato le cellule fibroblastiche sono scarse o assenti a causa di perossidi tossici liberatisi nel corso del trattamento [58] (Figura 3.9). Ciò evidenzia come la profondità stromale dell'apoptosi dei cheratociti sia chiaramente correlata all'irraggiamento UV-A superficiale applicato. La DL rappresenta un "segno clinico diretto", oltre alla topografia corneale, dei cambiamenti morfologici indotti dal CXL alla cornea [63] [64].



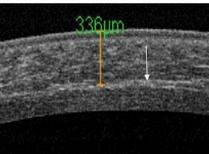


Figura 3.9: Sia lo studio istologico (sinistra) che l'OCT mostrano entrambe la linea di demarcazione stromale dopo il CXL. Essa rappresenta il "confine" tra la cornea trattata con il CXL e quella non trattata. Le frecce individuano la zona a partire dalla quale si ha nuovamente il ripopolamento di cellule cheratocitiche.

Durante il CXL corneale, per essere efficace dal punto di vista clinico la riboflavina-5'fosfato deve raggiungere concentrazioni adeguate ed omogenee nello stroma corneale. Per
fare ciò, la molecola deve superare la barriera multristrato dell'epitelio che, dal punto di vista
anatomico-funzionale, svolge un ruolo diametralmente opposto: impedire l'accesso di
xenobiotici¹² [58]. La diffusione della riboflavina nello stroma è un processo dipendente dal
tempo, pertanto, sono necessari fino a diversi minuti prima che la riboflavina sia
adeguatamente diffusa nel tessuto stromale [61].

3.3 Procedure di intervento

Il cross-linking è stato utilizzato per la prima volta nei pazienti alla fine degli anni '90, mentre i primi risultati clinici sono stati pubblicati nel 2003 [62]. Nel protocollo originario di Dresda, la proceduta di CXL nasce come una procedura "*Epi-off*", quindi prevedendo l'asportazione dell'epitelio prima dell'irradiazione della vitamina B con raggi ultravioletti. Tale procedura ha lo scopo di rimuovere la barriera multistrato rappresentata dall'epitelio, al fine di consentire una sufficiente penetrazione delle molecole di riboflavina nello stroma, accelerandone la saturazione. Il CXL in modalità Epi-off prevede l'irradiazione della cornea – imbibita di riboflavina – con ultravioletti A (370 nm) con una densità di potenza fissa a seconda del protocollo utilizzato e per una energia totale emessa dalla sorgente UV-A di 5,4 J/cm². Attualmente il CXL in modalità epi-off può essere effettuato seguendo due protocolli:

- 1. Protocollo standard con intensità UV-A pari a 3mW (detto protocollo di Dresda);
- Protocolli accelerati con alta intensità UV-A (da 9 mW a 45 mW) a luce continua o pulsata.

-

¹² Xenobiotico: una sostanza di qualsiasi tipo, di origine naturale o sintetica, estranea ad un organismo (Tratto da Wikipedia, l'enciclopedia libera).

Tuttavia tale strategia chirurgica può provocare complicanze legate proprio alla rimozione dello strato epiteliale, quali: dolore post-operatorio e rischio di infezioni. Pertanto, la ricerca scientifica si è concentrata nel ricercare ulteriori approcci chirurgici atti a migliorare la diffusione della riboflavina senza ricorrere all'asportazione dell'epitelio corneale. Si parla dunque di CXL in modalità *Epi-on* o transepiteliale (*teCXL*) e si basano sull'utilizzo di enhancer di penetrazione oculare, ovvero sostanze che sono in grado di incrementare il passaggio trans oculare della Rf [58]. Tale procedura presenta una sintomatologia minore e risulta più idonea per persone con cornee troppo sottili, che non si potrebbero sottoporre alla tecnica epi-off; tuttavia, la penetrazione della riboflavina nello stroma corneale è inferiore rispetto alla tecnica con rimozione dell'epitelio, quindi, il risultato potrebbe essere meno soddisfacente [2].

3.3.1 Protocollo di CXL *Epi-off*

La proceduta di Cross-Linking stardard epi-off ha mostrato, in numerosi studi presenti in letteratura, di poter arrestare o rallentare il cheratocono in fase progressiva. L'evidenza scientifica e gli ottimi risultati clinici, fanno sì che il CXL standard possa essere considerato, allo stato attuale delle cose, il trattamento di prima scelta per soggetti al di sotto dei 26 anni con KC progressivo di stadio I, II e III (secondo la classificazione di Krumeich) e spessore corneale minimo pre-operatorio di almeno di 400 µm. Tale valore è lo spessore corneale minimo raccomandato per evitare effetti tossici alle cellule endoteliali corneali, al cristallino e alla retina (Figura 3.10).

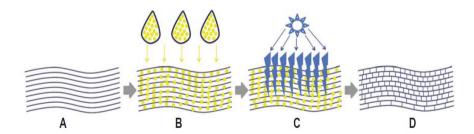


Figura 3.10: Figura 2: Modalità d'azione del cross-linking corneale con riboflavina e UVA. A: Disposizione parallela delle fibrille nello stroma corneale dopo la rimozione dell'epitelio; B: Applicazione del collirio di riboflavina fino alla saturazione dello stroma corneale; C: Irradiazione corneale con luce UVA (370 nm, 3 mW/cm²). Per ragioni di sicurezza, lo spessore corneale non dovrebbe essere inferiore a 400 μm; D: Fibrille di collagene reticolate.

I motivi per i quali si preferisce asportare lo strato di epitelio sono molteplici:

- L'epitelio funge da barriera, impedendo alla radiazione ultravioletta di penetrare nello stroma corneale profondo. Infatti, se già l'epitelio da solo è in grado di assorbire circa il 30% della radiazione ultravioletta, quando esso è imbibito di riboflavina arriva ad assorbire oltre l'85% della radiazione [65] – ciò fa sì che non

- venga raggiunta una concentrazione adeguata e omogenea di riboflavina nello stroma corneale.
- L'epitelio non è permeabile a composti di peso molecolare superiore ai 100 Dalton. La riboflavina ha un peso molecolare di 376,4 Dalton, pertanto se lo strato epiteliale non viene apportato minori quantità di riboflavina raggiungono lo stroma e minore sarà l'effetto del CXL per arrestare la progressione del KC.

3.3.1.1 Protocollo standard (Protocollo di Dresda)

Il trattamento ha una durata che va dai 30 ai 60 minuti e viene eseguito con il paziente steso su lettino operatorio e con l'occhio mantenuto aperto per mezzo di un blefarostato. I passi da seguire durante la procedura di CXL standard Epi-off sono:

- 1. Verifica dell'energia dell'illuminatore UVA, mediante apposito misuratore di potenza, in modo che venga erogata una densità di potenza che ricada in un range prestabilito.
- 2. Instillazione nell'occhio da trattare gocce di un collirio miotico (per restringere la pupilla) ed anestetico, per ridurre il fastidio ed i potenziali danni della luce UV-A.
- 3. Disepitelizzazione corneale di 9 mm di diametro mediante spatola o scarificatore epiteliale.
- 4. Imbibizione corneale in cui gocce di una soluzione di riboflavina vengono instillate ogni 3 minuti per 30 minuti per impregnare completamente la cornea.
- 5. Irraggiamento di luce UV-A sull'occhio con una intensità fissa di 3 mW/cm² per un totale di 30 minuti divisi in 6 passaggi di 5 minuti. Alcune gocce di riboflavina vengono instillate sull'occhio del paziente ogni 2 minuti durante tutta la fase di irraggiamento [65].

Al termine del trattamento l'occhio viene medicato e viene applicata una lente a contatto terapeutica morbida per ridurre il dolore e favorire la guarigione. La lente a contatto sarà poi rimossa dopo 3-5 giorni poiché l'epitelio corneale si rigenera velocemente [30] (Figura 3.11).

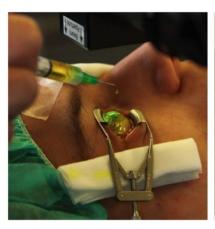




Figura 3.11: A sinistra: applicazione della soluzione concentrata di riboflavina. A destra: La luce UV stimola la reticolazione e rafforza la cornea.

3.3.1.2 Protocolli accelerati A-CXL ad alta intensità UV-A

Il protocollo di Cross-Linking "standard" epi-off (s-CXL) ha palesato, in numerosi studi clinici presenti in letteratura, un notevole aumento della rigidità corneale e dell'acuità visiva corretta (BCVA¹³) in soggetti patologici [58].

Tuttavia, la procedura standard presenta due limitazioni: la necessità di uno spessore corneale minimo di 400 µm ed un'elevata durata del trattamento. Per tale motivo, sono stati sviluppati protocolli accelerati, rinominati *A-CXL (Accelerated CXL)*, che prevedono in ogni caso la rimozione dell'epitelio corneale. Gli A-CXL hanno come obiettivo quello di accorciare la durata del trattamento attraverso l'implementazione di sorgenti UVA ad alta energia di irradiazione, compresa tra i 9-45 mW/cm², mantenendo la stessa energia totale emessa dalla sorgente di 5,4 J/cm² della procedura tradizionale. La fase d'imbibizione con riboflavina in questi casi varia da 10 a 15 minuti e la fase di irradiazione UV-A con luce continua o pulsata varia a seconda dell'energia scelta. Attualmente vi sono due modalità di irradiazione:

- I. Luce continua (Continuous-Light Accelerated CXL, CA-CXL);
- II. Luce pulsata (Pulsed-Light Accelerated CXL, PA-CXL): alternanza di una fase di accensione e di spegnimento dell'irradiazione ad intervalli regolari di tempo.

Un aumento dell'intensità da 3 mW/cm² fino a 45 mW/cm² – considerando in ogni caso un'energia trasmessa al tessuto costante e pari a 5,4 J/cm² – comporta un maggiore numero

¹³ BCVA: Miglior visione possibile che una persona può raggiungere con lenti correttive, misurata in termini di linee di Snellen su un tabellone luminoso, detto ottotipo (Tratto da Medicitalia⁺)

-

di fotoni UVA incidenti sulla superficie corneale massimamente concentrati sulla superficie anteriore corneale. Tuttavia, riducendo i tempi di esposizione si verifica una diminuzione della profondità della reazione foto-ossidativa e quindi una riduzione della profondità del trattamento (demarcation line) [58]. Inoltre, una minore durata del trattamento con un irraggiamento 10 volte superiore può in alcuni casi portare alla formazione di un microambiente ipossico. L'ipossia tissutale comporta un minore numero di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) generati dalla Rf, inducendo una minore formazione di legami chimici covalenti tra i gruppi amminici delle fibrille di collagene.

Al contrario, risulta evidente che un elevato tempo di esposizione nella fase di irradiazione (come nel caso del CXL standard o convenzionale) fa sì che la Rf raggiunga una maggiore penetrazione nello stroma e quindi una maggiore profondità della linea di demarcazione.

3.3.2 *te-CXL*

La procedura Epi-off è sicuramente efficace, ma può portare a potenziali complicazioni e quelle più comuni, riportate negli studi clinici della FDA, sono: cheratite, opacità, strie, dolore, riduzione dell'acuità visiva e visione offuscata. Tali limitazioni hanno portato all'idea di sviluppare protocolli che fossero in grado di garantire elevato assorbimento stromale e omogenea di distribuzione della Rf, senza procedere all'asportazione dell'epitelio [65]. Il CXL transepiteliale (te-CXL) ha il potenziale vantaggio di un recupero più rapido, meno dolore e di ampliare le opzioni di trattamento per i pazienti con cornee più sottili.

Nonostante l'assenza di complicazioni avverse, il te-CXL è meno efficace nell'arrestare la progressione del cheratocono, in quanto le concentrazioni intrastromali di riboflavina ottenute attraverso l'imbibizione in modalità epi-on sono notevolmente minori rispetto alla procedura tradizionale epi-off. Inoltre, così come riportato da studi clinici, i pazienti trattati con il te-CXL presentano una linea di demarcazione o un appiattimento corneale solo a partire da un anno dopo il trattamento transepiteliale [66].

3.3.3 CXL con iontoforesi (i-epi-on)

Per superare i limiti della te-CXL, la ricerca scientifica si è indirizzata verso procedure che permettono di migliorare la diffusione e penetrazione di riboflavina nello stroma attraverso la barriera dell'epitelio (Epi-on), con una maggiora rapidità di trattamento. Pertanto, è stato introdotto il Cross-Linking transepiteliale con Iontoforesi (*CXL i-Epi-on*) che consiste nel trasferimento di molecole, fornite di carica ionica (tra cui la riboflavina), all'interno del tessuto corneale da trattare, grazie ad un campo elettrico a basso voltaggio [67]. È una

metodica non invasiva in cui una piccola corrente elettrica viene applicata per migliorare la penetrazione della Rf in tutta la cornea. La iontoforesi è anche una procedura a basso rischio – lavora ad intensità di corrente molto basse – ed è utile in quanto si ottengono maggiori e più omogenee concentrazioni di riboflavina all'interno dell'occhio rispetto a quelle ottenute con la semplice applicazione del farmaco nella metodica convenzionale.

La iontoforesi permette di ridurre l'intervento di cross-linking corneale a soli 14 minuti totali: 5 minuti per la fase di imbibizione corneale e 9 minuti per la fase di irraggiamento UV-A con una densità di potenza variabile da 10 a 18 mW/cm² [65].

Il passaggio di corrente elettrica si basa su una differenza di potenziale che si viene a stabilire tra due elettrodi collegati ad un generatore di corrente continua. L'elettrodo negativo del circuito (catodo) è una griglia metallica, inserita in uno specifico device, che aderisce alla cornea del paziente con meccanismo di suzione per 5 minuti. Il polo positivo del circuito (anodo) è un elettrodo perioculare posizionato sulla fronte (Figura 3.12).

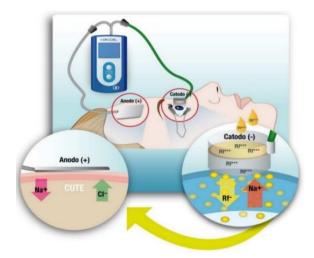


Figura 3.12: Applicazione degli elettrodi sul paziente per trattamento CXL-i-epi-on. L'anodo è applicato sulla fronte per mezzo di un cerotto, il catodo sulla cornea del paziente per mezzo di un anello di suzione.

La riboflavina presenta una carica elettrica negativa, pertanto si presta come candidato perfetto per andare a riempire l'anello di suzione applicato sulla cornea, facendo in modo che l'intera griglia metallica ne sia completamente ricoperta. Dopo aver posizionato i due elettrodi, viene attivato il generatore di corrente continua (settato per emettere una corrente di 1 mA per la durata di 5 minuti) e ha inizio la procedura di iontoforesi che per mezzo del flusso di corrente tra i due elettrodi, consente alla riboflavina di penetrare nello stroma preservando l'integrità dell'epitelio corneale. Una volta effettuata l'imbibizione, si esegue la fase di irraggiamento con protocollo standard o accelerato (Figura 3.13).

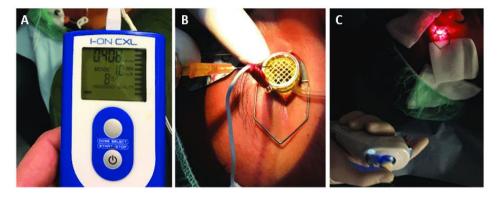


Figura 3.13: A) Attivazione del generatore di corrente continua ; B) Riempimento dell'applicatore con la soluzione di riboflavina; C) fase di irraggiamento UVA.

3.3.4 Considerazioni e confronto sulle tecniche

Gli effetti avversi del Cross-Linking Corneale sono pochi e, in generale, associati alla procedura utilizzata. Ad oggi, il trattamento più sicuro ed efficace che mira ad arrestare la progressione del KC è il protocollo standard s-CXL (protocollo di Dresda) che prevede l'asportazione dell'epitelio corneale. Una rassegna delle principali differenze tra i diversi protocolli – già ampiamente enunciate nei paragrafi precedenti – è ulteriormente evidenziata nella Tabella 3.4.

Recentemente studi clinici hanno evidenziato che un risultato clinico indiretto dell'efficacia del CXL è fornito dalla linea di demarcazione corneale (rilevata con OCT un mese dopo il trattamento). In uno studio effettuato nel 2017, dal gruppo di ricerca di Caporossi et al [68], è emerso un effettivo riscontro di differenti profondità di trattamento con i diversi protocolli (Figura 3.14). In particolare, la linea di demarcazione corneale è apparsa significativamente più profonda dopo CXL standard (340 µm) rispetto ai trattamenti accelerati a luce continua CA-CXL. Invece i trattamenti a luce pulsata, dal momento che consentono all'ossigeno di diffondere durante le fasi "off" e di essere nuovamente disponibile durante le fasi "on", presentano una maggior effetto biomeccanico e una maggiore profondità della linea di demarcazione – così come si evince anche dallo studio di Caporossi et al.

CXL	Vantaggi	Svantaggi
Epi-off standard (s-CXL)	 Profondità di trattamento elevata Maggiore effetto di appiattimento topografico Efficace nell'arrestare la progressione del cheratocono 	 Rimozione dello strato epiteliale Maggiore rischio di infezione (disepitelizzazione) Fastidio e dolore post-intervento Elevata durata dell'intervento Pachimetria di almeno 400 μm
Epi-off accelerato (A-CXL)	 Bassa durata dell'intervento Minore perdita di trasparenza (haze) 	Rimozione dello strato epiteliale Maggiore rischio di infezione (disepitelizzazione) Profondità del trattamento medio-bassa Minore effetto di appiattimento topografico
Epi-on senza iontoforesi (TE-CXL)	 Mantenimento dello strato epiteliale Recupero più rapido e limitato dolore post- intervento (assenza di cicatrici, infezioni e dolore) Pachimetria al di sotto dei 400 μm 	 Minore concentrazione di Rf rispetto all Epi-off Meno efficace nell'arrestare la progressione del cheratocono Profondità del trattamento bassa Elevata durata dell'intervento
Epi on con iontoforesi (i-epi-on-CXL)	 Mantenimento dello strato epiteliale Maggiore concentrazione di Rf nello stroma rispetto a Epi-on CXL Pachimetria al di sotto dei 400 μm Bassa durata dell'intervento 	Minore concentrazione di Rf rispetto all Epi-off Meno efficace nell'arrestare la progressione del cheratocono

Tabella 3.4: Principali differenze tra i protocolli di CXL

La linea di demarcazione era visualizzabile a 241 μm dopo A-CXL pulsato con 30 mW/cm² (1 sec on, 1 sec off) per 8 minuti di trattamento, fino ad arrivare a 348 μm di profondità utilizzando una irradiazione di 15 mW/cm² (2 sec on, 1 sec off) per 12 minuti di trattamento. Questi ultimi risultati sono comparabili con quelli ottenuti con il protocollo standard (3 mW/cm²).

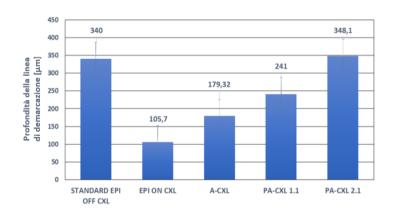


Figura 3.14: Differenti profondità di trattamento (demarcation line) con differenti protocolli di CXL.

3.4 Modello matematico alla base del CXL

Nel cross-linking corneale il tessuto corneale viene esposto ad un fascio laser di raggi ultravioletti di tipo A (UVA) a basso dosaggio. Procedendo verso la cornea, la radiazione luminosa viene in parte assorbita dai tessuti della cornea e dalla riboflavina di cui essa è imbibita. Il fascio luminoso attraversando la cornea perde parte della sua energia, ovvero si riduce di intensità sulla base della legge di Lambert-Beer. La legge afferma che la quantità di luce assorbita A è direttamente proporzionale alla concentrazione C delle sostanze che assorbono la radiazione ultravioletta, al loro coefficiente di assorbimento molare ε_{λ} e alla dimensione dello spessore l di soluzione che la radiazione UV-A deve attraversare [69].

$$A = \varepsilon_{\lambda}Cl$$

È stato dimostrato che l'intensità del fascio UV-A entrante nella cornea non dovrebbe superare la soglia massima di 0,37 mW/cm², per non provocare danni alle cellule endoteliali dovuti al rilascio di radicali liberi a seguito del processo fotodinamico che porta la Rf dal suo stato singoletto (1Rf*) ad uno stato tripletto (3Rf*). Poiché il coefficiente di assorbimento molare della cornea umana è 70 cm⁻¹ e l'irradianza superficiale prevista è 3 mW/cm², il valore tossico viene raggiunto ad una profondità di 300 μm. Mentre in una cornea spessa 400 μm, satura di riboflavina, l'irradianza a livello endoteliale risulta essere di circa 0.18 mW/cm², che rappresenta solo il 50% della soglia di danno. Pertanto, il limite di 400 μm è considerato per proteggere l'endotelio e le strutture intraoculari dagli effetti negativi dell'irradiazione ultravioletta ed è stato quindi stabilito come standard clinico [58] [70].

Tuttavia la sola legge di Lambert-Beer non risulta essere sufficiente, poiché diversi studi condotti sia in vitro che in vivo, hanno evidenziato un aumento nel tempo dell'intensità della radiazione UV-A. Ciò può essere spiegato sulla base della legge temporale di consumo, per mezzo della quale la Rf presente sulla cornea tende progressivamente a diminuire come conseguenza della sua diffusione nello stroma. In letteratura, diversi sono stati i tentavi atti ad individuare un modello matematico che tenga conto di entrambe le leggi (Lambert-Beer e legge di consumo), evitando di superare la soglia massima di tossicità senza dover continuamente somministrare Rf durante la procedura [71].

$$\frac{\partial I(z,t)}{\partial z} = -I(z,t) \times [(\varepsilon - \alpha) \times R_A(z,t) + \alpha \times R_A(z,0) + \beta]$$
$$\frac{\partial R_A(z,t)}{\partial t} = -\frac{\varepsilon \times P}{\nu} \times I(z,t) \times R_A(z,t)$$

Dove:

- $R_A(z,t)$: concentrazione (mg/cm³) di Rf disponibile per il CXL ad una profondità z nello spessore corneale al tempo t;
- I(z,t): intensità della radiazione UV-A assorbita dalla Rf disponibile e contenuta in uno strato corneale infinitesimamente spesso dz alla profondità z e al tempo t;
- S: superficie esposta;
- ε: assorbanza specifica della Rf;
- β: assorbanza UV-A corneale specifica prima dell'applicazione topica della soluzione di Rf;
- P: probabilità di fotolisi per una molecola di riboflavina durante il processo di CXL;
- γ: fattore di proporzionalità [circa 935.500 (m²·s⁻²) per la riboflavina e 639.727 (m²·s⁻²) per la riboflavina fosfato.

Per mezzo di questo modello matematico, noti lo spessore corneale dello occhio da trattare e l'intensità della radiazione ultravioletta, può essere ricavato per derivazione il tempo di trattamento. In particolare, si è evince che più lungo è il tempo di esposizione alla radiazione, maggiore è la profondità del trattamento; in ogni caso, dal punto di vista della sicurezza, per non superare la soglia massima dell'intensità del fascio entrante nella cornea – pari a 0,35 mW/cm² – il trattamento più lungo deve essere di 15 minuti.

3.5 Modello termico della cornea: equazione di Pennes

Attualmente, numerose sono le tipologie di laser impiegate nelle procedure chirurgiche – come nel caso del CXL – che coinvolgono l'occhio umano ed in particolare la cornea. Il problema che desta maggiore preoccupazione è l'aumento di temperatura nei tessuti corneali, dovuto all'assorbimento della radiazione laser UV-A. L'estensione spaziale e il grado di danneggiamento dei tessuti corneali dipendono principalmente dai parametri del laser quali: lunghezza d'onda, densità di potenza, tempo disposizione, dimensione dello spot e velocità di ripetizione. Ma anche le proprietà ottiche dei tessuti come il coefficiente di assorbimento e di dispersione, e le proprietà termiche come la capacità termica e la conduttività termica devono essere prese in considerazione per descrivere il processo di generazione e trasporto di calore nel tessuto corneale (Figura3.15).

La generazione di calore all'interno della cornea è determinata dai parametri del laser e dalle proprietà ottica della cornea stessa. Tuttavia, anche quando non sono presenti fonti esterne, è necessario prendere in considerazione dei parametri, quali il tasso volumetrico di perfusione del sangue W_b e la generazione volumetrica interna di calore Q_m (ovvero il tasso

metabolico). Questi due termini sono sempre presenti nell'organismo e sono responsabili – in generale – del mantenimento della temperatura costante del corpo.



Figura 3.15: Parametri necessari per modellare l'interazione termica laser-cornea

Il coefficiente di assorbimento è la proprietà ottica più importante della cornea nel trattamento di CXL. In generale, l'assorbimento nei tessuti biologici è dovuto alla presenza di molecole d'acqua, proteine, pigmenti e altre macromolecole. Sulla base di ciò, il modello che può essere preso in considerazione nell'analizzare il trasferimento di calore nel tessuto corneale si basa sull'equazione bioterma o anche detta equazione di Pennes.

$$\rho C \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla (k \nabla T) + W_b C_{pb} (T_a - T) + Q_m + H \tag{1}$$

$$-k\frac{\partial T}{\partial n} = h_c(T - T_{amb}) + \sigma\epsilon(T^4 - T_{amb}^4)$$
 (2)

Essa enuncia che era l'aumento di temperatura nei tessuti soggetti alla radiazione è dato dalla somma di diversi contributi, quali: conduzione netta di calore nel tessuto, generazione di calore metabolico, effetti di riscaldamento dovuti al flusso sanguigno arterioso.

3.6 Rischi ed effetti collaterali dopo il CXL corneale

La Rf è generalmente considerata un composto sicuro essendo una vitamina ingerita nelle diete ed una molecola presente nei sistemi biologici. Ne consegue che qualsiasi residuo di Rf, o in generale qualsiasi fotoprodotto secreto durante il trattamento, non presenti un rischio pericoloso per il paziente. D'altra parte, bisogna tenere in considerazione il ruolo assunto dalla radiazione ultravioletta UV, la quale rappresenta un potenziale pericolo per l'occhio umano. È noto che i danni fotochimici indotti dalla radiazione ultravioletta (come scottature e foto-cheratiti) sono causati dalla luce UV-B. Tuttavia nel CXL le radiazioni in gioco sono UV-A (370 nm) e il loro assorbimento nella cornea aumenta massicciamente a seguito della procedura per mezzo della Rf, con il risultato di una trasmissione UV-A di solo il 7% attraverso la cornea [72].

La microscopia confocale ha indicato, dopo il trattamento, una scomparsa dei cheratociti (apoptosi) a causa del danno endoteliale foto-ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno, rilasciate dalla Rf irradiata alla lunghezza d'onda di 370 nm. D'altra parte, è stato osservato che la riduzione dei cheratociti nella porzione anteriore e intermedia dello stroma corneale è seguita da un ripopolamento graduale entro i 6 mesi successivi al trattamento di CXL. Se la cornea trattata ha uno spessore minimo di 400 µm (così come raccomandato), l'endotelio corneale, il cristallino e la retina non subiranno danni e le lesioni citotossiche indotte dalla radiazione UV-A. Per tale motivo, risulta necessario fare in modo che la sorgente luminosa fornisca un'irradiazione il più possibile omogenea, evitando punti caldi, che potrebbero danneggiare severamente il tessuto corneale.

Per mezzo di esami topografici è stato riscontrato che la tecnica ha una durata soggettiva e che spesso può essere ripetuta più volte nell'arco della vita del paziente, in quanto il cheratocono tende a progredire ugualmente dopo il trattamento. La definizione di progressione dopo il CXL varia in letteratura; tuttavia, due variabili comuni nelle definizioni sono:

- aumento del massimo potere refrattivo corneale (Kmax) di più di 1 diottria entro 12 mesi;
- riduzione dello spessore corneale minimo più del 5% entro 12 mesi.

Pertanto, il sospetto di progressione del cheratocono potrebbe essere confermato nel corso della malattia.

Nei primi giorni successivi al trattamento il paziente potrebbe avvertire fastidio, spesso associato a lacrimazione, e visione offuscata. Questo avviene – soprattutto nel caso di trattamento con protocollo Epi-off – perché la disepitelizzazione lascia eventuali escoriazioni, cicatrici sulla cornea e quindi comporta disagio. Dopo la fase post-operatoria precoce la cornea tende ad "assestarsi" lentamente nel tempo: se anche la visione torna a valori buoni nel giro di qualche settimana, sono necessari alcuni mesi per apprezzare al meglio il trattamento. Per questa ragione sono necessari ripetuti controlli e cure prolungate che vanno modulate in base ai rilievi clinici e strumentali [73].

Capitolo 4

Analisi clinica e risultati numeri

Con la diffusione del Cross-Linking corneale (CXL) come terapia per il trattamento del KC, sono diventate disponibili più informazioni relative alla risposta corneale intra e postoperatoria a seguito della procedura. Il seguente capitolo riporta i risultati clinici del trattamento con CXL e analizza i dati di 22 pazienti con l'obiettivo di valutare criticamente questo trattamento, esplorare i suoi benefici, evidenziare i limiti in termini di efficacia e sicurezza a lungo termine e infine identificare nuove aree per la ricerca futura. Negli occhi con cheratocono in stadio avanzato sono state valutate misure di pachimetria, topografia, aberrometria – in particolare l'astigmatismo – e misure della miglior acuità visiva corretta (BCVA). I dati relativi all'astigmatismo risultano pertanto fondamentali per valutare la riuscita del trattamento con CXL e dovrebbero essere sempre associati alla valutazione dei dati sul visus. Non bisogna infatti dimenticare che la valutazione dell'efficacia di una qualsiasi terapia si basa sui dati strumentali (da cui non è possibile prescindere) ma si dovrebbe sempre accompagnare alla considerazione di un aspetto più propriamente psicologico, e quindi soggettivo, che caratterizza il processo di guarigione.

4.1 Materiali e metodi

L'analisi clinica da me attuata è stata condotta su pazienti affetti da KC i quali sono stati sottoposti al trattamento di Cross-Linking corneale. I dati sono stati acquisiti per mezzo di un Topografo Corneale Sirius (CSO) presente nel reparto di oculistica dell'Azienda Ospedaliera Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo della città di Alessandria, in un arco temporale compreso tra il 2018 e il 2021. Alcuni pazienti sono stati operati mediante protocolli di CXL *Epi-off* accelerati con alta intensità UV-A (10 mW/cm²) a luce continua, altri invece sono stati trattati seguendo protocolli di CXL *Epi-on con Iontoforesi* corneale ad alta energia in luce continua. La scelta del trattamento, a discrezione del medico, è condotta a seconda dello

stadio evolutivo del cheratocono, della sua progressione e tenendo in considerazione l'età del paziente. Si ricordi infatti che il cheratocono è una patologia lentamente progressiva che insorge durante la pubertà, progredisce fino ai 30-40 anni per poi arrestarsi spontaneamente. Più giovani sono gli individui colpiti, più alto è il loro rischio di una progressione (rapida e pronunciata).

Nel seguente lavoro si è scelto di analizzare i dati di pachimetria, curvatura, astigmatismo e potere diottrico della cornea considerando quattro istanti temporali:

- 1. circa un mese prima dell'intervento di CXL;
- 2. circa 1-3 mesi dopo l'intervento di CXL;
- 3. circa 6-8 mesi dopo l'intervento di CXL;
- 4. circa 10-12 mesi dopo l'intervento di CXL;

L'intento dell'analisi è appunto quello di effettuare un confronto delle condizioni cliniche del paziente prima del trattamento (Pre-op) e nei mesi successivi, al fine di verificare l'effettiva efficacia del CXL, le eventuali complicanze o, ancora, l'evoluzione delle caratteristiche cliniche del cheratocono.

4.1.1 Pazienti e criteri di inclusione/esclusione

L'analisi condotta ha considerato i dati relativi a 22 pazienti (12 maschi e 10 femmine con età media di anni 34,08 +/- 17,52 DS), affetti da cheratocono. Sono stati esaminati complessivamente 24 occhi poiché a due pazienti è stato effettuato un intervento binoculare. Il cheratocono è generalmente binoculare, per cui si presuppone che, nel set di pazienti analizzati la malattia, essendo ancora in una fase iniziale, abbia colpito un solo occhio e che, nelle fasi avanzate, questo risulterà con molta probabilità il più grave dal punto di vista clinico. Il CXL è stato eseguito, in linea generale, in pazienti che presentavano forme di cheratocono in fase refrattiva (stadio 1 e 2) il cui peggioramento è stato accuratamente documentato nei 6 mesi precedenti all'intervento dal punto di vista clinico, topografico, pachimetrico e aberrometrico.

Pazienti trattati	22
Occhi trattati	24
Uomini	12
Donne	10
Età max	75
Età min	13
Interventi monoculari	20
Interventi binoculari	2

Tabella 4.1: Parametri generali dell'analisi condotta

Ai fini di un'analisi statisticamente significativa si è deciso di utilizzare i dati di coloro che abbiano manifestato una progressione clinica e strumentale della patologia nei mesi precedenti alla data di intervento e che si siano presentati alle successive visite di controllo sulla base dei criteri scelti per l'analisi.

4.1.2 Raccolta dei dati e Topografia corneale altimetrica

I dati sono stati acquisiti tramite un Topografo Corneale Sirius (CSO) presente nel reparto di Oculistica dell'ospedale. La topografia è un esame diagnostico non invasivo e indolore in grado di fornire informazioni di pachimetria, elevazione, curvatura e potere diottrico di entrambe le superfici corneali su un diametro di 12 mm. Il topografo è costituito da:

- Dischi di Placido, ovvero cerchi concentrici che vengono proiettati sulla cornea e riflessi dalla stessa;
- 2. Fotocamera 3D rotante Scheimpflug;
- 3. Software di elaborazione delle immagini (Phoenix), un'interfaccia utente, che consente di archiviare i dati dei pazienti al termine di ogni esame.



Figura 4.1: Topografo corneale altimetrico: rappresentazione del dispositivo e dei dischi di placido; a destra rappresentazione della riflessione del pattern luminoso proiettato sulla cornea.

Il dispositivo utilizzato per la seguente analisi, ovvero il Sirius (CSO), è sostanzialmente un topografo a riflessione e dunque si basa sulla proprietà della cornea di comportarsi come uno specchio convesso. Viene collocato un pattern di luci davanti la cornea – dischi di Placido – e acquisendo il riflesso del pattern di luci è possibile identificare la forma della cornea stessa grazie alle distorsioni del pattern originale [73]. A seconda di come vengono riflessi i dischi di Placido (Figura 4.2) il software riesce ad interpretare e a definire quale sia il raggio di curvatura della cornea. Il principio su cui si basa la tecnologia dei dischi di Placido è: minore distanza tra i cerchi riflessi indica zone a maggiore curvatura; maggiore distanza tra i cerchi

riflessi indica zone a maggior appiattimento. La cornea in un soggetto sano presenta una forma '*prolata*' o a collina, ovvero risulta essere più curva nella parte centrale e più piatta nella zona periferica.

L'apparecchio acquisisce l'immagine della cornea del paziente ed elabora una mappa colorata in cui ogni colore corrisponde ad una curvatura della superficie corneale – espressa in diottrie – più o meno accentuata. Le mappe topografiche utilizzano delle scale cromatiche per rappresentare visivamente i risultati in cui, in accordo con la scala Klyce/Wilson, i colori verdi rappresentano il "sea level" (BFS, Best Fit Sphere) ovvero la curvatura in corrispondenza della migliore superficie sferica – presa come riferimento – che approssima quella della cornea; i colori più freddi (azzurro, blu e nero) sono associati a superfici con una curvatura ridotta, più piatte, meno potenti o al di sotto della sfera di riferimento; i colori più caldi (giallo, arancione e rosso) sono associati a superfici con una curvatura accentuata, più curve, più potenti o al di sopra della sfera di riferimento (Figura 4.2).

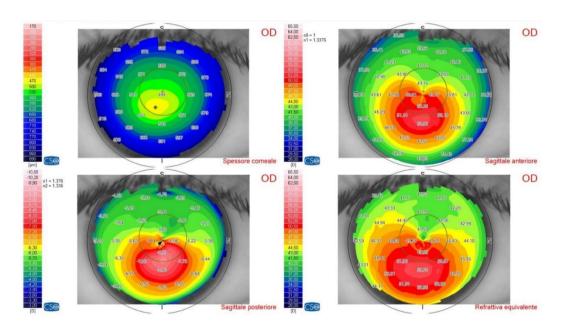


Figura 4.2: Mappe topografiche fornite dal topografo corneale altimetrico.

Per mezzo di una rappresentazione 3D fornita dal software è possibile individuare con maggiore dettaglio le zone a maggiore o minore curvatura e ricostruire l'aspetto tridimensionale della forma e della curvatura corneale (Figura 4.3). Da questa rappresentazione tridimensionale emerge l'asfericità della cornea. Essa, infatti, non è una sfera ideale poiché se fosse tale non riusciremmo ad avere una visione ottimale; al contrario, essendo asferica riesce ad eliminare le aberrazioni e i difetti di vista di altro grado e a fornire una qualità della visione pressoché perfetta.

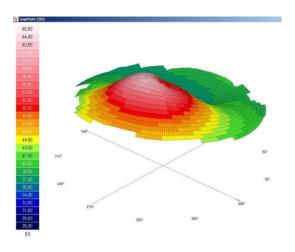


Figura 4.3: Mappa 3D refrattiva sagittale in un caso di cheratocono

4.1.3 Indici topografici e parametri analizzati

Il dispositivo fornisce, oltre alle mappe colorimetriche, dei parametri sintetici quali: indici riassuntivi, letture di curvatura (K), indici di analisi refrattiva (Cyl) e indici di forma per un rapido confronto dei diversi esami nei diversi istanti temporali. Grazie alla combinazione di mappe topografiche e specifici indici con valori normativi, la topografia corneale altimetrica è utile nella diagnosi del cheratocono, nella pianificazione preoperatoria e per scopi di follow-up. Indici topografici forniscono informazioni quantitative sulla superficie della cornea anteriore, a differenza delle mappe colorimetriche che forniscono informazioni qualitative [59]. Le considerazioni nella seguente analisi clinica sono state effettuate sulla base delle mappe topografiche, andando a valutare l'andamento dello spessore e della curvatura sia all'apice che nel punto più sottile, dell'astigmatismo e del BCVA nei 4 istanti di tempo considerati.

4.1.3.1 Spessore all'apice

Lo spessore corneale, detto anche pachimetria, è un parametro importante che prima del trattamento con CXL ci consente di valutare l'effettiva progressione del KC. Una cornea normale presenta uno spessore intorno ai 520-540 μm, mentre sono considerate patologiche cornee con spessore al di sotto dei 470 μm. Tuttavia sono considerati normali anche valori compresi tra 470 e 620 μm. Si riporta per una maggiore comprensione la mappa colorimetrica dello spessore corneale del paziente *X* rilevata un mese prima dell'intervento di CXL. Le zone periferiche presentano uno spessore maggiore, mentre la zona inferotemporale presenta uno spessore minore. Il punto più sottile della cornea (ThkMin, Minimum Thickness) in questo caso studio è 443 μm, tale per cui la cornea risulta essere

patologica. I colori più freddi rappresentano aree più spesse, mentre colori più caldi rappresentano aree più sottili.

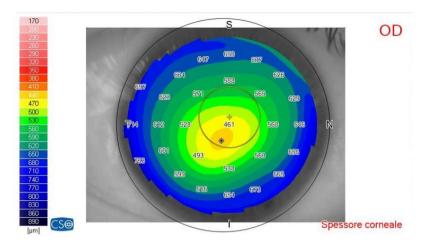


Figura 4.4 Mappa colorimetrica dello spessore corneale. I colori freddi individuano le zone più spesse della superficie corneale, i colori freddi le zone a minore spessore.

4.1.3.2 Curvatura sagittale-anteriore (SA) all'apice

Come già detto le considerazioni affrontate in questo lavoro di tesi sono state effettuate sulla base della curvatura sagittale anteriore della superficie corneale. La sagittale anteriore (SA) misura la curvatura di un punto corneale in direzione assiale rispetto al centro ed approssima il potere rifrattivo medio della cornea. Anche in questo caso per una maggiore comprensione si riporta la mappa colorimetrica sagittale anteriore del generico paziente *Y*, rilevata un mese prima dell'intervento. La mappa evidenzia una curvatura apicale pari a 52,92 D, al di sopra dunque dei valori fisiologici di cheratometria apicale che si approssimano al di sotto delle 47,2 D.

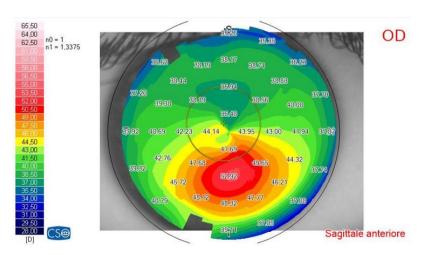


Figura 4.5: Mappa colorimetrica della curvatura sagittale della superficie anteriore della cornea. I colori freddi individuano le zone a minore curvatura, i colori caldi le zone a curvatura maggiore.

4.1.3.3. Astigmatismo (CYL)

Come già ampiamente discusso nel capitolo precedente una conseguenza diretta dello sfiancamento corneale è l'astigmatismo (cilindro). Esso è un difetto di curvatura della cornea che fa sì che la cornea non sia perfettamente sferica e di conseguenza, il potere del diottro oculare non è lo stesso su tutti i meridiani. Da tutto ciò derivano problemi di visione (offuscamento visivo) degli oggetti osservati sia da vicino che da lontano [73]. L'astigmatismo è detto:

- Regolare: se lungo uno stesso meridiano la curvatura è sempre la stessa. L'astigmatismo regolare è quello più diffuso e facilmente correggibile per mezzo di occhiali o LAC, che andranno ad annullare gli effetti di sfocatura derivanti da questa curvatura che si discosta da quella sferica, ideale.
- Irregolare: se la curvatura cambia lungo uno stesso meridiano. È meno frequente e normalmente non è congenito ma acquisito nell'arco della vita. Viene definito "irregolare" in quanto non risulta possibile correggerlo con opportune lenti.

Il cheratocono è l'esempio tipico ed anche la manifestazione più seria di astigmatismo irregolare [73]. Pertanto, il topografo corneale altimetrico effettua anche un'analisi refrattiva, fornendo i valori dell'astigmatismo, in particolare il cilindro (cilynder, *Cyl*). Il cilindro indica la quantità di potenza della lente necessaria per correggere l'astigmatismo. Il numero del cilindro può essere preceduto dal segno meno (per la correzione dell'astigmatismo miope) o dal segno più (per l'astigmatismo presbite). La variabilità del potere astigmatico e dell'orientamento degli assi a diversa distanza dal centro evidenziano infatti una curvatura irregolare – tipica, appunto, del cheratocono.

Maggiore è l'astigmatismo e maggiore sarà la distribuzione cromatica. La mappa cromatica di un astigmatismo regolare assume un aspetto a clessidra orientata verso il meridiano più refrattivo. Nel caso invece di astigmatismo irregolare – come nel caso del cheratocono – ci sono diversi pattern che possono essere visti sia nelle cornee normali che in quelle anormali (Figura 4.6).

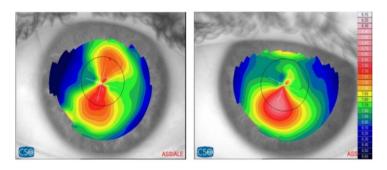


Figura 4.6: Mappe colorimetriche ricavate dall'esame topografico. A sinistra forma a clessidra tipico di un astigmatismo regolare; a sinistra rappresentazione di un astigmatismo irregolare.

Il più importante risultato del Cross-linking è la stabilizzazione della progressiva deformazione corneale. Il rinforzo del collagene corneale comporta una lieve regolarizzazione, ed in alcuni casi anche un miglioramento, dell'astigmatismo che si traduce anche in un lieve miglioramento della vista. In base a quanto detto l'efficacia della terapia può essere valutata sia oggettivamente, in quanto con il CXL diminuisce l'astigmatismo e ciò viene verificato su base strumentale, ma anche dal punto di vista soggettivo si comprende che la sensazione visiva del paziente è migliorata e ciò emerge dall'esame di acuità visiva (BCVA).

4.1.3.4 BCVA: Best Corrected Visual Acuity

Per valutare l'efficacia della terapia di CXL sono stati tabulati anche i valori di BCVA (*Best Corrected Visual Acuity*), ovvero la miglior visione possibile che una persona può raggiungere con lenti correttive, misurata in termini di linee di Snellen su un tabellone luminoso, detto ottotipo. Il valore dell'acuità visiva è stato misurato per tutti i pazienti e ad ogni visita di controllo (pre e post-operatoria). Questa valutazione, comunque, viene fatta su base empirica e non scientifica, in quanto è soggettiva del paziente e può risultare, in certe situazioni, non attendibile.

Nei diversi Paesi l'acutezza visiva è annotata come una frazione, in altri come un numero decimale. Se è annotata come una frazione essa può essere riferita ai metri, piedi o, come nell'analisi condotta in questo lavoro, come una frazione decimale.

Un altro tipo di scala comunemente usata è la LogMAR, che sarebbe l'acronimo di logaritmo in base 10 del minimo angolo di risoluzione (Minimal Angle of Resolution). Il sistema LogMAR è spesso associato ad un diverso sistema di progressione della grandezza degli ottotipi, cioè quello logaritmico. Questa scala è usata molto poco in ambito clinico e molto in ambito di ricerca per le proprietà matematiche e statistiche che possiede. Tabelle ottotipiche espresse in decimi di LogMAR hanno una più graduale variazione delle dimensioni dei simboli. Lo svantaggio della notazione LogMAR è che richiede alcuni calcoli aritmetici per la determinazione esatta e che i valori con notazione negativa sono, contrariamente alle norme, i valori che rappresentano la migliore acuità. Per ovviare a questi problemi, è stato ideato un metodo alternativo per la notazione dell'acuità chiamato VAR (Visual Acuity Rating). Il calcolo del VAR è il seguente: VAR = 100 – (50 * LogMAR). Questa notazione mantiene i vantaggi del LogMAR, ma richiede meno calcoli mentali da parte dell'operatore (Tabella 4.1).

Frazione Valore		Frazione o	di Snellen	LogMAR	Angolo di	VAR
decimale	decimale	in metri	in piedi		risoluzione	
1/10	0,10	6/60	20/200	1,00	10,00	50
1,3/10	0,13	6/48	20/150	0,90	8,00	55
1,6/10	0,16	6/36	20/125	0,80	6,30	60
2/10	0,20	6/30	20/100	0,70	5,00	65
2,5/10	0,25	6/24	20/80	0,60	4,00	70
3/10	0,30	6/20	20/66	0,50	3,30	75
4/10	0,40	6/15	20/50	0,40	2,50	80
5/10	0,50	6/12	20/40	0,30	2,00	85
6/10	0,60	6/10	20/32	0,20	1,66	90
7/10	0,70	6/8,6	20/28	0,14	1,43	93
8/10	0,80	6/7,5	20/25	0,10	1,25	95
9/10	0,90	6/6,7	20/22	0,04	1,11	98
10/10	1,00	6/6	20/20	0,00	1,00	100
11/10	1,10	6/5,5	20/18	-0,04	0,90	102
12/10	1,20	6/5	20/16,6	-0,10	0,83	105
16/10	1,60	6/3,8	20/12	-0,20	0,625	110
20/10	2,00	6/3	20/10	-0,30	0,50	115

Tabella 4.1: Corrispondenza fra le diverse espressioni dell'acutezza visiva e l'angolo di risoluzione

4.1.3.5 Screening del cheratocono

L'esame di topografia corneale con il dispositivo Sirius (CSO) fornisce degli indici, indicativi appunto della presenza o meno del cheratocono. Tra questi indici vi sono:

- LSA (Longitudinal Spherical Aberration): aberrazione sferica longitudinale espressa in diottrie su un'area di cornea del diametro di 4,5 mm. Fornisce un'indicazione sulla forma della cornea, se assume una forma prolata oppure oblata;
- BCV (Baiocchi Calossi Versaci front Index): per mezzo di un'analisi aberrometrica, valuta la presenza e la collocazione di un'ectasia per valutare il rischio di cheratocono. Le cornee normali hanno valori di BCV molto vicini allo 0, ed il valore aumenta progressivamente in base alla presenza di cheratocono sospetto, accertato, e della sua gravità.

Il software presenta una sezione intitolata "Screening del cheratocono", in cui sulla base degli indici precedentemente enunciati, i dati vengono elaborati da una rete neurale al fine di classificare il paziente in uno dei seguenti gruppi:

- Compatibile con la norma
- Sospetto cheratocono
- Compatibile con cheratocono
- Anomalo o trattato

Pochi dati per classificare

4.2 Trattamento

Alcuni centri – come quello dell'ospedale di Alessandria – nei quali si effettua l'intervento di CXL corneale, prevedono di utilizzare una densità di potenza pari a 10 mW/cm² per un tempo di 9 minuti, invece di 3 mW/cm². Tuttavia in entrambe le casistiche l'energia totale emessa dalla sorgente UV-A (circa 370 nm) è di 5,4 J/cm².

Delle 24 cornee analizzate, 19 (79,17%) sono state trattate con protocollo Epi-off, mentre le restanti cornee sono state trattate con la tecnica della Iontoforesi, in cui si utilizza una sorgente che emette raggi UV-A a 10 mW/cm² e si effettua un unico ciclo di irradiazione continuo della durata di 9 minuti.

Le due diverse procedure adottate nella struttura vengono impiegate a seconda del caso clinico e della scelta terapeutica del medico, al fine di raggiunge il migliore risultato clinico ed efficacia dell'intervento. Per una maggiore comprensione del fenomeno si è deciso di classificare i pazienti sia sulla base dell'età che sulla base dello stadio evolutivo del cheratocono.

4.3 Classificazione sulla base dell'età

I pazienti sono stati suddivisi in quattro gruppi in base all'età anagrafica (Figura 4.7):

- Pediatrici: 3 pazienti (13%)
- 18-29 anni: 11 pazienti (46%)
- 30-39 anni: 2 pazienti (8%)
- > 40 anni: 8 pazienti (33%)

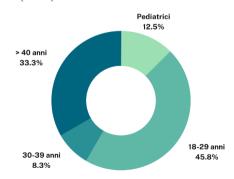


Figura 4.7: Classificazione dei pazienti in base all'età

Una prima, seppur semplice, considerazione che emerge è l'effettiva numerosità del gruppo di pazienti di età compresa tra 18-29, nei quali la progressione della patologia risulta essere più grave e pronunciata. È essenziale cercare, pertanto, di sottoporre i pazienti al CXL in giovane età al fine di arrestare la progressione della patologia prima che peggiori irreversibilmente lasciando come solo opzione il trapianto di cornea. Una fascia di pazienti non irrilevante è quella di età superiore ai 40 anni (33%), nella quale il cheratocono non ha riportato un rallentamento bensì una netta progressione; considerato però che il margine di miglioramento offerto dalla terapia con CXL in questa fascia di età è minore rispetto alle altre, si noti come 5 pazienti su 8 (sopra i 40 anni) siano stati sottoposti al trattamento con protocollo Epi-on con Iontoforesi, data la minore invasività di questa tecnica rispetto all'Epi-off. Con l'aumentare dell'età quindi c'è una diminuzione dei pazienti trattati con Epi-off e un aumento di quelli operati tramite protocollo Epi-on con iontoforesi. Si preferisce la iontoforesi in pazienti più anziani in virtù della quasi totale assenza di deficit visivi nel post-operatorio e del recupero più veloce in pazienti che non possono sospendere l'attivita' lavorativa, e hanno minor rischio di progressione per il fattore età.

4.4 Classificazione sulla base dello stadio evolutivo del cheratocono

Per valutare l'efficacia del trattamento di Cross-Linking corneale è stata effettuata un'ulteriore classificazione che tiene conto dello stadio evolutivo del cheratocono nelle 24 cornee. Nella prima visita di controllo, sulla base dello spessore e della curvatura all'apice, ai pazienti sono stati attribuiti i diversi stati di progressione della malattia secondo la classificazione di Krumeich. In questa analisi i pazienti risultano così distribuiti (Figura 4.8):

- Stadio I: 4 cornee (17 %);
- Stadio II: 8 cornee (33 %);
- Stadio III: 6 cornee (25 %);
- Stadio IV: 6 cornee (25 %).

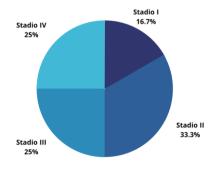


Figura 4.8: Classificazione dei pazienti in base allo stadio evolutivo

Diversamente da come ci si potrebbe aspettare, dato il carattere progressivo della patologia, i gruppi risultano numericamente piuttosto omogenei. Peraltro dall'analisi dei dati risulta come anche un discreto numero di pazienti in età pediatrica sia collocato in uno stadio IV di progressione. Questo è riconducibile al fatto che numerosi sono i fattori che intervengono nella patogenesi del cheratocono e del suo sviluppo: fattori genetici o fattori biomeccanici, quali lo sfregamento degli occhi e l'uso di lenti a contatto, che potrebbero causare un trauma oculare continuato nel tempo.

Di seguito sono riportati i valori numerici medi per i quattro istanti temporali considerati di tutte e 24 le cornee affette da KC.

	PRE-OP	1-3 MESE	6-8 MESI	10-12 MESI
Spessore apice [µm] (mean ± sd)	483,83 ± 41,15	446,33 ± 54,64	$446,25 \pm 52,72$	$453,5 \pm 49,27$
Curvatura apice [d] (mean ± sd)	54,16 ± 64,09	$56,49 \pm 6,04$	$54,38 \pm 4,80$	$54,19 \pm 4,43$
Cilindro [d] (mean ± sd)	$-3,58 \pm 1,71$	$-3,84 \pm 2,12$	$-3,73 \pm 1,74$	$-3,55 \pm 1,77$
BCVA (mean ± sd)	$5,13 \pm 2,07$	$7,00 \pm 1,58$	$8,58 \pm 1,53$	$9,42 \pm 1,19$

Tabella 4.2: Valori medi e relative deviazioni standard (SD) di spessore all'apice, curvatura, astigmatismo e BCVA.

4.5 Valutazione degli effetti del CXL su base strumentale

*** SPESSORE CORNEALE ALL'APICE:**

In relazione all'età

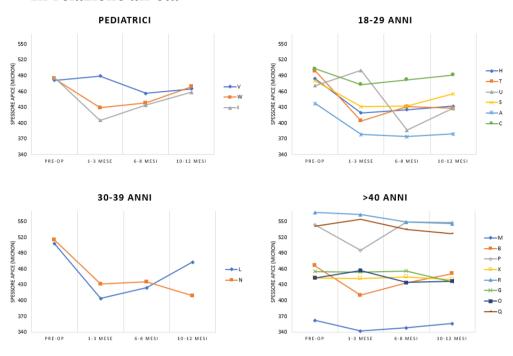


Figura 4.9: Andamento dello spessore all'apice in relazione all'età

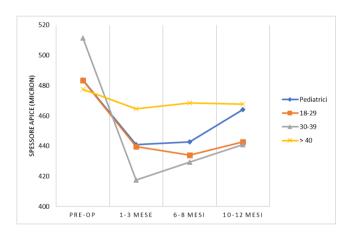


Figura 4.10: Andamento medio dello spessore all'apice in relazione all'età

Dall'analisi dei grafici relativi all'andamento dello spessore corneale nelle diverse classi d'età considerate si evince una sostanziale differenza di comportamento della cornea tra i primi tre gruppi e il gruppo di età superiore ai 40 anni. Questo è essenzialmente legato a due aspetti: in primo luogo alla scelta, nell'ultimo gruppo, di due tecniche di intervento differenti (Epi-off ed Epi-on) rispetto ai primi tre gruppi in cui i pazienti sono stati trattati esclusivamente con tecnica Epi-off; secondariamente, al fatto che maggiore è l'età alla quale

i pazienti si sottopongono a intervento di CXL, minore è la plasticità intrinseca delle fibrille di collagene corneale e quindi la capacità di recupero post-intervento. Il fatto che nel grafico relativo alla corte di età >40 anni gli andamenti si dispongano spazialmente in modo diverso nel grafico non è attribuibile alla metodica di intervento impiegata ma unicamente al fatto che i pazienti partivano da valori di spessore molto diversi tra loro.

In relazione allo stadio evolutivo

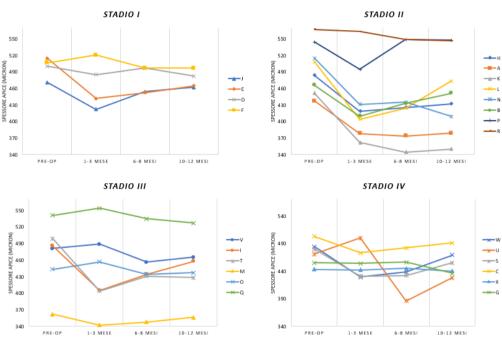


Figura 4.11: Andamento dello spessore all'apice in relazione allo stadio evolutivo

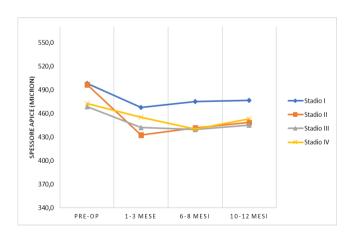


Figura 4.12: Andamento medio dello spessore all'apice in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono

Anche sulla base della suddetta classificazione si evince un comportamento relativamente omogeneo, con una sostanziale riduzione dello spessore corneale all'apice nell'immediato post-operatorio, successivamente seguita da un graduale recupero che tuttavia si mantiene al di sotto del livello di partenza. I pazienti con KC in stadio IV, contrariamente agli altri gruppi, come già descritto nel paragrafo precedente, presentano complessivamente un decremento meno marcato al tempo di osservazione 1-3 mesi, attribuibile alle medesime ragioni di cui sopra. Si noti come, secondo i criteri classificativi della patologia, i pazienti con KC in stadio III e IV sono caratterizzati da valori di spessore all'apice di partenza mediamente più bassi, pertanto più critici, rispetto ai pazienti di stadio I e II.

❖ CURVATURA CORNEALE

In relazione all'età

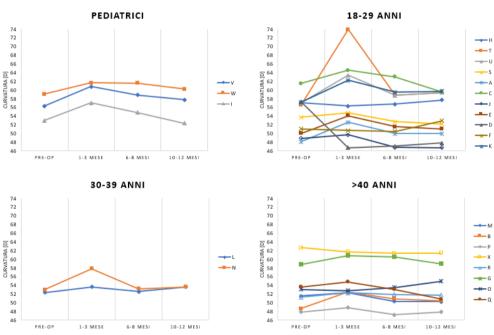


Figura 4.13: Andamento della curvatura corneale all'apice in relazione all'età

Analizzando il comportamento della curvatura corneale nelle diverse classi d'età si nota come il valore in diottrie tenda generalmente ad aumentare nell'immediato post-operatorio (1-3 mesi) per poi subire una graduale diminuzione. Questo fenomeno è imputabile a processi che intervengono a seguito del CXL e sono probabilmente legati al manifestarsi di condizioni di edema corneale transitorio con appannamento visivo (i quali solitamente permangono per 30-60 giorni) o formazione di eventuali cicatrici corneali; infatti, per quanto la tecnica termica del CXL sia considerata minimamente invasiva rispetto ad altre tecniche più tradizionali, essa comporta in ogni caso l'utilizzo di una radiazione ultravioletta i cui

effetti si ripercuotono sui tessuti interessati. Per quanto tali eventualità si risolvano spontaneamente è evidente che le capacità di assestamento della curvatura corneale sono maggiori per la coorte pediatrica per le medesime ragioni di plasticità corneale descritte precedentemente, proprie di una popolazione più giovane rispetto a una via via più anziana.

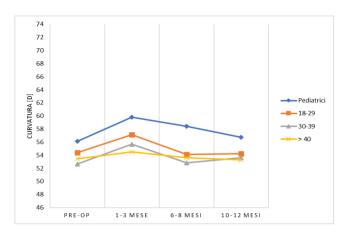


Figura 4.14: Andamento medio della curvatura corneale all'apice in relazione all'età

Il seguente grafico descrive questo concetto confrontando i livelli di curvatura corneale a 1-3 mesi e a 10-12 mesi per ogni sottogruppo. Si noti come la differenza tra i due valori (in grigio) sia maggiore per pazienti più giovani e tende a diminuisca all'aumentare dell'età.

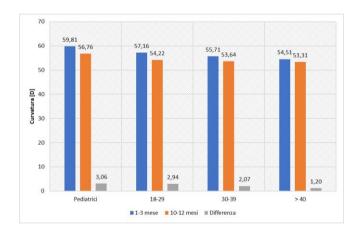


Figura 4.15: Confronto tra i livelli di curvatura corneale a 1-3 mesi e 10-12 mesi per ogni classe di età.

La deduzione emersa anche da altri studi di ricerca – che prescindono da questa analisi clinica condotta presso l'Ospedale di Alessandria – secondo la quale l'ètà sia un fattore determinante per la buona riuscita del trattamento di Cross-Linking corneale è ancora evidente. Come si evince dal grafico in Figura 4.15 i pazienti più giovani sono più inclini a bloccare o far regredire lo sviluppo della malattia, rispetto alle persone di età maggiore di 40 anni nei quali si ha una progressione del cheratocono o un lieve riassorbimento.

In relazione allo stadio evolutivo

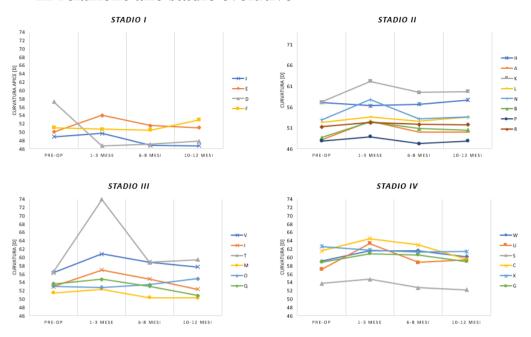


Figura 4.15: Andamento della curvatura corneale all'apice in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono.

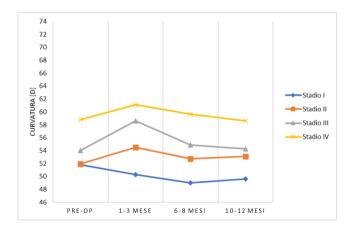


Figura 4.16: Andamento medio della curvatura corneale all'apice in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono

Si noti come anche in questo caso l'analisi ha confermato per i pazienti in stadio II, III e IV un lieve aumento dei valori di curvatura corneale nel post-operatorio (1-3 mesi). I pazienti in stadio I nel complesso hanno presentato un trend diverso al primo tempo di osservazione post-operatorio, in quanto a differenza degli altri gruppi il valore di curvatura decresce.

Come già descritto in precedenza le considerazioni di questa analisi sono state condotte sulla base dei valori di curvatura ricavati dalle mappe topografiche, in quanto essa è il parametro principe per valutazione dell'efficacia del trattamento di CXL corneale. Tuttavia, nonostante l'analisi di questo grafico suggerisce che il trend della curvatura, dopo una iniziale risalita, sia quello di diminuire nel tempo, i dati raccolti non sono sufficienti a registrare una riduzione della curvatura che sia significativa. Per tale ragione sarebbe necessario prolungare questa analisi programmando ulteriori follow-up.

* ASTIGMATISMO In relazione all'età

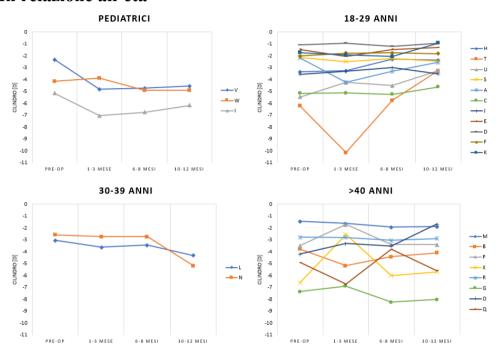


Figura 4.17: Andamento dell'astigmatismo in relazione all'età

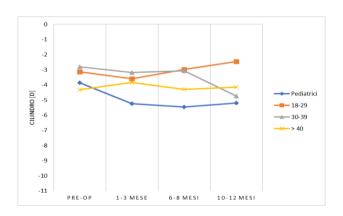


Figura 4.18: Andamento medio dell'astigmatismo in relazione all'età

In relazione allo stadio evolutivo

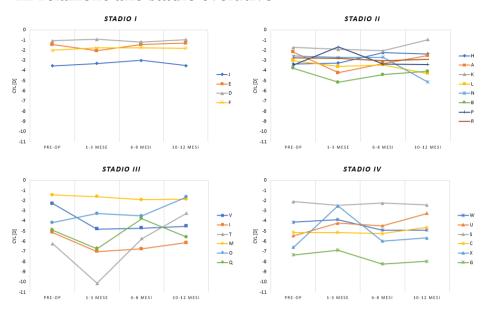


Figura 4.19: Andamento dell'astigmatismo in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono

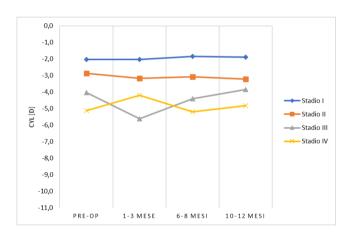


Figura 4.20: Andamento medio dell'astigmatismo in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono

Come descritto precedentemente l'astigmatismo è un parametro che in assenza di alterazioni della vista dovrebbe tendere a 0, e quando si discosta da questo valore assume un connotato di difetto visivo di tipo miope (valori negativi) o presbite (valori positivi). Tutti i dati raccolti si posizionano al di sotto dello 0 e sono pertanto compatibili con un astigmatismo di tipo miope; una loro ulteriore diminuzione corrisponderebbe a un peggioramento dell'astigmatismo miope, mentre un loro aumento corrisponderebbe a un suo miglioramento. Tuttavia, dall'analisi dei dati disponibili suddivisi sia per classi d'età sia per stadio evolutivo della malattia è difficile prevedere l'andamento dei valori nel tempo e per questa ragione si rimanda a una successiva sezione di questo lavoro in cui verranno commentati i valori medi di astigmatismo calcolati sul totale delle cornee ai vari tempi post-operatori.

4.6 Valutazione degli effetti del CXL su base soggettiva

***** BCVA

In relazione all'età

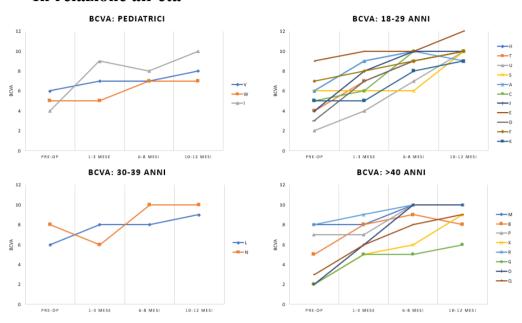


Figura 4.21: Andamento del BCVA in relazione all'età

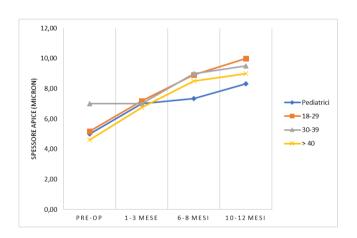


Figura 4.22: Andamento medio del BCVA in relazione all'età

In relazione allo stadio evolutivo

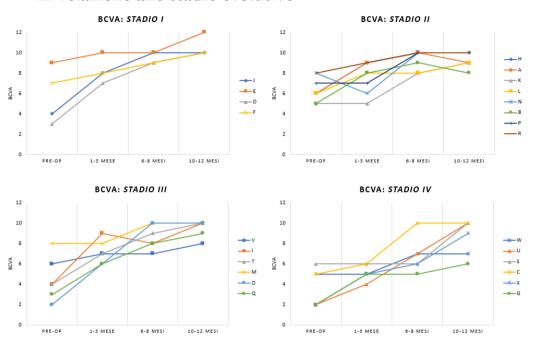


Figura 4.23: Andamento del BCVA in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono

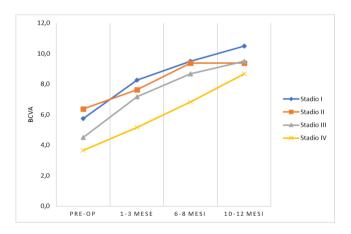


Figura 4.24: Andamento medio del BCVA in relazione allo stadio evolutivo del cheratocono

Analizzando i valori del BCVA sia suddivisi per età che per stadio evolutivo, sia nei grafici individuali sia in quelli che riportano i valori medi, è evidente un importante miglioramento del visus per tutti i pazienti. Ulteriori considerazioni su questo aspetto verranno formulate in una sezione successiva in cui si terrà conto dei risultati medi di tutte le cornee trattate.

4.7 Analisi degli effetti del CXL: andamento generale

Si propongono di seguito i grafici relativi all'andamento medio calcolato su tutte le cornee trattate per ogni parametro precedentemente considerato. In questo studio prospettico sono state messe a confronto le procedure di CXL standard Epi-off e Epi-on con Iontoforesi per un follow-up complessivo di circa 12 mesi.

SPESSORE APICALE ANDAMENTO MEDIO DELLO SPESSORE APICE CONFRONTO TRA EPI-OFF E IONTOFORESI 520 520 471 60 462,20 461 20 471,20 460 446 25 430 430 439.68 442,05 400 400 340 340

Figura 4.25: A sinistra: andamento medio dello spessore corneale all'apice; a destra: confronto tra valori medi di spessore all'apice tra le due tecniche operatorie.

1-3 MESE

Analizzando il grafico a sinistra si comprende come sia la tecnica Epi-off che la tecnica Epi-on con iontoforesi producono una sostanziale riduzione dello spessore corneale dopo 10-12 mesi, che tende successivamente a stabilizzarsi e ad assestarsi per effetto della plasticità collagenica. Il grafico sulla destra, invece, fornisce ulteriori informazioni riguardo gli effetti a breve termine delle due diverse tecniche di intervento: la tecnica Epi-off, comportando l'asportazione chirurgica dello strato più superficiale dell'epitelio corneale, determina una brusca riduzione dello spessore della cornea al primo tempo post-operatorio cui segue successivamente una stabilizzazione. Si ricorda comunque che la valutazione dell'andamento dello spessore corneale, che in questo lavoro viene inserito per completezza, non costituisce un parametro per la verifica dell'efficacia clinica dell'intervento e per questo si rimanda all'analisi dei successivi grafici. Tuttavia, la misura dello spessore all'apice – che non si discosta molto da quello del punto più sottile – può essere un parametro utile, qualora il CXL corneale nel lungo termine non abbia avuto un effetto positivo e quindi si renda necessario ripetere l'intervento per valori di spessore ancora patologici (< 470 μm).

❖ CURVATURA APICALE

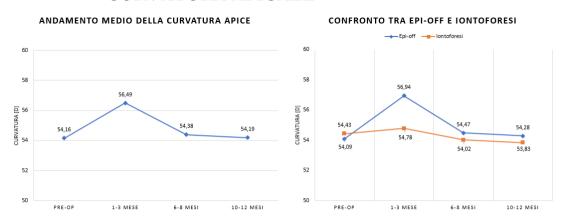


Figura 4.26: A sinistra: andamento medio della curvatura corneale all'apice; a destra: confronto tra valori medi di curvatura corneale all'apice tra le due tecniche operatorie.

Il grafico dell'andamento medio rimarca le considerazioni precedentemente formulate, in quanto si verifica al primo tempo post-operatorio un aumento della curvatura dovuto ad eventuali effetti collaterali iatrogenici che tendono a risolversi spontaneamente nell'arco di 30-60 giorni (edema corneale e cicatrici); nei successivi tempi post-operatori si assiste ad una riduzione della curvatura che va a sottolineare le capacità di adattamento della cornea e la buona riuscita dell'intervento.

Nel grafico a destra si noti come la curvatura segue due andamenti differenti per le diverse procedure chirurgiche. La curva della tecnica Epi-off è caratterizzata al primo tempo post-operatorio da un aumento più marcato della curvatura dovuto proprio alla rimozione dell'epitelio – caratteristico della procedura – e quindi da una maggiore invasività rispetto alla tecnica Epi-on; quest'ultima infatti, consente di ottenere risultati sovrapponibili in termini di curvatura a lungo termine, minimizzando l'aumento iniziale della curvatura tipico della proceduta Epi-off e quindi gli effetti collaterali al paziente.

* ASTIGMATISMO

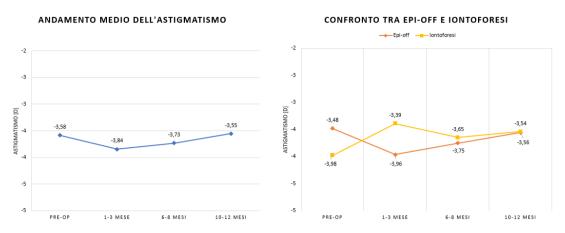


Figura 4.27: A sinistra: andamento medio dell'astigmatismo; a destra: confronto tra valori medi di astigmatismo tra le due tecniche operatorie.

L'astigmatismo è il parametro più importante per la valutazione dell'efficacia del trattamento assieme alla curvatura. Dall'analisi del grafico che presenta l'andamento medio dell'astigmatismo di tutte le cornee trattate, si nota come al primo tempo post-operatorio questo tenda a peggiorare, per poi diminuire e migliorare progressivamente nel corso del tempo. Anche in questo caso sarebbe utile continuare il monitoraggio dei pazienti per comprendere ulteriormente se i valori di astigmatismo possono ulteriormente migliorare oppure tendono ad assestarsi. Analizzando il grafico a destra, invece, si nota come la curva relativa all'astigmatismo nei pazienti trattati con protocollo Epi-off presenti nel postoperatorio un aumento dell'astigmatismo. Questa osservazione è conseguenza della procedura applicata, poiché dal momento che si esegue la rimozione l'epitelio si ha una riduzione della pachimetria e di conseguenza - come riportato in letteratura - un maggiore rischio di sviluppare cicatrici stromali che aumentano l'astigmatismo. La curva relativa alla tecnica Epi-on, invece, dimostra un iniziale miglioramento per poi assestarsi su valori intermedi, comunque confrontabili con quelli raggiunti tramite la procedura Epi-off. Tuttavia, i pazienti sottoposti alla procedura Epi-on con iontoforesi partivano da valori di astigmatismo mediamente peggiori rispetto a quelli trattati con procedura Epi-off, raggiungendo però valori più promettenti a 10-12 mesi dopo il CXL rispetto al secondo gruppo. Per quanto riguarda i pazienti trattati con tecnica Epi-off e l'andamento generale dei due gruppi non si è registrato un sostanziale miglioramento dell'astigmatismo valutato da un punto di vista strumentale. Si segnala però che la valutazione del miglioramento della vista da parte del paziente non è valutabile unicamente da un punto di vista strumentale ma necessita di una metodica che prenda in considerazione l'aspetto soggettivo della percezione visiva del singolo individuo. A questo scopo è utile nonché complementare la valutazione dell'andamento medio del BCVA che segue nel successivo paragrafo.

* BCVA

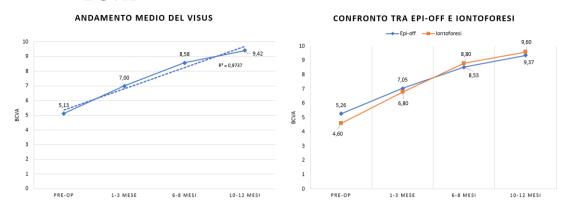


Figura 4.28: A sinistra: andamento medio del BCVA; a destra: confronto tra valori medi di BCVA tra le due tecniche operatorie.

I dati relativi all'astigmatismo per quanto fondamentali per valutare la riuscita del trattamento con CXL, dovrebbero essere sempre associati alla valutazione dei dati relativi al visus (acuità visiva o visus), i quali tengono conto della sensazione visiva del paziente sull'efficacia del trattamento nell'arrestare la progressione del cheratocono. Nonostante i valori medi dell'astigmatismo rimangano sostanzialmente invariati nei 10-12 mesi dopo il CXL rispetto al pre-operatorio, l'andamento medio del visus mostra un netto aumento, chiaro segno di una migliorata percezione visiva. Non bisogna infatti dimenticare che la valutazione dell'efficacia di una qualsiasi terapia si basa sui dati strumentali (da cui non è possibile prescindere) ma si dovrebbe sempre accompagnare alla considerazione di un aspetto più propriamente psicologico, e quindi soggettivo, che caratterizza il processo di guarigione. Dal momento che la maggior parte delle attività svolte dall'essere umano sfrutta la vista come senso principale, a maggior ragione non è possibile escludere il miglioramento della sintomatologia. La considerazione del BCVA risponde esattamente a questa necessità e, assieme al colloquio clinico effettuato col medico ad ogni follow-up, assume un ruolo centrale nella valutazione della riuscita dell'intervento.

Dal grafico che confronta i due gruppi di pazienti trattati con le due procedure differenti, si noti come non emerge una differenza statisticamente significativa in termini di acuità visiva tra le due curve, in quanto entrambi i gruppi mostrano un significativo miglioramento a 12 mesi.

Si riportano per completezza i valori dello stesso parametro convertiti nella scala LogMAR, che come già detto è usata molto poco in ambito clinico e molto in ambito di ricerca per le proprietà matematiche e statistiche che possiede. Tabelle ottotipiche espresse in decimi di LogMAR hanno una più graduale variazione delle dimensioni dei simboli.

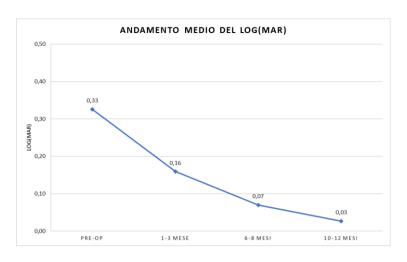


Figura 4.29: Andamento medio del LogMAR

4.7 Conclusioni analisi

- Il cheratocono colpisce entrambi i sessi, anche se non è chiaro se esistano differenze significative tra maschi e femmine. Questo studio non ha trovato differenze nella prevalenza tra i generi.
- L'età è un fattore determinante per quanto riguarda la buona riuscita del trattamento:
 i pazienti giovani sono più inclini a bloccare o far regredire lo sviluppo della
 malattia rispetto alle persone di età maggiore ai 40 anni nei quali si ha una
 progressione del cheratocono o un lieve riassorbimento.
- Lo studio ha riscontrato una prevalenza di pazienti in età compresa tra i 18 e 29 anni, coerentemente con quanto riportato già in letteratura. Questo perché la patologia risulta essere più pronunciata e gravosa in soggetti più giovani, che presentano in relazione proprio all'età una plasticità maggiore delle fibre di collagene.
- I gruppi suddivisi in base allo stadio evolutivo risultano numericamente piuttosto omogenei.
- Numerosi sono i fattori che influiscono sulla buona riuscita del trattamento di CXL, tra questi: fattori genetici o fattori biomeccanici, quali lo sfregamento degli occhi e l'uso di lenti a contatto, che potrebbero causare un trauma oculare continuato nel tempo.
- Con l'aumentare dell'età quindi c'è una diminuzione dei pazienti trattati con Epi-off e un aumento di quelli operati tramite protocollo Epi-on con iontoforesi. Si preferisce la iontoforesi in pazienti più anziani in virtù della quasi totale assenza di deficit visivi nel post-operatorio e del recupero più veloce in pazienti che non possono sospendere l'attivita' lavorativa, e hanno minor rischio di progressione per il fattore età.
- Nello studio lo spessore in linea generale ha presentato una sostanziale riduzione dello spessore corneale all'apice nell'immediato post-operatorio, successivamente seguita da un graduale recupero che tuttavia si mantiene al di sotto del livello di partenza.
- Lo studio ha riscontrato generalmente un aumento della curvatura nell'immediato post-operatorio (1-3 mesi) per poi subire una graduale diminuzione. Nei successivi tempi post-operatori si assiste ad una riduzione della curvatura che va sottolineare le capacità di adattamento della cornea e la buona riuscita dell'intervento.
- Lo studio ha riscontrato un evidente ed importante miglioramento del visus per tutti i pazienti.

- L'efficacia del CXL viene valutata per mezzo di un risultato oggettivo strumentale, fornito dalla misurazione dell'astigmatismo ad ogni istante di tempo considerato, ma anche per mezzo di un risultato soggettivo (psicologico) che tende a evidenziare la sensazione individuale del paziente, pertanto la sua percezione visiva a seguito del trattamento.
- Anche se il visus torna a valori buoni nel giro di qualche settimana, sono necessari
 alcuni mesi per apprezzare al meglio il trattamento. Per questa ragione sono
 necessari ripetuti controlli e cure prolungate che vanno modulate in base ai rilievi
 clinici e strumentali.
- I dati ottenuti dimostrano come la procedura Epi-on con Iontoforesi sia altrettanto valida e, certamente, non inferiore all'Epi-off, in quanto mostra efficacia a lungo termine, minore dolore post-operatorio e ridotti rischi ed infezioni.

4.8 Dati analisi

Pz.	Sesso	Età	Stadio	Tecnica
A	F	24	II	EPI-OFF
В	M	44	II	EPI-OFF
С	M	25	IV	EPI-OFF
D	M	27	I	EPI-OFF
E	M	26	Ι	EPI-OFF
F	M	27	I	EPI-OFF
G	F	63	IV	EPI-OFF
Н	M	19	II	EPI-OFF
I	M	15	III	EPI-OFF
J	F	26	I	EPI-OFF
K	M	29	II	EPI-OFF
L	F	34	II	EPI-OFF
M	M	41	III	IONTO
N	M	35	II	EPI-OFF
0	F	65	III	IONTO
P	F	46	II	EPI-OFF
Q	F	75	III	IONTO
R	F	60	II	IONTO
S	M	21	IV	EPI-OFF
T	F	21	III	EPI-OFF
U	F	21	IV	EPI-OFF
V	M	13	III	EPI-OFF
W	M	13	IV	EPI-OFF
X	F	48	IV	IONTO

		Spess	sore apice		Curvatura apice			
Pz	Pre-op	1-3 mese	6-8 mesi	10-12 mesi	Pre-op	1-3 mese	6-8 mesi	10-12 mesi
A	437,00	378,00	374,00	379,00	48,11	52,57	49,97	49,95
В	466,00	410,00	433,00	451,00	48,64	52,47	50,86	50,46
С	503,00	473,00	482,00	491,00	61,51	64,50	62,98	59,57
D	500,00	485,00	497,00	482,00	57,24	46,72	47,10	47,78
E	515,00	442,00	452,00	465,00	50,07	54,05	51,54	51,02
F	506,00	521,00	497,00	497,00	51,08	50,72	50,50	52,94
G	455,00	454,00	456,00	436,00	58,83	60,87	60,59	59,00
Н	484,00	419,00	425,00	432,00	57,10	56,30	56,73	57,70
I	486,00	405,00	434,00	458,00	52,99	57,00	54,80	52,37
J	471,00	422,00	454,00	462,00	48,90	49,66	46,81	46,72
K	451,00	362,00	344,00	350,00	57,18	62,19	59,51	59,71
L	508,00	404,00	424,00	473,00	52,35	53,62	52,55	53,67
M	362,00	342,00	348,00	356,00	51,52	52,36	50,36	50,25
N	515,00	431,00	435,00	409,00	52,96	57,79	53,16	53,61
0	443,00	457,00	434,00	437,00	53,04	52,75	53,47	54,89
P	544,00	495,00	549,00	548,00	47,85	48,85	47,21	47,86
Q	541,00	554,00	535,00	527,00	53,67	54,77	53,07	50,84
R	567,00	563,00	549,00	546,00	51,27	52,28	51,87	51,74
S	480,00	431,00	432,00	455,00	53,72	54,76	52,68	52,21
Т	499,00	404,00	431,00	428,00	56,61	73,91	58,81	59,43
U	471,00	500,00	386,00	428,00	57,11	63,37	58,77	59,43
V	481,00	489,00	456,00	465,00	56,34	60,81	58,84	57,73
W	484,00	429,00	438,00	469,00	59,07	61,63	61,59	60,17
X	443,00	442,00	445,00	440,00	62,64	61,73	61,34	61,41

		Punto	più sottile		Astigmatismo			
Pz	Pre-op	1-3 mese	6-8 mesi	10-12 mesi	Pre-op	1-3 mese	6-8 mesi	10-12 mesi
A	434,00	376,00	371,00	371,00	-2,19	-4,22	-3,30	-2,53
В	447,00	365,00	390,00	395,00	-3,78	-5,16	-4,41	-4,09
C	496,00	466,00	467,00	481,00	-5,14	-5,13	-5,26	-4,64
D	476,00	475,00	476,00	467,00	-1,08	-0,93	-1,19	-0,95
Е	497,00	466,00	431,00	431,00	-1,46	-2,07	-1,46	-1,31
F	486,00	492,00	480,00	471,00	-2,02	-1,78	-1,75	-1,81
G	448,00	425,00	442,00	424,00	-7,35	-6,88	-8,24	-7,99
Н	461,00	396,00	413,00	414,00	-3,36	-3,27	-2,26	-2,38
I	476,00	386,00	427,00	448,00	-5,14	-7,03	-6,76	-6,16
J	470,00	386,00	419,00	455,00	-3,54	-3,31	-3,00	-3,52
K	432,00	349,00	335,00	339,00	-1,74	-1,93	-2,07	-0,96
L	504,00	395,00	412,00	435,00	-3,03	-3,62	-3,44	-4,30
M	352,00	370,00	345,00	347,00	-1,45	-1,62	-1,92	-1,87
N	501,00	370,00	404,00	364,00	-2,57	-2,72	-2,70	-5,15
0	378,00	421,00	411,00	424,00	-4,17	-3,28	-3,51	-1,66
P	538,00	459,00	523,00	530,00	-3,48	-1,68	-3,39	-3,40
Q	507,00	492,00	493,00	495,00	-4,91	-6,74	-3,79	-5,59
R	539,00	528,00	534,00	533,00	-2,76	-2,80	-3,04	-2,90
S	469,00	399,00	408,00	430,00	-2,12	-2,48	-2,25	-2,44
Т	493,00	384,00	403,00	410,00	-6,24	-10,15	-5,74	-3,27
U	467,00	500,00	366,00	410,00	-5,46	-4,23	-4,49	-3,27
V	471,00	467,00	442,00	455,00	-2,31	-4,81	-4,72	-4,54
W	472,00	412,00	423,00	453,00	-4,12	-3,87	-4,90	-4,90
X	424,00	430,00	428,00	415,00	-6,60	-2,53	-5,99	-5,68

Ъ		,	Visus		LogMAR			
Pz	Pre-op	1-3 mese	6-8 mesi	10-12 mesi	Pre-op	1-3 mese	6-8 mesi	10-12 mesi
A	6,00	9,00	10,00	9,00	0,20	0,04	0,00	0,04
В	5,00	8,00	9,00	8,00	0,30	0,10	0,04	0,10
С	5,00	6,00	10,00	10,00	0,30	0,20	0,00	0,00
D	3,00	7,00	9,00	10,00	0,50	0,14	0,04	0,00
E	9,00	10,00	10,00	12,00	0,04	0,00	0,00	-0,10
F	7,00	8,00	9,00	10,00	0,14	0,10	0,04	0,00
G	2,00	5,00	5,00	6,00	0,70	0,30	0,30	0,20
Н	6,00	9,00	10,00	10,00	0,20	0,04	0,00	0,00
I	4,00	9,00	8,00	10,00	0,40	0,04	0,10	0,00
J	4,00	8,00	10,00	10,00	0,40	0,10	0,00	0,00
K	5,00	5,00	8,00	9,00	0,30	0,30	0,10	0,04
L	6,00	8,00	8,00	9,00	0,20	0,10	0,10	0,04
M	8,00	8,00	10,00	10,00	0,10	0,10	0,00	0,00
N	8,00	6,00	10,00	10,00	0,10	0,20	0,00	0,00
O	2,00	6,00	10,00	10,00	0,70	0,20	0,00	0,00
P	7,00	7,00	10,00	10,00	0,14	0,14	0,00	0,00
Q	3,00	6,00	8,00	9,00	0,50	0,20	0,10	0,04
R	8,00	9,00	10,00	10,00	0,10	0,04	0,00	0,00
S	6,00	6,00	6,00	10,00	0,20	0,20	0,20	0,00
Т	4,00	7,00	9,00	10,00	0,40	0,14	0,04	0,00
U	2,00	4,00	7,00	10,00	0,70	0,40	0,14	0,00
V	6,00	7,00	7,00	8,00	0,20	0,14	0,14	0,10
W	5,00	5,00	7,00	7,00	0,30	0,30	0,14	0,14
X	2,00	5,00	6,00	9,00	0,70	0,30	0,20	0,04

Capitolo 5

Questioni irrisolte sul CXL e sviluppi futuri

5.1 Il ruolo dell'ossigeno nel CXL corneale

Il ruolo dell'ossigeno nel Cross-Linking corneale è ancora oggi oggetto di acceso dibattito scientifico; tuttavia, deve essere preso in considerazione durante una procedura di CXL, soprattutto quanto si sviluppano nuovi protocolli di trattamento.

Quando viene esposta ai raggi UVA, la Rf viene rapidamente foto-degradata e convertita nei suoi derivati ossidati, alcuni dei non bloccano più i raggi UVA e sono inattivi nel processo CXL. L'efficacia del processo CXL e la protezione dell'endotelio dipendono dalla riboflavina attiva e non degradata nella cornea. Pertanto, le attuali procedure CXL richiedono l'applicazione ripetuta di Rf durante l'esposizione agli UVA. La reazione di fotodegradazione è guidata dall'interazione dell'ossigeno stromale corneale, della riboflavina e dell'irradiazione UVA e può avvenire per mezzo di due meccanismi:

- Meccanismo di Tipo I: si sviluppa in condizioni ipossiche o anaerobiche. Il prodotto
 finale della reazione è il perossido di idrogeno che determina l'ossidazione del
 substrato, risulta essere meno efficace nella formazione di legami chimici tra e
 fibrille di collagene e risulta essere potenzialmente citotossico.
- Meccanismo di Tipo II: si sviluppa in condizioni aerobiche e ha come prodotto finale l'ossigeno singoletto (${}^{1}\theta_{2}$) che lega le fibre di collagene, evitando la formazione di prodotti tossici.

Questo ruolo fondamentale dell'ossigeno è stato inizialmente proposto da McCall et al [73] che teorizzarono che l'efficace del CXL corneale fosse direttamente correlata alla presenza dell'ossigeno singoletto. Nel loro studio la sodio azide è stata usata per spegnere l'ossigeno singoletto, con conseguente diminuzione dell'irrigidimento delle cornee di squalo e coniglio

dopo il CXL. Tuttavia, lo studio è stato messo in discussione poiché la sodio azide non andava a "spegnere" solo l'ossigeno singoletto ma anche altri radicali, tra cui la riboflavina tripletto.

Attualmente, il meccanismo più plausibile per il CXL corneale postula che durante l'esposizione UVA continua standard, le condizioni aerobiche esistono per meno di un minuto di esposizione UVA, generando un CXL sicuro, guidato dall'ossigeno singoletto e altre specie di ossigeno reattivo meno tossiche (meccanismo di tipo II). Dopo l'esposizione iniziale, l'irradiazione continua di UVA esaurisce l'ossigeno stromale e la reazione del CXL passa al meccanismo di tipo I, basandosi sulla reazione tra perossido di idrogeno tossico e riboflavina tripletto. Questo modello spiega il fallimento delle procedure A-CXL quando vengono utilizzate energie più elevate (>20 mW/cm²), poiché l'ossigeno si esaurisce rapidamente e la sua ridiffusione stromale è impedita. La soluzione clinica proposta, per far pronte a tali problemi e consentire una maggiore diffusione della riboflavina a livello stromale, è rappresentata dall'impiego di luce pulsata. Tuttavia un lavoro presente in letteratura [74] [58] nel protocollo a luce pulsata ha individuato un maggiore effetto apoptotico. Pertanto, sono necessari ulteriori studi sul ruolo dell'ossigeno durante la proceduta di Cross-Linking corneale.

5.2 CXL custom fast

Nonostante gli ottimi risultati ottenuti per mezzo del trattamento con il Cross-Linking corneale, in alcuni pazienti è stato osservato un'evoluzione delle caratteristiche cliniche del cheratocono. Ciò potrebbe portare ad ipotizzare come numerosi sono i passi ancora da percorrere per migliorare la procedura e consentire una migliore regolarizzazione del profilo corneale. A tal proposito recenti studi hanno messo in risalto come un protocollo di CXL ottimale, senza la rimozione dell'epitelio, sia quello definito cfCXL, *Custon Fast Corneal Cross-Linking*. Si tratta di un protocollo "topo guidato" o rifrattivo che per mezzo di algoritmi di irraggiamento customizzati permette una regolarizzazione personalizzata del profilo corneale e una riduzione dell' astigmatismo irregolare, che caratterizza il cheratocono. Il software in maniera specifica e personalizzata per il singolo paziente è in grado sulla base di alcuni parametri pre-acquisiti – curvatura all'apice, spessore del punto più sottile – di calcolare automaticamente il diametro del fascio UV-A, l'intensità e il tempo di esposizione [58]. Contrariamente alle altre procedure che sono essenzialmente su base empirica, nel cf-CXL la scelta dell'intensità del fascio e tempo di irraggiamento si basa su modelli sperimentali e sulla variazione delle proprietà biomeccaniche acquisite durante la

prima visita di controllo. Nonostante tale protocollo "topo guidato" sia recente, ha mostrato risultati ottimale, nonché migliori, rispetto dalla procedura standard e fatto emergere come il CXL corneale non sia energia dipendente ma intensità dipendente.

5.3 Conclusione sul CXL

Sulla base dei diversi studi controllati e randomizzati presenti in letteratura, effettuati negli ultimi anni, si può affermare che il Cross-Linking mediato da riboflavina e raggi UVA è in grado di arrestare la progressione del cheratocono. La procedura CXL ideale dovrebbe essere altamente efficace dal punto di vista clinico, sicura e standardizzata e comportare un disagio e un tempo di recupero minimi per il paziente. Esaminando la letteratura, questi requisiti possono essere soddisfatti, indipendentemente dal protocollo utilizzato se:

- 1. si ottiene un adeguato carico stromale omogeneo di riboflavina;
- 2. si mantiene un'adeguata trasmissione relativamente libera della radiazione UVA attraverso lo stroma:
- 3. si promuove un'adeguata ridiffusione di ossigeno evitando lo spostamento della reazione verso un Meccanismo di Tipo I.

Ulteriori ricerche in corso in quest'area sono fondamentali per massimizzare i risultati del Cross-Linking corneale e limitare le complicazioni. In particolare, la pubblicazione di linee guida aggiornate sulle controindicazioni della procedura, possono essere uno strumento estremamente utile per aiutare a mitigare le complicazioni postoperatorie che minacciano la vista.

Appendice

Tavola riassuntiva delle caratteristiche fisiche del I. diottro oculare emmetrope

INDICI DI RIFRAZIONE

Aria	1,000294
Film lacrimale	1,34
Cornea	1,376
Acqueo e Vitreo	1,336
Cristallino	1,4085
Complessivo	1,479

RAGGI DI CURVATURA [mm]

	Riposo	Accomodazione
<u>Cornea</u>		
Superficie anteriore	7,8	
Superficie posteriore	6,8	
<u>Cristallino</u>		
Superficie anteriore	10	5,33
Superficie posteriore	-6	-5,33

POTERI DIOTTRICI [D]

Film lacrimale	43,553
Superficie anteriore	4,615
Totale superficie anteriore	48,168
Superficie posteriore	-5,8
Potere diottrico totale	42,67
<u>Cristallino</u>	
D 4 1' 44 ' 4 4 1	10 1003

Potere diottrico totale 19,1883 33,77

CARATTERISTICHE COMPLESSIVE DEL DIOTTRO OCULARE

Potere diottrico [D]	61,478	76
I distanza focale [mm]	16,2	13,161
II distanza focale [mm]	24	19,46
Punto prossimo		12,7
Punto remoto	infinito	

II. Malattie riportate in associazione al cheratocono

In studio clinico sul cheratocono condotto negli Stati Uniti da Yaron e Rabinowitz nel 1998 sono state evidenziate le possibili associazioni di ulteriori patologie al cheratocono [54]. Di seguito sono elencate le patologie riscontrate nello studio clinico.

Disturbi multisistemici

Sindrome di Alagille

Malattia di Albers-Schonberg

Sindrome di Angleman

Sindrome di Apert

Anetodermia

Sindrome di Bardet-Biedl

Sindrome di Crouzon

Sindrome di Down

Sindrome di Ehlers-Danlos

Sindrome di Goltz-Gorlin

iperornitinemia

Sindrome di Kurz

Sindrome Laurence-Moon-Bardet-Biedl

Sindrome di Marfan

Sindrome di Mulvihil-Smith

Sindrome della patella del chiodo

Angiomatosi neurocutanea

Neurofibromatosi

Sindrome di Noonan

Osteogenesi imperfetta

Displasia oculo-dento-digitale

Sindrome di Rieger

Sindrome di Rothmund

Malattia di Tourette

Sindrome di Turner

Xeroderma pigmentoso

Altri disturbi sistemici

Displasia congenita dell'anca
False corde tendinee del ventricolo sinistro
Ipermobilità articolare
Prolasso della valvola mitrale
Retinopatia da morbillo
Ipertensione oculare
Sindrome di Thalesselis

Disturbi oculari (non corneali)

Aniridia Anetoderma e cataratta subcapsulare bilaterale Coloboma maculare bilaterale Sclera blu Cataratta congenita
Anomalie ectodermiche e mesodermiche
Sindrome delle palpebre flosce
Iridoschisi
Amaurosi congenita di Lebers
Membrana pupillare persistente
Lenticono posteriore
Retinite pigmentosa
Sindrome di Marfan
Fibroplasia retrolentale
Congiuntivite Vernale

Disturbi della cornea

Cheratocongiuntivite atopica
Anomalia di Axenfeld
Distrofia di tipo Avellino
Sindrome di Chandler
Amiloidosi corneale
Distrofia corneale filiforme profonda
Atrofia essenziale dell'iride
Distrofia corneale di Fleck
Distrofia corneale di Fuchs
Disgenesi iridocorneale
Distrofia dei reticoli
Microcornea
Degenerazione marginale pellucida
Distrofia polimorfa posteriore
Degenerazione marginale di Terriens

III. Segni clinici del cheratocono

SEGNI ESTERNI

- Segno di Munson
- Fenomeno Rizzuti

RISULTATI DELLA LAMPADA A FESSURA

- Assottigliamento stromale
- Linee di stress posteriori (strie di Vogt)
- Anello di ferro (anello di Fleischer)
- Cicatrici epiteliali o subepiteliali

SEGNI DI RETROILLUMINAZIONE

- Forature alla retinoscopia
- Segno delle gocce d'olio ("Charleaux")

SEGNI DI FOTOCHERATOSCOPIA

- Compressione delle piaghe inferotemporali
- Compressione delle mire inferiormente o centralmente

SEGNI DI VIDEOCHERATOGRAFIA

- Aumento del potere superficiale localizzato
- Asimmetria diottrica inferiore superiore
- Inclinazione relativa degli assi radiali più ripidi sopra e sotto il meridiano orizzontale

Bibliografia

- [1] G. C. Balboni, A. Bastianini, E. Brizzi e P. Motta, *Anatomia Umana* vol. 3 Sistema Nervoso, Milano: Edi.Ermes, 2004.
- [2] Medicina per tutti: il sito per gli studenti di medicina e chirurgia, *Apparato della vista*. Sito web: https://www.medicinapertutti.it/argomento/apparato-della-vista/. Data ultima modifica: 13/09/2021.
- [3] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Occhio*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Occhio. Data ultima modifica: 23/04/2021.
- [4] A. Lucente, *Cenni di anatomia e fisiologia oculare*. Sito web: https://www.amedeolucente.it/pdf/Dispensa-anatomia.pdf.
- [5] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: Sclera. Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/sclera.html. Data ultima modifica: 20/09/2019.
- [6] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: *Cornea*. Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/cornea.html. Data ultima modifica: 12/02/2020.
- [7] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: *Cross-Linking Corneale (CXL)*. Data ultima modifica: 13/02/2020.

 Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute/cross-linking-corneale.html.
- [8] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: *Uvea*. Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/uvea.html.
- [9] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: *Retina*. Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/retina.html. Data ultima modifica: 20/01/2020.
- [10] M. E. Carrabetta, *Focus Healthy ageing: Strategie per il benessere dell'occhio*. Sito web: https://www.researchgate.net/publication/319665538_Focus_Healthy_ageing. Data ultima modifica: 03/2017
- [11] L. Bianchi, *Conosciamo insieme l' anatomia della retina*. Sito web: https://www.occhi.net/conosciamo-insieme-l-anatomia-della-retina/. Data ultima modifica: 16/06/2020.
- [12] G. Brusasco, «Occhio & Benessere: Anatomia». Sito we: http://www.occhioebenessere.it/anatomia/.
- [13] Wikipedia, l'enciplomedia libera, *Spettro elettromagnetico*. Sito web: Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Spettro_elettromagnetico. Data ultima modifica: 03/04/2021.
- [14] European Chemistry Thematic Network, *La luce e la materia*. Sito web: http://www.whatischemistry.unina.it/it/lucecolor.html.
- [15] R. Cocomazzi, La stimolazione dei fotocettori della retina e il percorso della luce, Bald Mountain Science.
 - Sito web: http://www.bmscience.net/blog/la-stimolazione-dei-fotocettori-della-retina-e-il-percorso-della-luce/. Data ultima modifica: 07/05/2020.
- [16] C. Salesse, Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle

- visuel,» Journal Français d'Ophtalmologie, pp. 239-250, 03 2017.
- [17] V. Graziola, *Il meccanismo della visione*, Occhio alla fisica.

 Sito web: https://valentinagraziola.wixsite.com/occhioallafisica/il-meccanismo-della-visione.
- [18] R. Auriemma, *Relazione tra ametropie e geometrie*, Tesi dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", 2018.
- [19] T. K. Derek W. Del Monte, Anatomy and physiology of the cornea, *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, vol. 37, n. 3, pp. 588-598, 2011.
- [20] M. S. Sridhar, Anatomy of cornea and ocular surface, *Indian Journal of Ophthalmology*, vol. 66, n. 2, pp. 190-194, 2018.
- [21] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Leucoma*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Leucoma. Data ultima modifica: 18/12/2016.
- [22] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Cornea*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Cornea. Data ultima modifica: 14/11/2020.
- [23] P. Rama, *Anatomia della cornea*. Sito web: vailable: https://www.paolorama.it/anatomia-cornea/.
- [24] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Lamina di Bowman*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Lamina_di_Bowman. Data ultima modifica: 21/06/2019.
- [25] M. Torriani, Cornea: cos'è, anatomia, funzioni, principali patologie, trattamenti e cure, Melarossa.
 Sito web: https://www.melarossa.it/salute/cornea/. Data ultima modifica: 21/04/2021.
- [26] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Membrana di Descemet*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Membrana_di_Descemet. Data ultima modifica: 28/01/2020.
- [27] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Collagene*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Collagene.
- [28] J. Ma, Y. Wang, P. Wei e V. Jhanji, «Biomechanics and Structure of the Cornea: Implications and Association with Corneal,» *Survey of Ophthalmology*, 21 04 2018.
- [29] D. F. Holmes, Y. Lu, T. Starborg e K. E. Kadler, «Collagen Fibril Assembly,» in *Current Topics in Developmental Biology*, Elsevier Inc., 2018, pp. 107-142.
- [30] E. Soriano e D. Conti, «Effetto del cross-linking terapeutico sulla biomeccanica corneale: indagine sperimentale in-vitro e modellazione numerica», Tesi del Politecnico di Milano, 2019.
- [31] Wikipedia, l'enciclopedia libera, *Diffrazione dei raggi X*. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Diffrazione_dei_raggi_X. Data ultima modifica: 04/05/2021.
- [32] K. M. Meek e R. H. Newton, «Organization of Collagen Fibrils in the Corneal Stroma in Relation to Mechanical Properties and Surgical Practice,» *J. Refract. Surg.*, n. 15, p. 695–699, 1999.
- [33] A. Pandolfi e G. A. Holzpfel, «Three-Dimensional Modeling and Computational Analysis of the Human Cornea Considering Distributed Collagen Fibril Orientations,» *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 120, n. 061006, 2008.
- [34] S. Villani, «Oftalmometrologia, potere diottrico dell'occhio e adnexa oculi,». Sito web: http://www.aiocitalia.com/files/Dispense-Villani.pdf.
- [35] G. Del Monte, «Anatomia, fisiologia e fisiopatologia della cornea». Sito web: http://www.gaudiosodelmonte.it/anatomia/cornea.htm.
- [36] C. Knupp e K. M. Meek, «Corneal structure and transparency,» Elsevier, 2015.
- [37] A. Parrozzani, «Ottica oftalmica e fisiopatologia della refrazione,».

- Sito web: http://www.oculistanet.it/ottica-fisiop/ottica-fisiop-6.htm. [Consultato il giorno 09/10/2021].
- [38] Wikipedia, l'enciclopedia libera, «*Accomodazione*». Data ultima modifica: 14/05/2021. Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Accomodazione. [Consultato il giorno 13/10/2021].
- [39] M. R. Prausnitz e J. S. Noonan, «Permeability of Cornea, Sclera, and Conjunctiva: A Literature Analysis,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 87, n. 12, p. 12, 1998.
- [40] D. P. Piñero e N. Alcón, «Corneal biomechanics: a review,» *Clinical and Experimental Optometry*, n. 16, pp. 98-107, 2104.
- [41] A. Lucente, Argomenti di diagnosrica strumentale e oftalmologia clinica, Palermo: Edizioni Danaus, 2021.
- [42] A. Elsheikh, P. Rama e D. Alhasso, «Assessment of the epithelium's contribution to corneal biomechanics,» *Informa Healthcare*, n. 451, 2007.
- [43] J. Last, P. Nealey, C. Murphy e S. Liliensiek, «Determining the mechanical properties of human corneal basement membranes with atomic force microscopy,» *J Struct Biol*, pp. 19-24, 2009.
- [44] G. Orssengo e D. Pye, «Determination of the true intraocular pressure and modulus of elasticity of the human cornea in vivo,» *Bull Math Biol*, pp. 551-572, 1999.
- [45] K. Anderson, A. El-Sheikh e T. Newson, «Application of structural analysis to the mechanical behaviour of the cornea,» *The Royal Society*, n. 1, pp. 3-15, 2004.
- [46] A. Lucente e A. Manganotti, *«Alcuni segni clinici che indentificano il cheratocono»*. Sito: https://amedeolucente.it/public/2%20Segni%20clinici%20del%20cheratocono.pdf. [Consultato il giorno 22 09 2021].
- [47] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: *Pachimetria*. Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute/pachimetria.html. Data ultima modifica: 12/02/2020.
- [48] Humanitas Gavezzeni, «*Tomografia corneale*». Sito web: https://www.gavazzeni.it/visite-esami/tomografia-corneale-pentacam/.
- [49] G. Bertelli, MyPersonalTrainer: *Cheratocono*. [Online]. Sito web: https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/cheratocono.html. Data ultima modifica: 12/02/2020. [Consultato il giorno 02/10/2021].
- [50] Wikipedia, l'enciclopedia libera, «*Cheratocono*». Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Cheratocono. Data ultima modifica: 03/07/2021.
- [51] M. R. Jiméneza, J. S. Rubid e J. S. Wolffsohn, «Keratoconus: A review» *British Contact Lens Association, Published by Elsevier Ltd.*, vol. 33, pp. 157-166, 2010.
- [52] A. Pearson, B. Soneju e J. Sandfors-Smith, «Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus?,» *Royal College of Ophthalmologists*, vol. 8, n. 14, pp. 625-628, 2000.
- [53] Humanitas Research Hospital, *«Cheratocono»*Sito web: https://www.humanitas.it/malattie/cheratocono/. [Consultato il giorno 22/09/2021].
- [54] S. Yaron e M. Rabinowitz, «Keratoconus,» Survey of Ophthamology, vol. 42, n. 4, 1998.
- [55] S. Wilson, Y. He e J. Weng, «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*, n. 62, 1996.
- [56] Ospedale Oftalmico di Roma, Policlinico "Umberto I", «Cheratocono percorso diagnostico terapeutico assistenziale». Data ultima modifica: 11/2012. Sito web: https://archivio.forumriskmanagement.it/images/FORUMRISK11/LABORATORIO-

- PDTA/REGIONI/LAZIO/oftalmico-policlinico_cheratocono.pdf. [Consultato il giorno 12/10/2021].
- [57] C. Mazzotta, «Tecnica di cura del Cheratocono». Sito web: http://www.mazzottacosimo.com/cross-linking/. [Consultato il giorno 12/10/2021].
- [58] SOI (Società Oftalmologica Italiana Associazione Medici Oculisti Italiani), *Cross-Linking Corneale*, Milano: FGE S.r.l., 2018.
- [59] S. Francia, «Cheratocono: problematiche cliniche, diagnostiche e terapeutiche in relazione alle proprietà fisiche della cornea», Tesi di Laurea Magistrale, Politecnico di Torino, 2018.
- [60] Wikipedia, l'enciclopedia libera, «Riboflavina». Sito web: https://it.wikipedia.org/wiki/Riboflavina. Data ultima modifica: 05/10/2021. [Consultato il giorno 21/10/2021].
- [61] M. B. Sinjab e A. B. Cummings, «Fundamentals of Corneal Cross Linking,» in *Corneal Collagen Cross Linking*, Springer, 2017, pp. 63-86.
- [62] P. Maier, M. Kohlhaas e T. Reinhard, «Corneal Collagen Cross-Linking in the Stabilization of Keratoconus,» *Deutsches Ärzteblatt International*, n. 116, pp. 184-190, 2019.
- [63] C. Mazzotta, A. Balestrazzi e C. Traversi, «Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans,» in *Cornea*, 2007, p. 390–397..
- [64] T. Seiler e F. Hafezi, «Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line,» in *Cornea*, 2006, p. 1057–1059.
- [65] SOI Società Oftalmologica Italiana, «Scheda informativa per intervento di UV-A Cross-Linking Corneale (CXL),» Ultimo aggiornamento: Febbraio 2019.
- [66] C. B. Evangelista e K. M. Hatch, «Corneal Collagen Cross-Linking Complications,» Seminars in Ophthalmology, 2017.
- [67] InVistaCenter, «Cross linking con ionoforesi». Sito web: https://www.invistacenter.com/cross-linking-ionoforesi/.
- [68] A. Caporossi, A. Villano, O. Caporossi e C. Mazzotta, «Volumetric Corneal Crosslinking: Current Possibilities and Depth of Treatment. In: Advances in Corneal Disease,» Avid Science, 2017.
- [69] S. Gelosa, «Legge di Lambert e Beer,» Enciclopedia Italiana Treccani. Sito web: https://www.treccani.it/enciclopedia/legge-di-lambert-e-beer_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/.
- [70] L. Spadea e R. Mencucci, «Transepithelial corneal collagen cross-linking in ultrathin keratoconic corneas,» *Clinical Ophthalmology*, n. 6, pp. 1785-1792, 2012.
- [71] C. Caruso, R. L. Epstein e L. Pacente, «Customized Corneal Cross-Linking: A Mathematical Model,» *Basic Investigation*, vol. 36, n. 5, pp. 600-604, 2017.
- [72] M. Gkika e G. Labiris, «Corneal collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A irradiation: a review of clinical and experimental studies,» *Int Ophthalmol*, vol. 31, pp. 309-319, 2011.
- [73] A. McCall, S. Kraft, H. Edelhauser e et al., «Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA),» *Invest Opthalmol Vis Sci.*, pp. 51-129, 2010.
- [74] C. Mazzotta, C. Traversi, S. Cargiuli e et al., «Pulsed vs continuous light accelerated corneal collagen crosslinking: in vivo qualitative investigation by confocal microscopy and corneal OCT.,» vol. 28, n. 10, pp. 1179-1183, 2014.