



**Politecnico  
di Torino**

## Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica  
A.A. 2022/2023  
Sessione di Laurea Ottobre 2023

# **Cross-linking: risposta elastica corneale a sollecitazioni termiche**

Relatori:

Prof. Umberto Lucia

Candidati:

Francesca Deriu

Correlatori:

Ing. Giulia Grisolia

Dott.ssa Mariarosa Astori

# INDICE

ABSTRACT	4
INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 1: Anatomia e fisiologia dell'apparato visivo	6
1.1 Struttura dell'occhio	6
1.1.1 Il contenuto dell'occhio: umor acqueo, umor vitreo e cristallino	11
1.2 Forze agenti nel sistema oculare e pressione intraoculare	14
1.3 Generalità sul processo di visione e cenni di ottica fisiologica	15
1.3 Difetti visivi	19
CAPITOLO 2: La cornea	23
2.1 Struttura anatomica	24
2.1.1 Composizione	26
2.1.2 Orientamento delle fibre di collagene	28
2.2 Geometria corneale	30
2.2.1 Geometria cornea sana	30
2.3 Potere di rifrazione della cornea	34
CAPITOLO 3: Cheratocono e Cross-Linking corneale	37
3.1 Cheratocono: epidemiologia, istopatologia, eziologia e sintomatologia.	38
3.2 Cheratocono: diagnosi, classificazione e trattamento.	40
3.3 Cross-linking: principi base	45
3.3.1 Il ruolo della Riboflavina	47
3.4 Cross-linking: procedure di intervento	49
3.4.1 Cross-linking transepiteliale con iontoforesi ( <i>i-Epi-On</i> )	51
3.5 Cross-linking: emettitore di raggi UV	54
CAPITOLO 4: Topografia corneale	59
4.1 Mappe topografiche	65
4.2 Indici topografici	69
4.2.1 Indici di sommario	70
4.2.2 Cheratometrie	70
4.2.3 Asfericità Corneale	71
4.2.4 Analisi refrattiva	72
4.2.5 Screening del cheratocono	72
CAPITOLO 5: Risposta meccanica corneale al trattamento di CXL	74
5.1 Biomeccanica corneale	74

5.2 Caratterizzazione <i>in vitro</i> della biomeccanica corneale: Cornea porcina come modello approssimativo per la cornea umana _____	80
5.3 Caratterizzazione geometrica e meccanica della cornea _____	86
5.4 Derivazione matematica del modulo elastico della porzione trattata dal CXL _____	93
<b>CAPITOLO 6: Modello fenomenologico per analisi dati _____</b>	<b>98</b>
6.1 Analisi dati e risultati _____	99
6.1.1 Modello di regressione lineare _____	101
6.1.2 Applicazione del modello ai dati clinici _____	106
6.1.3 Stima del modulo elastico stromale _____	108
6.1.4 Determinazione del lavoro compiuto dal tessuto corneale tramite approccio termofisico _____	110
6.1.5 T-test di Welch _____	114
6.2 Mappe corneali patologiche _____	120
<b>CONCLUSIONE _____</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA _____</b>	<b>122</b>
<b>APPENDICE: CODICE MATLAB _____</b>	<b>127</b>
A.1 Dati geometrici _____	127
A.2 Pressioni intraoculari _____	127
A.3 Modello di regressione lineare _____	128
A.4 Applicazione del modello _____	129
A.5 Stima del modulo elastico stromale _____	129
A.6 Lavoro compiuto dal tessuto corneale _____	130
A.7 T-test di Welch _____	131
A.8 Mappe corneali _____	132

## ABSTRACT

Il Cross-Linking del collagene corneale (CXL) è una terapia innovativa utilizzata per trattare le malattie ectasiche della cornea, tra cui il cheratocono (KC). Questa patologia è caratterizzata da una modifica dei parametri elastici e/o da un assottigliamento progressivo del tessuto corneale. Ciò si traduce in un indebolimento strutturale che altera la trasparenza della cornea, compromettendo le capacità visive. Il CXL è una tecnica parachirurgica volta a rafforzare il tessuto corneale. Essa sfrutta le proprietà della Riboflavina (o vitamina B2), una sostanza fotosensibilizzante che, sottoposta all'azione dei raggi ultravioletti UV-A, consente la formazione di legami incrociati tra le fibre corneali, rallentando l'avanzamento del KC. L'obiettivo di questa tesi di laurea magistrale è lo studio della risposta elastica di cornee colpite da cheratocono a seguito del trattamento di cross-linking. Grazie ad un'approfondita ricerca e analisi della geometria e delle caratteristiche biomeccaniche della cornea, si è scelto di valutare la risposta sfruttando i concetti della meccanica strutturale, in modo da poter quantificare la robustezza del tessuto corneale in termini di modulo elastico di Young. Per sviluppare questo modello di analisi, il lavoro di tesi si è concentrato sullo studio fisico-matematico della teoria dei gusci elastici finalizzata alla stima dell'effettivo incremento della rigidità post CXL a livello dello stroma corneale. Il modello meccanico ha permesso l'impiego dei dati geometrici delle cornee cheratoconiche di un campione di pazienti, in cura presso il Dipartimento di Oculistica dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria. I dati sono stati acquisiti direttamente dalle mappe topografiche risultanti dall'esame di topografia corneale, svolto sia precedentemente che successivamente al Cross-Linking del collagene corneale. Nell'elaborato è stato effettuato sia un confronto delle rigidità corneali prima e dopo il trattamento, in termini di modulo elastico; sia una comparazione di natura statistica con i dati presenti in letteratura relativi a prove sperimentali *in vitro*. Quest'ultima ha avuto lo scopo di confermare la validità del modello meccanico applicato e dei risultati delle simulazioni analitico-numeriche. Inoltre, si è anche sviluppato un approccio termofisico derivante dai risultati dello studio biomeccanico svolto, valutando il lavoro compiuto dal tessuto corneale come variazione delle condizioni elastiche prima e dopo il trattamento parachirurgico. Dai risultati ottenuti è possibile affermare che, per tutti i campioni di cornea considerati, il Cross-Linking, eseguito secondo il protocollo vigente, ha portato ad un efficiente rafforzamento dello stroma corneale.

## INTRODUZIONE

La cornea è una membrana trasparente che ricopre la parte anteriore dell'occhio e svolge le seguenti funzioni: proteggere i tessuti interni dell'occhio, resistendo alla pressione intraoculare esercitata dai fluidi di riempimento, e rifrangere la luce, contribuendo a circa il 70% del potere di rifrazione totale dell'occhio, rappresentando la lente più potente del sistema visivo. Il comportamento biomeccanico della cornea dipende dalla topografia, dallo spessore e dalle proprietà del tessuto biologico. La cornea è un tessuto viscoelastico e le sue proprietà meccaniche dipendono dalla composizione e dalla struttura. Il tessuto corneale è principalmente costituito da un fitto intreccio di fibrille di collagene disposte secondo una ben precisa architettura, quest'ultime si trovano immerse in una matrice glicoproteica che le unisce e le rende trasparenti. Al fine di mettere a fuoco correttamente le immagini è fondamentale che la cornea mantenga la sua forma approssimativamente sferica. Un'alterazione della normale curvatura della superficie corneale può portare a difetti visivi piuttosto rilevanti, caratteristici delle patologie ectasiche corneali. Una di queste è il cheratocono, malattia progressiva non infiammatoria della cornea, in cui si verifica una diminuzione delle reticolazioni tra le fibrille di collagene causando una perdita di rigidità che porta a un progressivo assottigliamento del tessuto, il quale tende ad assumere una forma conica e irregolare. Per bloccare l'evoluzione del cheratocono il trattamento di elezione consiste nel Cross-linking del collagene corneale (CXL). Il CXL è una tecnica parachirurgica volta a rafforzare il tessuto corneale, poiché, grazie all'azione combinata di una sostanza fotosensibilizzante (Riboflavina) con raggi UV-A ad una lunghezza d'onda di 370 nm, viene instaurata la fotopolimerizzazione del collagene. La reazione fotochimica porta alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno, che a loro volta, rendono possibile la formazione di nuovi legami covalenti tra le fibrille di collagene nello stroma anteriore della cornea. Ciò aumenta la rigidità del tessuto corneale impedendo un ulteriore sfianamento in avanti del tessuto stesso.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi magistrale è lo studio della risposta elastica di cornee colpite da cheratocono a seguito del trattamento di cross-linking. È stato eseguito un attento studio sulla geometria della cornea e sull'esame di topografia corneale, il quale fornisce i dati morfologici della superficie corneale e permette di valutarne forma e curvatura tramite lettura di specifiche mappe colorimetriche. L'analisi dell'equilibrio delle forze agenti su un generico elemento di cornea, basata sui concetti di meccanica strutturale, ha permesso l'utilizzo dei dati topografici delle cornee cheratoconiche di un campione di pazienti, in cura presso l'ospedale di Alessandria, su un modello meccanico derivato dalla teoria dei gusci elastici. Le cornee colpite da cheratocono, considerate in questo elaborato, sono state trattate con due tecniche differenti di CXL: l'*Epi-Off* CXL standard, in cui prima di irraggiare la cornea si esporta l'epitelio corneale chirurgicamente; e l'*i-Epi-On* CXL (iontoforesi), che evita la rimozione dell'epitelio. L'analisi strutturale permette il calcolo dei moduli elastici di Young dello stroma di ciascuna cornea patologica relativi a uno stato corneale pretrattato e post-trattato. La quantificazione della rigidità dello stroma corneale in termini di modulo di elasticità ha consentito lo sviluppo di un approccio termofisico atto, dopo la determinazione del lavoro meccanico compiuto dal tessuto corneale, a valutare la variazione di energia oculare a seguito del cross-linking del collagene corneale tramite irraggiamento con luce ultravioletta. In questo lavoro di tesi si è verificata l'efficacia del protocollo vigente sul trattamento di Cross-linking del collagene corneale.

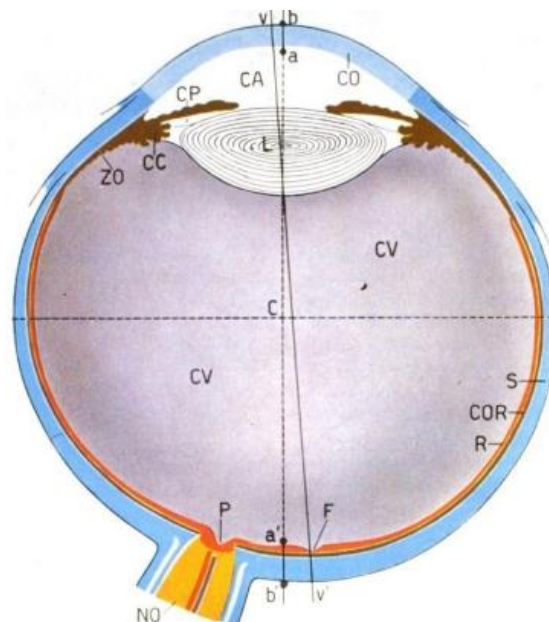
# CAPITOLO 1: Anatomia e fisiologia dell'apparato visivo

L'occhio è il principale organo di senso del sistema visivo, ricava informazioni sull'ambiente circostante attraverso la luce. Più precisamente, esso trasduce gli stimoli luminosi in segnali elettrici utilizzati dal sistema nervoso al fine di trasmettere l'informazione all'encefalo. Questo primo capitolo si pone come obiettivo quello di fornire una breve descrizione anatomico strutturale del bulbo oculare al fine di mostrare quali siano i principali difetti della vista.

## 1.1 Struttura dell'occhio

L'occhio (o bulbo oculare) e i suoi organi accessori, protetti nelle cavità orbitarie del massiccio facciale, rappresentano il complesso sistema sensoriale in grado di trasformare i segnali luminosi ambientali in impulsi nervosi [1]. Il globo oculare è il principale costituente dell'apparato visivo insieme al nervo ottico, attraverso cui gli stimoli luminosi sono trasmessi all'encefalo, e ad una serie di annessi che provvedono alla protezione, alla pulizia ed ai movimenti del globo oculare stesso [2]. Le principali funzioni del bulbo oculare sono la messa a fuoco dell'immagine sulla retina e la trasformazione delle radiazioni luminose in potenziali d'azione.

Da un punto di vista strutturale, il bulbo oculare è costituito da due segmenti di sfera giustapposti aventi raggio di curvatura differente, presentandosi globalmente di forma sferica. Fornendo una descrizione maggiormente dettagliata, la forma del globo oculare è quella di una sfera leggermente schiacciata verso il basso, con una porzione anteriore trasparente, denominata **cornea** e sporgente nella restante superficie oculare (Fig.1.1).



*Figura 1.1: Disegno schematico di una sezione meridionale orizzontale del bulbo oculare che evidenzia le tonache di copertura e il contenuto del bulbo [2].*

Nell'immagine sovrastante si può notare come sia presente un'asimmetria dei tre diametri ortogonali del globo oculare: il diametro trasverso come quello verticale misurano circa 23 mm, mentre quello antero-posteriore è di 24-26 mm. Nel bulbo oculare si possono distinguere due poli: uno corrisponde al centro della cornea (polo anteriore); l'altro è situato in posizione diametralmente opposta, lateralmente all'emergenza del nervo ottico (polo posteriore). L'asse anatomico dell'occhio è localizzato proprio tra questi due poli e perpendicolarmente a tale asse decorre l'equatore che divide il globo in due emisfere, una anteriore e una posteriore.

La Fig. 1.1 permette di evidenziare schematicamente i due tipi di strutture presenti nel globo e gli assi principali. I due tipi di strutture sono quelle membranose, costituenti le pareti oculari, ed i mezzi liquidi, o solidi, disposti uno dopo l'altro dal polo anteriore a quello posteriore. L'asse anatomico è delineato da **b** e **b'**, invece, con le lettere **a** e **a'** si delimita l'asse interno del bulbo. Quest'ultimo si incrocia con il piano meridionale nel centro geometrico **C** e, infine, con **vv'** si indica la linea di visione. Per quanto riguarda le strutture membranose che costituiscono le pareti dell'occhio, ne vengono evidenziate le componenti. Con **CO** viene identificata la cornea e con **S** la sclera. Esse fanno parte di una struttura spessa e resistente che è la **tonaca fibrosa**, lo strato più esterno dell'occhio. Nella stessa figura vengono evidenziati altri componenti fondamentali dell'apparato visivo, quali:

- Camere anteriore e posteriore (**CA** e **CP**) separate dall'**iride**
- Corona circolare o ciliare (**CC**)
- Corpo vitreo (**CV**)
- Corioidea (**COR**)
- Retina (**R**)
- Fovea della macula (**F**)
- Nervo ottico (**NO**)
- Lente o cristallino (**L**)

Tra queste sono presenti le componenti delle altre due strutture membranose oltre la tonaca fibrosa, le quali vengono chiamate: tonaca vascolare e tonaca nervosa.

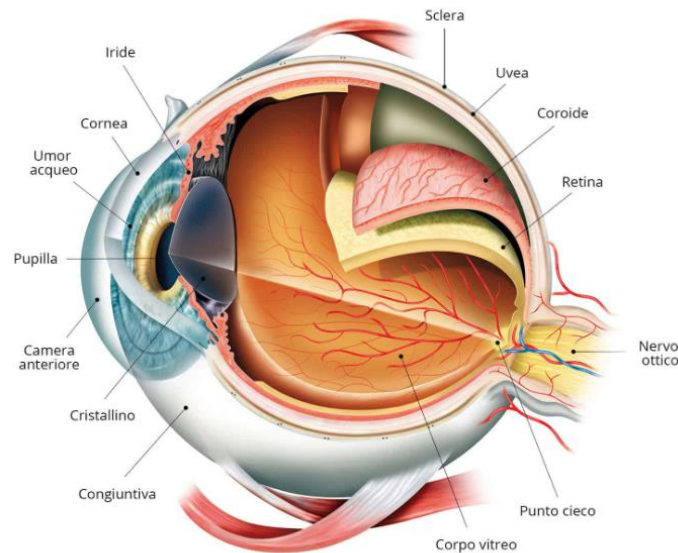


Figura 1.2: Principali strutture che definiscono il bulbo oculare.

In sintesi, la parete del bulbo oculare è costituita da tre tonache concentriche che, dall'esterno verso l'interno, sono:

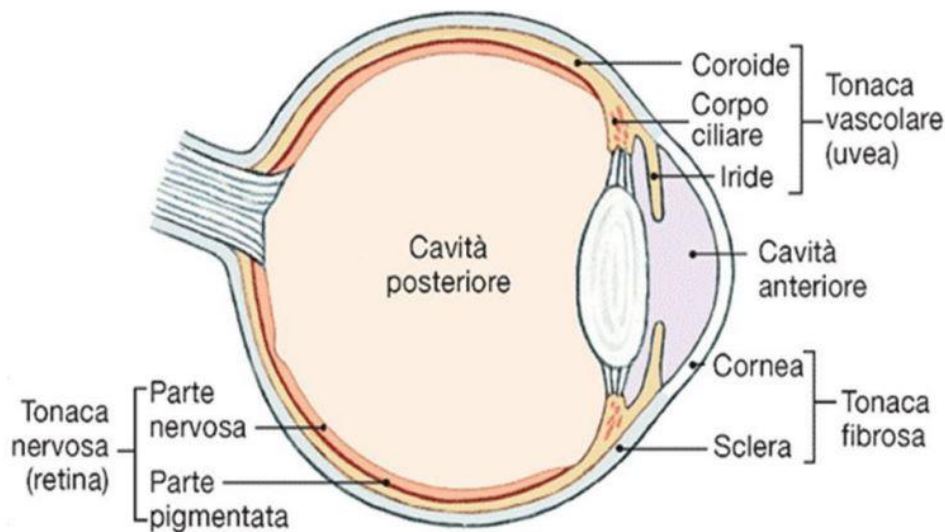


Figura 1.3: Bulbo oculare in sezione con le tre tonache in evidenza.

- 1) **Tonaca fibrosa**, la quale svolge le funzioni di sostegno meccanico e protezione fisica, assicurando all'occhio la sua forma sferica ed il suo tono controbilanciando la pressione esercitata dai liquidi intraoculari. Inoltre, essa funge da ancoraggio per i muscoli estrinseci del bulbo oculare, i quali ne permettono la rotazione in tutte le direzioni. Questa tonaca può essere divisa in due porzioni di diversa estensione. Nei suoi cinque sesti posteriori è costituita dalla **sclera**, robusta membrana di colore biancastro costituita da fasci di fibre di collagene strettamente addensati e sovrapposti in più strati, opaca ai raggi luminosi. Nel suo sesto anteriore, la tonaca fibrosa è formata dalla **cornea**, lamina trasparente priva di vasi sanguigni che copre sia la pupilla che l'iride. La cornea



è la prima e più potente lente del sistema ottico dell'occhio. Cornea e sclera sono due membrane in continuità tra loro ed il limite tra queste è rappresentato dal limbo (o giunzione sclerocorneale) [3].

- 2) **Tonaca vascolare**: chiamata anche **uvea**, svolge il compito di membrana nutritiva poiché ricca di vasi sanguigni e di cellule pigmentate che coadiuvano lo strato pigmentato della retina nell'assorbire i raggi luminosi impedendone la riflessione. La tonaca vascolare è formata da tre segmenti: uno posteriore, più esteso, detto **coroidea** o **coroide**; due anteriori, il **corpo ciliare** e l'**iride**.

L'iride è il segmento più anteriore dell'uvea ed è una lamina circolare connettivale ricca di cellule pigmentate perforata al centro da un ampio forame detto *pupilla*. L'iride si presenta come un diaframma disposto frontalmente al cristallino, il quale semplicemente costituisce una lente trasparente che svolge la funzione di focalizzare sulla retina la luce proveniente dagli strati superiori. Il forame pupillare, variando la propria dimensione, regola la quantità di luce che entra nell'occhio.

Il corpo ciliare è posteriore all'iride, possiede una parte anteriore (corona ciliare) e una posteriore, che sono due anelli caratterizzati da una serie di pieghe radiali, che nel caso di corona ciliare vengono chiamate *processi ciliari*. Questi, assieme al *muscolo ciliare*, consentono la produzione dell'umor acqueo, il quale svolge un ruolo vitale per la salute e il corretto funzionamento dell'occhio, contribuendo alla nutrizione, alla protezione e alla regolazione dell'ambiente oculare. Inoltre, il muscolo ciliare, che è uno spesso anello di muscolatura liscia, provvede a modificare la forma del cristallino. In pratica, questo muscolo consente una serie di movimenti necessari per la messa a fuoco dell'immagine osservata, permette dunque il *meccanismo di accomodazione*, di cui si discuterà con maggior dettaglio più avanti.

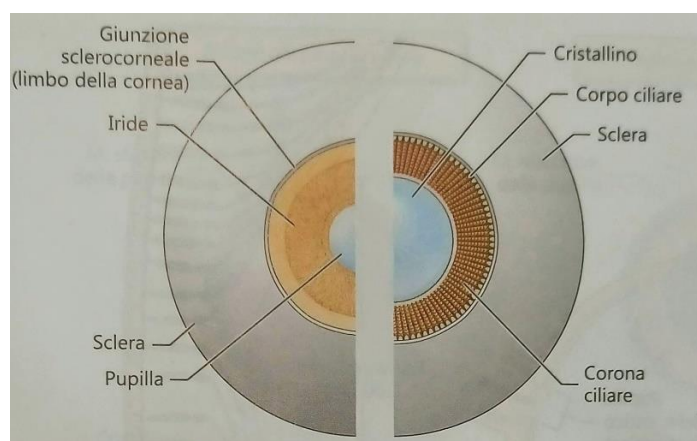


Figura 1.4: Bulbo oculare, sezione frontale. A sinistra si mettono in rilievo la pupilla, delimitata dall'iride e a destra il cristallino con il suo apparato sospensore [1].

La coroide è una delicata membrana bruno neastra costituita da una faccia esterna convessa che aderisce debolmente all'interno della sclera, mentre, la sua faccia interna, concava, è a contatto con lo strato pigmentato della retina [2]. La coroidea è riccamente vascolarizzata e come compito primario presenta quello di nutrire e ossigenare la retina nella sua parte esterna.

3) **Tonaca nervosa**: è la struttura più interna del bulbo oculare ed è rappresentata dalla retina. Si estende dal punto di emergenza del nervo ottico fino al margine pupillare dell'iride. Nella retina si può distinguere una parte cieca che riveste il corpo ciliare e l'iride, ed una parte ottica ricca di fotorecettori e neuroni posta posteriormente all'ora serrata [1], la quale rappresenta il limite tra zona cieca e ottica. Entrambe le parti presentano un foglietto esterno pigmentato e un foglietto interno che, nella parte cieca, è costituito da cellule epiteliali, mentre, nella parte ottica, è costituito da un sistema neuronale stratificato [1]. Strutturalmente, la parte ottica della retina è costituita da due strati fondamentali: uno strato esterno a contatto con la coroidea, **epitelio pigmentato**, ed uno interno in relazione con il corpo vitreo, **retina sensoriale**. Il primo è costituito da cellule epiteliali contenenti un pigmento di colore scuro che assorbono la luce costituendo una barriera per i raggi luminosi, ma l'epitelio pigmentato risulta fondamentale poiché partecipa al metabolismo dei fotorecettori, immagazzinando e rilasciando vitamina A per il rinnovo dei pigmenti visivi. Lo strato interno nervoso della retina è formato da tre tipi diversi di neuroni: dall'esterno verso l'interno essi sono rispettivamente i fotorecettori, le cellule bipolari e le cellule gangliari.

I *fotorecettori* possiedono un segmento interno ed uno esterno. Se, quest'ultimo presenta una forma corta e tozza significa che il fotorecettore è un *cono*, mentre se mostra una forma allungata e cilindrica è un *bastoncello*.

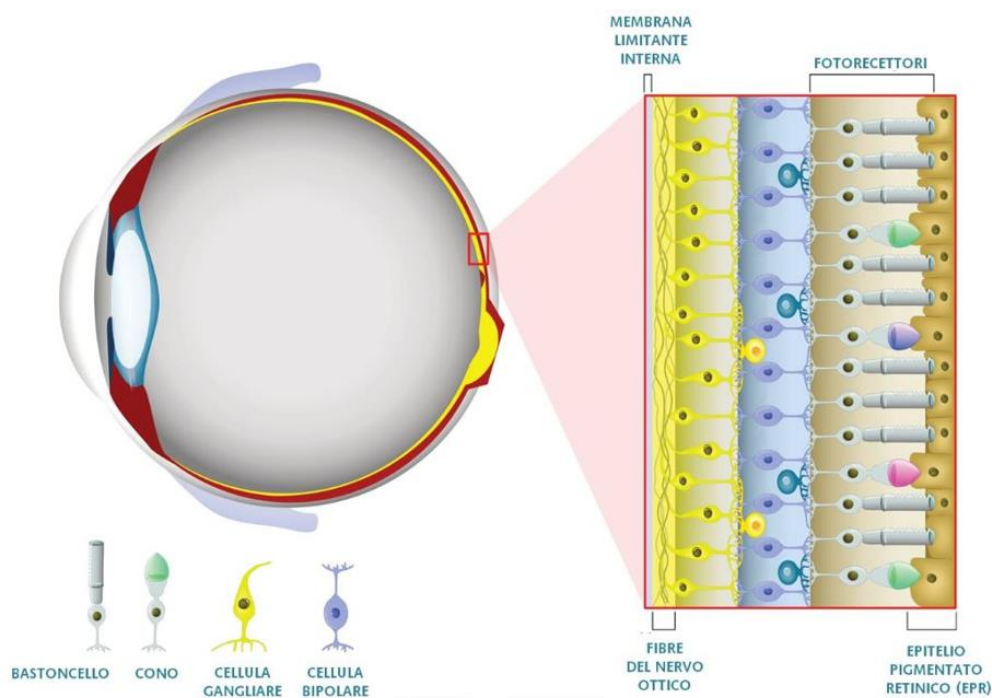


Figura 1.5: Schema semplificato della retina. Vengono messi in evidenza i tre diversi tipi di neuroni della retina sensoriale [4].

I segmenti esterni sia dei coni che dei bastoncelli contengono pigmenti fotosensibili, i quali, degradandosi, sono in grado di tradurre lo stimolo luminoso in impulso elettrico. Esiste, però, una differenza chimica tra il pigmento retinico dei coni e quello dei bastoncelli che sta nella sensibilità.

Infatti, i bastoncelli sono maggiormente sensibili alla luce crepuscolare, invece, i coni sono deputati alla discriminazione dei colori. Il pigmento fotosensibile nei bastoncelli è la cosiddetta *rodopsina*, mentre nei coni è la *iodopsina*. Rodopsina e iodopsina hanno picchi di assorbanza diversi. La rodopsina presenta il massimo di assorbimento per lunghezza d'onda dell'ordine dei 500 nm [5]. Per quanto riguarda i coni, è importante sottolineare che ne esistono di tre tipi, ciascuno dei quali contiene un pigmento che li rende sensibili a lunghezze d'onda differenti nello spettro visibile; in particolare presentano picchi di assorbimento a 419 nm (blu), 533 nm (verde) [5].

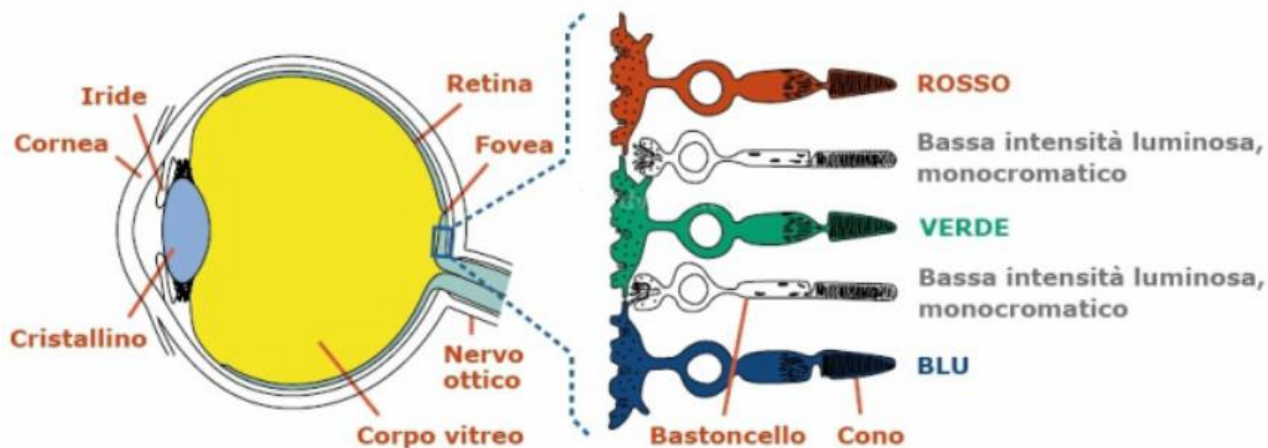


Figura 1.6: I fotorecettori della retina.

Le *cellule bipolari* sono considerate il primo neurone nella catena neuronale retinica in grado di contrarre sinapsi da una parte con le fibre dei fotorecettori e dall'altra con uno strato di cellule situate ancora più in profondità che sono le *cellule gangliari* [2], ovvero neuroni multipolari i cui prolungamenti sono le fibre nervose che vanno a costituire il nervo ottico, come si può notare dalla schematizzazione in figura 1.5.

### 1.1.1 Il contenuto dell'occhio: umor acqueo, umor vitreo e cristallino

Da un punto di vista strutturale, concentrandosi nella parte anteriore dell'occhio, è possibile suddividerlo nelle cosiddette *camere oculari*. Esse sono due cavità piene di liquido, si presentano con dimensione diversa e sono collegate tra loro tramite la pupilla. La **camera anteriore** contiene l'umor acqueo ed è compresa tra la superficie interna della cornea, che la delimita anteriormente, e l'iride, che la delimita posteriormente. La **camera posteriore**, significativamente più piccola, è invece limitata anteriormente dall'iride e posteriormente dal cristallino [6]. L'umor vitreo è retrostante al cristallino e insieme all'umor acqueo contribuiscono al mantenimento della forma del globo oculare.

L'**umor acqueo** è un liquido trasparente composto in massima parte da acqua, secreto dall'epitelio dei processi ciliari. Esso circola, tramite la pupilla, attraverso le camere posteriore ed anteriore. È fondamentale poiché ha una funzione nutritiva in quanto, nell'acqua che lo compone, sono disciolte

sostanze proteiche e minime quantità di sali [7]. A livello della camera anteriore, l'umor acqueo viene riassorbito dal seno venoso della sclera [2], chiamato anche canale di Schlemm.

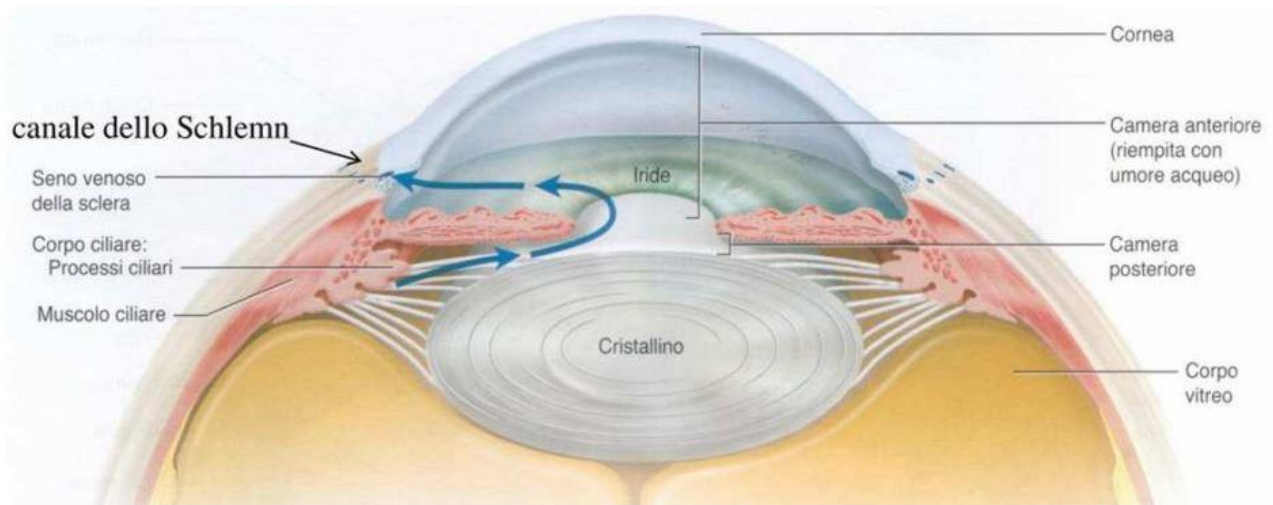
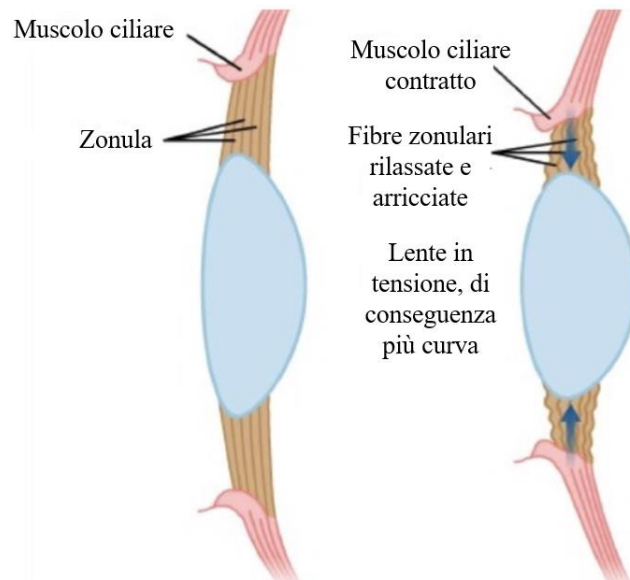


Figura 1.7: Rappresentazione del percorso dell'umor acqueo.

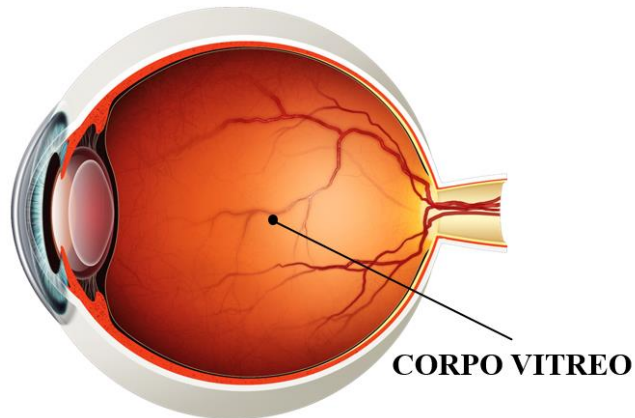
Questo meccanismo avviene poiché l'umor acqueo, sollecitato dalla pressione intraoculare, va ad attraversare i pori progressivamente minori della rete trabecolare, situata tra sclera e cornea immettendo nel seno venoso della sclera. Quindi, è il gradiente della pressione intraoculare che regola il riassorbimento dell'umor acqueo. Se il deflusso dell'umor acqueo attraverso il seno venoso è ostacolato, la pressione dell'umore acqueo e dell'intero globo oculare aumenta portando a casi patologici come il glaucoma, che col tempo provoca danni a carico degli assoni delle cellule gangliari e pertanto del nervo ottico. In sintesi, il principale compito dell'umor acqueo è quello di mantenere la tensione interna dell'occhio entro determinati valori.

Il **cristallino** (o **lente**) è una lente biconvessa e trasparente, localizzata tra iride e corpo vitreo che consente il processo di *accomodazione*, cioè di messa a fuoco dell'immagine sulla retina. L'apparato di accomodazione è composto anche dalla zonula ciliare e dal corpo ciliare con il muscolo ciliare, oltre che dal cristallino. Tutti questi elementi formano un sistema elastico che mantiene il cristallino appiattito, limitandone la convessità. Per la visione da vicino il muscolo ciliare si contrae così da avvicinare i corpi ciliari al margine del cristallino, lasciando libero quest'ultimo di aumentare la sua convessità (e pertanto il suo potere di rifrazione) [2].



*Figura 1.8: A sinistra, il cristallino in stato di riposo, piatto e allungato. A destra, il cristallino in accomodazione.*

Il **corpo vitreo** è una struttura tondeggiante, trasparente, avascolare, situata tra il cristallino e la porzione ottica della retina. Esso tiene distese le tre tonache dell'occhio. Si mostra come un gel chiaro costituito al 99% di acqua e viscoso, per via della presenza di acido ialuronico [8]. La sua consistenza vischiosa simile all'albume d'uovo risulta maggiore alla sua periferia che non al centro.



*Figura 1.9: Umor vitreo.*

Tutti gli elementi sopra descritti sono mezzi diottrici del sistema visivo, di cui si tratterà nel paragrafo 1.3.



## 1.2 Forze agenti nel sistema oculare e pressione intraoculare

Le forze che agiscono sull'occhio includono la forza di gravità, pressione atmosferica (Fig. 1.10 A), tensione nella sclera (Fig 1.10 B), forze dovute ai muscoli orbitali, muscolo ciliare (in modalità non accomodante), pressione atmosferica e pressione intraoculare [9].

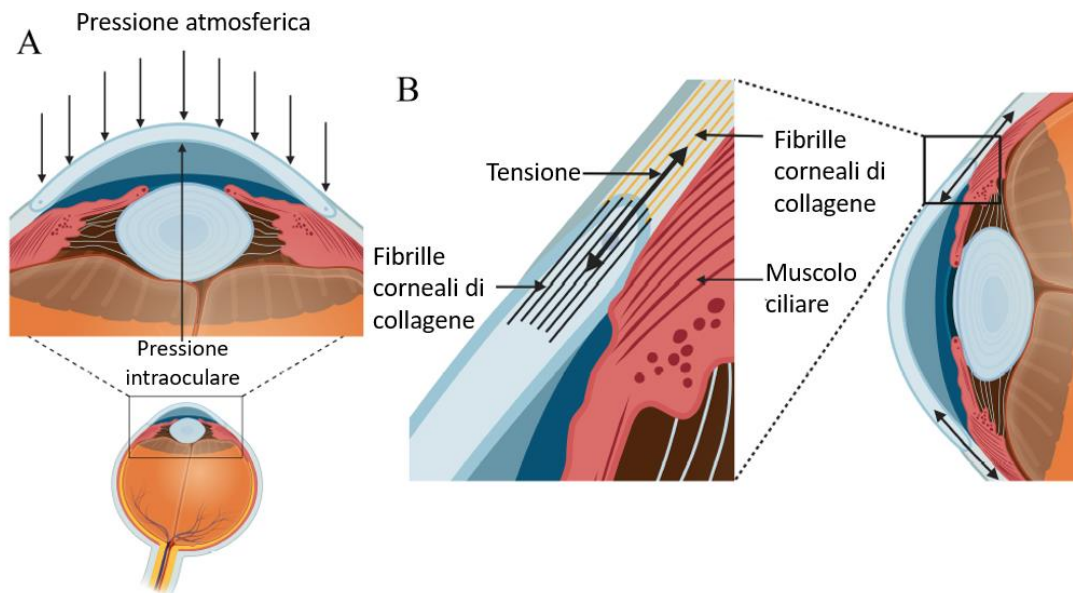


Figura 1.10: Schematica rappresentazione delle forze che agiscono sull'occhio [9].

Questa rappresentazione mostra le connessioni tra le fibrille di collagene nella cornea e nel limbo che stabilizzano la giunzione corneo-limbo-sclerale. In caso di occhio affetto da cheratocono (come si vedrà nel capitolo 3), la massa stromale perde consistenza e la spinta dell'occhio fa in modo che la cornea protruda in avanti assumendo una forma a cono. Tra le forze che agiscono sull'occhio quella che viene presa maggiormente in considerazione per valutare lo stato del sistema oculare è la pressione intraoculare (IOP). La IOP è mantenuta costante dall'equilibrio tra la produzione ed il drenaggio di umor acqueo, in altri termini, dipende dalla dinamica di quest'ultimo. Come affermato nel precedente paragrafo, l'umor acqueo è un fluido interstiziale che fuoriesce dai processi ciliari, scorre dalla camera posteriore arrivando anteriormente attraverso la pupilla per riempire la camera anteriore e nutrire la cornea. Successivamente, dalla camera anteriore viene rimosso attraverso una rete di cellule e tessuti. Dietro il cristallino si trova il corpo vitreo, un tessuto connettivo relativamente inerte, piuttosto poroso che trasmette la pressione dalla camera anteriore all'interno dell'occhio. L'umor acqueo viene riassorbito grazie ai pori sempre più piccoli che costituiscono il trabecolato e le cellule del canale di Schlemm, situato nell'angolo tra la cornea e l'iride (fare riferimento alla Fig. 1.7). Nel caso in cui il drenaggio di umor acqueo risulti eccessivo o, semplicemente, la sua produzione è insufficiente si possono presentare alterazioni patologiche. Quando, invece, l'umor acqueo è prodotto in quantità eccessive o non viene assorbito correttamente dal sistema di drenaggio si va in condizioni di ipertensione oculare, come in caso di glaucoma [10].

La misurazione della pressione oculare, i cui valori normali rientrano nel range 10-21 mmHg avviene attraverso un esame chiamato tonometria e la **tonometria ad appianazione di Goldmann** ne costituisce il gold standard. Questo metodo richiede un contatto fisico con la superficie oculare e in

esso la IOP è desunta dalla forza meccanica necessaria ad appianare una ridotta area circolare corneale (in zona centrale), attraverso la legge di Imbert-Fick. La legge di Fick afferma che per una sfera ideale, la pressione all'interno della sfera (P) è uguale alla forza necessaria ad appiattire la sua superficie (F) divisa per l'area di appianazione (A).

$$P = F/A$$

L'area appiattita dipenderà sia dalla forza che dalla durezza della sfera. La IOP fisiologica (10-21 mmHg) è la pressione richiesta al fine di mantenere la forma e le proprietà ottiche corrette del globo oculare. Lo spessore corneale può influenzare questo tipo di misura in quanto varia la resistenza del tonometro. Una cornea sottile solitamente implica una sottovalutazione della IOP e viceversa.



*Figura 1.11: Tonometria ad appianazione.*

Lo strumento viene avvicinato all'occhio raggiungendo il contatto con esso. La procedura ha una durata di pochi secondi, circa 20.

Esistono diversi strumenti per misurare il tono oculare oltre il tonometro di Goldmann, il più utilizzato è il **tonometro a soffio**. In questo caso l'esame non prevede contatto. Una volta avvicinato lo strumento all'occhio del paziente e messa a fuoco la mira, un soffio d'aria arriva sino alla cornea e viene captato da una fotocellula [11].

La variazione della pressione oculare può dipendere da diversi fattori quali l'assunzione di farmaci, fattori genetici, presenza d'infezioni, traumi, trattamenti di chirurgia oculare e, la misura tonometrica, come tutti gli esami medici, bisogna considerare che può essere influenzata anche dalle condizioni emotive e dall'aspettativa del paziente che si troverà in una condizione di stress.

### **1.3 Generalità sul processo di visione e cenni di ottica fisiologica**

La visione è un processo complesso che utilizza i due occhi e che coinvolge oltre quaranta diverse parti del cervello [12]. Ciò che è strettamente necessario per vedere un oggetto è la luce e, a seconda dei diversi mezzi che incontra, un raggio di luce può essere riflesso, rifratto, disperso o assorbito. Gli occhi obbediscono alle leggi di rifrazione. La rifrazione è quel fenomeno che rende possibile la formazione dell'immagine da parte dell'occhio e consiste in un brusco cambiamento nella direzione dei raggi luminosi durante l'attraversamento di mezzi caratterizzati da diverse proprietà ottiche.

Questi effetti sulla propagazione della luce si verificano poiché essa viaggia a velocità diverse a seconda del mezzo. L'indice che fornisce un'indicazione sulla velocità della luce in uno specifico mezzo è denominato **indice di rifrazione ( $n$ )**, maggiore è  $n$ , più lentamente la luce viaggerà in quel mezzo [13]. Infatti, l'indice di rifrazione di un materiale è il rapporto tra la velocità della luce nel vuoto  $c$  (pari a  $3 \cdot 10^8$  m/s) e la velocità della luce nel materiale.

L'occhio è definito come un sistema diottrico, ovvero un sistema formato da un insieme di lenti convergenti con indici di rifrazione differenti, che hanno lo scopo di portare i raggi luminosi sulla retina. I mezzi diottrici che consentono questo fenomeno di rifrazione sono: cornea, umor acqueo, cristallino e corpo vitreo [14]. Paragonando l'occhio umano ad una fotocamera, l'obiettivo invece che essere costituito da un'unica lente convessa, è formato da due lenti, la prima e la più esterna è la cornea, la seconda e più interna è il cristallino. Il potere di una lente si esprime in **diottrie**. Le diottrie esprimono la capacità dell'occhio di far convergere la luce verso la retina.

Dato che lo scopo di questo capitolo non si traduce nel fornire una dettagliata descrizione fisiologica del meccanismo della trasduzione visiva e della generazione dell'immagine nel cervello, in seguito, viene rilasciato un breve sunto riguardo il processo di visione.

La visione inizia con il passaggio della luce attraverso la cornea in cui avviene l'80% di rifrazione. Successivamente, la luce raggiunge la pupilla che modifica le proprie dimensioni a seconda dell'intensità. In condizioni di elevata luminosità la pupilla si restringe, in ambienti scuri si dilata. Attraverso la pupilla la luce arriva al cristallino, che modifica la propria forma per assecondare la messa a fuoco dei raggi luminosi sulla retina. I fotorecettori situati nella tonaca nervosa assorbono la luce subendo un cambiamento chimico, il quale genera una differenza di potenziale elettrico che si propaga al cervello [15]. Gli impulsi elettrici provenienti da vari recettori si combinano e interagiscono nella retina generando segnali elettrici (*fototrasduzione*). Essi vengono trasportati dal nervo ottico al centro visivo del cervello. Infine, è importante sottolineare che per una buona *acuità visiva* (discriminazione tra punti o oggetti vicini tra loro), la luce proveniente da oggetti vicini deve essere rifratta più della luce proveniente da oggetti distanti. Pertanto, per mettere a fuoco la luce di un oggetto vicino, la lente diventa più arrotondata al fine di formare un'immagine nitida [13].

Banalmente, è possibile far un parallelo tra fotocamera e occhio umano, schematizzato nella seguente rappresentazione:



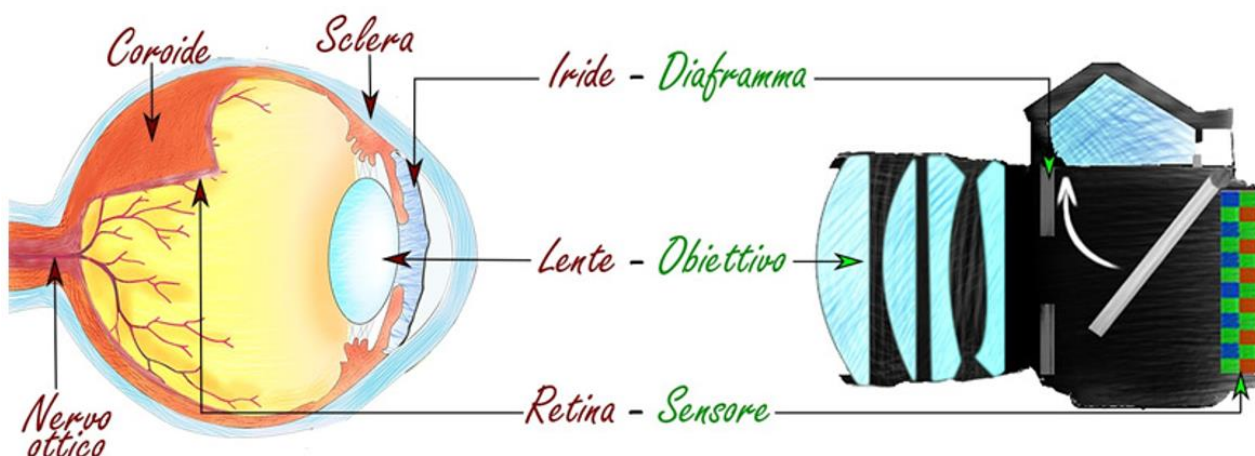


Figura 1.12: Comparazione tra le componenti di una fotocamera e l'occhio umano [16].

- Cornea e cristallino svolgono il ruolo di *obiettivo*. La lente più esterna è la cornea trasparente, data la sua forma curva e la sua capacità di deviare la luce consente di concentrare quest'ultima in modo preciso sulla superficie del cristallino. In figura sono indicate schematicamente dalla denominazione di lente.
- Dato che la pupilla e l'iride hanno la capacità di allargarsi e restringersi in base alle condizioni luminose esistenti, rappresentano il *diaframma*: dosano la quantità di luce che raggiunge la parte sensibile deputata alla percezione visiva, ovvero la retina.
- Le palpebre sono facilmente individuabili nell'otturatore della fotocamera.
- La retina rappresenta il *sensor* di una fotocamera, poiché è il tessuto fotosensibile localizzato nella parte posteriore dell'occhio deputato alla trasformazione della luce in segnali elettrici che vengono poi elaborati e interpretati dal cervello per la formazione dell'immagine visiva. I grani di sali di argento di una pellicola o i fotodiodi di un sensore digitale imitano le cellule recettoriali. Nel caso digitale avviene anche la trasduzione del segnale luminoso in segnale elettrico, il quale viene poi inviato dal sensore al microprocessore (passaggio retina-cervello) tramite un sistema circuitale (sistema nervoso) [16].
- I coni e i bastoncelli si possono correlare alla moltitudine di pixel di cui è composto il sensore [17].

L'aspetto principale dell'intero meccanismo di visione è la luce. Essa è un'onda elettromagnetica e come tale rappresenta una forma di propagazione dell'energia attraverso lo spazio. Il termine luce è riferito alla porzione dello spettro elettromagnetico visibile dall'occhio umano, compresa tra 380 nm (violetto) e 750 nm (rosso) di lunghezza d'onda [18], comprendendo tutti i colori dell'arcobaleno.

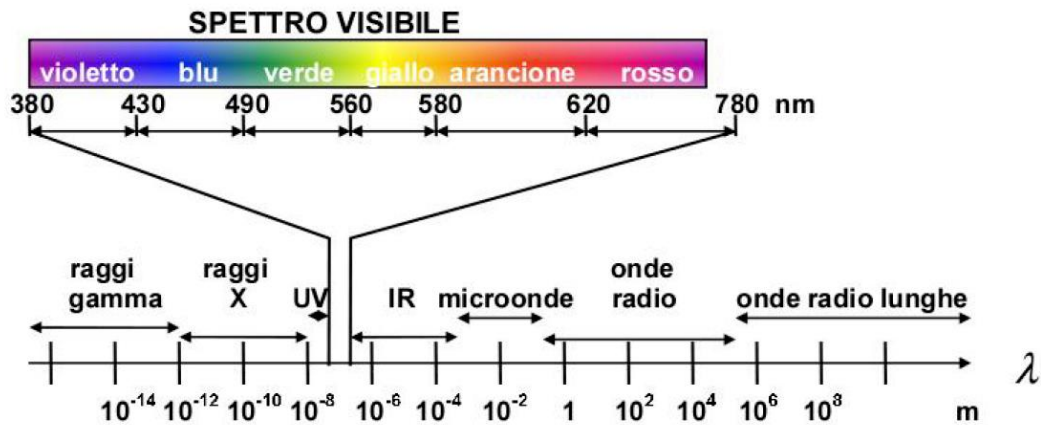


Figura 1.13: Bande dello spettro elettromagnetico.

Quando un oggetto viene colpito dalla luce, le radiazioni elettromagnetiche che la compongono interagiscono con la materia che costituisce l'oggetto. La luce viene in parte assorbita e in parte riflessa. L'oggetto appare nero quando la luce viene assorbita del tutto, al contrario, se la luce viene completamente riflessa l'oggetto apparirà bianco [19]. Il colore percepito è il complementare di quello assorbito. Come precedentemente descritto, la retina contiene diversi tipi di cellule specializzate, tra cui i fotorecettori, i cui due principali tipi sono i bastoncelli ed i coni. I bastoncelli sono quelli che, essendo più sensibili alla luce debole, forniscono una visione monocromatica in bianco e nero e non sono in grado di percepire i colori, mentre i coni, essendo più attivi in condizioni di luce intensa risultano responsabili della visione dei colori. Esistono tre tipi di coni, ognuno sensibile a diverse lunghezze d'onda della luce consentendo di percepire i tre colori primari. Queste tre tipologie vengono indicate con delle lettere che indicano gli intervalli di lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica visibile ai quali ciascun tipo di cono risponde:

1. Coni L (long), rispondono a lunghezze d'onda lunghe del rosso
2. Coni M (medium), rispondono a lunghezze d'onda medie del verde
3. Coni S (small), rispondono a lunghezze d'onda corte del blu

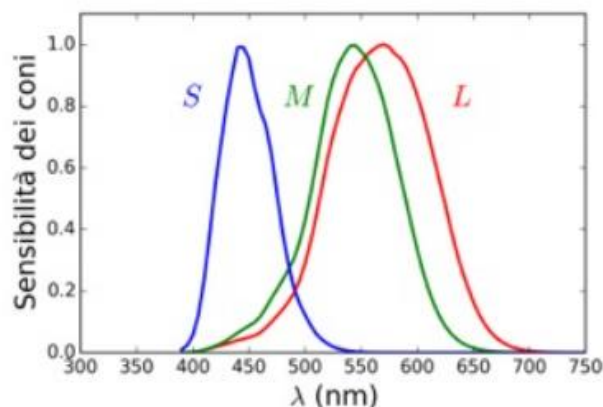


Figura 1.14: Spettro della sensibilità dei coni S, M, L al variare della lunghezza d'onda [20].

Considerando la luce come un insieme di fotoni, ognuno dei quali è una particella elementare che trasporta energia elettromagnetica, si può affermare che i fotoni che raggiungono l'occhio costituiscono lo stimolo per la percezione del colore. Ogni fotone attraversa successivamente la

cornea, l'umor acqueo, la pupilla, il cristallino e l'umor vitreo, fino a raggiungere uno dei fotorecettori presenti sulla retina. Qui, il fotone può essere assorbito o non assorbito, e la probabilità che un particolare fotorecettore assorba un fotone dipende sia dal tipo di fotorecettore che dalla frequenza del fotone stesso. Come risultato dell'assorbimento, ciascun fotorecettore genera un segnale elettrico con modulazione in ampiezza, proporzionale al numero di fotoni assorbiti. I segnali prodotti dai tre coni sono direttamente collegati alla sensazione di colore e sono noti come *segnali di tristimolo*. Successivamente si verifica una seconda fase in cui questi segnali di tristimolo vengono elaborati e compressi per generare altri tre segnali elettrici chiamati *opponenti* modulati in frequenza che vengono trasmessi al cervello lungo il nervo ottico. Infine, i segnali opponenti che raggiungono il cervello vengono proiettati in apposite aree della corteccia visiva, dove nasce la percezione del colore [21].

### 1.3 Difetti visivi

In un processo di visione normale, i raggi luminosi, passando attraverso il cristallino e la cornea, si focalizzano sulla retina. Quando un occhio non presenta anomalie di rifrazione viene chiamato **emmetrope**. Nel caso di emmetropia, in condizione di rifrazione statica, ovvero ad accomodazione rilassata, i raggi paralleli provenienti 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 [22]. L'emmetropia si verifica quando la curvatura della cornea e la lunghezza assiale del bulbo oculare sono in relazione tale che i raggi di luce vengano a coincidere esattamente a fuoco sulla retina (Fig. 1.17 A).

I principali elementi del sistema visivo dell'occhio sono il potere diottrico e l'indice di rifrazione dei mezzi che lo costituiscono e la lunghezza assiale del bulbo oculare, ovvero la distanza tra la parete anteriore (cornea) e posteriore dell'occhio (retina). In un occhio adulto la lunghezza assiale misura in media 23-24 mm. La conoscenza di questa distanza risulta necessaria per correggere alcuni difetti della vista, poiché serve a calcolare il potere diottrico delle lenti correttive.

Per potere diottrico di una lente o di un sistema di lenti si intende la loro capacità di focalizzare la luce ed è l'inverso della distanza focale della lente, cioè quella tra fuoco e centro di una lente. La cornea e il cristallino sono lenti convergenti. Una lente convergente riceve i raggi paralleli e li fa convergere in un punto sull'asse ottico detto fuoco, una lente divergente devia i raggi che incidono su di essa parallelamente all'asse ottico facendoli divergere come se provenissero da un punto sull'asse ottico (fuoco).

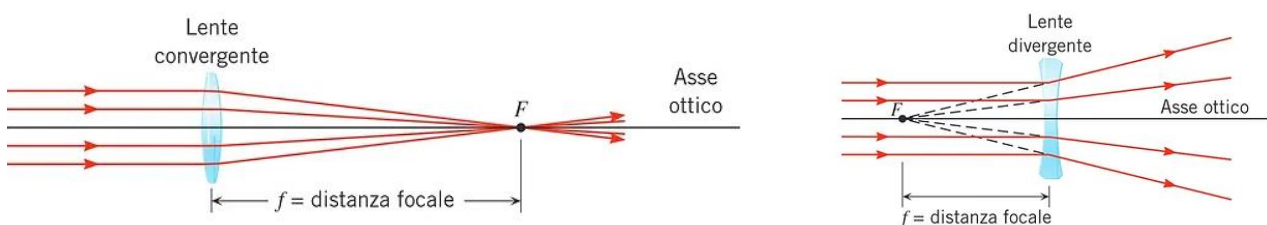
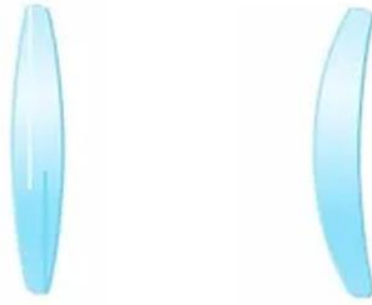


Figura 1.15: comportamento di una lente convergente (a sinistra) e di una lente divergente (a destra).

La cornea è una lente menisco convessa convergente; il cristallino, anch'esso convergente, risulta di forma biconvessa.



*Figura 1.16: Da sinistra, forma di una lente biconvessa e menisco convessa.*

Quando i raggi di luce passano attraverso l'occhio, vengono rifratti. Esiste un punto denominato punto nodale in cui i raggi luminosi diretti verso di esso attraversano il sistema diottrico oculare senza subire deviazioni. Il punto nodale è situato a circa 7 mm dall'apice corneale e a circa 17 mm dalla retina. Gli errori di rifrazione sono problemi di visione che si verificano quando la forma dell'occhio non rifrange correttamente la luce risultando in un'immagine sfocata poiché i raggi provenienti da un oggetto distante non raggiungono la retina perfettamente a fuoco [23].

I principali difetti di rifrazione oculare sono: miopia, ipermetropia, astigmatismo e presbiopia.

## **Miopia**

Nella miopia l'occhio non vede chiaramente gli oggetti lontani. Questo accade in quanto un occhio miope, rispetto a un occhio sano è troppo convergente, in pratica la cornea è troppo lunga o, semplicemente, quando la forma del bulbo oculare è allungata. Rispetto alla sua potenza diottrica, l'occhio risulta troppo lungo e l'immagine visiva si forma davanti alla retina, infatti per correggere la miopia si usano lenti divergenti con potere diottrico negativo. Quello che si verifica è che, nonostante il massimo appiattimento da parte del cristallino non si compensa il difetto anatomico e l'occhio non risulta in grado di focalizzare i raggi luminosi più indietro e sulla retina.

## **Ipermetropia**

È l'opposto della miopia, infatti è generalmente provocata da una cornea eccessivamente piatta o da un globo oculare corto. Causa dell'ipermetropia può essere anche un cristallino mal formato. L'occhio ipermetrope non riesce a vedere in maniera nitida gli oggetti vicini focalizzandone l'immagine su un piano posteriore alla retina, mentre le immagini distanti vengono messe a fuoco senza accomodazione. L'ipermetropia viene corretta attraverso lenti convergenti con potere diottrico positivo in cui la potenza sarà maggiore quanto maggiore è la lunghezza assiale dell'occhio ametrope.

## **Astigmatismo**

È un difetto refrattivo conseguente ad un'anomala curvatura della cornea (essa si presenta ovoidale invece che sferica). Un occhio astigmatico ha difficoltà di messa a fuoco sia da vicino che da lontano. I meridiani della cornea di un occhio astigmatico non presentano tutti lo stesso potere refrattivo come nella cornea normale, bensì lo hanno tutti diverso provocando la messa a fuoco sulla retina in due fuochi differenti. L'astigmatismo viene trattato con lenti cilindriche (o toriche) che presentano due curvature differenti sui due meridiani perpendicolari tra loro [24]. Un astigmatismo pronunciato è uno dei sintomi principali del cheratocono.

I difetti visivi sopra descritti si possono trattare con diversi tipi di chirurgia laser: LASIK (Laser in situ Keratomileusi), PRK (keratectomia fotorefrattiva), LASEK (Laser Keratomileusi Sub-Epiteliale) e SMILE (Small Incision Lenticule Keratomileusi). Tutte queste tipologie di intervento si basano sul fatto di effettuare un rimodellamento della cornea utilizzando il laser per rimuoverne uno strato superficiale molto sottile [13].

Nella procedura PRK si agisce col laser dopo aver asportato l'epitelio corneale, modificando la curvatura della superficie corneale.

Nella tecnica LASEK il laser serve sempre per modificare la curvatura della cornea ma l'epitelio, durante l'operazione, viene sollevato completamente per poi riposizionarlo sull'occhio al termine del trattamento.

La tecnica che viene maggiormente utilizzata risulta, però, la LASIK in quanto il paziente patisce meno dolore e il recupero visivo è molto rapido. L'aspetto rischioso si riflette principalmente nella creazione del *flap* (uno "sportello" comprendente i primi tre strati corneali) poiché il suo successo dipende fortemente dall'abilità e dall'esperienza del chirurgo. Quest'ultimo va ad effettuare una sezione orizzontale della superficie oculare trasparente con un microcheratomo (bisturi di precisione) o attraverso un laser a femtosecondi. Una volta sollevato il flap, grazie all'azione del laser ad eccimeri, la cornea viene assottigliata.

Infine, la procedura SMILE viene utilizzata principalmente per correggere la miopia ed è meno invasiva delle precedenti. Con un laser a femtosecondi viene creata una piccola forma di tessuto (lenticola) nella cornea. Lo spessore e la forma di questa lenticola corrispondono all'ammontare di tessuto corneale che deve essere rimosso per correggere la miopia. La lenticola viene poi rimossa attraverso una piccola incisione di circa 2-4 mm [25].

Nell'immagine sottostante viene fornita una semplice rappresentazione di quelli che sono i vizi refrattivi appena descritti:

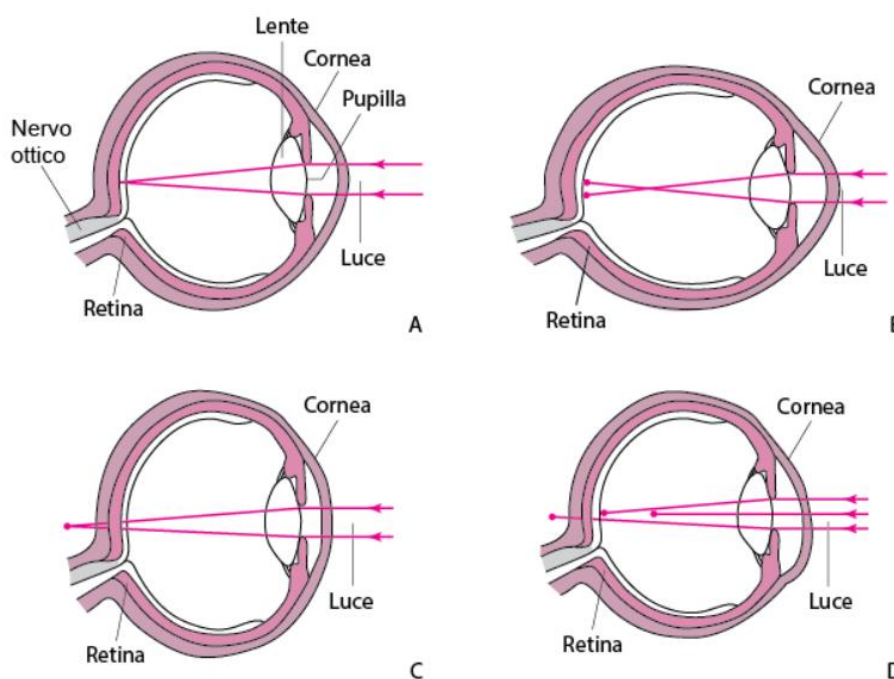


Figura 1.17: (A) Emmetropia, (B) Miopia, (C) Ipermetropia, (D) Astigmatismo [26].

## **Presbiopia**

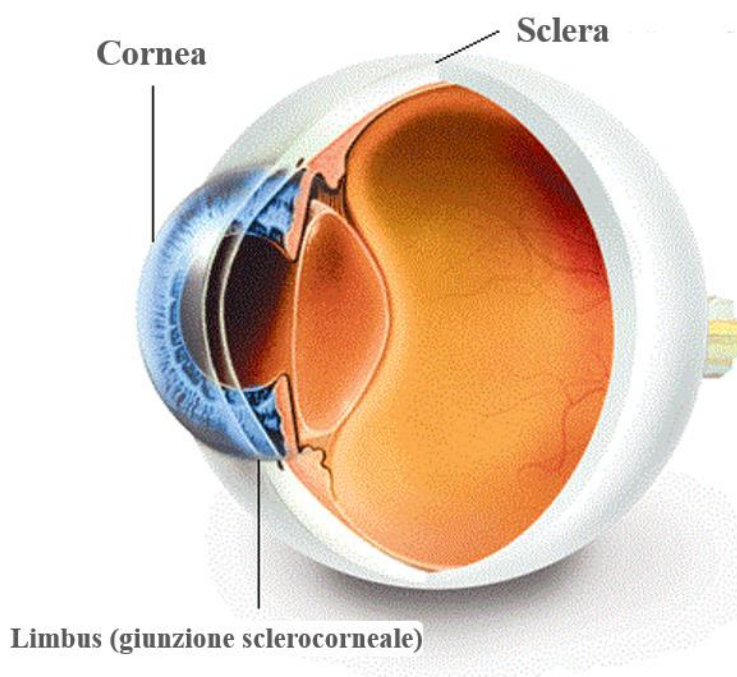
La fisiologica perdita di elasticità del cristallino ne costituisce la causa. L'elasticità del cristallino tende a diminuire con l'età, e questo processo si accompagna inevitabilmente alla riduzione progressiva della capacità di accomodazione dell'occhio per la visione da vicino [5]. È un processo che inizia intorno ai 40 anni per completarsi intorno ai 60 anni che richiede l'allontanamento dell'oggetto che si sta osservando al fine di vederlo più nitidamente [24]. La si può correggere con lenti convesse.



## CAPITOLO 2: La cornea

La cornea è una membrana trasparente composta da tessuto avascolare che ricopre la parte anteriore dell'occhio, attraverso la quale è possibile intravedere l'iride e la pupilla. Rappresenta la barriera tra il mondo esterno e il bulbo oculare e possiede funzioni ottiche e meccaniche ben precise. Viene definita come la lente più potente del sistema visivo e la sua principale funzione ottica è quella di deviare i raggi luminosi sul cristallino e sulla retina. Proteggere i tessuti interni dell'occhio dall'ambiente esterno e resistere all'azione della pressione intraoculare (IOP) esercitata dai fluidi di riempimento, costituiscono le sue principali funzioni meccaniche [27].

La cornea è coperta anteriormente dal film lacrimale, posteriormente continua nella sclera attraverso la giunzione sclerocorneale (limbus).



*Figura 2.1: Rappresentazione di cornea, sclera e limbus.*

Essendo una membrana di forma convessa, non possiede uno spessore uniforme, presentandosi più sottile al centro ed ispessita lungo i bordi. Lo spessore medio della zona centrale supera di poco il mezzo millimetro (520-540)  $\mu\text{m}$  e all'estremità misura al massimo 650  $\mu\text{m}$ . Se la cornea viene osservata anteriormente, presenta una forma ellittica con il diametro orizzontale maggiore lungo 11.7 mm contro i 10.6 mm del diametro minore [28]. Interiormente, ha, invece, forma circolare con un diametro medio di circa 11 mm [27].

La cornea è una struttura multistrato. Quello più esterno è l'epitelio corneale stratificato, seguito da strati formati da un fitto intreccio di fibrille di collagene disposte in lamelle, con una matrice glicoproteica che le unisce e le rende trasparenti. Questi strati sono la sottile membrana basale di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio corneale. Quest'ultimo rappresenta l'unico strato di cellule altamente specializzate responsabili della nutrizione e della barriera osmotica che tappezza la faccia posteriore della cornea.

Insieme al film lacrimale, la cornea fornisce un'adeguata superficie refrattiva anteriore per l'occhio, contribuendo ai due terzi del potere refrattivo oculare [29].

## 2.1 Struttura anatomica

La cornea è costituita da componenti cellulari e acellulari. I componenti cellulari includono le cellule epiteliali, i cheratociti e le cellule endoteliali. La componente acellulare comprende collagene e glicosamminoglicani [29]. Strutturalmente, è composta da cinque differenti strati che sono l'epitelio, la membrana di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio, dei quali è possibile visionarne una rappresentazione grafica nella seguente immagine.

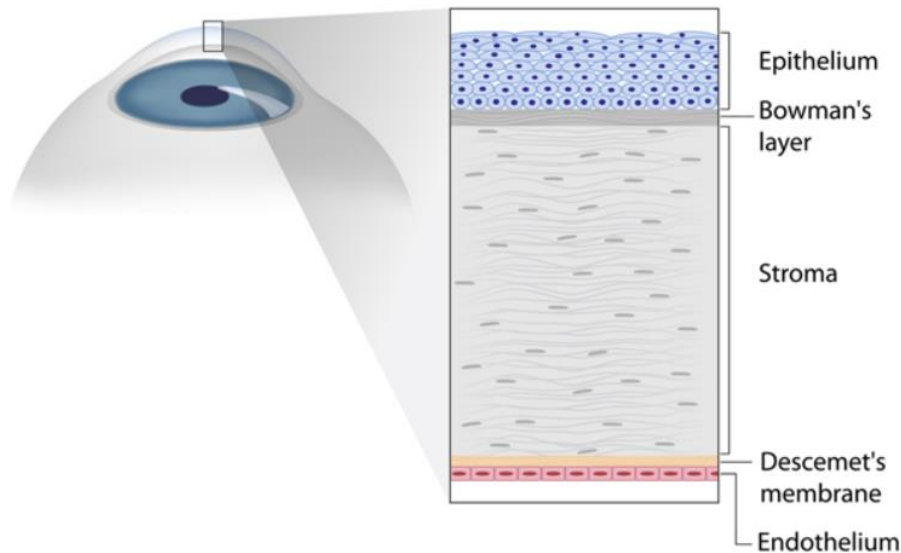


Figura 2.3: Strati della cornea.

Al di sopra del primo dei cinque strati corneali vi è il film lacrimale, composto a sua volta da strati lipidici, acquosi e proteici. Esso è di fondamentale importanza in quanto provvede alla protezione, alla lubrificazione e al mantenimento di una superficie ottica liscia.

Una delle caratteristiche più importanti della cornea è la trasparenza. Una cornea opaca o non trasparente impedisce il passaggio della luce attraverso di essa, portando, inevitabilmente, a una visione distorta od oscurata. La cornea è infatti densa di proteine, in particolare collagene, e riesce a mantenere la sua trasparenza attraverso un regolare impaccamento proteico all'interno di una matrice ricca di proteoglicani. La combinazione di fattori strutturali e funzionali fa sì che la cornea risulti trasparente.

Riportando quanto pubblicato nel giornale "Frontiers" in *Bioengineering and Biotechnology* [30] la cornea umana è una struttura multistrato, spessa circa 550  $\mu\text{m}$ , di cui i 56  $\mu\text{m}$  più superficiali includono il film lacrimale e l'**epitelio**.

Quest'ultimo non presenta una rete proteica continua, ma è costituito da 5-6 strati con tre tipi di cellule che formano una barriera permeabile e proteggono la superficie oculare dall'abrasione meccanica. I tre tipi di cellule presenti nell'epitelio corneale sono: cellule superficiali, cellule alari e cellule basali. Le cellule superficiali sono 2-3 strati costituiti da celle poligonali piatte che mantengono stretti complessi di giunzione tra i vicini impedendo alle lacrime di entrare negli spazi intercellulari. Le cellule alari vengono denominate così in quanto presentano una forma ad ala e sono disposte in tre file. Le cellule basali formano un singolo strato epiteliale, ovvero lo strato basale, il più profondo



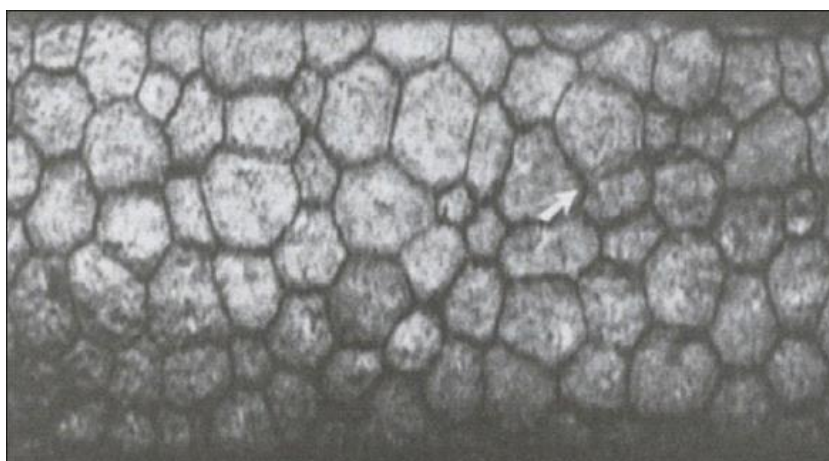
dell'epitelio [29]. L'epitelio funge da barriera alle sostanze chimiche, all'acqua e ai microbi; inoltre, fornisce una superficie ottica liscia come parte interna dell'interfaccia film lacrimale-cornea, contribuendo al potere refrattivo dell'occhio.

Il successivo strato corneale è la **membrana di Bowman**. Esso è uno strato acellulare, composto da fibrille di collagene orientate in modo casuale, spesso circa 17  $\mu\text{m}$ . Descrivendola più precisamente, la membrana di Bowman è costituita da collagene di tipo I e V e da proteoglicani, i quali sono macromolecole organiche ad elevato peso molecolare costituite da brevi catene peptidiche unite covalentemente a lunghe catene glucidiche che aiuta nel mantenimento della forma corneale. Non possiede capacità rigenerative e dunque può provocare cicatrici. È uno strato liscio che aiuta la cornea a mantenere la propria forma.

Sempre composto da fibrille di collagene organizzate in lamelle che corrono approssimativamente parallele alle superfici corneali, è lo **stroma** corneale, posto al di sotto dello strato di Bowman. Lo stroma costituisce la maggior parte del tessuto corneale e il suo spessore pari a circa 500  $\mu\text{m}$ . L'appropriata spaziatura tra le lamelle adiacenti e le fibrille di collagene al loro interno è cruciale per la trasparenza corneale ed è mantenuta dai proteoglicani. Tra una lamella e l'altra sono presenti i cheratociti, fibroblasti di forma dendritica, che producono cheratina, la quale conferisce resistenza meccanica. In sintesi, lo stroma è lo strato che provvede maggiormente al mantenimento della trasparenza corneale e ne conferisce la maggior parte della resistenza meccanica.

La **membrana di Descemet**, spessa soltanto 3  $\mu\text{m}$ , è uno strato fibroso acellulare secreto dalle cellule endoteliali sottostanti, costituito da collagene di tipo IV e laminina. È una membrana elastica e si "ariccica" se viene recisa.

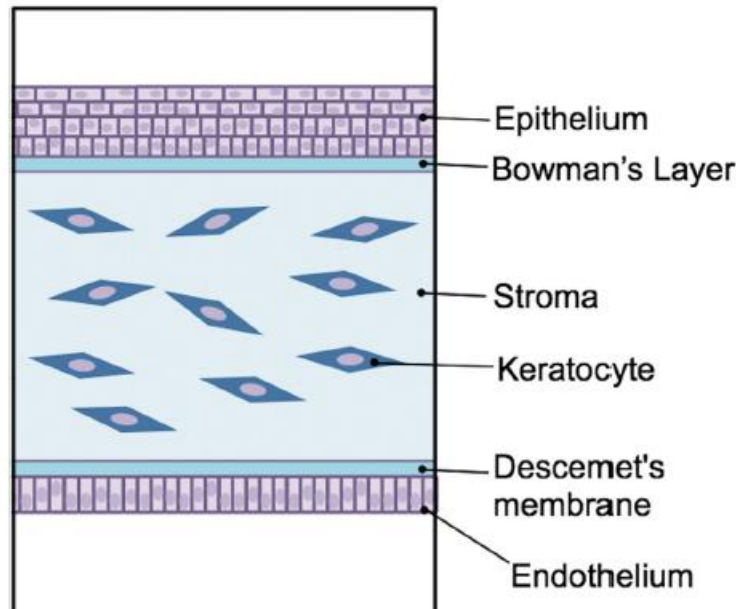
Infine, l'**endotelio** è un monostrato cellulare che non possiede una rete proteica continua. Le cellule che lo compongono sono esagonali e metabolicamente attive. L'endotelio è un monostrato che appare come un mosaico a nido d'ape se visto dal lato posteriore.



*Figura 2.4: strato di cellule endoteliali su microscopia speculare [29].*

## 2.1.1 Composizione

Il tessuto corneale è costituito per il 90% dallo stroma, che conferisce alla cornea fondamentali proprietà; tra cui trasparenza, avascolarizzazione, nonché proprietà meccaniche necessarie per la resistenza e il mantenimento della forma. Lo stroma è composto da molecole della matrice extracellulare (ECM), acqua e una rete comunicante di cheratociti.



*Figura 2.5: Schematica rappresentazione mostrante gli strati corneali e la forma approssimativa delle cellule all'interno di ogni strato. Lo strato di Bowman e la membrana di Descemet sono privi di cellule [31].*

Il cheratocita è il tipo cellulare predominante nello stroma corneale. I cheratociti sono cellule derivate dalla cresta neurale che popolano lo stroma corneale in via di sviluppo e sintetizzano i componenti della matrice extracellulare stromale. Queste cellule sono essenziali per lo sviluppo dello stroma e per il mantenimento delle sue proprietà, poiché regolano e dirigono la deposizione delle fibrille di collagene e organizzano le lamelle stromali durante lo sviluppo. Come affermato nel paragrafo precedente, è il collagene la proteina più presente nella matrice extracellulare corneale. Ciò che, infatti, caratterizza maggiormente lo stroma corneale sono le fibrille di collagene, le quali risultano omogenee, di piccolo diametro (23-35 nm) e altamente organizzate in lamelle approssimativamente perpendicolari tra loro [32].

In sintesi, l'unità strutturale dello stroma corneale è la fibrilla di collagene. La sottofamiglia costituente le fibrille di collagene comprende i collagene I, V e XI. Il collagene di tipo I è la proteina più abbondante dello stroma corneale. I collagene V e XI sono presenti in minor quantità. Il collagene V costituisce solo il 10-20% dei collagene che formano le fibrille. La sottoclasse di collagene V/XI va sotto la denominazione di "collagene regolatori", ovvero coinvolti nella regolazione dell'assemblaggio delle fibrille [32].

Tutti i collagene sopra menzionati hanno un dominio a tripla elica interrotto a circa 300 nm e sono sintetizzati e secreti come procollagene. Il collagene è, infatti, una proteina fibrosa organizzata in fibre a partire da sequenze polipeptidiche generate da sintesi proteica.

Ogni singola catena polipeptidica di collagene consiste in una sequenza di amminoacidi. Un amminoacido è una molecola organica caratterizzata da un gruppo funzionale amminico ( $-NH_2$ ) e un gruppo carbossilico ( $-COOH$ ). Gli amminoacidi in cui questi due gruppi sono legati allo stesso

atomo di carbonio (carbonio  $\alpha$ ), vengono chiamati  $\alpha$ -amminoacidi, i quali costituiscono la struttura primaria delle proteine. La formula generale di un  $\alpha$ -amminoacido è  $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COOH}$ , dove il gruppo R indica la catena laterale dell'amminoacido e ne conferisce le proprietà chimico-fisiche. Le sequenze polipeptidiche si generano attraverso l'instaurarsi di un legame covalente denominato ammidico, che provoca la liberazione di una molecola d'acqua, tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e il gruppo amminico di un altro amminoacido costituente la catena polipeptidica.

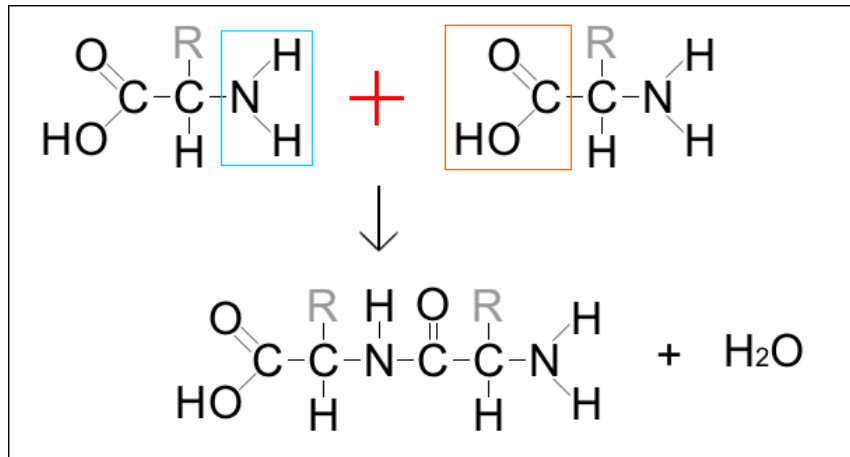


Figura 2.6: Reazione di condensazione di un aminoacido in cui la parte acida (gruppo carbossilico -COOH) si unisce con quella basica (gruppo amminico -NH<sub>2</sub>).

Nella biosintesi del collagene, tre catene polipeptidiche si avvolgono tra loro in una tripla elica che forma il procollagene, il quale matura poi in tropocollagene. Quest'ultimo è l'unità strutturale della fibrilla di collagene che, a sua volta, si organizza in fibre.

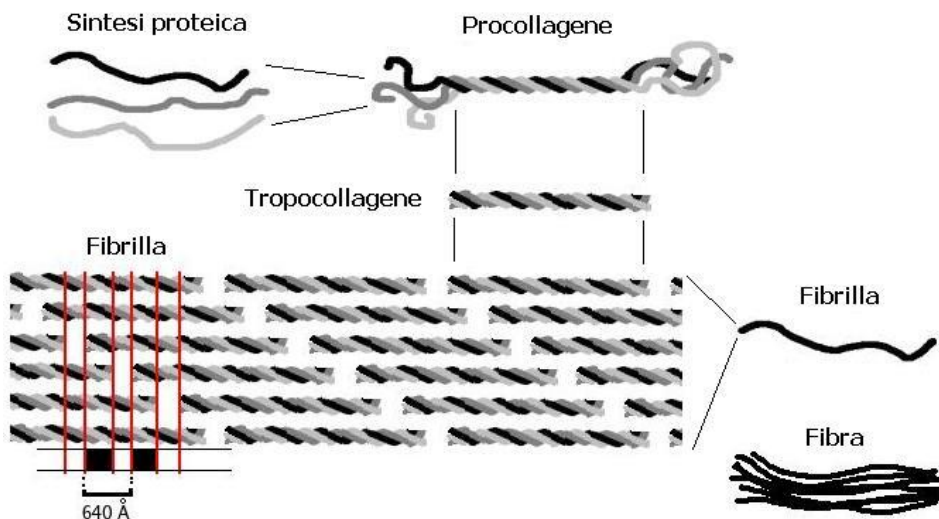


Figura 2.7: Schema della biosintesi del collagene.

In generale, il collagene è una delle principali proteine strutturali che forma dei cavi molecolari i quali rafforzano i tessuti molli. La struttura base è la microfibrilla. Le microfibrille possiedono una diversa architettura interna, diametro e disposizione spaziale correlata alle loro specifiche esigenze funzionali. All'interno della sezione trasversale della fibrilla ci sono circa 300-400 molecole a tripla elica [29]. Le fibrille stromali sono costituite principalmente da collagene di tipo I e V, il primo è

quello dominante e origina fibrille di diametro molto piccolo. Grazie alla microscopia elettronica a scansione utilizzata nel 1991 da Komai e Ushiki [33], è noto che le fibrille corneali di collagene hanno un diametro uniforme di circa 25 nm e sono organizzate sotto un rigido e regolare imballaggio. Esistono degli spazi interfibrillari, mantenuti dai componenti della matrice extracellulare ai quali si associano le fibrille. Le microfibrille sono a loro volta organizzate in macro aggregati tessuto-specifici di forma lamellare orientati più o meno ortogonalmente al percorso della luce attraverso la cornea. Le lamelle appaiono come nastri appiattiti, con spessore uniforme ma larghezza variabile (da 7 a 250  $\mu\text{m}$ ) [34].

Oltre al collagene le altre proteine extracellulari presenti nello stroma sono i proteoglicani. Questi sono filamenti proteici, posizionati ortogonalmente alle fibrille di collagene grazie a catene di glicosaminoglicani (GAGs), le quali sono legate covalentemente alla porzione globulare dei proteoglicani. All'interno della cornea prevalgono due tipi di proteoglicani: le osteoglicine, ciascuna contenente un filamento di cheraton-solfato e una proteina globulare diversa; e la decorina, un piccolo proteoglicano composto da una singola catena laterale di dermatan-solfato e da una proteina globulare a forma di ferro di cavallo. Si presume che queste molecole siano responsabili del mantenimento delle relazioni spaziali tra le fibrille e che su queste vi siano siti di legame specifici per differenti molecole. Nonostante l'interazione tra le fibrille di collagene e i proteoglicani sia relativamente debole, vari studi hanno dimostrato che la struttura risultante è altamente resistente; di fatto, la cornea può gonfiarsi e ritornare alla sua idratazione normale senza che vi siano alterazioni nell'organizzazione del collagene [35].

### **2.1.2 Orientamento delle fibre di collagene**

È dalla prima metà del 1900 che viene studiato l'orientamento delle lamelle stromali. Gli studi condotti da Kokkot nel 1938 [36] hanno permesso di conoscere i principi base della trasparenza e della struttura corneale. Con l'avanzare del tempo, il tessuto corneale è stato analizzato tramite le tecniche della microscopia elettronica a scansione (SEM), della diffrazione a raggi X, della microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e della tomografia a coerenza ottica (OCT). La tecnica che è stata maggiormente utilizzata è quella della diffrazione a raggi X, in quanto permette di condurre sia un'analisi qualitativa che quantitativa.

Ciò che viene considerato responsabile della trasparenza del tessuto corneale è il regolare arrangiamento delle fibrille di collagene all'interno di ogni lamella, mentre l'orientamento degli strati fibrillari adiacenti attraverso l'intera cornea risulta essere un fattore determinante le proprietà meccaniche della cornea. Il fatto di poter avere a disposizione delle informazioni quantitative sulla distribuzione delle lamelle stromali rende possibile la comprensione delle proprietà biomeccaniche della cornea e l'ottimizzazione della chirurgia refrattiva [37].

I vari studi condotti da Keith M. Meek su cornee umane con l'ausilio dei raggi X a sincrotroni ([38], [39], [40]) hanno portato ad identificare due direzioni preferenziali delle lamelle stromali: superiore-inferiore (SI) e nasale-temporale (NT), (Fig. 2.8). Le analisi condotte hanno rivelato un'anisotropia strutturale nelle cornee sane. L'orientazione lamellare che segue le due direzioni, SI ed NI, è specifica della regione centrale della cornea. Questa distribuzione strutturale coinvolge circa il 60% delle lamelle, mentre il restante 30% risulta orientato in maniera casuale. Inoltre, è stato riscontrato un

cambiamento di curvatura nella regione del limbus. Questa variazione è legata alla presenza di una consistente quantità di fibrille allineate secondo una direzione circonferenziale.

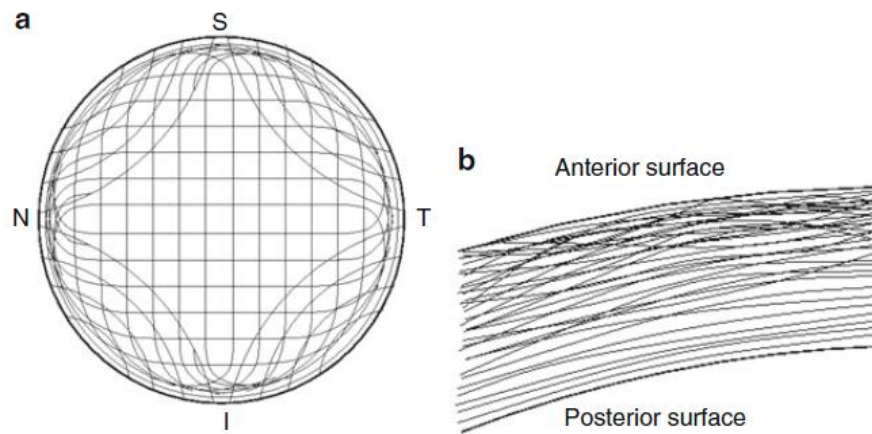


Figura 2.8: Distribuzione delle fibrille di collagene nella cornea umana. A) Vista in piano dell'orientazione principale delle fibrille nel terzo posteriore dello spessore corneale. B) Schematica rappresentazione dell'inclinazione delle lamelle attraverso lo spessore corneale [27].

I primi che quantificarono il grado di anisotropia strutturale nella cornea umana normale furono Daxer e Fratzi [37], osservando che il circa il 66% delle fibrille dello stroma sono localizzate in un settore di  $45^\circ$  lungo le direzioni NT e SI, ed il restante 33% è localizzato nei settori circostanti.

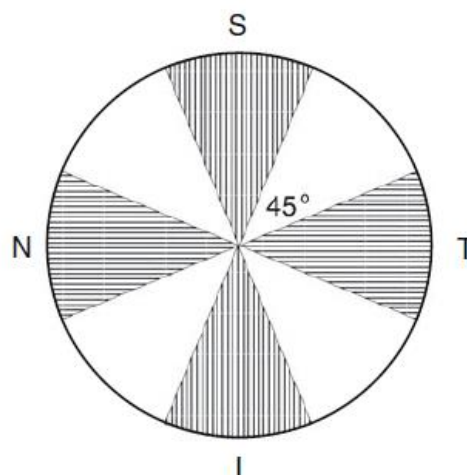


Figura 2.9: Orientamento preferenziale delle fibrille di collagene nella cornea [41].

Inoltre, indagini effettuate con tecniche di imaging biomedicale hanno rivelato che le lamelle di collagene nella cornea posteriore risultano due volte più spesse di quelle nella cornea anteriore, e che l'interazione interlamellare conseguente all'intreccio strutturale porta ad una rigidità di taglio tre volte superiore nel terzo anteriore dello stroma rispetto al suo terzo posteriore [42].

Riassumendo, nella regione della cornea centrale, le lamelle si estendono senza interruzione da limbus a limbus seguendo una disposizione preferenziale ortogonale lungo le direzioni dei due meridiani principali, SI ed NT, mentre, a livello del limbus il collagene assume un arrangiamento circolare (Fig. 2.8). Questa particolare organizzazione che segue due direzioni di allineamento delle fibrille è uno dei contributi principali per le diverse proprietà meccaniche della cornea periferica e del limbus rispetto al tessuto centrale, accompagnato dal fatto che sia le dimensioni delle fibrille di collagene che il numero di lamelle in queste due zone sia maggiore rispetto al centro [27].

## 2.2 Geometria corneale

Questo paragrafo è incentrato sulla descrizione geometrica della cornea sana umana. Si fornisce la descrizione matematica dell'asfericità corneale seguendo un modello di superficie biconica, approssimando il profilo corneale ad una sezione conica di forma ellittica. Una sezione conica (o più semplicemente 'conica') è una curva formata dall'intersezione di un piano e un cono. La sezione corneale è un'ellisse prolata, consistente di una parte più curva, l'apice, con un progressivo appiattimento verso la periferia. Ogni meridiano e semimeridiano della cornea verrà dunque considerato come una curva ellittica e verranno incluse una serie di approssimazioni. In particolare, si presuppone che l'apice coincida con il vertice e con il centro geometrico della cornea, e si considera la superficie corneale simmetrica rispetto all'asse visivo [43].

### 2.2.1 Geometria cornea sana

La cornea è una membrana trasparente, caratterizzata da una superficie anteriore convessa ed una posteriore concava. Le principali caratteristiche geometriche della cornea riguardano la forma, lo spessore ed i raggi di curvatura. La superficie anteriore ha la forma di un'ellissoide. Più precisamente, la cornea è una calotta di ellissoide e perciò la sua superficie è ben approssimata da un segmento ellissoidale. L'equazione di un corpo ellissoidale standard in un sistema di coordinate  $x - y - z$  è:

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} + \frac{z^2}{c^2} = 1 \quad (2.1)$$

dove  $a$  e  $b$  sono i raggi equatoriali (lungo gli assi  $x$  e  $y$ ) e  $c$  è il raggio polare (lungo l'asse  $z$ ). Il diametro ( $D_h$ ) lungo la direzione nasale-temporale NT risulta essere il 10% più grande del diametro ( $D_v$ ) lungo la direzione supero-inferiore SI, con, mediamente,  $D_h$  pari a 11.8 mm, mentre  $D_v$  pari a 10.6 mm [44], [45]. Il raggio di curvatura anteriore sull'asse ottico ( $R_z$ ) è pari a 7.8 mm, e la massima elevazione all'apice ( $H$ ) è pari a 2.6 mm [44].

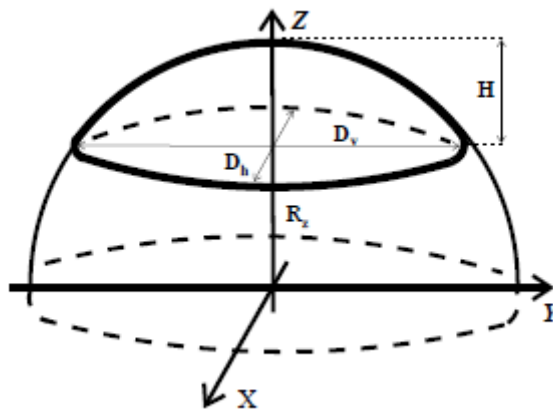


Figura 2.10: Geometria di un ellissoide corneale [46]

Il valore del raggio di curvatura è confermato anche dagli studi portati avanti da Dubbleman et al. [47], che mediante la tecnica della fotografia di Scheimpflug hanno ottenuto un valore medio per il raggio di curvatura anteriore pari a 7.87 mm e uno pari a 6.4 mm per la superficie posteriore. In



generale, la cornea umana presenta un diametro medio orizzontale che oscilla tra 11 e 13 mm ed uno spessore variabile, più sottile al centro rispetto ai bordi. Lo spessore raggiunge una media minima di 500  $\mu\text{m}$  in corrispondenza dell'apice (spessore corneale centrale CCT) ed una media massima di 650  $\mu\text{m}$  in periferia (spessore corneale periferico PCT), in prossimità del limbus, il quale consiste in una struttura spessa e rigida che collega la cornea trasparente alla sclera bianca [27].

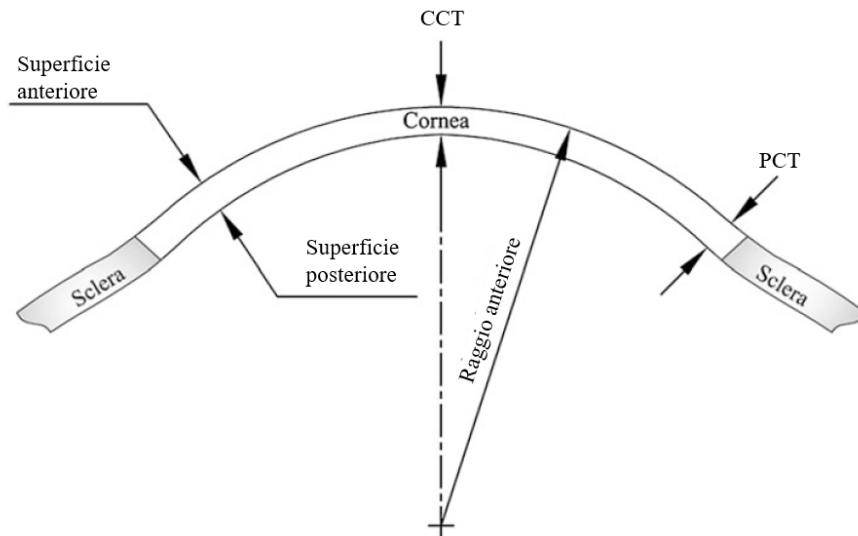


Figura 2.11: Rappresentazione grafica semplice dello spessore corneale.

Per fornire una descrizione geometrica accurata, data la difficoltà di definire matematicamente la forma delle superfici interna ed esterna della cornea per via della rapida variazione della loro curvatura in prossimità del limbo, è conveniente individuare due diverse regioni della cornea. Una di queste è la *zona ottica* (di raggio pari a 3 mm), la quale costituisce la parte circolare centrale posta di fronte alla pupilla, responsabile della corretta focalizzazione dei raggi luminosi sulla retina [48] ; l'altra viene denominata *zona periferica*.

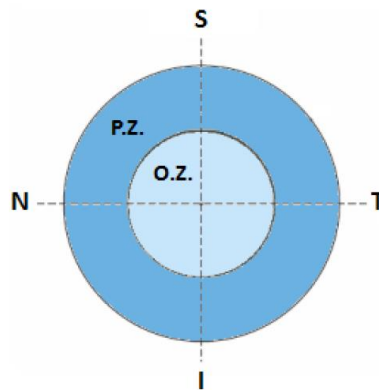


Figura 2.12: Visione frontale schematica della cornea. Zona periferica (P.Z.), zona ottica (O.Z.). Direzioni dei meridiani principali (SI ed NT).

La zona ottica è la più importante in termini di rifrazione ed è di forma sferica, ma considerando la cornea lungo tutto il suo diametro, essa non si può definire sferica in toto. La sua forma è determinata sia dall'azione della pressione intraoculare sulla superficie posteriore, responsabile della forma sferica nella zona ottica; che della maggiore rigidità del limbus, il quale vincola la zona periferica forzando la cornea ad assumere una diversa configurazione da quella sferica dell'apice. Per descrivere questi aspetti, come detto in precedenza, si approssima il profilo corneale ad una conica, caratterizzata da due parametri fondamentali: il raggio apicale ed un indice che, in generale, esprime quanto una

curva differisce dalla circonferenza descritta dal raggio apicale. Quest'ultimo parametro può essere definito con quattro diversi coefficienti. Tutti esprimono il fattore di forma di una conica e sono:

- $p$ : parametro conico
- $E$ : fattore di forma
- $e$ : eccentricità
- $Q$ : coefficiente di asfericità

Ogni conica può essere rappresentata dalla seguente equazione:

$$y^2 = 2r_0x - px^2 \quad (2.2)$$

in cui  $y$  è la distanza di un punto della curva dall'asse di simmetria. Dato che la conica in questione rappresenta la sezione di una superficie asferica ottica,  $y$  è la distanza di un punto sulla superficie dal suo asse ottico.

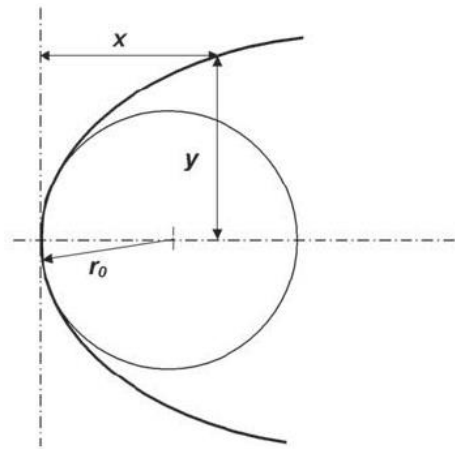


Figura 2.13: Generica sezione conica dove  $r_0$  è il raggio apicale.

Il parametro  $p$  è un fattore di forma che dà un'indicazione del grado di *flattening* o di *steepening* della curva dall'apice alla periferia. In un'ellisse descritto dalla (2.1), in cui  $a$  è il semiasse maggiore e  $b$  il semiasse minore, come mostrato in Fig. 2.14,  $p$  risulta essere pari a:

$$p = \frac{b^2}{a^2} \quad (2.3)$$

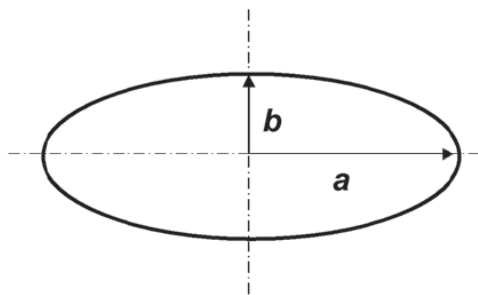


Figura 2.14: Ellisse

La cosiddetta costante conica, chiamata anche indice di asfericità  $Q$  è legata a  $p$  dalla seguente relazione:  $Q = p - 1$ . Per descrivere la forma corneale in un sistema di coordinate cilindriche viene utilizzata proprio la costante conica  $Q$ . Come detto in precedenza, le sezioni trasversali delle superfici interna ed esterna delle cornee naturali sono generalmente caratterizzate da asfericità e qualsiasi meridiano delle superfici della cornea risulta approssimato meglio da una sezione conica che da un



arco circolare. La deviazione dalla sfericità contribuisce a difetti refrattivi, quali astigmatismo e miopia. Le cornee emmetropi (caratterizzate da una corretta refrazione) o miopiche vengono ben descritte da semplici equazioni, come ad esempio ellissoidi prolata od oblate. Una cornea normale è prolata, ovvero più curva al centro e più piatta verso la periferia ( $-1 < Q < 0$ ), al contrario una superficie oblate è più piatta al centro ( $Q > 0$ ). Considerando un sistema di riferimento cilindrico ( $\rho, \theta, z$ ), l'equazione di un ellissoide è data dalla seguente relazione:

$$z = R_z \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{R^2}}, \quad \text{con } R = (1 + Q) R_z \quad (2.4)$$

dove  $Q$  è la costante conica,  $R$  è la massima curvatura in direzione radiale ed  $R_z$  è la curvatura in direzione  $z$ .

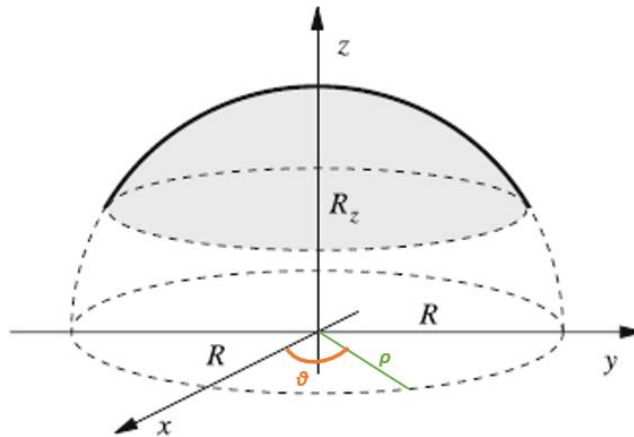


Figura 2.15: Geometria di un ellissoide prolata.

La maggior parte delle cornee emmetropi (caratterizzate da una corretta refrazione) possono essere descritte da ellissoidi prolata con  $R_z > R$ .

I meridiani principali sono delle sezioni non sferiche, reciprocamente ortogonali.

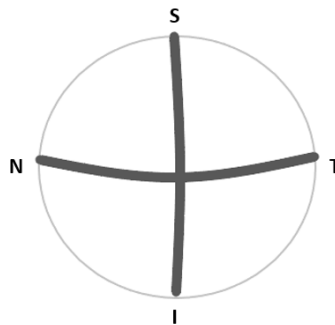


Figura 2.16: Visione frontale della cornea con, evidenziate, le direzioni dei meridiani principali (SI ed NT).

Per quantificare le due diverse asfericità, si può caratterizzare la geometria della cornea mediante l'equazione di una superficie biconica:

$$z(\rho, \theta; R_x, R_y, Q_x, Q_y, \alpha, z_0) = z_0 - \frac{\rho^2 A}{1 + \sqrt{1 - \rho^2 B}}, \quad \text{dove } A \text{ e } B \text{ sono pari a:}$$

$$A = \frac{\cos^2(\theta - \alpha)}{R_x} + \frac{\sin^2(\theta - \alpha)}{R_y}$$

$$B = (Q_x + 1) \frac{\cos^2(\theta - \alpha)}{R_x^2} + (Q_y + 1) \frac{\sin^2(\theta - \alpha)}{R_y^2}$$

In queste relazioni  $R_x$  ed  $R_y$  sono le massime curvature dei meridiani principali,  $\alpha$  è la direzione del meridiano principale più curvo, ed  $Q_x$  ed  $Q_y$  sono i parametri di asfericità lungo la direzione  $\alpha$  e  $\alpha+\pi/2$ , rispettivamente. La funzione  $z$  raggiunge il suo valore massimo  $z_0$  in corrispondenza dell'apice corneale ( $\rho = 0$ ) [48], [27], [49].

## 2.3 Potere di rifrazione della cornea

La cornea è una lente menisco ed è una delle quattro strutture trasparenti che consentono il passaggio della luce nel globo oculare e la conseguente formazione dell'immagine sulla retina, ovvero, costituisce uno dei mezzi diottrici oculari. La superficie anteriore della cornea è l'interfaccia tra l'aria e l'occhio ed è la superficie con il più alto potere di rifrazione nell'occhio umano pari a circa 48 D (diottrie) [50]. Il potere corneale rappresenta circa due terzi della potenza diottrica totale dell'occhio ed è per questo che la cornea è un componente cruciale del sistema di rifrazione oculare. Considerando anche la superficie posteriore della cornea, il suo potere diottrico risulta pari a 43 diottrie, contribuendo al 70% del potere refrattivo dell'occhio, seguito da quello del cristallino che va dalle 17 fino alle 22 diottrie; mentre l'umor acqueo e l'umor vitreo hanno un potere diottrico minimo [51].

Al fine di comprendere il potere diottrico della cornea è necessario richiamare brevemente le leggi dell'ottica. L'ottica geometrica insegna che la luce in un mezzo omogeneo, come l'aria, si propaga lungo linee rette (raggi luminosi). Quando passa tra due mezzi trasparenti differenti, caratterizzati da diverse densità, i raggi luminosi trasmessi dal primo al secondo mezzo subiscono il fenomeno di rifrazione secondo la legge di Snell:

$$n_1 \sin i = n_2 \sin r \quad (2.5)$$

In cui  $i$  e  $r$  rappresentano gli angoli che il raggio incidente e quello rifratto formano con la normale alla superficie di interfaccia tra due mezzi.

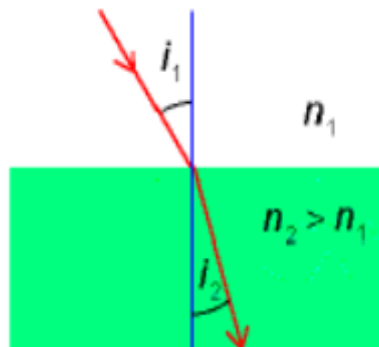


Figura 2.17: Rifrazione secondo la legge di Snell, il verde indica il secondo mezzo.

La lettera  $n$  sta ad indicare l'indice di rifrazione, il quale, come già anticipato nel paragrafo 1.3 del capitolo 1, è il rapporto tra la velocità della luce nel vuoto ( $c$ ) e la velocità della luce nel mezzo ( $v$ ):

$$n = \frac{c}{v}, \quad \text{dove } c = 3 \times 10^8 \text{ m/s} \quad (2.6)$$

L'indice di rifrazione è sempre maggiore o pari a 1 e costituisce una caratteristica del mezzo che dipende dalla lunghezza d'onda della luce.

Nel sistema visivo i raggi luminosi giungono alla superficie retinica dopo aver attraversato l'aria, il film lacrimale, la cornea, l'umor acqueo, il cristallino e l'umor vitreo. Queste strutture anatomiche trasparenti o, meglio, la loro successione, costituisce un insieme di diottri accoppiati e centrati sullo

stesso asse, dove, per diottro s'intende il più semplice sistema ottico costituito da una superficie di contatto che separa due mezzi ottici. Ciascuno di questi diottri è costituito da una superficie rifrangente delimitante due tessuti con indici di rifrazione differenti.

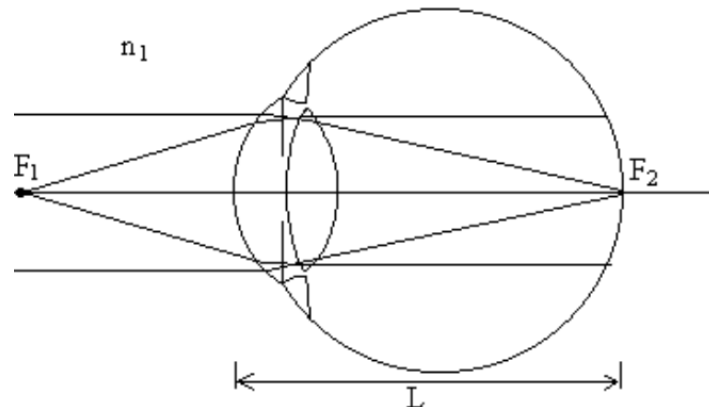


Figura 2.18: rappresentazione schematica del diottro oculare. Esso è un sistema ottico con due punti di fuoco: uno anteriore ( $F_1$ ), legato alla focalizzazione iniziale della cornea; uno retinico ( $F_2$ ), dove si forma l'immagine sulla retina.  $L$  e  $n_1$  sono rispettivamente la lunghezza assiale del bulbo oculare e l'indice di rifrazione dell'aria.

Riprendendo alcuni concetti fondamentali del primo capitolo dell'elaborato, il potere refrattivo di una lente è inversamente proporzionale alla sua distanza focale, ovvero alla distanza tra il fuoco e il centro della lente. È chiaro che, se si vuole calcolare il potere di rifrazione della cornea, la lente a cui si fa riferimento è la cornea stessa. Il potere refrattivo totale di un sistema diottrico è uguale alla somma algebrica del potere refrattivo di ciascuna lente componente.

Considerando la cornea un diottro semplice costituente il sistema refrattivo dell'occhio e sapendo che le potenze diottriche delle superfici vengono calcolate come

$$D = \frac{n_2 - n_1}{R} \quad (2.7)$$

dove  $D$  è la misura in diottrie ( $m^{-1}$ ),  $n_1$  rappresenta l'indice di rifrazione del primo mezzo,  $n_2$  quello del secondo mezzo ed  $R$  è il raggio di curvatura della superficie di riferimento; è facile ricavare il potere diottrico totale della cornea.

Per il calcolo è necessario conoscere specifici dati geometrici corneali:

- raggio di curvatura della cornea anteriore ( $r_1 = 7.7mm$ )
- raggio di curvatura della cornea posteriore ( $r_2 = 6.8mm$ )
- indice di rifrazione ( $n_{cornea} = 1.376$ )

Sono noti anche gli indici di rifrazione dell'acqua e dell'umor acqueo, rispettivamente pari a 1 e 1.336 [52].

Dunque, relativamente alla superficie anteriore del diottro:

$$D_1 = \frac{n_{cornea} - n_{aria}}{r_1} = \frac{1.376 - 1}{7.7 \times 10^{-3}} = 48.83 \text{ D}$$

Mentre, per la superficie posteriore del diottro:

$$D_2 = \frac{n_{acqueo} - n_{cornea}}{r_2} = \frac{1.336 - 1.376}{6.8 \times 10^{-3}} = -5.88 \text{ D}$$

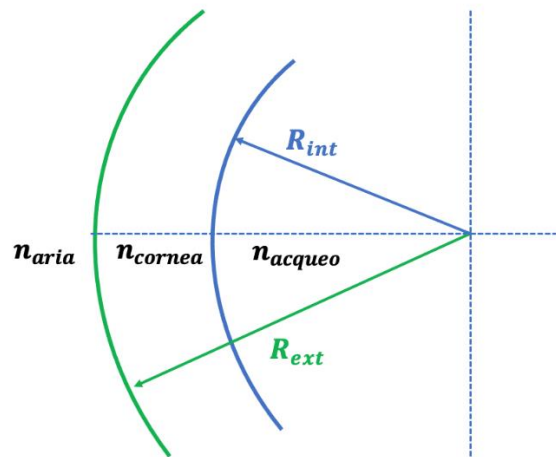


Figura 2.19: In verde, la superficie corneale anteriore. In blu, la superficie corneale posteriore.

Dunque, si ottiene una potenza diottrica totale della cornea pari a 42.95 D. Se nel calcolo viene considerato anche lo spessore corneale, uguale mediamente a 0.5 mm, si avrà:

$$D_{12} = 48.83 - 5.88 - \frac{0.5}{1.376 \times 1000} \times 48.83 \times (-5.88) = 43.05 \text{ D}$$

Con  $D_{12}$  viene indicata la potenza diottrica totale della cornea.

## CAPITOLO 3: Cheratocono e Cross-Linking corneale

In questo terzo capitolo si tratterà di una delle principali malattie dell'occhio che impattano la cornea: il **cheratocono**. Una cornea sana è trasparente, rigida e di forma approssimativamente sferica. Traumi, infiammazioni, avanzamento dell'età e predisposizione ereditaria, possono favorire l'insorgere di patologie corneali. Oltre al cheratocono, alcune di queste patologie sono: leucomi e distrofie corneali, scompenso corneale e cheratiti settiche. Tutte portano alla perdita di trasparenza compromettendo l'acuità visiva. Generalmente, i principali sintomi riscontrati nelle patologie corneali sono la sensazione di corpo estraneo, l'alterazione della visione e la fotofobia.

I leucomi corneali sono malattie della cornea riconducibili ad infezioni o traumi oculari, come abrasioni della cornea o penetrazioni di corpi estranei.

Le distrofie corneali sono disturbi progressivi di natura non infiammatoria, provocanti una progressiva opacizzazione della cornea.

Lo scompenso corneale si riscontra quando si verifica una riduzione del numero e della funzionalità delle cellule che hanno il compito di mantenere equilibrato e costante il livello d'idratazione della cornea. Se si riducono numericamente, la cornea si imbeve d'acqua, diventando biancastra.

Le cheratiti rientrano nella categoria delle patologie infiammatorie. Gli agenti infettivi, quali batteri, funghi e virus, costituiscono le cause più frequenti per questo tipo di patologia perché vengono spesso veicolati dall'acqua. Anche un eccessivo utilizzo delle lenti a contatto può provocare cheratite. Tra i sintomi più caratteristici delle cheratiti settiche si riscontrano: improvviso dolore oculare, intolleranza alla luce e lacrimazione.

Il cheratocono è una patologia ectasica che peggiora spontaneamente, si verifica quando la cornea perde rigidità e resistenza portando a un progressivo assottigliamento di una porzione centrale e paracentrale del tessuto corneale, il quale nel tempo assume forma conica con l'insorgenza di un astigmatismo miopico irregolare. In genere il cheratocono è bilaterale, con un occhio peggiore rispetto all'altro, quello in cui la malattia si manifesta prima. Una diagnosi precoce è fondamentale per bloccare l'evoluzione della malattia. Nei casi più avanzati, quando l'assottigliamento estremo del tessuto corneale comporta un rischio imminente di perforazione, è necessario il trapianto di cornea. Fortunatamente, questo intervento può essere in molti casi evitato grazie al **Cross-Linking Corneale**. Questo è un tipo di trattamento a bassa invasività che si può effettuare nelle fasi iniziali del cheratocono evolutivo e serve proprio a bloccarne l'evoluzione. Il cross linking (CXL) prevede l'installazione di un collirio a base di riboflavina associata a irradiazione con raggi UV-A, in modo da irrigidire il tessuto corneale attraverso la polimerizzazione delle fibre stromali.

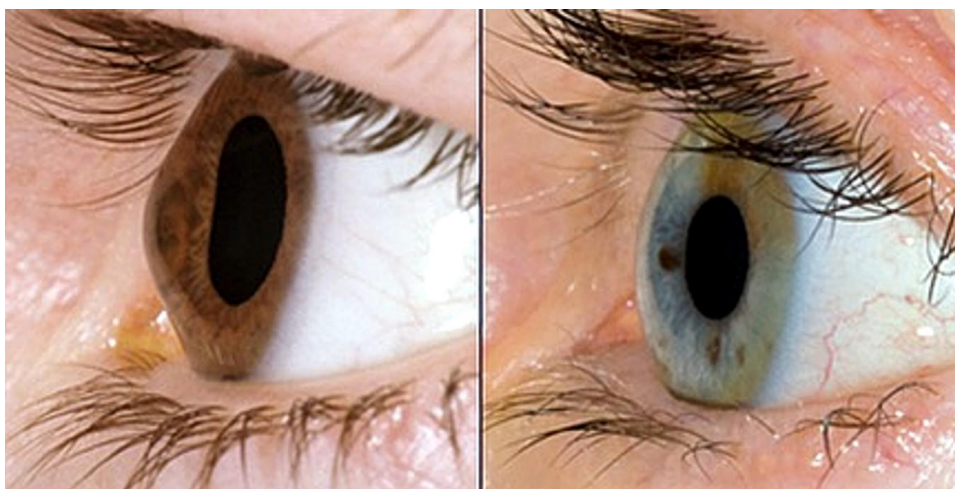
Il cheratocono è una patologia della cornea che peggiora spontaneamente, portando a un progressivo assottigliamento e alla perdita della sua normale forma sferica con l'insorgenza di un astigmatismo miopico irregolare. Il sintomo principale è la comparsa di visione sfuocata da lontano, ma la caratteristica che nell'evoluzione diventa prevalente è l'impossibilità di ottenere una correzione con l'occhiale senza una residua distorsione delle immagini, soprattutto la notte, e il peggioramento progressivo dell'astigmatismo. Si manifesta più frequentemente tra i 12 e i 15 anni, con un peggioramento fino ai 25-30 anni, per poi stabilizzarsi dopo i 35-40 anni. Può avere una velocità di peggioramento molto variabile, e pur essendo una malattia bilaterale, uno dei due occhi inizia per primo, rimanendo sempre il peggiore negli anni. La maggiore frequenza in alcuni nuclei familiari e in determinate aree geografiche suggerisce un ruolo genetico, anche se non sono stati identificati i

geni responsabili di questa malattia. Effettuare regolari visite dal medico oculista è fondamentale, anche per un banale incremento della miopia e soprattutto dell'astigmatismo. In caso di sospetto si prescrivono ulteriori accertamenti, come la tomografia corneale OCT e la pachimetria totale della cornea. Una diagnosi precoce è fondamentale per bloccare l'evoluzione della malattia.

### 3.1 Cheratocono: epidemiologia, istopatologia, eziologia e sintomatologia.

Il termine cheratocono deriva da due parole greche: “kéras”, che significa cornea, e “conus”, il cui significato è cono. Perciò, la parola cheratocono possiede il significato letterale “a forma di cono” e viene comunemente abbreviato con la sigla **KC**. Il cheratocono viene considerata una patologia oculare bilaterale e asimmetrica che colpisce tutte le etnie ed entrambi i sessi. Ancora oggi il cheratocono è identificato come una malattia non infiammatoria, anche se recenti studi indicano che gli occhi cheratoconici presentano spesso qualche forma di infiammazione oculare.

Il cheratocono viene definito come patologia ectasica della superficie corneale caratterizzata da una distrofia e lenta evoluzione del tessuto che si traduce in un indebolimento strutturale. La conseguenza a questo indebolimento porta a una progressiva deformazione della cornea, caratterizzata da protrusione con assottigliamento stromale. Il profilo corneale caratteristico di questa patologia si presenta con una forma irregolarmente appuntita a cono; in pratica, la cornea passa da essere lievemente asferica a conica.



*Figura 3.1: A sinistra, immagine di una cornea cheratoconica. A destra, immagine di una cornea normale.*

Di norma, il cheratocono si sviluppa nel secondo e terzo decennio di vita progredendo sino al quarto. Si manifesta più frequentemente tra i 12 e i 15 anni, con un peggioramento sino ai 25-30 anni. Può avere una velocità di peggioramento molto variabile, e pur essendo una malattia bilaterale, uno dei due occhi inizia per primo, rimanendo sempre il peggiore negli anni. La prevalenza e i tassi di incidenza del cheratocono sono stati stimati tra 0.2 e 4790 per 100000 persone e 1.5 e 25 casi per 100000 persone l'anno, rispettivamente, con i tassi più elevati che si verificano tipicamente nella fascia d'età precedentemente indicata (20-30 anni) nelle aree del Medio Oriente ed etnie asiatiche [53].

In sintesi, il KC è un'alterazione strutturale del tessuto corneale. Questa alterazione istopatologica è più pronunciata nella cornea centrale rispetto a quella periferica, concentrandosi principalmente nell'epitelio corneale, nello strato di Bowman e nello stroma, ovvero a livello della cornea anteriore. I risultati istopatologici maggiormente osservati nei casi di cheratocono sono il progressivo assottigliamento stromale, la rottura della membrana limitante anteriore (strato di Bowman) e, infine, l'ectasia della cornea centrale/paracentrale, dove per ectasia corneale si intende lo sfiancamento del tessuto che porta ad un'alterazione della normale curvatura della cornea stessa.

L'eziologia della malattia è ancora incerta. Da tempo si suppone esista una componente genetica. Dallo studio condotto da Wang et al. [54] nel 2000, si evince che un parente di un individuo affetto da cheratocono presenta un rischio da 15 a 67 volte maggiore di incorrere nel KC rispetto ad uno privo di una storia familiare cheratoconica. Molto più recentemente, nel 2020, si è riscontrato che il cheratocono colpisce in maniera smisurata le persone con sindrome di Down [55].

Oltre a questa correlazione dell'insorgenza della malattia con fattori genetici, si ipotizza anche che sia causata da condizioni comportamentali, come lo sfregamento degli occhi, da predisposizioni allergiche [56], fattori ambientali e disfunzioni delle ghiandole endocrine. Responsabili della comparsa di cheratocono sono le anomalie di crescita e metabolismo dei cheratociti, le cellule deputate al rinnovamento del tessuto corneale che hanno il compito di garantirne un'architettura strutturale adeguata.

Come descritto nel precedente capitolo, lo stroma è una matrice extracellulare composta da proteine fibrose intrecciate, principalmente collagene di tipo I e V. L'organizzazione e l'allineamento delle fibre di collagene in fasci denominati lamelle che si incrociano mostrando un elevato grado di intreccio nella parte anteriore della cornea e un andamento circonferenziale ai bordi, fa sì che la cornea si presenti come una struttura pseudo-cristallina che facilita il passaggio della luce attraverso la cornea. I cheratociti sono quella forma specializzata di fibroblasti responsabili del mantenimento della matrice extracellulare (ECM) all'interno dello stroma corneale. Queste cellule, normalmente incorporate nella ECM, si attivano quando è necessario innescare un processo di guarigione in risposta a un trauma o un'infezione dello stroma. I cheratociti attivi migrano nella zona della ferita e iniziano il processo di rimodellamento producendo enzimi che digeriscono la matrice extracellulare perdendo l'espressione delle proteine associate alla trasparenza cellulare. I cheratociti attivati possono anche diventare miofibroblasti ed esprimere l'alfa actina favorendo la chiusura della ferita stromale. Il problema è che questi miofibroblasti sono associati a processi patologici come l'opacità corneale e cicatrici. I cheratociti sono cellule guidate da citochine prodotte dall'epitelio corneale. Ma, nel cheratocono il comportamento dei cheratociti è anormale. In questa condizione di assottigliamento cellulare si verifica una deplezione dei cheratociti e delle cellule epiteliali. È chiaro che questa diminuzione nella densità cellulare porti ad indesiderabili ripercussioni come, nei casi più gravi, la rottura dello strato di Bowman perdendo l'adeguata protezione stromale e causando il cambiamento della forma dell'occhio mostrato in Fig. 3.1 [57].

Ciò che altera il regolare ricambio delle fibre di collagene da parte dei cheratociti, si è ipotizzato derivi dall'attivazione di alcuni geni presenti sul cromosoma 18. Secondo questa ipotesi, durante la seconda decade di vita, i cheratociti, incomincerebbero a lavorare in modo anomalo. All'interno di tali cellule, il cheratocono comporterebbe una variazione di produzione di alcuni enzimi, tra cui la proteasi (proteina che catalizza la rottura del legame peptidico tra il gruppo carbossilico ed ammidico delle proteine). Questo squilibrio tra produzione e degradazione delle fibre di collagene dello stroma provocherebbe la modifica della normale disposizione lamellare, portando alla perdita di trasparenza

e ad una ridotta resistenza meccanica con conseguente assottigliamento. L'assunzione della forma di un tronco di cono da parte della cornea potrebbe essere spiegata dal fatto che l'occhio possiede una pressione endoculare, la quale, nel punto di minor resistenza, ne determina una protrusione verso l'esterno [58].

In riferimento a quanto appena affermato si possono segnalare altre caratteristiche istopatologiche relative a questa malattia ectasica corneale, quali: la riduzione del numero di lamelle, in particolare nelle regioni associate allo sviluppo del cono; la diminuzione della distanza interfibrillare dei fogli di collagene e un aumento dei proteoglicani. Tali mutamenti a livello dell'architettura stromale, uniti al probabile spostamento laterale delle lamelle dovuto al gradiente pressorio sulla cornea, forniscono una potenziale spiegazione alla perdita di massa centrale che alla fine porta ad una riduzione dello spessore stromale [53].

Per quanto concerne la sintomatologia, in presenza di un cheratocono in fase iniziale, il paziente può riferire la comparsa di visione sfocata, specialmente da lontano, come una semplice miopia. Successivamente, le capacità visive peggiorano con aumento delle sensibilità alla luce (fotofobia) e percezione delle immagini distorte, soprattutto la notte. In pratica, la deformazione corneale causa astigmatismo irregolare che impedisce una messa a fuoco ottimale degli oggetti, indipendente dalla distanza di osservazione. Un ulteriore sintomo che si può riscontrare è lo sdoppiamento della vista. Nelle prime fasi, il cheratocono, il quale si esprime come miopia e astigmatismo, risulta correggibile con semplici occhiali. In un secondo momento, dato che la vista può continuare a regredire irreversibilmente, nasce la necessità di cambiare frequentemente la gradazione degli occhiali. Durante gli stadi intermedi, si passa ad una correzione tramite lenti corneali a contatto, le quali, col passare del tempo, possono risultare mal tollerate dal paziente o addirittura non sufficienti per correggere i difetti refrattivi. Col progredire della malattia si possono formare cicatrici, le quali, negli stadi più evoluti, impediscono il passaggio della luce causando un fastidioso senso di abbagliamento.

### **3.2 Cheratocono: diagnosi, classificazione e trattamento.**

La peggiore conseguenza alla quale un paziente affetto da cheratocono potrebbe incorrere è la totale perdita della vista. Dunque, è fondamentale contrastare e arrestare la progressione del cheratocono il prima possibile, ma una diagnosi tempestiva purtroppo non risulta sempre possibile. Per esempio, il paziente potrebbe tendere a minimizzare i disturbi percepiti; potrebbe non rendersi conto di un particolare calo della vista in quanto, nelle fasi iniziali, spesso, solamente un occhio viene colpito dalla malattia e l'altro occhio ne compensa i difetti refrattivi; oppure, lo specialista potrebbe non avere a disposizione la strumentazione necessaria per individuare la condizione patologica negli stadi iniziali. Oggi esistono tecnologie diagnostiche che rendono possibile il riconoscimento del cheratocono iniziale così da poter rallentare l'avanzamento del cheratocono al fine di evitare la terapia maggiormente invasiva relativa a questa patologia ectasica corneale, ovvero il trapianto di cornea (cheratoplastica).

Lo strumento maggiormente utilizzato per diagnosticare il cheratocono è il topografo corneale, capace di fornire mappe corneali mostranti dati cruciali per il riconoscimento del KC. La topografia corneale studia elevazione, curvatura e spessore della cornea. L'uso del topografo corneale è così diffuso poiché fornisce specifici indici topometrici e tomografici, attraverso lo studio dei quali diventa



possibile l'individuazione della malattia anche nelle sue forme più lievi, permettendo di documentarne l'evoluzione.

Esistono altri esami diagnostici come quello della lampada a fessura in cui l'oculista dirige il fascio di luce nell'occhio ed utilizza un microscopio a bassa potenza per visualizzare le strutture oculari e cercare potenziali difetti a livello della cornea. Questo è un esame che valuta la forma della superficie corneale ed è finalizzato alla ricerca di particolari caratteristiche tipiche del cheratocono, come l'**anello di Kayser-Fleischer** visibile nella seguente figura:



*Figura 3.2: Anello di Kayser-Fleischer.*

Esso consiste in una pigmentazione giallo-bruno-verdastra che circonda la base del cono ed è presente nel 50% dei casi di cheratocono [59].

Oltre alla topografia corneale e all'esame della lampada a fessura, un'ulteriore tecnologia per la diagnosi del cheratocono consiste nella tomografia corneale, in grado di seguire l'andamento della patologia nel tempo. Questo esame analizza forma e dimensioni della parte visibile dell'occhio, permette di ricostruire in 3D il segmento anteriore dello stesso e della camera anteriore. Inoltre, la tomografia misura curvatura ed elevazione della superficie anteriore e posteriore della cornea, fornisce lo spessore corneale e rileva la densitometria del cristallino. Nonostante il campo di applicazione del tomografo sia molto vasto, esso viene utilizzato prevalentemente per lo studio topografico della cornea. Risulta molto utile nel caso di KC e permette di analizzare la situazione pre e post-operatoria in chirurgia refrattiva [60].

Infine, per quanto riguarda gli esami diagnostici, è importante specificare che esiste anche la tomografia a coerenza ottica (OCT: *Optical Coherent Tomography*). Essa consiste in un esame diagnostico per immagini e permette di ottenere sia scansioni corneali che retiniche. Grazie a questo esame, si può esaminare spessore e forma della cornea, e spessore e conformazione della retina. Consente di analizzare la macula e il nervo ottico. In particolare, attraverso l'OCT, è possibile: effettuare una segmentazione dettagliata della retina che rivela, strato dopo strato, la fisiopatologia retinica; individuare accuratamente la fovea; analizzare dettagliatamente la macula misurandone le variazioni di spessore da punto a punto; analizzare le cellule ganglionari in modo da verificare le alterazioni maculari precoci, molto utile in caso di glaucoma (malattia cronica e progressiva che colpisce il nervo ottico) [61].

Dunque, la tomografia a coerenza ottica consente la diagnosi e il follow up di varie patologie corneali e retiniche.

Tutti gli esami sopra descritti consistono in tecniche diagnostiche non invasive.

Il tomografo a coerenza ottica e il topografo corneale sono gli strumenti diagnostici maggiormente utilizzati presso il reparto di oculistica dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria nei casi di cheratocono. Grazie alla Dott.ssa Maria Rosa Astori, durante questo lavoro di tesi si sono potute osservare le principali funzionalità e le modalità di utilizzo sia del tomografo che del topografo corneale.

A seguire, due immagini raffiguranti tali strumenti diagnostici:



*Figura 3.3: Due foto scattate presso l'ospedale di Alessandria. La prima a sinistra mostra il tomografo a coerenza ottica in uso dal medico specialista. Nella seconda foto viene mostrato il topografo corneale.*

In Figura 3.3, sulla sinistra, viene mostrato il tomografo a coerenza ottica CIRRUS HD-OCT della Zeiss e, sulla destra, il topografo-pachimetro corneale SIRIUS della CSO.

Per quanto concerne la topografia corneale, essa costituisce il Gold Standard per la diagnosi del cheratocono [62], per questo motivo se ne parlerà nel dettaglio nel capitolo successivo.

Il trattamento del cheratocono dipende dal suo stadio evolutivo, ragion per cui risulta fondamentale saper classificare la malattia. Di norma, le classificazioni più utilizzate sono tre [63]:

1. Classificazione di Amsler
2. Classificazione di Krumeich
3. Classificazione di Rama

La classificazione proposta da Amsler suddivide la patologia in quattro stadi evolutivi, come evidenziato in tabella:

STADIO	CURVATURA	ANGOLO DI AMSLER	CORREZIONE
1 (evidente)	45-48 D	Angolo di 1-3 gradi	Occhiali
2 (evidente)	48-53 D	Angolo di 3-9 gradi	Lenti a contatto
3 (classico)	> 53 D	Mal definibile	Lenti a contatto
4 (eclatante)	Non definibile	Mal definibile	Mal definibile

Tabella 3.1: Classificazione di Amsler.

Questa classificazione considera l'inclinazione degli assi delle mire dell'oftalmometro. Tale inclinazione è definita come *Angolo di Amsler*.

- **Primo stadio:** presenza di un astigmatismo obliquo, con lieve asimmetria delle mire, curvatura corneale compresa tra 45 e 48 diottrie e angolo di Amsler compreso tra 1 e 3 gradi;
- **Secondo stadio:** oltre all'astigmatismo è presente una miopia, l'asimmetria delle mire è maggiore, la curvatura corneale è compresa tra 48 e 53 diottrie e l'angolo di Amsler è compreso tra 4 e 8 gradi;
- **Terzo stadio:** la deformazione è tale che non è possibile quantificare l'astigmatismo mediante l'oftalmometro, la curvatura corneale supera le 53 diottrie e all'esame biomicroscopico è possibile evidenziare una o più alterazioni come opacità dell'apice corneale e strie profonde.
- **Quarto stadio:** l'ectasia è visibile anche a occhio nudo ed è associata ad un marcato assottigliamento stromale.

Nella tabella successiva, viene mostrata, invece, la classificazione secondo Krumeich:

STADIO 1	STADIO 2
Miopia e/o astigmatismo < 5 D K reading max < 48 D Pachimetria > 500 micron	Miopia e/o astigmatismo > 5 D < 8 D K reading max < 53 D No cicatrici corneali Pachimetria > 400 micron
STADIO 3	STADIO 4
Miopia e/o astigmatismo > 8 D < 10 D K reading max > 53 D No cicatrici corneali Pachimetria 200-400 micron	Refrazione non misurabile K reading max > 55 D Cicatrici corneali Spessore corneale inferiore a 200 micron

Tabella 3.2: Classificazione di Krumeich.

La classificazione di Krumeich si articola, anch'essa, in quattro stadi ed è basata su astigmatismo, potere diottrico, trasparenza e pachimetria corneale. Con il termine K reading max, in topografia corneale, si fa riferimento a una misura che indica la curvatura della superficie anteriore della cornea (parte trasparente dell'occhio situata davanti a iride e pupilla).

Infine, la classificazione di Rama si basa sulla possibilità di correggere il difetto visivo provocato dal cheratocono ed è utile per valutare l'indicazione all'intervento chirurgico:

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

Secondo l'Associazione Italiana Cheratoconici, nel cheratocono si possono distinguere quattro fasi [64]:

1. **Cheratocono frusto:** fase che può essere completamente asintomatica, ma in generale viene confusa con semplice miopia o astigmatismo. È la forma più lieve e la topografia corneale è l'unico esame che permette di identificarla evidenziando eventuali irregolarità sospette;
2. **Cheratocono correggibile con occhiali:** in questo secondo stadio miopia e astigmatismo aumentano rapidamente. Ciò implica la correzione del difetto visivo con modifiche costanti. In questa condizione la pachimetria mostra una cornea più sottile del normale;
3. **Cheratocono correggibile con lenti a contatto:** la deformazione corneale progredisce e l'astigmatismo continua ad incrementare. La cornea cambia conformazione e per questo motivo si richiede l'utilizzo di lenti a contatto specifiche per cheratocono. Esistono varie tipologie di lenti: lenti a contatto gas permeabili (RGP), lenti a contatto ibride, lenti mini-sclerali e lenti Piggy-Back. Le RGP vengono costruite con polimeri che permettono il passaggio di ossigeno sotto forma di molecola gassosa. Se mal tollerate, si utilizzano le lenti a contatto ibride che presentano la parte centrale rigida e la zona periferica morbida. Le lenti mini-sclerali, sono lenti rigide gas permeabili di grandi dimensioni. La parte periferica di questo tipo di lente non poggia sulla cornea ma sulla sclera garantendo un comfort maggiore durante l'uso. Nel caso delle Piggy-Back il materiale di costruzione deve essere un materiale estremamente gas permeabile perché vengono applicate due lenti una sopra l'altra: una lente morbida sottostante a una piccola lente RGP [65].

Nei casi sopraelencati è bene sottoporre il paziente al trattamento di **Cross-Linking** finalizzato a rafforzare la struttura oculare rallentando lo sfiancamento corneale [66]. In alcuni casi la malattia progredisce rapidamente in pochi mesi per poi stabilizzarsi per anni; altri pazienti peggiorano lentamente ma inesorabilmente. Quindi, l'evoluzione del cheratocono non è prevedibile, esso può evolvere al punto da richiedere una soluzione chirurgica.

4. **Cheratocono da trattare chirurgicamente:** la deformazione della cornea è tale da impedire una corretta applicazione delle lenti a contatto e spesso si presentano opacità della cornea e smagliature (20% delle forme più gravi del KC). In questi casi la visione risulta ostacolata in modo irrecuperabile e si deve ricorrere al trapianto di cornea chiamato **cheratoplastica** (quarto stadio). Quest'ultimo consiste in un intervento di microchirurgia nel quale viene sostituita la cornea malata con una sana da donatore. L'intervento di cheratoplastica può essere

penetrante (*Penetrating Keratoplasty – PK*) o lamellare. La PK consiste nella rimozione dell'intero spessore della cornea e nella sostituzione con tessuto donatore.

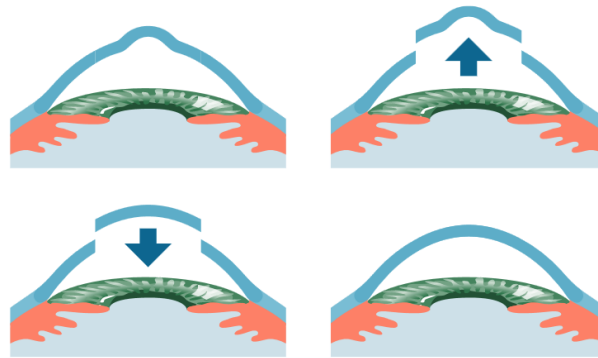


Figura 3.4: *Cheratoplastica perforante* [67].

Invece, nella cheratoplastica lamellare anteriore profonda (*Deep anterior lamellar keratoplasty – DALK*) viene sostituito solo lo stroma malato con lo stroma corneale del donatore conservando sia l'endotelio che la lamina limitante posteriore.

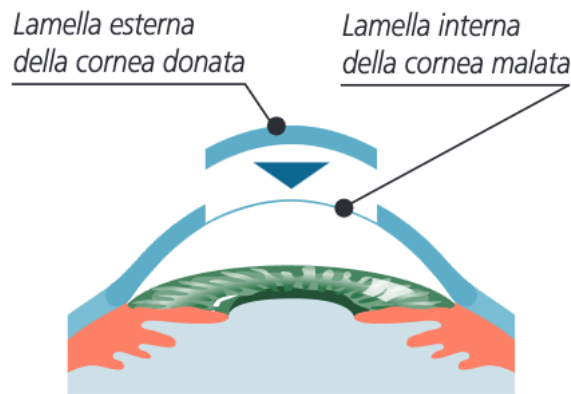


Figura 3.5: *Cheratoplastica lamellare* [67].

Con questa tecnica si incorre a un rischio minore di perdita di cellule endoteliali e di rigetto rispetto al PK [53].

### 3.3 Cross-linking: principi base

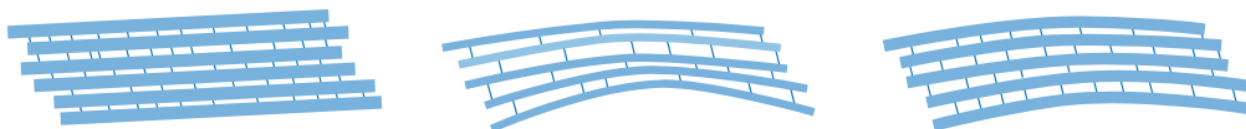
Il Cross-linking del collagene corneale (CXL) è un trattamento parachirurgico a bassa invasività che permette di arrestare la progressione del cheratocono e nella maggior parte dei casi evita l'intervento di cheratoplastica. La terapia di CXL è stata approvata nel 2016 dalla FDA (*Food and Drug Administration*) come trattamento di elezione per il cheratocono.

La definizione del termine cross-linking è “formazione di legami incrociati”. Il CXL consiste nella fotopolimerizzazione delle fibre di collagene dello stroma corneale con lo scopo di stabilizzare il tessuto della cornea aumentandone la robustezza e la resistenza allo sfiancamento. Questo è reso possibile dall'azione combinata di una sostanza fotosensibilizzante, la Riboflavina (Rf), con dei raggi nello spettro ultravioletto, i raggi UV-A.

Essi hanno una lunghezza d'onda compresa tra i 315 e i 400 nm e sono capaci di penetrare negli strati più profondi dei tessuti, alterando elastina e collagene. Inoltre, contribuiscono alla produzione di radicali liberi, ovvero di molecole responsabili dell'invecchiamento cellulare.

La Riboflavina, anche conosciuta come vitamina B2, è una vitamina del gruppo B resistente al calore, idrosolubile e sensibile alla luce. La Rf è una sostanza sensibilizzante che contiene un cromoforo giallo (flavina) e, nel trattamento di cross-linking, viene utilizzata per innescare una reazione chimica all'interno dello stroma corneale.

Il Cross-linking consiste, dunque, in un'innovativa terapia che mira a irrigidire la cornea formando legami incrociati interlamellari tra le fibre corneali, facendo uso della Riboflavina sottoposta all'azione dei raggi UV-A che irradiano la cornea.



*Figura 3.6: Da sinistra a destra si possono visionare le seguenti tre condizioni: fibre collagene in una cornea normale, fibre collagene in una cornea con KC (i legami sono ridotti e le fibre assottigliate), fibre collagene in una cornea con KC post CXL [67].*

Da un punto di vista pratico, l'intervento di CXL per cheratocono è costituito dalle fasi di:

- **Preparazione** in cui, in ambiente sterile (sala operatoria), al paziente, viene somministrato un collirio anestetico.
- **Impregnazione** della cornea in cui vengono somministrate gocce di collirio a base di Rf, vitamina fotosensibile in grado di assorbire i raggi ultravioletti.
- **Irradiazione**: la cornea viene esposta ad un fascio laser di raggi UV-A così che si vengano a creare ponti di legame tra le fibre collagene stromali [68].



*Figura 3.7: Fase di irradiazione.*

Il CXL è un tipo di intervento consigliato principalmente a pazienti giovani che presentano un cheratocono in fase evolutiva (non stadio avanzato) con spessori corneali non inferiori a 400 micron [69]. Il fatto che il target più indicato per questo trattamento siano i giovani è stato verificato in vari studi come quello condotto da Paolo Vinciguerra et al. [70] in cui si riportano i risultati rifrattivi, topografici, tomografici e aberrometrici di cornee cheratoconiche di giovani pazienti dell'età inferiore ai 18 anni. Questi risultati suggeriscono che l'effetto della reticolazione nei giovani è più pronunciata che nei pazienti più anziani e che le possibili complicanze alla procedura parachirurgica sembrano verificarsi meno frequentemente nei più giovani. Il Cross-linking del collagene corneale risulta di



notevole importanza nei pazienti più giovani poiché la progressione della malattia si pronuncia maggiormente in questi soggetti [71].

Assicurare uno spessore corneale di almeno 400  $\mu\text{m}$  risulta cruciale per evitare di esporre a rischio le strutture intraoculari come l'endotelio corneale. Questo limite per il livello pachimetrico è una misura di sicurezza che si basa sulla legge di Lambert Beer dimostrata in vari studi [72], [73], [74], la quale afferma che il prodotto tra la concentrazione  $C$  della sostanza che assorbe la radiazione UV, il suo coefficiente di assorbimento molare  $\epsilon$  e lo spessore  $l$  del tessuto da attraversare, definisce la quantità di luce assorbita  $A$ :

$$A = C \epsilon l$$

Nonostante la risposta fotochimica provocata dal CXL comporti un moltiplicarsi di legami tra le fibre del collagene stromale rendendole più ordinate e robuste (Fig. 3.6), bisogna considerare che il normale rinnovamento tissutale fa sì che le lamelle linkate vengano sostituite dall'organismo e che, conseguentemente, l'ectasia tissutale si ripresenti. Fortunatamente, dopo alcuni anni, il trattamento si può ripetere [75].

### 3.3.1 Il ruolo della Riboflavina

La Riboflavina (Rf) è una vitamina del gruppo B. Conosciuta anche col nome di vitamina B2, essa è un composto eterociclico di colore giallo, formato da una molecola di flavina a cui è legata una catena di ribitolo che è un derivato del ribosio.

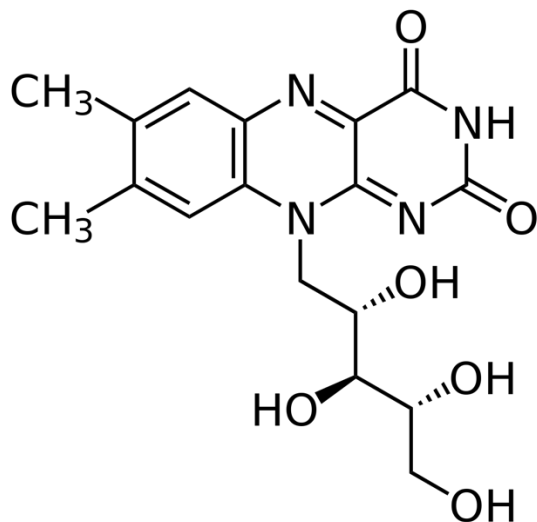


Figura 3.8: Riboflavina (RF) estratta da [76].

Le flavine (dal latino *flavus*, giallo) sono un gruppo di composti organici in grado di partecipare a reazioni redox accettando elettroni o trasferendoli, quando si presentano nella loro forma ridotta [77]. La Riboflavina è una molecola termostabile e presenta proprietà di fluorescenza, quando sottoposta alla luce ultravioletta.

La Rf presenta due picchi di assorbimento nello spettro UV, uno alla lunghezza d'onda di 300 nm e l'altro a 370 nm. Il picco di lunghezza d'onda di 370 nm fornisce la migliore combinazione di sicurezza e assorbimento UV [78].

Nella procedura di cross-linking corneale si irradia la cornea con luce UV a 370 nm, così da assicurare un elevato assorbimento della radiazione a livello dello stroma, impregnato di Riboflavina a una concentrazione sufficiente, al fine di indurre la reazione fotochimica che genera specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quest'ultime, a loro volta, portano alla formazione di nuovi legami covalenti tra le fibre di collagene. I legami chimici si formano tra i terminali amminici delle catene laterali del collagene e i proteoglicani della matrice extracellulare [78].

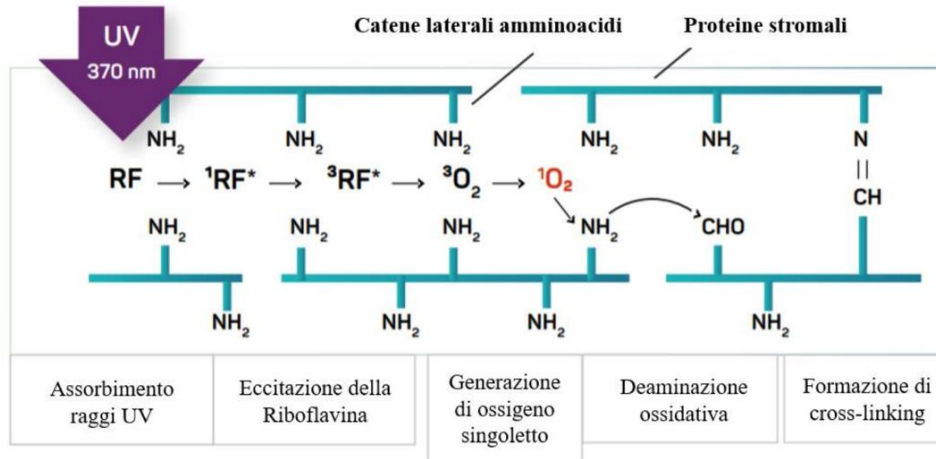


Figura 3.9: Reazione fotochimica di cross-linking.

Nella figura appena riportata si evidenzia come la fotosensibilizzazione della Riboflavina porti alla produzione di ossigeno singoletto  $^1O_2$ . Nel cross-linking corneale, il principale meccanismo fotochimico risulta l'interazione diretta tra triplette Rf ( $^3RF^*$ ) con gruppi reattivi delle proteine stromali. L'ossigeno incide sull'efficienza della procedura di CXL e sull'irrigidimento corneale. Affinché avvenga la reticolazione delle proteine corneali è necessaria una quantità minima di ossigeno nello stroma. La fotoreazione è guidata dall'interazione tra l'ossigeno stromale, la riboflavina e il fascio di raggi UV-A. In base alla concentrazione di ossigeno locale, la fotoreazione può seguire un percorso di tipo I (anaerobico) o di tipo II (aerobico) [79] [78].

In altri termini si può affermare che, attraverso meccanismi fotochimici misti di tipo I e di tipo II, la Rf, esposta alla luce UV, mostra proprietà fotosensibilizzanti reagendo con substrati donatori di elettroni (ammine).

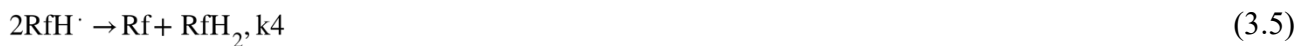
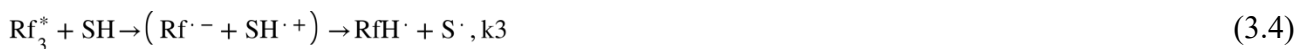
Segue l'analisi cinetica della reticolazione corneale con vitamina B2, estratta dal lavoro di Pavel Kamaev et al. intitolato "Photochemical Kinetics of Corneal Cross-Linking with Riboflavin" [80].

Reazioni comuni per i meccanismi di tipo I e di tipo II:





Il **tipo I** è il meccanismo favorito da basse concentrazioni di ossigeno in cui il substrato reagisce con lo strato eccitato della sostanza sensibilizzante (Riboflavina) generando ioni radicali o radicali mediante trasferimento di atomi di elettroni o di idrogeno, rispettivamente. Reazioni per meccanismo di tipo I:



Nel meccanismo di **tipo II**, il sensibilizzatore in stato eccitato reagisce con l'ossigeno per formare ossigeno molecolare singoletto:



In queste reazioni Rf,  $Rf_1^*$ , e  $Rf_3^*$  indicano la riboflavina allo stato non eccitato, allo stato eccitato singoletto e allo stato tripletto.

$Rf^{\cdot-}$ ,  $RfH^{\cdot}$ ,  $RfH_2$  rappresentano l'anione radicale, il radicale e la forma ridotta della Riboflavina.

SH è il substrato, mentre  $SH^{\cdot+}$ ,  $S^{\cdot}$ ,  $S_{OX}$  sono il catione radicale intermedio, il radicale e la forma ossidata del substrato.

Noto il fatto che durante l'irradiazione UV-A viene consumato ossigeno, questo studio sulla cinetica fotochimica della reticolazione corneale con Riboflavina, in cui viene monitorata la concentrazione di  $O_2$  durante l'illuminazione ultravioletta tramite microsensore a fibra ottica, risulta di fondamentale importanza nella scelta del miglior protocollo da adottare per il trattamento di Cross-linking.

Un'ulteriore funzione della Rf nella sua applicazione nel CXL è legata all'alta tossicità dei raggi UV-A per le cellule endoteliali. Essa aiuta a ridurre l'effetto citotossico [81]. Inoltre, la vitamina B2 possiede un effetto protettivo, poiché solo quando lo stroma è saturo di Riboflavina, la luce UV-A ad alta energia sarà sufficientemente assorbita nella cornea [71].

### 3.4 Cross-linking: procedure di intervento

Il cross-linking è un trattamento che alla fine degli anni '90 cambiò completamente la gestione delle ectasie corneali progressive [81]. Introdotto per la prima volta nella pratica clinica in quegli anni, è ancora oggi una terapia ampiamente studiata. Il protocollo convenzionale per il trattamento CXL è una tecnica che è stata ideata nel 1998 presso l'Università di Dresda in Germania, poi introdotta in Italia nel 2005 [82].

Il **protocollo di Dresda** è definito come protocollo standard ed è anche conosciuto come "Epi-Off", in quanto prevede la depitelizzazione della cornea. Il protocollo standard di reticolazione di Dresda (S-CXL) per il trattamento del cheratocono comporta:

- la rimozione della zona centrale dell'epitelio (8-9 mm)
- l'applicazione sulla cornea di una soluzione 0.1% di riboflavina-5-fosfato e 20% di destrano T-500 [83]
- l'esposizione del tessuto corneale alla radiazione UV di lunghezza d'onda uguale a 370 nm per 30 min, con una potenza di 3 mW/cm<sup>2</sup> e un diametro del fascio di 9 mm, per un'energia totale di 5.4 J/cm<sup>2</sup>.

Al fine di evitare danni sullo strato endoteliale, durante l'irradiazione con raggi UV-A dev'essere mantenuto un continuo film precorneale di riboflavina. Con il protocollo di Dresda si raggiunge una profondità di reticolazione compresa tra 250 e 350 nm. Per questo viene consigliato uno spessore minimo corneale di 400 nm, oppure si può applicare una soluzione ipotonica per gonfiare la cornea fino allo spessore richiesto [84].

Tuttavia, negli anni sono nate delle preoccupazioni relative alle complicanze dovute alla durata del trattamento e si sono sviluppati nuovi protocolli, tra cui quello accelerato (A-CXL), quello transepiteliale (T-CXL) e la iontoforesi (I-ON CXL).

L'**A-CXL Epi-off** è basato sulla legge di Bunsen-Roscoe<sup>1</sup> della reciprocità, la quale afferma che il grado di una reazione fotochimica è direttamente proporzionale alla dose totale di energia, indipendentemente dal tempo durante il quale tale dose viene erogata [85]. Nel protocollo accelerato, viene infatti diminuito il tempo di esposizione ma aumentata la potenza di irradiazione rispetto allo standard S-CXL. In questo modo la dose totale di irradiazione rimane sempre a pari a 5.4 J/cm<sup>2</sup>. Fornendo una descrizione più dettagliata di tale procedura accelerata, l'occhio affetto da KC viene anestetizzato per procedere con la rimozione dell'epitelio attraverso l'ausilio di uno strumento chiamato *blefarostato*, successivamente la cornea viene imbibita goccia a goccia con la riboflavina, per poi esporla all'azione dei raggi UV-A.



*Figura 3.10: somministrazione goccia a goccia di riboflavina su una cornea disepitelizzata, mentre l'occhio viene tenuto aperto grazie al blefarostato.*

<sup>1</sup> Legge di Bunsen-Roscoe della reciprocità fotochimica: in una sostanza, l'effetto fotochimico è proporzionale al prodotto dell'intensità luminosa per l'esposizione [86].

Per i pazienti trattati all'ospedale di Alessandria, viene utilizzato un unico ciclo di irradiazione continuo della durata di 9 min. Il motivo deriva dal fatto che viene utilizzato un emettitore di raggi ultravioletti di tipo A a 10 mW/cm<sup>2</sup>. Al termine dell'intervento, sull'occhio viene applicata una lente a contatto morbida in modo da ridurre il dolore. In generale, i protocolli accelerati si possono eseguire con alta intensità UV-A (da 9 mW a 45 mW) con luce continua o pulsata [87].

Bisogna considerare che l'esportazione dell'epitelio centrale può provocare indesiderate complicanze, come il rischio di incorrere a infezioni e dolore post-operatorio. Questa è la ragione per cui, numerosi studi clinici e di laboratorio si sono impegnati alla ricerca di un approccio alternativo finalizzato al miglioramento della diffusione della vitamina B2 attraverso lo stroma corneale. La procedura d'intervento in cui non si ricorre alla rimozione dell'epitelio viene chiamata transepiteliale (T-CXL) o **Epi-On**. Quest'ultima è una tecnica che prevede un'alterazione della permeabilità corneale o un'alterazione chimica della soluzione di riboflavina, tramite sostanze atte a incrementare il passaggio trans oculare della riboflavina nel tessuto corneale (*enhancer*).

La iontoforesi (**I-ON CXL**) sfrutta una corrente elettrica al fine di migliorare la permeazione di vitamina B2 nella cornea.

In sintesi, le principali opzioni per eseguire il Cross-linking corneale sono due:

- Procedura **Epi-Off**: prevede la rimozione dell'epitelio, la somministrazione goccia a goccia di riboflavina sulla cornea, per esporla alla irradiazione ultravioletta. Questa tecnica consente l'assorbimento di riboflavina in tutto lo spessore corneale.
- Procedura **Epi-On**: non prevede la rimozione dell'epitelio e, per questo motivo è più adatta a pazienti con cornee sottili. In questo caso il risultato finale dell'intervento potrebbe non risultare totalmente soddisfacente perché l'epitelio potrebbe limitare la diffusione della vitamina B2 nei livelli corneali profondi.

### 3.4.1 Cross-linking transepiteliale con iontoforesi (*i-Epi-On*)

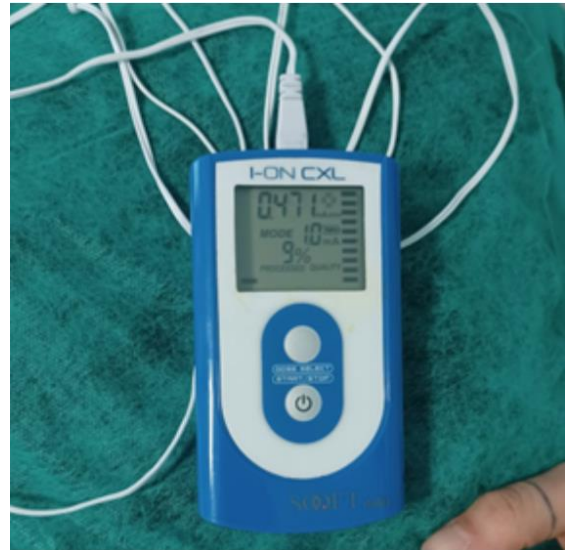
Il cross-linking del collagene corneale mediante iontoforesi è una procedura rivoluzionaria in grado di stabilizzare ed evitare la progressione del cheratocono. In termini generali, costituisce una metodica per l'assorbimento di un farmaco all'interno dei tessuti [88]. Il termine **iontoforesi** significa trasporto di ioni (da *iòntos* = ione e *phòresis* = trasporto) e consiste nel trasferimento unidirezionale di molecole fornite di carica ionica all'interno del tessuto corneale attraverso un campo elettrico a bassa intensità [89].

Nella procedura *i-Epi-On* viene mantenuto l'epitelio corneale e si genera un piccolo campo elettrico tramite il quale viene somministrata la Riboflavina nella cornea. L'intensità della corrente è bassa (1 mA), ma sufficiente affinché la vitamina B2 venga attratta all'interno dell'epitelio. Nella soluzione di riboflavina esistono anche degli *enhancer*, nello specifico una sostanza che si chiama trometamolo, la quale allenta le *gap junction* cellulari dell'epitelio e facilita la penetrazione della vitamina. La corrente viene generata attraverso un piccolo generatore, mostrato di seguito.

Nello schermo del generatore sono presenti tre righe:

- in alto, si vedono gli ampere totali forniti in tempo reale;
- al centro è possibile leggere l'ampere erogato;
- in basso, la percentuale di avanzamento del processo;

Il generatore è dotato di segnale acustico (doppio bip) per avvertire gli operatori sanitari in caso venissero riscontrate delle problematiche.



*Figura 3.11: Generatore per iontoforesi.*

Per mettere in pratica la tecnica di iontoforesi si necessita di due poli: una patch da posizionare sulla fronte del paziente (l'anodo positivo) e un anello in gomma che aderisce alla cornea (il catodo negativo).

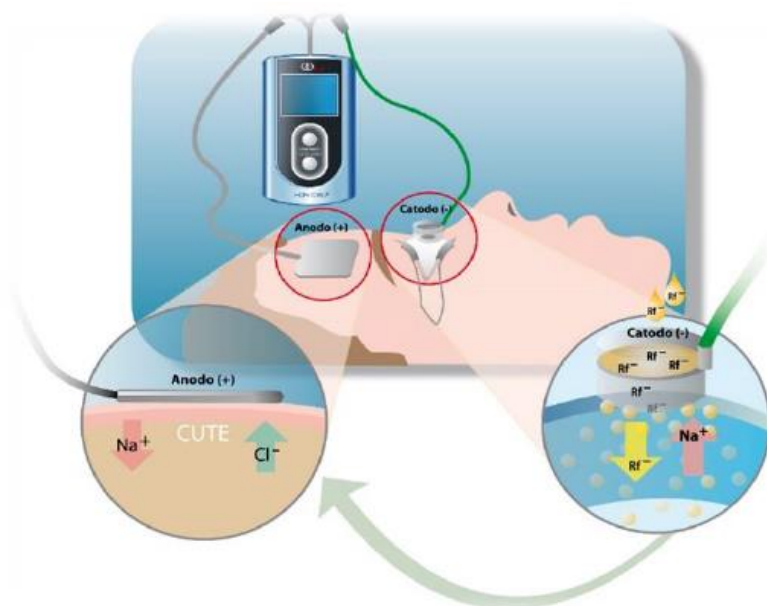


*Figura 3.12: a sinistra, anello in gomma con griglia metallica (catodo) che aderisce alla cornea del paziente tramite meccanismo di suzione. A destra, riboflavina che va a ricoprire la griglia per poi diffondere nel tessuto corneale.*



*Figura 3.13: patch per iontoforesi: elettrodo perioculare da posizionare sulla fronte.*

Un'illustrazione semplificata della procedura di iontoforesi viene mostrata nella successiva figura:



*Figura 3.14: illustrazione della procedura di iontoforesi [90].*

Dopo che gli elettrodi vengono applicati sul paziente, essi vengono collegati al generatore di corrente continua (1mA) che rimane acceso per 5 min, tempo sufficiente affinché avvenga la diffusione di riboflavina carica negativamente. In questo modo avviene il processo di iontoforesi che, attraverso la differenza di potenziale presente tra i due elettrodi, permette alla vitamina B2, o Riboflavina (Rf), di penetrare uniformemente nello stroma corneale.

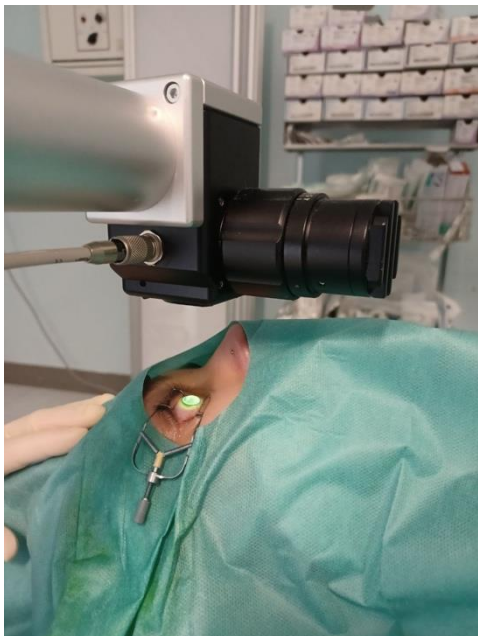


*Figura 3.15: attesa della completa imbibizione di riboflavina*



Avvenuta l'imbibizione, si irraggia la cornea con protocollo standard o accelerato.

I pazienti in cura presso l'azienda ospedaliera di Alessandria sono trattati seguendo il protocollo accelerato, in cui la cornea viene esposta alla luce ultravioletta per 9 min tramite un emettitore UV-A con potenza uguale a  $10 \text{ mW/cm}^2$ .



In quest'arco di tempo la riboflavina, essendo fotosensibile, sotto l'azione dei raggi UV, si fotoossida liberando i radicali ossidrilici, i quali sono capaci di creare ponti di legame tra le fibre collagene generando legami covalenti di cross-linking.

Grazie alla iontoforesi è dunque possibile facilitare e velocizzare l'assorbimento di riboflavina all'interno dello stroma corneale. La durata del trattamento CXL tramite la tecnica *i-Epi-On* diminuisce notevolmente (5 min per la fase di assorbimento, più 9 min per la fase di irraggiamento) rispetto all'*S-CXL* (fase di rimozione dell'epitelio, più 30 min di irraggiamento, per una potenza di irradiazione pari a  $3 \text{ mW/cm}^2$ ).

Figura 3.16: cornea irraggiata con luce UV di tipo A.

Riportando quanto affermato nella “scheda informativa per intervento di UV-A cross-linking corneale (CXL)” della Società Oftalmologica Italiana (SOI), sia al termine della procedura epi-off che epi-on è necessario applicare una lente a contatto morbida terapeutica, la quale verrà rimossa dal medico oculista entro 3-5 giorni [87].

### 3.5 Cross-linking: emettitore di raggi UV

Attualmente in commercio esistono due tipologie di emettitori di raggi UV. In un caso la macchina eroga con intensità continua, nell'altro con intensità pulsata.

Nel periodo relativo lo svolgimento di questo lavoro di tesi magistrale, il Dipartimento di Oculistica dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria disponeva dell'emettitore mostrato nell'immagine seguente:



Figura 3.17: Dispositivo erogatore raggi UV per CXL.

La Figura 3.17 mostra un dispositivo medico elettronico per il trattamento corneale di Cross-linking che irradia luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 370 nm in modalità fissa a una potenza di  $10\text{mW}/\text{cm}^2$ . Lo strumento in analisi eroga con intensità continua e non pulsata; infatti, è privo della modalità di funzionamento *custom*, la quale consente un trattamento “su misura” per il paziente. Una rappresentazione semplificata dell'emettitore UV è fornita di seguito:

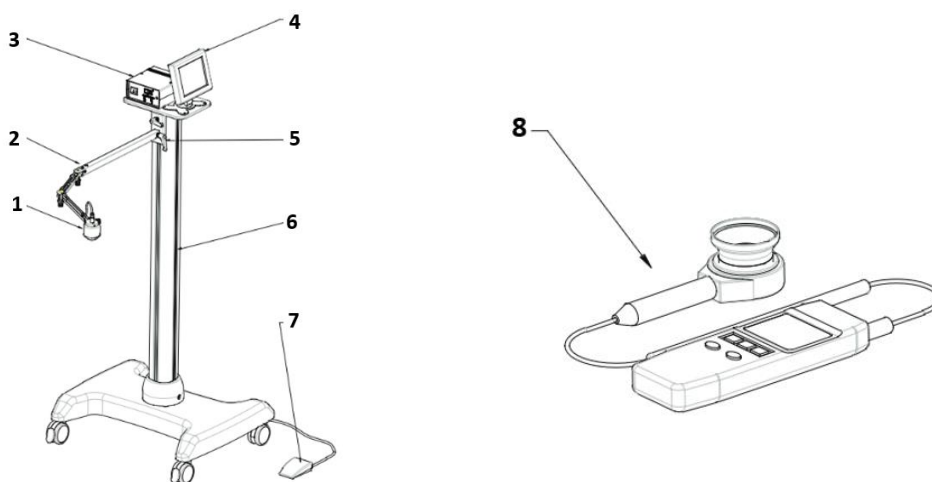


Figura 3.18: illustrazione schematica dell'emettitore di raggi UV per trattamenti con tecnica cross-linking.

Lo strumento dispone di una testa con telecamera integrata la quale rende possibile il controllo in tempo reale del trattamento su schermo LCD (4). Inoltre, presenta un braccio snodabile (2) con manopola di bloccaggio (5), dotato di base (6) e stativo (6) su ruote, tutti componenti che rendono l'uso del macchinario confortevole. La sorgente UV è costituita da un LED nel campo UV-A. Questo dispositivo medico consente di lavorare a una distanza elevata pari a 54 mm, mantenendo un'ottima

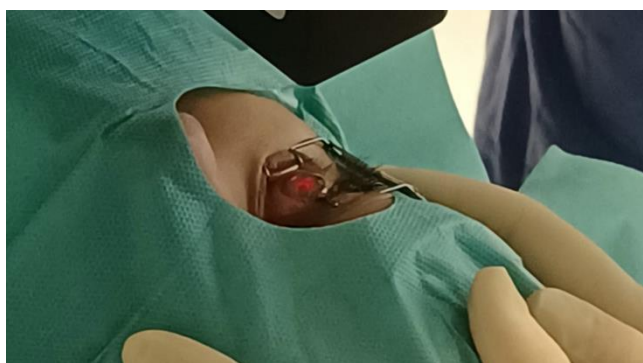


uniformità di radiazione. L'emissione UV parte dalla testa ottica (1) che può irraggiare un'area corneale di diametro aggiustabile nel range 4-11 mm [91] tramite la manopola mostrata in figura:



*Figura 3.19: componente strumentale utile alla scelta dell'area di irraggiamento*

Inoltre, l'apparato dispone di un sistema di collimazione a due LED rossi e un LED di colorazione verde di fissazione per il paziente.



*Figura 3.20: 2 led rossi per collimazione.*

In Figura 3.18 viene rappresentato un ulteriore componente, l'elemento (8), che rappresenta il misuratore UV, necessario alla verifica della potenza di emissione del dispositivo.

Deve essere assicurata una potenza nel range  $10\text{mWcm}^2 \pm 10\%$ .



*Figura 3.21: misurazione della potenza emessa*

Lo svantaggio principale del dispositivo appena descritto si traduce nell'impossibilità di customizzare il trattamento. Potendo erogare solo in modalità continua e non pulsata sorgono dei problemi nella procedura di intervento standard Epi-Off, poiché, rimuovendo l'epitelio, lo stroma risulta maggiormente esposto al calore e si disidrata con più facilità con il potenziale rischio che la cornea si scaldi ad un livello tale da rimanere bianca e sottile. Con uno strumento atto a erogare anche in modalità pulsatile, l'alternanza accensione/spegnimento permette alla cornea di raffreddarsi. In questo modo si migliora il metabolismo della Riboflavina o, meglio, la reazione foto ossidativa. La modalità continua porta solo ad una consumazione di ossigeno, non fornendo il tempo allo stroma corneale di riossigenarsi. Quanto appena affermato non risulta una problematica in caso di Epi-On perché l'epitelio non viene rimosso.

Gli svantaggi appena evidenziati vengono superati da un nuovo dispositivo per il CXL, il CF X-LINKER.



*Figura 3.22: CF X-LINKER [92]*

Questo consente la fotopolimerizzazione delle fibrille del collagene irradiando luce UV a una lunghezza d'onda pari a 365 nm. L'emissione ultravioletta viene controllata da un software che permette di selezionare il trattamento desiderato, con intensità continua o pulsata, per scegliere l'opportuna procedura in base al paziente.

Trattamenti selezionabili:

- EPI-OFF: Dresda
- Iontoforesi
- EPI-ON: Custom Fast CXL
- CXL per il trattamento delle cheratiti
- Emissione UV continua e pulsata

Il sistema CF X-LINKER è in grado di effettuare il Custom Fast CXL (cfCXL) grazie al software proprietario che calcola i parametri del trattamento su misura per il paziente, sfruttando un modello

matematico che si basa sui dati topografici e pachimetrici della cornea da trattare. Il cfCXL è un trattamento Epi-On customizzato a basse intensità [92], [93].

La tecnica di intervento utilizzata presso l'Azienda Ospedaliera Nazionale di Alessandria prevede che il LED sorgente di cui dispone l'emettitore di Fig. 3.18 irraggi un'area circolare corneale di 9 mm di diametro (raggio pari a 4.5 mm), esponendola a luce UV (lunghezza d'onda:  $370 \pm 5$  nm) per 9 minuti (540 secondi) con una potenza di irradiazione per unità di area pari a  $10\text{mW}/\text{cm}^2$ . Questo permette di ottenere una densità di dose per area di  $5.4\text{ J}/\text{cm}^2$ . La stessa che si ottiene con il protocollo di Dresda.

L'irrigidimento corneale lo si può ottenere fornendo sempre la dose energetica di  $5.4\text{ J}/\text{cm}^2$  per tutte le tipologie di trattamento, perché, secondo la legge di Bunsen–Roscoe, applicando una maggiore fluensa UV-A, ma in tempo più breve, si ottiene la stessa energia [94].

La densità di dose energetica per superficie corneale viene calcolata moltiplicando la fluensa, ovvero la potenza di irradiazione, per la durata di esposizione UV. La dose totale si ottiene moltiplicando la densità di dose per l'area irraggiata ( $5.4\text{ J}/\text{cm}^2 \cdot \pi r^2$ ).

## CAPITOLO 4: Topografia corneale

La topografia corneale costituisce il Gold Standard per la diagnosi ed il follow-up del cheratocono. È un esame diagnostico non invasivo indolore che non necessita la somministrazione di colliri. Al paziente, in posizione seduta, viene richiesto di poggiare mento e fronte su appositi supporti per guardare una mira luminosa centrata rispetto ad una serie di anelli concentrici, proiettati sulla superficie anteriore della cornea.



*Figura 4.1: Esame di topografia corneale.*

Gli anelli appena citati costituiscono il cosiddetto **cheratoscopio a Disco di Placido**, osservabile nella successiva immagine:



*Figura 4.2: Disco di Placido.*

Eseguendo un esame di topografia corneale si può visionare la cosiddetta **cheratoscopia**, ovvero le immagini del disco di Placido riflesse sulla cornea.

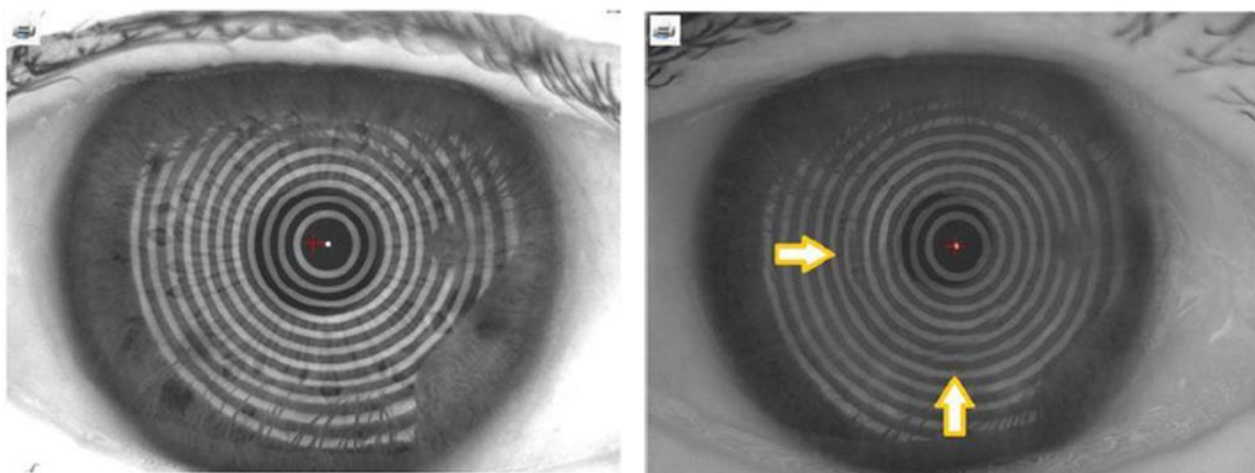


Figura 4.3: A sinistra, esempio di cheratoscopia non ben centrata. A destra, cheratoscopia ben centrata con artefatti lacrimali: gli anelli nella zona indicata dalle frecce si distorcono [95].

Il cheratoscopio, per definizione, è uno strumento diagnostico costituito da un disco in cui sono dipinti cerchi concentrici, alternativamente bianchi e neri. Il metodo del disco di Placido prevede la proiezione degli anelli concentrici sulla cornea e la cattura del loro riflesso tramite una telecamera posta al centro degli anelli [96]. Ciò permette di evidenziare eventuali deformazioni corneali o astigmatismi elevati.

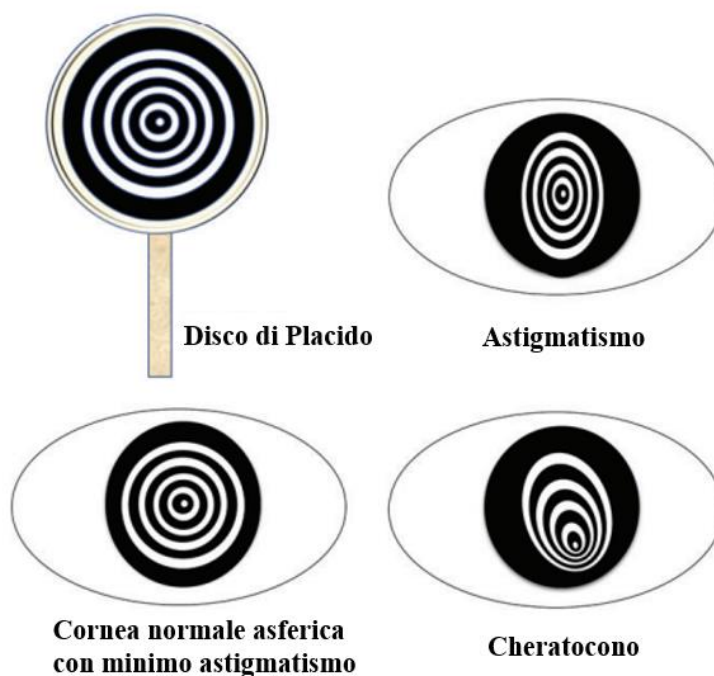


Figura 4.4: Illustrazione semplificata del Disco di Placido e modelli rappresentativi di diverse forme corneali [97].

Una topografia basata esclusivamente su questa tecnologia permette la sola analisi della superficie anteriore della cornea. Considerando che la cornea è responsabile di oltre i due terzi del potere rifrattivo totale dell'occhio, la sua forma è di fondamentale importanza nel determinare la qualità del sistema ottico oculare. Piccolissime variazioni della sua conformazione possono avere un effetto drammatico sulla messa a fuoco dell'immagine retinica [98]. Questo è il motivo per cui, nei moderni topografi, si combina la topografia a riflessione ottica con disco di Placido alla **tomografia di Scheimpflug** del segmento anteriore. Essa permette di mappare anche la superficie posteriore corneale. Al fine di comprenderne meglio la differenza, il termine "topografia" deriva dalle parole greche "topo" (luogo/collocamento, collocare) e "graphien" (scrivere). Un disco di Placido ricostruisce la forma corneale analizzando il pattern dei raggi luminosi riflessi dalla superficie anteriore della cornea e dall'interfaccia film lacrimale-aria. Il cheratoscopio a disco di Placido, non avendo a disposizione le informazioni della superficie corneale posteriore, non può fornire una valutazione pachimetrica completa, ricordando che quest'ultima studia lo spessore della cornea. "Tomografia" è anch'esso un termine che deriva da due parole greche, ovvero "tomos" (sezione) e "graphien" (scrivere); in tal senso, la tomografia corneale permette la valutazione dell'intera cornea, dalla superficie corneale anteriore alla superficie corneale posteriore [97]. Attualmente, la maggior parte dei topografi corneali utilizzati nella pratica clinica si affidano alla tecnologia del Disco di Placido affiancata alla Scheimpflug camera. La principale caratteristica di quest'ultima si esplica nella possibilità di fotografare sezioni del segmento anteriore dell'occhio. I sistemi basati sull'imaging di Scheimpflug consentono le seguenti analisi: pachimetria topografica, volume corneale, profondità della camera anteriore, diametro del segmento anteriore e densitometria del cristallino. Invece, l'analisi della curvatura delle superfici anteriore e posteriore del cristallino non risulta possibile. L'imaging Scheimpflug è basato sulla **regola Scheimpflug**. Questa, anche definita principio di Scheimpflug, si verifica quando un soggetto planare non si trova in posizione parallela al piano dell'immagine. In questo scenario, è possibile tracciare una tangente obliqua dai piani dell'immagine, dell'oggetto e della lente. Il punto di intersezione viene chiamato intersezione di Scheimpflug, punto in cui l'immagine viene focalizzata [98]. Per meglio comprendere il principio di Scheimpflug, vengono descritte le seguenti illustrazioni ricavate da un lavoro svolto da Gaurav Prakash [99]:

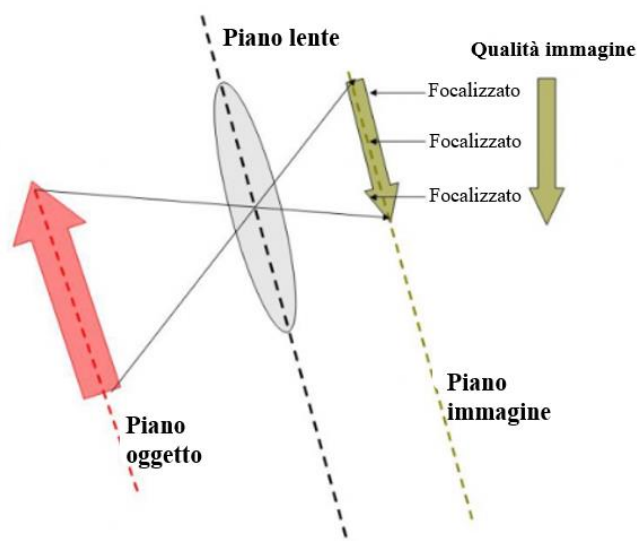


Figura 4.5: piano oggetto, piano lente, piano immagine sono paralleli creando, in questo modo, una nitida messa a fuoco complessiva.



In questa prima rappresentazione si osserva la situazione in cui il piano oggetto dell'acquisizione fotografica è parallelo al piano della lente. L'oggetto andrà a formare un piano di focalizzazione parallelo al piano della lente che andrà a proiettarsi, a fuoco, sul piano immagine.

Al contrario, quando sul piano immagine si presenta un'immagine distorta significa che l'oggetto non risulta parallelo al piano della lente, caso in cui non si riesce a focalizzare l'intera immagine sul piano immagine parallelo alla lente. Questa seconda condizione viene schematizzata nel seguente modo:

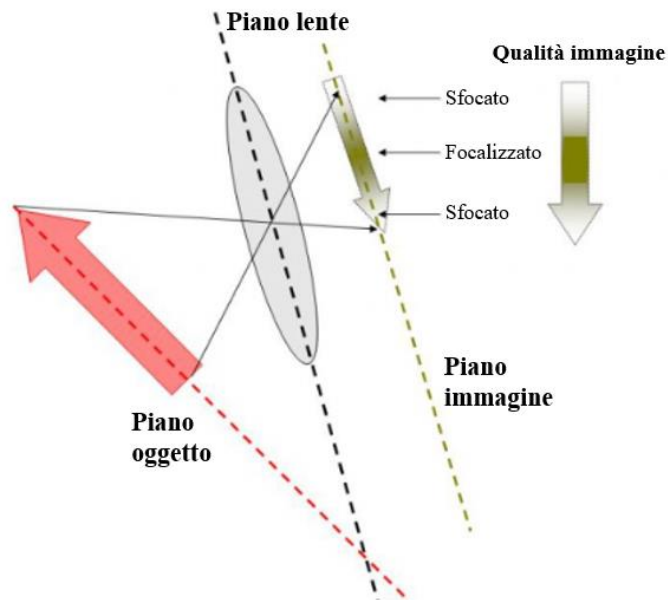


Figura 4.6: il piano oggetto non è parallelo al piano immagine che porta a una scarsa messa a fuoco nella periferia.

Il principio di Scheimpflug asserisce che nel caso in cui un piano oggetto non sia parallelo al piano della lente, le rette passanti per i tre piani (piano oggetto, piano lente e piano immagine) si incontrano esattamente nel punto di intersezione di Scheimpflug:

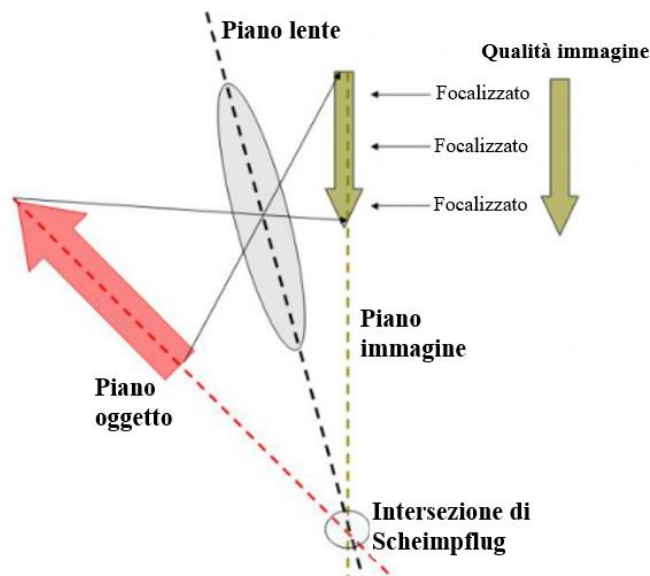


Figura 4.7: il piano oggetto non è parallelo all'immagine; tuttavia, il piano immagine viene manovrato dal principio di Scheimpflug: messa a fuoco generale.



Nel topografo corneale, la Scheimpflug camera viene fatta ruotare attorno al proprio asse in modo da acquisire diverse sezioni della struttura corneale. Dalla combinazione di queste immagini bidimensionali si ottiene la ricostruzione di una mappa tridimensionale di tutta la cornea.

In sintesi, la riflessione del disco di Placido serve per analizzare la curvatura della superficie corneale e la ricostruzione delle immagini di Scheimpflug permette di ottenere dati relativi l'altimetria e lo spessore corneali. Per altimetria è intesa la determinazione della quota di un punto rispetto ad una superficie di riferimento.

In generale, le tecnologie ad oggi sviluppate per la misurazione della topografia corneale finalizzate alla caratterizzazione geometrica della cornea, sfruttano i seguenti concetti:

- Altezza o Elevazione: distanza di ogni punto della superficie corneale rispetto ad una superficie di riferimento. La sfera è la superficie di riferimento. Una volta espressa la forma della superficie corneale in termini di altezza, si possono calcolare altri parametri quali curvatura, pendenza e potenza.
- Raggio di curvatura: generalmente espresso in mm, caratterizza la curvatura della superficie anteriore della cornea.
- Potere: proprietà ottica espressa in diottrie (D) che dipende dalla forma delle superfici e dalla variazione dell'indice di rifrazione tra i due lati della superficie. La diottria cheratometrica viene calcolata tramite il raggio di curvatura e l'indice di rifrazione cheratometrico standard (SKI=1.3375):

$$P(D) = \frac{SKI - 1}{r} = \frac{337.5}{r(mm)}$$

Nella definizione della formula precedente si ignora il fatto che la superficie rifrangente è un'interfaccia aria-film lacrimale e non si tiene conto dell'incidenza obliqua della luce in arrivo nella periferia corneale. Di conseguenza, calcola erroneamente l'indice di rifrazione corneale. Ciò è il motivo per cui queste diottrie vengono chiamate diottrie cheratometriche, in modo da distinguerle dalle diottrie che esprimono più precisamente il vero potere rifrattivo in un determinato punto corneale [98].

In commercio esiste uno strumento che permette l'analisi accurata del segmento anteriore dell'occhio e della cornea.

Si tratta del **Sirius (CSO)**:



Figura 4.8: Topografo-pachimetro corneale Sirius CSO [100].

L'esecuzione della topografia corneale attraverso questo strumento permette di definire la forma, le caratteristiche della cornea e consente l'indagine quantitativa e qualitativa del potere di rifrazione della superficie corneale anteriore attraverso la generazione di mappe colorimetriche, visibili in Figura 4.8 sulla destra.

Il dispositivo mostrato in Figura 4.8 sfrutta la combinazione di una Scheimpflug camera rotante e un cheratoscopio a disco di Placido. Il Sirius è un sistema ad alta precisione per l'analisi tridimensionale della cornea. È in grado di fornire una misura accurata delle superfici corneali poiché unisce i dati dalla ricostruzione **Arc-Step** tipica del disco di Placido a quella derivante dall'analisi delle immagini di Scheimpflug, catturate nel medesimo istante da due diverse telecamere [101]. L'algoritmo Arc-Step ricostruisce un profilo corneale come una serie di archi che riflettono i raggi dalle mire alla lente del cheratoscopio. Il termine "mire corneali" si riferisce ad un effetto ottico che si verifica quando la luce passa attraverso una superficie curva, proprio come la cornea. Quando la luce attraversa la cornea, essa può essere distorta e creare un pattern di forma circolare o mire corneali. È bene evidenziare che gli archi adiacenti hanno tangenti comuni e che il principale vantaggio presentato da questo algoritmo è l'utilizzo di archi, i quali non devono obbligatoriamente risultare centrati sull'asse. Pertanto, i raggi degli archi rappresentano i raggi locali di curvatura relativi a piccole regioni corneali [102].

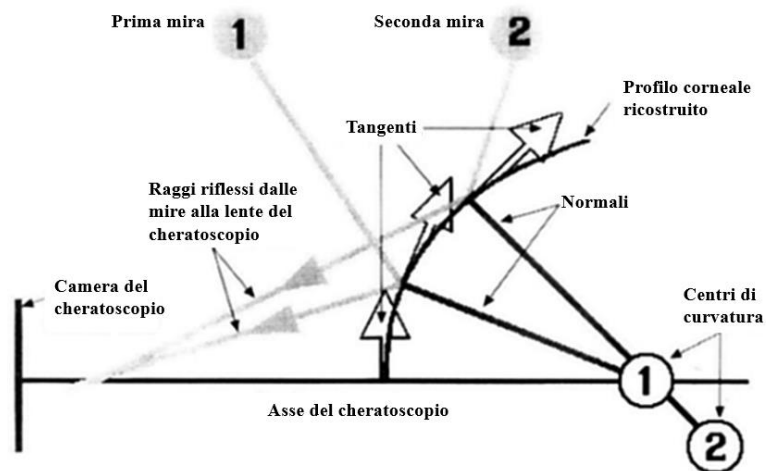


Figura 4.9: Schema illustrativo del principio di funzionamento dell'algoritmo Arc-Step per il raggio di curvatura [102].

Nella sovrastante figura si mostra come vengono calcolati gli angoli dei raggi riflessi da un meridiano corneale all'obiettivo del cheratoscopio, per un semimeridiano cheratografico. Viene costruita una serie di archi che rifletterebbe i raggi all'obiettivo del cheratoscopio. Il primo arco è tangente all'apice e il suo centro di curvatura giace sull'asse del cheratoscopio (1). Il secondo arco ha una tangente comune con il primo arco a livello della loro giuntura, ma il suo centro di curvatura può giacere al di fuori dall'asse del cheratoscopio (2), proprio come potrebbe verificarsi per il centro di curvatura degli archi successivi. La potenza locale ad ogni intersezione dell'arco e del raggio è la media delle potenze dei due archi adiacenti. Il raggio assiale di curvatura sarà la distanza, lungo la normale, dalla superficie all'asse del cheratoscopio [102].

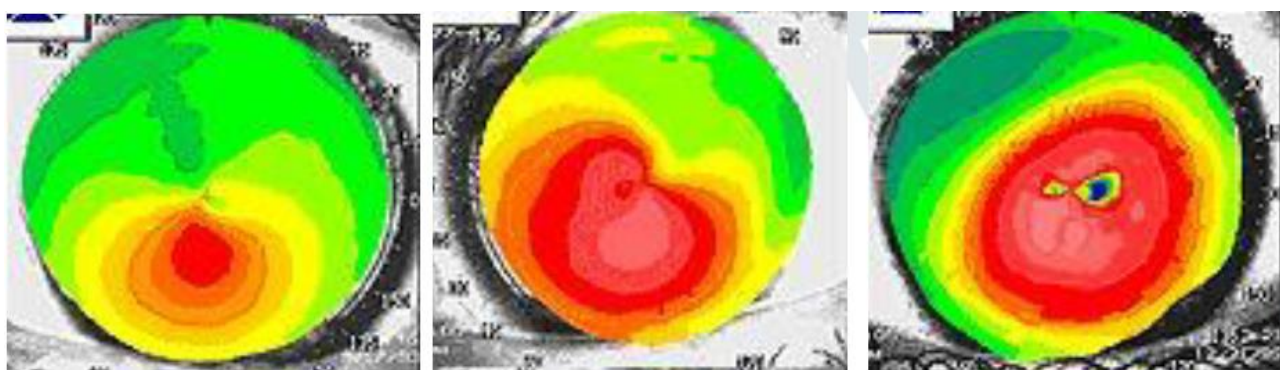
Il topografo-pachimetro corneale Sirius (CSO) viene utilizzato presso l'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria come strumento d'elezione per la diagnosi e il follow-up dei pazienti affetti da cheratocono poiché fornisce informazioni di pachimetria, elevazione, curvatura e potere diottrico di entrambe le superfici corneali su un diametro di 12 mm. Inoltre, tutte le misure biometriche della camera anteriore vengono calcolate a partire da 25 sezioni della cornea [103].

#### 4.1 Mappe topografiche

I topografi corneali rappresentano le caratteristiche morfologiche ed ottiche delle superfici della cornea attraverso diverse mappe colorimetriche, generate grazie ad un apposito software di elaborazione di immagini che analizza quanto acquisito dalle due telecamere (camera Scheimpflug e camera cheratoscopica) per poi visualizzarle su apposito monitor. In base al software di elaborazione cambia il metodo di rappresentazione delle immagini acquisite.

Segue la spiegazione delle mappe ottenibili dal dispositivo Sirius basandosi principalmente su quanto riportato nel Manuale Utente PHOENIX- CSO srl [95], al fine di fornire quanto necessario per la comprensione dei dati utilizzati per la realizzazione di questo elaborato volto a quantificare la risposta elastica del tessuto corneale a seguito del trattamento d CXL.

La rappresentazione visiva dei risultati dell'esame topografico della cornea avviene attraverso le **mappe topografiche**.



*Figura 4.10: esempio di mappe topografiche rappresentanti, da sinistra a destra, lo stadio iniziale, intermedio e avanzato di un occhio affetto da cheratocono.*

Ogni mappa topografica o mappa corneale è una mappa cromatica con una scala di colori, ciascuno specifico per un certo range diottrico corneale. Durante la valutazione dell'esame topografico, risulta fondamentale tenere conto della dimensione/scala da adottare per poter descrivere in maniera accurata le mappe corneali.

In generale si possono distinguere tre scale:

- Scala assoluta: la mappa con scala assoluta assegna ad ogni potere diottrico minimo e massimo della cornea sempre lo stesso colore. In altre parole, attribuisce un valore diottrico costante a ciascun colore.
- Scala normalizzata: l'intervallo diottrico è adattato alla cornea da analizzare. Si basa dallo scarto tra il valore minimo e massimo di curvatura della cornea in esame.
- Scala regolabile: programmata dall'operatore. Quest'ultimo deve stabilire a quali valori diottrici attribuire i colori. Viene utilizzata meno rispetto alle precedenti.

La seconda scala è quella che permette una più appropriata analisi personalizzata della morfologia corneale e un esame maggiormente dettagliato, dato che è sensibile a piccole variazioni di curvatura. Il vantaggio della scala assoluta si traduce nel fatto che consente un confronto più rapido e semplice rispetto ad esami precedenti o eseguiti da diversi operatori.

Le scale colorimetriche si presentano a sinistra di ogni mappa e permettono di associare un colore a un determinato intervallo di valori.

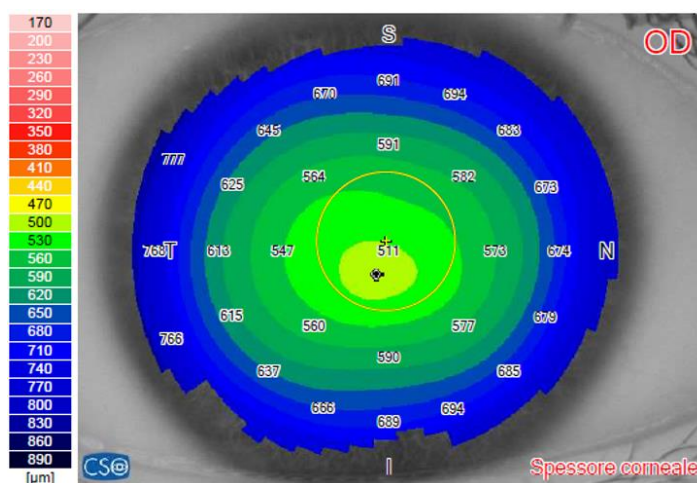


Figura 4.11: mappa dello spessore corneale con relativa scala in µm a sinistra.

Il sistema Sirius (CSO) fornisce diversi tipi di mappe e tutte fanno riferimento alla scala di Klyce/Wilson secondo la quale i colori verdi simboleggiano il “*sea level*”, ovvero la migliore superficie sferica che approssima la superficie corneale (BFS-*Best Fit Sphere*). I colori caldi come il rosso, l'arancione e il giallo sono situati sopra il *sea level* e per questo indicano zone più alte, più curve o più sottili. I colori freddi, quali azzurro e blu, stando al di sotto del *sea level*, indicano zone corneali più basse, più piatte, più profonde e più spesse. La variazione dell'intensità dei colori è correlata alla distanza dal BFS [104].

Segue una schermata mostrante quattro differenti mappe topografiche utili alla diagnosi e alla classificazione del cheratocono:



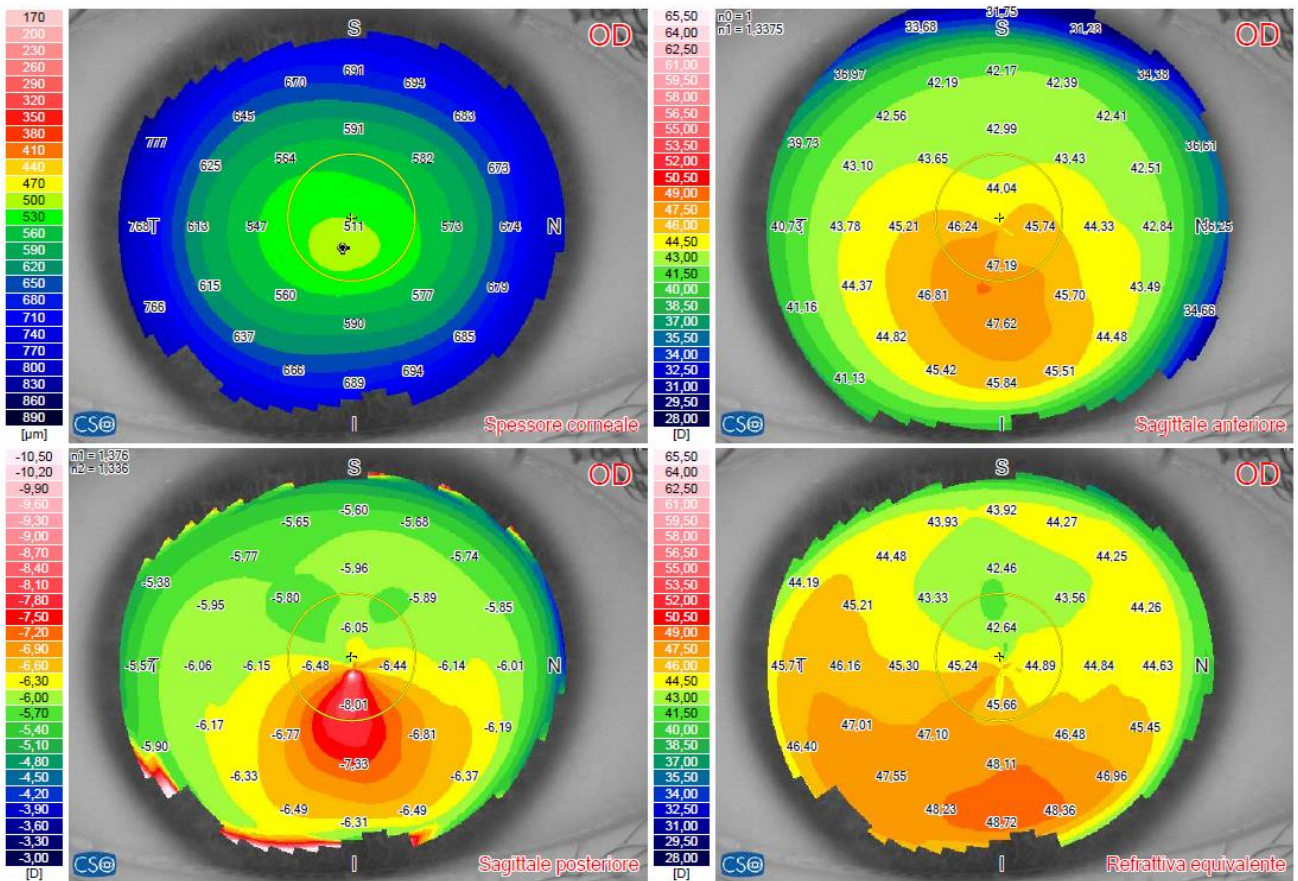


Figura 4.12: Mappe topografiche della cornea cheratoconica di un giovane paziente (19 anni) relative a 12 giorni prima dell'intervento epi-off.

Da sinistra in alto si possono osservare le seguenti mappe:

- Spessore corneale: la mappa rappresenta lo spessore della cornea in micron ( $\mu\text{m}$ ). I colori più freddi indicano aree più spesse, viceversa, i colori più caldi aree più sottili.
- Sagittale anteriore e posteriore: la mappa sagittale misura la curvatura di un punto della superficie corneale in direzione assiale rispetto al centro; è molto attendibile nella zona centrale, ma non oltre i 3-4 mm [104]. In accordo alla scala di Klyce/Wilson i colori freddi rappresentano aree maggiormente piatte, colori più caldi aree più curve. Nella mappa sagittale posteriore le curvature vengono indicate con numeri negativi
- Refrattiva equivalente: rappresenta la mappa dei poteri locali della cornea. I poteri sono espressi in diottrie. Gli indici di rifrazione per le due interfacce sono quello dell'aria ( $n_0=1$ ), quello dello stroma ( $n_1=1.376$ ) e quello dell'umor acqueo ( $n_2=1.336$ ). La scala è in diottrie, i colori caldi sono associati ad aree con maggiore potere diottrico e i colori freddi ad aree con minor potere.

Un'ulteriore possibile schermata ottenibile dal dispositivo Sirius è la seguente:

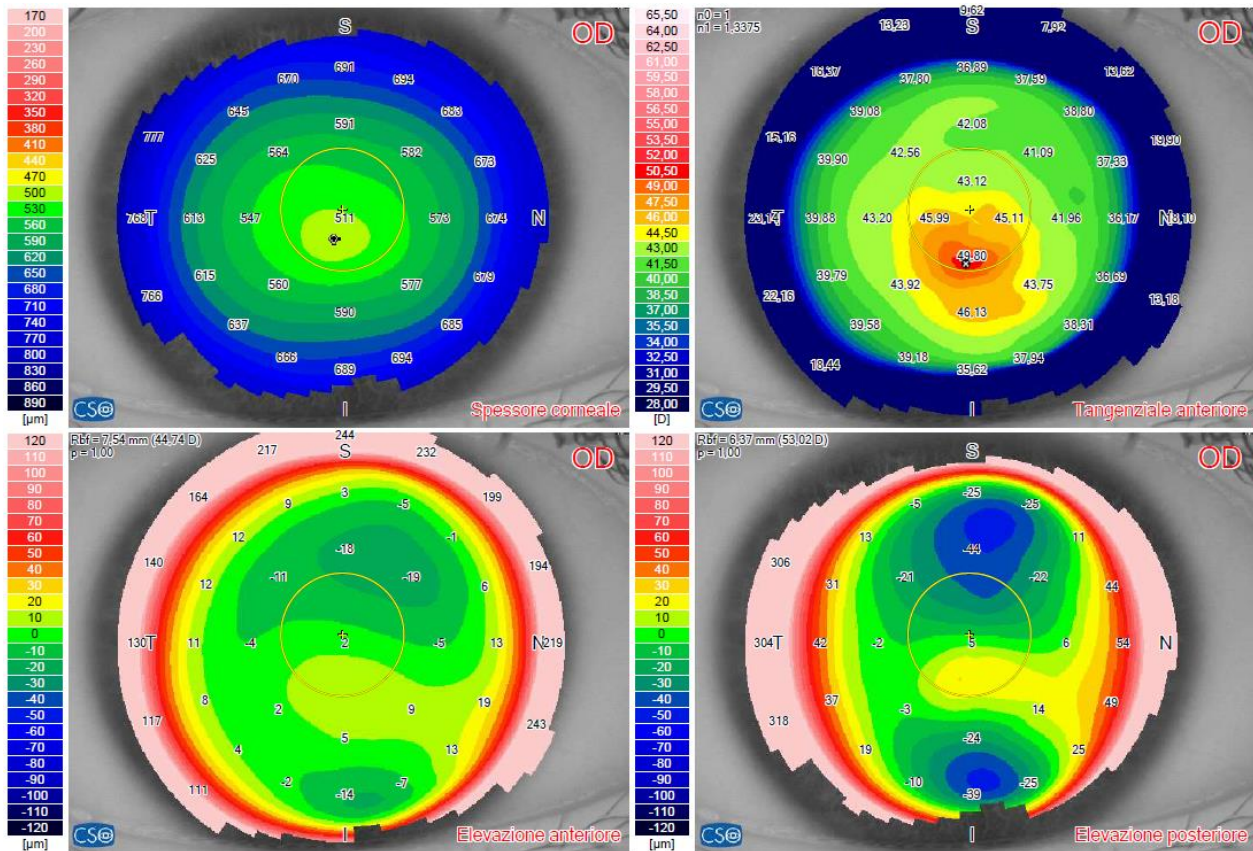


Figura 4.13: Mappe topografiche della cornea cheratoconica di un giovane paziente (19 anni) relative a 12 giorni prima dell'intervento epi-off.

Partendo sempre dall'alto a sinistra si vedono:

- Spessore corneale: la mappa rappresenta lo spessore della cornea in micron ( $\mu\text{m}$ ). I colori più freddi indicano aree più spesse, viceversa, i colori più caldi aree più sottili.
- Tangenziale anteriore: questa mappa misura la curvatura di un certo punto della superficie corneale considerando la tangente ad ogni punto e riuscendo a rilevare in modo più sensibile piccoli cambiamenti di curvatura essendo un calcolo geometrico svincolato dalla curvatura dell'apice; supera i limiti dell'algoritmo assiale fornendo un'affidabile rappresentazione anche della periferia [104]. In Fig. 4.13 la mappa è espressa in Diottrie e con riferimento alla scala di Klyce/Wilson colori più caldi indicano aree più curve, colori più freddi indicano aree più piatte.
- Elevazione anteriore e posteriore: questa tipologia di mappa rappresenta l'altezza della superficie anteriore (o posteriore) della cornea rispetto ad una superficie di riferimento sferica (best-fit). Le differenze vengono rappresentate in micron e, sempre in riferimento alla scala colorimetrica di Klyce/Wilson, i colori caldi sono associati alle aree che si trovano al di sopra della superficie di riferimento e i colori freddi sono associati alle aree che si trovano al di sotto.



## 4.2 Indici topografici

Nelle schermate di analisi dei topografi corneali appaiono non solo le mappe corneali affiancate alle scale cromatiche, bensì importanti indici topografici, solitamente presentati sulla destra. Essi sono parametri quantitativi utilizzati per valutare la forma e la superficie della cornea. Rendono più facilmente leggibili ed interpretabili le mappe corneali colorimetriche, le quali forniscono informazioni di tipo qualitativo. Questi indici sono in grado di caratterizzare la qualità ottica della superficie corneale anteriore fornendo importanti informazioni su curvatura, irregolarità ed asimmetria della cornea. Gli indici topografici costituiscono dei veri e propri indicatori matematici.

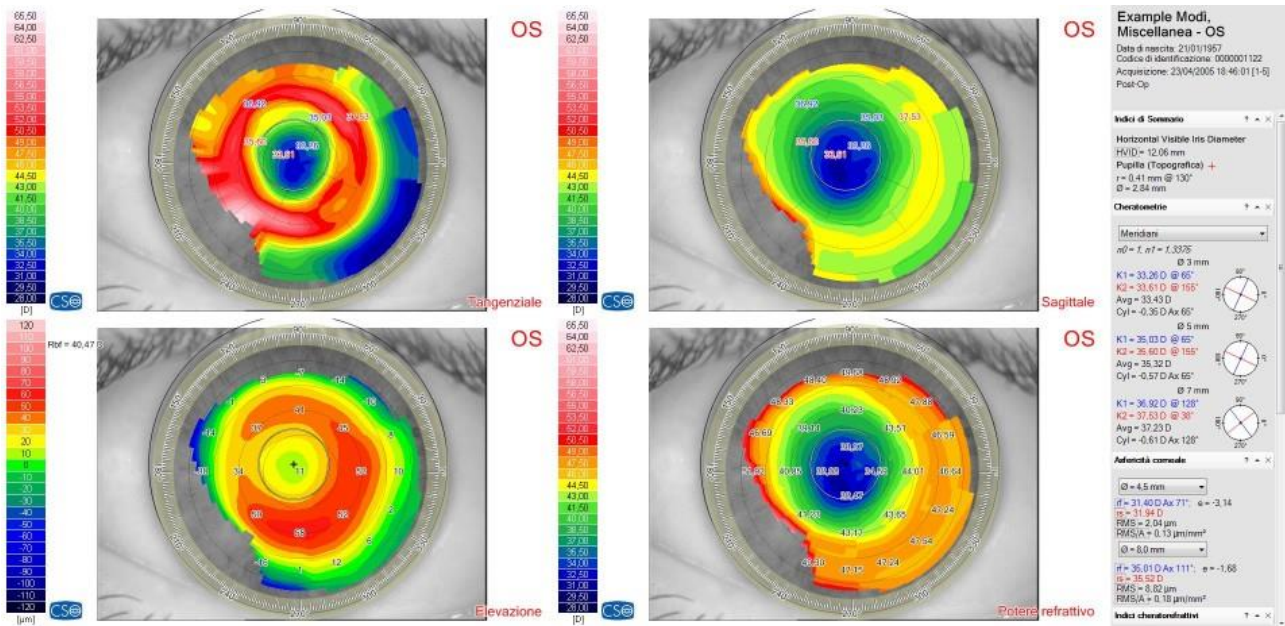


Figura 4.14: esempio di una schermata di analisi comprendente alcuni indici topografici sulla destra.

Gli indici di cruciale importanza per una completa caratterizzazione della cornea sotto esame sono riassunti nella seguente illustrazione:

<b>Indici di Sommario</b> HVID* = 11,12 mm ✚ Pupilla (Topografica) r = 0,75 mm @ 99° Ø = 3,75 mm intercetta λ: r = 2,20 mm @ 99° ✦ Punto più sottile r = 1,40 mm @ 225° Thk = 401 µm ✖ Apice r = 1,40 mm @ 257° Curv = 64,83 D Camera anteriore CCT + AD = 0,457 + 3,15 = 3,61 mm Volume = 188 mm³ Angolo irido-corneale = 41° HACD = 12,29 mm Sollevamento cristallino = -0,34 mm Volume corneale (Ø=10mm) Volume = 54,6 mm³	<b>Cheratometrie</b> n0 = 1 n1 = 1,3375 Sim-k K1 = 45,46 D @ 55° K2 = 50,41 D @ 145° Avg = 47,81 D Cyl = -4,95 D Ax 55° Anteriore Ø=3mm K1 = 44,50 D @ 58° K2 = 53,75 D @ 148° Avg = 48,69 D Cyl = -9,25 D Ax 58° Anteriore Ø=5mm K1 = 45,08 D @ 57° K2 = 50,98 D @ 147° Avg = 47,85 D Cyl = -5,91 D Ax 57° Anteriore Ø=7mm K1 = 45,04 D @ 57° K2 = 48,87 D @ 147° Avg = 46,88 D Cyl = -3,83 D Ax 57°	<b>Cheratometrie</b> n1 = 1,376 n2 = 1,336 Posteriore Ø=3mm K1 = -6,59 D @ 47° K2 = -8,49 D @ 137° Avg = -7,42 D Cyl = +1,90 D Ax 47° Posteriore Ø=5mm K1 = -6,54 D @ 48° K2 = -7,50 D @ 138° Avg = -6,99 D Cyl = +0,96 D Ax 48° Posteriore Ø=7mm K1 = -6,56 D @ 53° K2 = -6,92 D @ 143° Avg = -6,73 D Cyl = +0,36 D Ax 53°	<b>Asteroformia corneale</b> Anteriore Ø=6,0mm rf = 49,78 D Ax 42° rs = 53,04 D p = -0,13 ▲ RMS/A=0,56µm/mm² Posteriore Ø=6,0mm rf = -7,89 D Ax 5° rs = -8,40 D p = -0,42 ▲ RMS/A=1,61µm/mm² Anteriore Ø=8,0mm rf = 50,97 D Ax 26° rs = 52,39 D p = -0,18 ▲ RMS/A=0,52µm/mm² Posteriore Ø=8,0mm rf = -7,90 D Ax 149° rs = -8,58 D p = -0,58 ▲ RMS/A=1,32µm/mm²	<b>Analisi refrattiva</b> Ø=4,0mm Cyl = -8,95 D Ax 71° MPP = 45,82 D LSA = 1,05 D <b>Screening del cheratocono</b> ▲ Sif = 16,08 D □ KvF = 73 µm ▲ BCvF = 7,69 D @ 239° ▲ Sfb = 4,54 D ✦ KvB = 190 µm ▲ BCvB = 8,99 D @ 225° ▲ Thk = 401 µm Classe: <b>Compatibile con cheratocono</b>
---	--	---	--	--

Figura 4.15: indici topografici risultanti da un esame di topografia corneale.

Nei successivi sottoparagrafi viene riportata la descrizione degli indici in Fig. 4.15.



## 4.2.1 Indici di sommario

- **HIVD (Horizontal Iris Visible Diameter)**: rappresenta il diametro orizzontale della cornea in millimetri ed è ricavato dall'immagine cheratoscopica.
- **Pupilla (Topografica)**: riporta il centro ed il diametro della pupilla nel momento dell'acquisizione.
- **Punto più sottile**: riporta il punto più sottile della cornea come posizione e valore. Le coordinate di tale punto possono essere espresse sia in forma polare che cartesiana in base alle impostazioni settate dall'operatore.
- **Apice**: riporta la posizione e la curvatura del punto più curvo della mappa tangenziale anteriore. Le coordinate di tale punto possono essere espresse sia in forma polare che cartesiana in base alle impostazioni settate dall'operatore.
- **Camera anteriore**:
  - o **CCT+AD**: profondità della camera anteriore dal vertice della cornea al vertice del cristallino, espressa in millimetri. L'altezza totale della camera anteriore corrisponde allo spessore corneale CCT (*Central Corneal Thickness*) + la profondità della camera anteriore ACD (*Anterior Chamber Depth*).
  - o **Volume**: volume della camera anteriore in millimetri cubici.
  - o **Angolo irido-corneale**: rappresenta la media delle misure dell'angolo sui meridiani nell'intervallo  $180^\circ \pm 20^\circ$ .
  - o **HACD (Horizontal Anterior Chamber Diameter)**: diametro orizzontale della camera anteriore, calcolato come distanza media sui meridiani dei vertici degli angoli iridocorneali.
- **Volume corneale**: volume della cornea entro un diametro di 10 mm.

## 4.2.2 Cheratometrie

La cheratometria è una tecnica di misurazione utilizzata nel settore oftalmico per determinare la curvatura della superficie anteriore della cornea. In questa sezione vengono presentati indici di cruciale importanza in caso di monitoraggio di una cornea malata affetta da cheratocono. Il Simulated K (SimK) è un indice fondamentale in quanto rappresenta la simulazione delle letture che si otterrebbero con un cheratometro in riferimento ai meridiani principali (il più curvo e il più piatto). Mostrando un ingrandimento della Figura 4.14, vengono evidenziati i valori di curvatura **K1** e **K2** in mm. Essi possono essere espressi anche in Diottrie (D) come nella rappresentazione riassuntiva di tutti gli indici presente in Fig. 4.15.

**K1** indica la curvatura e @ l'orientamento del meridiano più piatto

**K2** indica la curvatura e @ l'orientamento del meridiano più curvo

**Avg** indica la curvatura media dei meridiani principali

**Cyl** indica la toricità corneale (differenza in diottrie fra **K1** e **K2**)

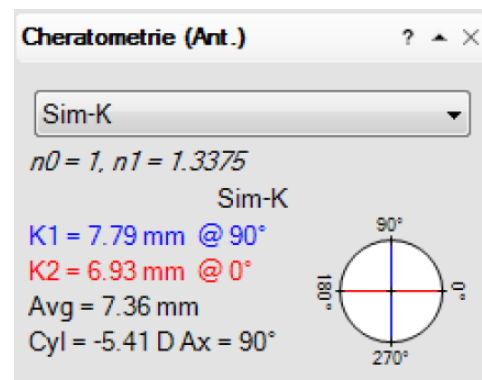


Figura 3.16: Cheratometrie anteriori

Continuando a fare riferimento alla sezione “cheratometrie” della Fig. 4.15 di cui se ne riporta un’ulteriore rappresentazione qui sotto, si può vedere che oltre al SimK, sono presenti i valori di curvatura e orientamento del meridiano più piatto e di quello ad esso perpendicolare nelle zone di diametro 3, 5 e 7 mm della cornea. Ovviamente, vengono visualizzati anche i valori di curvatura dei meridiani per la superficie posteriore della cornea.

**K1** indica la curvatura e **@** l’orientamento del meridiano più piatto

**K2** indica la curvatura e **@** l’orientamento del meridiano più curvo

**Avg** indica la curvatura media dei meridiani principali

**Cyl** indica la toricità corneale (differenza in diottrie fra **K1** e **K2**)

Cheratometrie		n0 = 1 n1 = 1,3375	Cheratometrie		n1 = 1,376 n2 = 1,336
Sim-k	K1 = 45,46 D @ 55° K2 = 50,41 D @ 145° Avg = 47,81 D Cyl = -4,95 D Ax 55°		Posteriore Ø=3mm	K1 = -6,59 D @ 47° K2 = -8,49 D @ 137° Avg = -7,42 D Cyl = +1,90 D Ax 47°	
Anteriore Ø=3mm	K1 = 44,50 D @ 58° K2 = 53,75 D @ 148° Avg = 48,69 D Cyl = -9,25 D Ax 58°		Posteriore Ø=5mm	K1 = -6,54 D @ 48° K2 = -7,50 D @ 138° Avg = -6,99 D Cyl = +0,96 D Ax 48°	
Anteriore Ø=5mm	K1 = 45,08 D @ 57° K2 = 50,98 D @ 147° Avg = 47,85 D Cyl = -5,91 D Ax 57°		Posteriore Ø=7mm	K1 = -6,56 D @ 53° K2 = -6,92 D @ 143° Avg = -6,73 D Cyl = +0,36 D Ax 53°	
Anteriore Ø=7mm	K1 = 45,04 D @ 57° K2 = 48,87 D @ 147° Avg = 46,88 D Cyl = -3,83 D Ax 57°				

Figura 4.17: Cheratometrie mostrate nella schermata riassuntiva del Sirius CSO.

### 4.2.3 Asfericità Corneale

In questa sezione vengono illustrati gli indici di curvatura in due diverse zone corneali, centrale e periferica. Per due diametri corneali (6 o 8 mm) vengono visualizzati diversi indici di forma per la superficie anteriore e posteriore della cornea.

**rf** rappresenta il raggio di curvatura apicale del meridiano più piatto della superficie asfero-torica di best fit.

**rs** rappresenta il raggio di curvatura apicale del meridiano più curvo della superficie asfero-torica di best fit.

**p** fattore di forma descritto nel paragrafo 2.2.1 del capitolo 2.

**RMS/A**: Root mean square per unità di superficie.

È una misura di quanto la superficie in esame si discosta da quella asfero-torica di best-fit.

Il triangolo rosso indica che l’indice eccede i valori di normalità, risultando anomalo.

Più l’RMS/A è alto, più la superficie della cornea è irregolare. Se RMS/A è basso significa che la superficie della cornea nell’area delimitata da quel particolare diametro è regolare.

Asfericità corneale	
Anteriore Ø=6,0mm	rf = 49,78 D Ax 42° rs = 53,04 D p = -0,13 ▲ RMS/A=0,56µm/mm²
Posteriore Ø=6,0mm	rf = -7,89 D Ax 5° rs = -8,40 D p = -0,42 ▲ RMS/A=1,61µm/mm²
Anteriore Ø=8,0mm	rf = 50,97 D Ax 26° rs = 52,39 D p = -0,18 ▲ RMS/A=0,52µm/mm²
Posteriore Ø=8,0mm	rf = -7,90 D Ax 149° rs = -8,58 D p = -0,58 ▲ RMS/A=1,32µm/mm²

Figura 4.18: indici di forma.

## 4.2.4 Analisi refrattiva

Questo pannello mostra degli indici calcolati a partire dal fronte d'onda corneale relativo ad una pupilla d'entrata situata nella posizione della pupilla del paziente.

**Cyl:** cilindro corneale in diottrie

**MPP** (*mean pupil power*): potere corneale equivalente in diottrie

**LSA** (*longitudinal spherical aberration*): aberrazione sferica longitudinale espressa in diottrie

Analisi refrattiva	
Ø=4.0mm	Cyl = -8,95 D Ax 71°
	MPP = 45,82 D
	LSA = 1,05 D

Figura 4.19: Pannello mostrante le misure di analisi refrattiva.

## 4.2.5 Screening del cheratocono

Esistono indici specifici indicanti la presenza o meno del cheratocono:

Screening del cheratocono
▲ S1f = 16,08 D
▣ KVf = 73 µm
▲ BCVf = 7,69 D @ 239°
▲ S1b = 4,54 D
◆ KVb = 190 µm
▲ BCVb = 8,99 D @ 225°
▲ Thk = 401 µm
Classe:
Compatibile con cheratocono

Figura 4.20: Indici specifici per il cheratocono

**S1f** ed **S1b** sono indici basati sulle curvature, ne segue una descrizione maggiormente dettagliata.

**S1f** (*Simmetry Index front*): simmetria di curvature anteriore, definita come la come differenza della curvatura tangenziale anteriore media, espressa in diottrie, di due zone circolari centrate nell'asse verticale poste rispettivamente nell'emisfero inferiore e nell'emisfero superiore della cornea. S1f è un indice di asimmetria verticale: valori positivi indicano un emisfero inferiore più curvo di quello superiore, viceversa valori negativi indicano un emisfero superiore più curvo di quello inferiore. Per questo indice sono mostrati i valori normativi (95° percentile e 99° percentile della popolazione normale) [105].

**S1b** (*Simmetry Index back*): simmetria di curvatura posteriore, definita come la differenza della curvatura tangenziale posteriore media, espressa in diottrie, di due zone circolari centrate nell'asse verticale poste rispettivamente nell'emisfero inferiore e nell'emisfero superiore della cornea. Si noti che essendo l'indice definito in diottrie ed essendo il salto d'indice di segno opposto rispetto al caso

aria-stroma la differenza viene cambiata di segno per compatibilità con Sif. Anche per questo indice sono mostrati i valori normativi (95° percentile e 99° percentile della popolazione normale) [105].

**KVf** (*Keratoconus Vertex front*): punto più elevato dell'ectasia sulla superficie anteriore.

**KVb** (*Keratoconus Vertex back*): punto più elevato dell'ectasia sulla superficie posteriore.

**BCV** (*Baiocchi Calossi Versaci front Index*) valuta la presenza e la collocazione di un'ectasia per mezzo di un'analisi aberrometrica. BCV molto vicini a 0 indicano cornee normali. Più lo stadio del cheratocono è avanzato, più il valore di BCV aumenta.

**Thk** (*Thickness*): spessore della cornea in  $\mu\text{m}$ .

I dati relativi agli indici appena descritti vengono elaborati da una rete neurale, avente lo scopo di classificare il paziente in uno dei seguenti gruppi:

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

## **CAPITOLO 5: Risposta meccanica corneale al trattamento di CXL**

Il trattamento di Cross-Linking del collagene corneale crea nuove connessioni tra le fibre collagene presenti nello stroma. In tal senso, consente di rinforzare la superficie corneale, la quale, nel caso di cornea affetta da cheratocono, è caratterizzata da uno sfiancamento tissutale dovuto ad assottigliamento conseguente all'indebolimento progressivo della cornea. In questo quinto capitolo, basandosi sulle fonti letterarie esistenti, si vuole comprendere il comportamento meccanico corneale e fornire un modello analitico che possa verificare l'effettivo aumento di rigidità a livello stromale a seguito del CXL.

### **5.1 Biomeccanica corneale**

La biomeccanica corneale è un ramo della scienza che studia la deformazione e l'equilibrio del tessuto corneale sotto l'applicazione di una qualsiasi forza [106]. Recentemente, la ricerca sta dando sempre più attenzione alle proprietà biomeccaniche dei tessuti oculari in modo da comprendere l'insorgere di problemi quali ad esempio l'ectasia post-refrattiva o la progressione di malattie oculari come il cheratocono. Il comportamento meccanico della cornea risulta essere essenziale al fine di mantenere la sua stabilità dimensionale e, di conseguenza, delle proprietà visive ottimali. Inoltre, il suo studio è di fondamentale importanza per una serie di applicazioni cliniche, tra cui la pianificazione delle procedure di chirurgia refrattiva, la selezione degli anelli corneali, il monitoraggio della progressione del cheratocono, l'ottimizzazione del trattamento di reticolazione e la misura della pressione intraoculare (IOP).

Il comportamento biomeccanico della cornea dipende dalla topografia, dallo spessore e dalle proprietà del tessuto biologico. La distribuzione dello spessore e la topografia possono essere misurati in vivo già da oltre vent'anni grazie all'utilizzo dei topografi corneali, mentre, per quanto riguarda la determinazione delle proprietà biomeccaniche del tessuto corneale, ancora oggi bisogna basarsi, nella maggior parte dei casi, su esperimenti su cornee animali (cornee porcine, bovine e di coniglio). Questo perché, al momento, non è stata ancora sviluppata una tecnica di misurazione che possa riflettere in modo completo le caratteristiche meccaniche della cornea (Gold Standard) [107].

La cornea è un tessuto molle e come tale è caratterizzato da anisotropia a causa delle fibre che tendono ad assumere direzioni preferenziali e, inoltre, la rigidità aumenta con la deformazione. Questo si verifica in quanto, in assenza di carico uniassiale, le fibrille di collagene si trovano in una configurazione rilassata; invece, quando vengono allungate, tendono progressivamente ad allinearsi nella direzione della deformazione contribuendo alla resistenza globale. A dimostrazione di quanto appena affermato, la Fig. (5.1) mostra la tipica curva che descrive la relazione sforzo-deformazione per un tessuto molle.

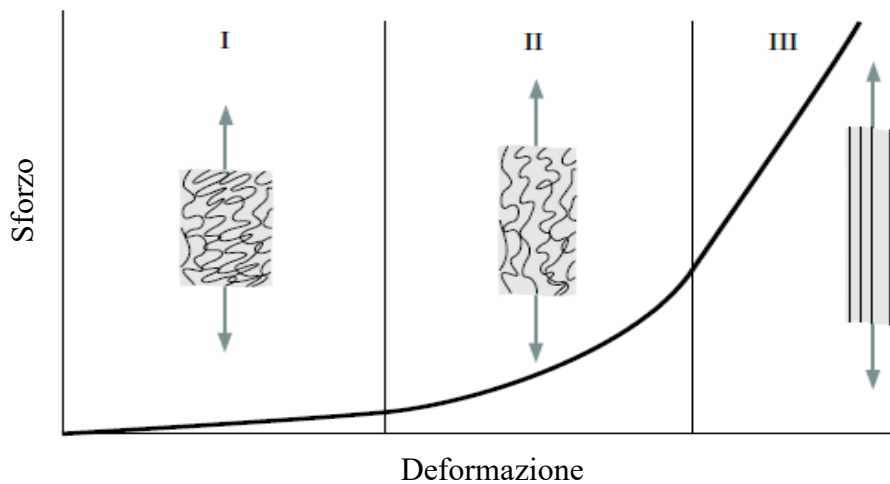


Figura 5.1: Curva tipica sforzo-deformazione (di trazione) per un tessuto molle con, associata, la morfologia delle fibre di collagene.

Nella prima fase le fibre di collagene appaiono in condizione rilassata e aggraffate, data l'assenza del carico. La relazione sforzo-deformazione è approssimativamente lineare, caratterizzata da un basso modulo elastico.

Nella seconda fase, come il carico aumenta, le fibre di collagene tendono ad allinearsi lungo la direzione del carico allungandosi gradualmente ed interagendo con la matrice extracellulare.

Nella terza fase, ad alti stress di trazione, il pattern costituito da fibre ondulate ed aggraffate scompare del tutto. Le fibre di collagene allineate resistono fortemente al carico e il tessuto diventa rigido a sollecitazioni più elevate. La relazione sforzo-deformazione torna ad essere lineare ed oltre questa terza fase viene raggiunta la resistenza alla trazione massima, dopo la quale le fibre iniziano a rompersi [108].

Dalla letteratura si evince che la cornea sia un tessuto **viscoelastico** e che le sue proprietà meccaniche dipendano dalla composizione e dalla struttura. In generale, si può affermare che il collagene è responsabile della resistenza del tessuto, mentre la matrice glicoproteica (sostanza fondamentale), che avvolge le fibrille di collagene rendendole trasparenti, è responsabile delle proprietà viscoelastiche. Per comprendere al meglio il significato dei risultati delle misure di biomeccanica corneale, è bene ricordare quali sono i descrittori biomeccanici fondamentali e il loro significato fisico. Partendo dal concetto di viscoelasticità, esso sottintende un comportamento intermedio tra quello puramente elastico e quello puramente viscoso. Nei materiali elastici la deformazione è proporzionale alla forza applicata e viene recuperata immediatamente dopo lo scarico, restituendo una linea retta come relazione sforzo-deformazione. La costante di proporzionalità tra sforzo e deformazione è il **modulo elastico**, denominato anche **modulo di Young**. Esso precisamente è definito come il rapporto tra la sollecitazione (carico per unità di superficie) e la deformazione (deformazione/spostamento per unità di lunghezza). È chiaro, dunque, che un alto modulo elastico indichi un materiale più rigido e ciò porta alla definizione di resistenza, la quale consiste nella capacità di un materiale di sopportare la sollecitazione senza deformarsi. Invece, un materiale è viscoso quando la velocità di deformazione è più rapida del tasso di rilassamento. Il lento rilassamento è dovuto alla riorganizzazione configurazionale del materiale durante la deformazione. In sintesi, un materiale viscoso resiste alla deformazione della forza applicata nel tempo, mentre i materiali elastici si deformano immediatamente con l'applicazione della forza e tornano allo stato originale quando la forza viene rimossa. Il comportamento dei materiali viscoelastici è mostrato nella seguente immagine sulla destra:

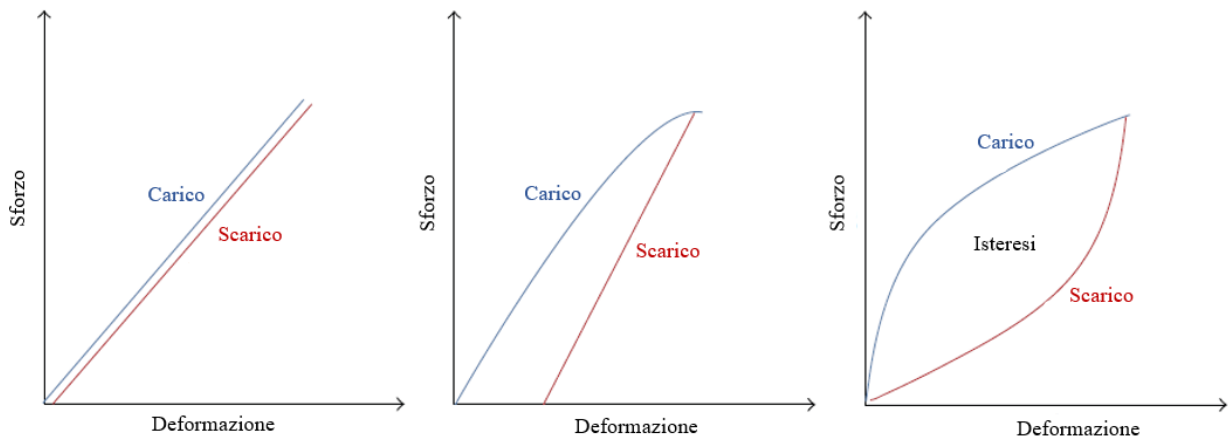


Figura 5.2: Da sinistra a destra vengono mostrate le differenti risposte sforzo-deformazione per un materiale elastico, plastico e viscoelastico.

Nel caso di materiale viscoelastico si può ben notare come esista un *gap* tra le curve di carico e scarico, conosciuto con il nome di **isteresi**. L'area all'interno del ciclo di isteresi rappresenta l'energia dissipata per volume nel materiale per ciclo [109].

Le proprietà meccaniche più comunemente misurate per la cornea sono il modulo elastico (modulo di Young), il modulo di taglio e il modulo di perdita. Ognuna di queste può essere misurata osservando la deformazione del campione in risposta ad uno specifico carico meccanico [30]. Quando si parla di modulo di Young, per semplicità denotato con la lettera **E**, si può fare una distinzione tra un modulo secante e un modulo tangente.

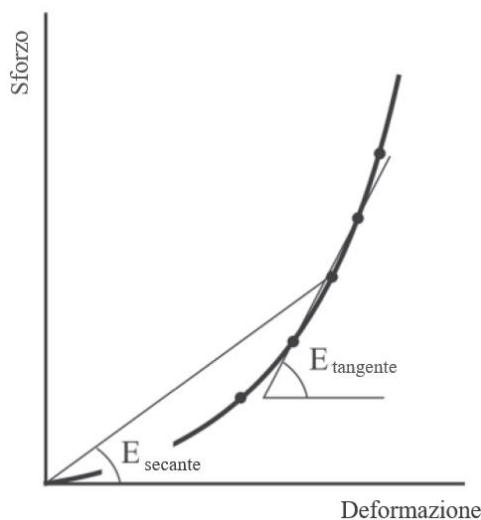


Figura 5.3: modulo di Young tangente e secante.

Il modulo tangente di elasticità è la pendenza del diagramma stress-deformazione in ogni punto. Il modulo di elasticità secante considera la pendenza di una linea retta tangente tracciata sulla curva stress-deformazione a un punto specifico di interesse all'interno della curva. In pratica, per calcolare il modulo di elasticità secante, si seleziona un punto specifico sulla curva stress-deformazione; successivamente, viene calcolata la pendenza della tangente a quella curva in quel punto. Questa pendenza rappresenta il modulo di elasticità secante in quello specifico punto.



Misurare le proprietà meccaniche della cornea non è semplice data la sua struttura eterogena ed anisotropa. Per eterogeneo si intende che le proprietà meccaniche corneali variano in base alla localizzazione nello spazio tridimensionale, proprio come si verifica nel caso di cheratocono. Mentre, “anisotropia” significa che un modulo elastico o altre proprietà misurate lungo un meridiano radiale della cornea, risulterà differente dai valori ottenuti per altri meridiani, contrariamente a un materiale isotropo, le cui proprietà meccaniche e termiche si presentano identiche in tutte le direzioni.

Dagli anni '80 sino ad oggi, per ottenere le proprietà dei materiali e derivare un modello costitutivo per tessuti biologici come la cornea, sono stati tentati due approcci. Uno è quello di condurre esperimenti standard come test di estensimetria su striscia, test di inflazione, test di compressione e test di indentazione, i quali comportano una serie di significative semplificazioni ed ipotesi, tra cui ad esempio l'omogeneità del materiale biologico; l'altro approccio più recente è quello di combinare tecniche numeriche e sperimentali per calcolare le proprietà dei materiali indirettamente con l'utilizzo del metodo inverso degli elementi finiti [110]. Quest'ultima è una tecnica potenzialmente non invasiva, la quale però comporta lo svantaggio di richiedere la misurazione *in vitro* delle proprietà del materiale al fine della scelta del corretto modello reologico. Tuttavia, questo lavoro di tesi non si pone come obiettivo quello di svolgere simulazioni ad elementi finiti e perciò è bene focalizzarsi semplicemente sul fatto che esistono diversi metodi di misura delle proprietà meccaniche corneali. Essi operano sia in regime temporale che spaziale. Generalmente, i metodi che possiedono scala temporale più breve rappresentano fortemente le proprietà elastiche, mentre quelli con scala temporale più lunga rappresentano meglio le proprietà viscosoelastiche. Chiaramente esiste una differenza anche per quei metodi di misura che operano in un regime spaziale ristretto fornendo le proprietà di una specifica porzione della cornea *in situ* e quelli che operano in un regime spaziale più ampio. Il regime spaziale si riferisce all'area sulla quale viene applicata una forza e misurata una deformazione. Questo differisce dalla risoluzione meccanica del metodo, che descrive l'abilità dello stesso di risolvere le differenze nelle proprietà meccaniche lateralmente e in profondità [30].

Numerosissimi sono gli studi finalizzati alla caratterizzazione meccanica corneale *in vitro*, in cui le prove di trazione uniassiale e le prove di pressurizzazione risultano protagoniste. Le ultime permettono di caratterizzare il comportamento a breve termine del materiale in risposta ad una pressione variabile; mentre, le prove di trazione, consentono di studiare le caratteristiche tempo-dipendenti, il comportamento a rottura e l'anisotropia. I test di trazione costituiscono la tecnica sperimentale più comunemente utilizzata per determinare le proprietà ingegneristiche dei materiali ed è probabilmente il metodo di test *ex-vivo* più semplice per determinare il comportamento stress-deformazione del tessuto corneale.

La procedura del test è molto semplice: viene sezionata una striscia rettangolare di tessuto, con larghezza costante, e la si sottopone a tensione uniassiale monitorandone il comportamento. I risultati sperimentali, ovvero il carico applicato e l'allungamento risultante, vengono convertiti rispettivamente in tensione e deformazione dividendo il carico per l'area della sezione trasversale del provino e l'allungamento per la lunghezza iniziale del provino non caricato. Quest'analisi fornisce la relazione sforzo-deformazione della striscia di tessuto corneale che ne descrive il comportamento, il quale è inteso indipendente dalla lunghezza, dallo spessore e dalla larghezza del provino [111]. Il problema è che in questa procedura sono intrinsecamente presenti delle carenze. Una deriva dal fatto che il campione di striscia corneale è originariamente parte di una superficie sferica. Di conseguenza,

la lunghezza del campione lungo la sua linea centrale longitudinale è maggiore rispetto ai lati. Questa variazione nella lunghezza del provino porta inevitabilmente a una distribuzione delle sollecitazioni non uniforme su tutta la larghezza del provino con la linea centrale che subisce deformazioni inferiori rispetto ai bordi (Fig. 5.4).

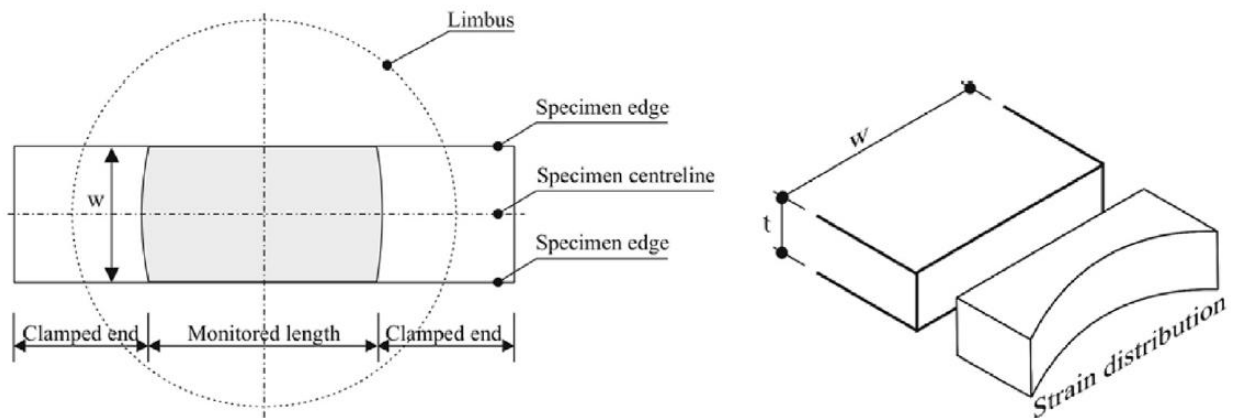


Figura 5.4: la distribuzione della deformazione sotto carico assiale non è uniforme a causa della variazione della lunghezza del provino dal massimo lungo la linea centrale al minimo lungo i bordi [111].

La seconda carenza riguarda l'appiattimento del campione originariamente curvo. Infatti, esso produce deformazioni tensionali di trazione, sforzi sul lato posteriore e deformazioni di compressione sul lato anteriore (Fig. 5.5).

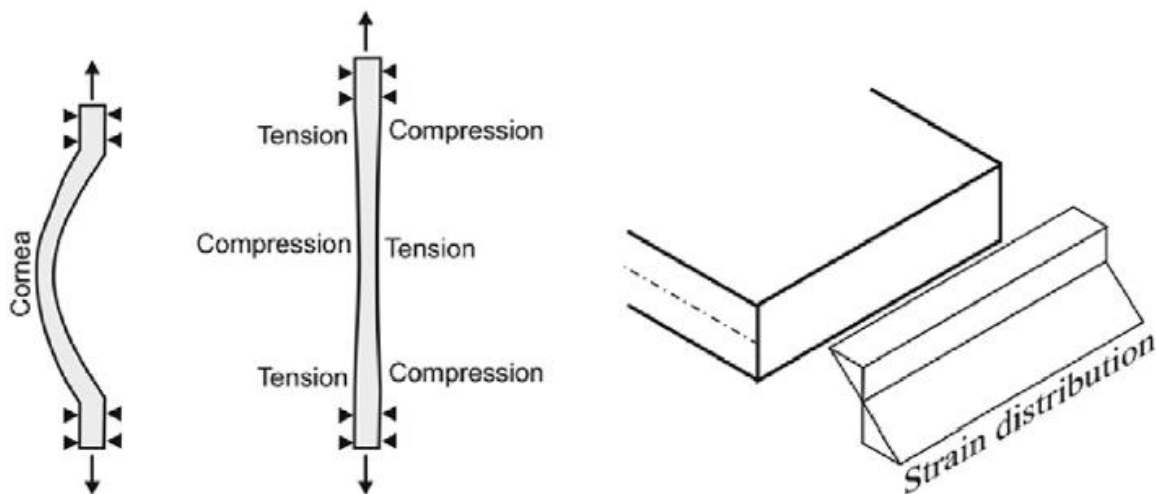


Figura 5.5: distribuzione della deformazione causata dal raddrizzamento del campione di striscia corneale inizialmente curva [111].

Queste deformazioni iniziali potrebbero essere considerevoli anche se lo spessore corneale venisse considerato piccolo rispetto alle altre dimensioni ( $\approx 7\%$  del raggio) [112]. Di conseguenza, le deformazioni iniziali di compressione e trazione generate rispettivamente durante l'appiattimento sui lati anteriore e posteriore porteranno a una distribuzione delle sollecitazioni non uniforme sotto il carico di tensione applicato. In aggiunta, potrebbe sorgere un'ulteriore complicanza a causa dell'uso di morsetti meccanici alle estremità dei campioni e della bassa coesione tra le lamelle stromali della cornea. Infine, bisogna considerare che questa procedura di test, sebbene sia un metodo di analisi molto semplice, ignora il fatto che lo spessore corneale non è costante. Lo spessore corneale varia da un minimo in corrispondenza dell'apice aumentando gradualmente verso il limbus, senza considerare

il caso delle cornee ectasiche in cui il profilo dello spessore risulta ancora più complesso. Un'ultima carenza di questa prova meccanica è presente a livello microstrutturale, in quanto la preparazione di un campione di tessuto corneale in striscia comporta inevitabilmente il taglio delle fibrille di collagene che attraversano i bordi del campione. La rottura della microstruttura del tessuto rischia di influenzare l'affidabilità delle proprietà meccaniche misurate [111].

La consapevolezza di tutte le sopramenzionate carenze del test su striscia ha, dunque, portato ad un maggiore impiego del test di gonfiaggio, nonostante il costo più elevato. Questa tipologia di test mantiene intatto il tessuto e lo carica di una pressione interna che simula la IOP. La pressione viene applicata attraverso un'iniezione di fluido utilizzando una colonna d'acqua o una pompa a siringa, la quale può essere controllata da un computer in un circuito chiuso con l'ausilio di un trasduttore di pressione che fornisce la misura del segnale di feedback.

Nella figura seguente è possibile vedere una rappresentazione grafica semplificata del set up di un test di inflazione:

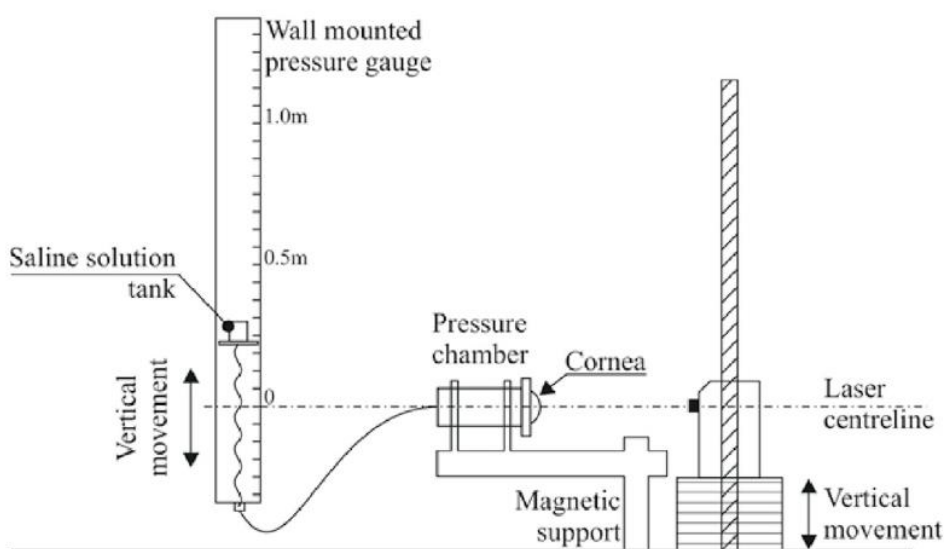


Figura 5.6: layout del set up di un test di gonfiaggio [111].

I campioni di materiale corneale sono collegati ai morsetti attraverso l'anello di tessuto sclerare. Perciò, il test comporta la dissezione del tessuto (Fig. 5.7) e l'utilizzo di condizioni di supporto non fisiologiche.



Figura 5.7: Esempio di campione corneale suino depitelizzato, inciso e pulito per i test di gonfiaggio [113].

La conseguente deformazione dei campioni alla variazione della pressione interna viene misurata da un sistema di fotocamere digitali ad alta risoluzione distribuite attorno al campione. Vengono scattate delle immagini sotto diverse pressioni interne ed analizzate attraverso l'utilizzo di sistemi di correlazione delle immagini digitali al fine di quantificare la distribuzione degli spostamenti sulla superficie dei campioni.

Negli ultimi anni ci si è spostati verso i test di gonfiaggio dell'intero globo oculare, poiché oltre a risolvere molti dei problemi dell'estensimetria, evita anche gli effetti negativi delle condizioni di supporto non fisiologiche derivanti dai test che coinvolgono solo la cornea, sebbene sia necessario prestare attenzione nel controllo dell'idratazione dei tessuti quando i risultati mirano a imitare le risposte biomeccaniche *in vivo*. Questo tipo di test viene utilizzato per derivare la rigidità oculare e per determinare la relazione di risposta pressione-spostamento nella cornea. Ma, dato che la sclera ha un modulo di Young da 3 a 3.5 volte superiore a quello della cornea [114], l'impatto delle proprietà meccaniche della sclera sulle misurazioni della deformazione corneale è potenzialmente piccolo ed ecco perché numerosi lavori utilizzano solo la porzione anteriore del globo oculare (cornea e anello di sclera), così da poter separare la deformazione corneale da quella sclerale.

Lo studio condotto da S. Kling et al. [114] risulta essere il primo in cui sono stati effettuati test di inflazione su cornee suine sottoposte al trattamento di Cross-Linking del collagene, da cui si basano studi molto più recenti come quello svolto da F. Boschetti et al. [113] e Isaak Fischinger et al. [115] mirati alla valutazione dell'irrigidimento stromale di cornee di maiale indotto dalla reticolazione (CXL) con irradianza costante in funzione della fluenza totale.

## **5.2 Caratterizzazione *in vitro* della biomeccanica corneale: Cornea porcina come modello approssimativo per la cornea umana**

A causa delle difficoltà associate nell'ottenere cornee di donatori umani, la maggior parte delle analisi presenti in letteratura riguardano prove di trazione e pressurizzazione su cornee animali, specialmente sulle cornee suine. Quest'ultime presentano forti similarità con le cornee umane sia da un punto di vista geometrico che di risposta meccanica ad una sollecitazione esterna.

Il diametro orizzontale medio della cornea porcina è paragonabile a quello della cornea umana: 14.23 mm (porcina [116]) contro 13 mm (umana). Lo spessore medio invece risulta essere maggiore rispetto al caso umano, poiché nei suini la cornea ha uno spessore medio di 975  $\mu\text{m}$  [117]; mentre nell'uomo, ricordando quanto scritto precedentemente nel paragrafo 2.4.1 riguardante la geometria della cornea umana sana, lo spessore sta nel range che va da 500  $\mu\text{m}$  (CCT) a 650  $\mu\text{m}$  (PCT).

Zeng et al. [118] ed Elsheikh et al. [119] hanno osservato che le cornee umane e suine presentano quasi la stessa forma di comportamento sotto carico sia a breve che a lungo termine.

A fini esplicativi si riportano i risultati di maggiore rilevanza di questi studi:

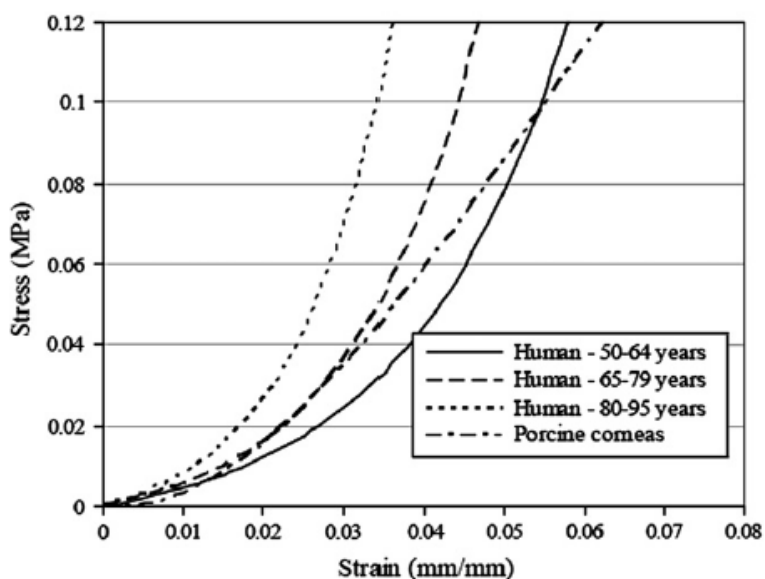


Figura 5.8: Curve sforzo-deformazione di confronto tra cornee umane e di maiale [119].

Entrambe mostrano un comportamento non lineare caratterizzato da valori di rigidità iniziali bassi e finali alti, ma le cornee umane si mostrano più rigide di quelle porcine. Inoltre, mentre le cornee umane presentano un comportamento non lineare con aumento graduale della rigidità, che aumenta con l'età, quelle porcine ne mostrano uno bi-lineare.

Gli autori di "Biomechanical properties of human and porcine corneas" [119] hanno anche effettuato test di rilassamento e di creep al fine di valutare le caratteristiche a lungo termine della cornea dimostrando che sia quelle porcine sia quelle umane presentano un comportamento viscoelastico. I risultati ottenuti sono i seguenti:

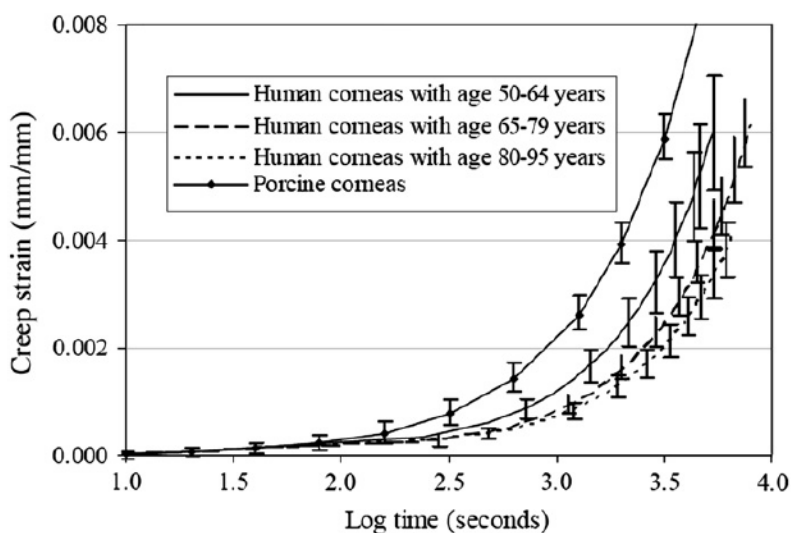


Figura 5.9: Confronto del comportamento a scorrimento tra cornee porcine e umane ad età diverse [119]

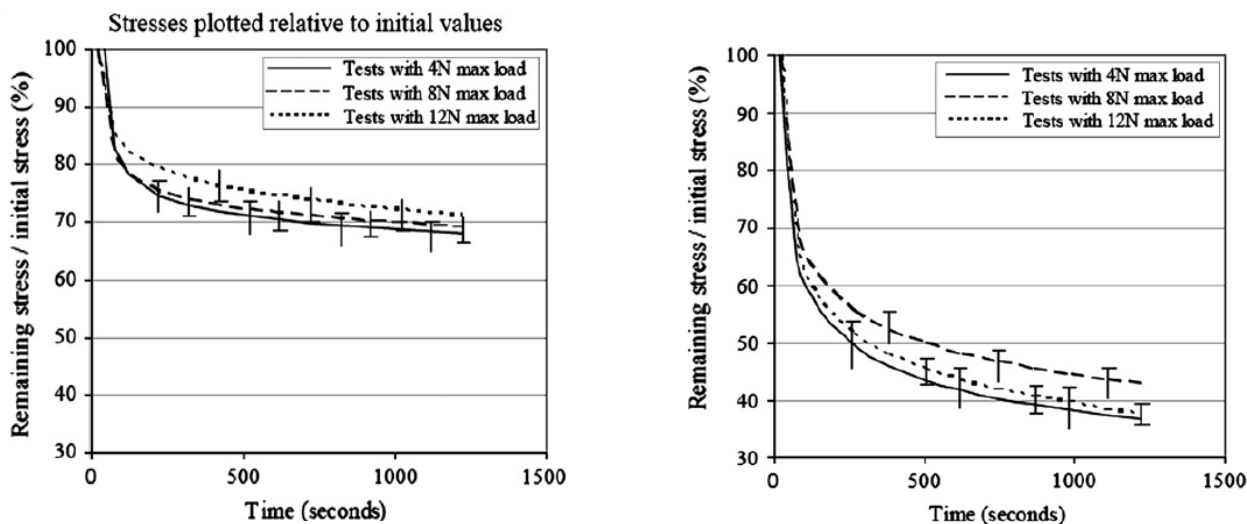


Figura 5.10: curve di rilassamento (a sinistra: cornee umane, a destra: cornee porcine) [119].

Le prove di creep e di rilassamento hanno lo scopo di misurare il comportamento a lungo termine del tessuto corneale, ma sotto differenti condizioni. Nei test di creep (o scorrimento), il materiale è tenuto sotto uno stress costante e ne viene monitorata la deformazione. Nei test stress-rilassamento viene controllata la lunghezza del campione e misurata la variazione durante uno stato di stress prolungato. In un ulteriore studio condotto dallo stesso anno da Elsheikh et al. [120] viene verificata anche l'anisotropia delle cornee porcine. Sia per il set di cornee umane che per quello costituito da cornee di maiale era stato riscontrato un comportamento anisotropo, dato che la direzione verticale (superiore-inferiore) risultava più rigida della direzione orizzontale (temporale-nasale) e molto più rigida di quella diagonale.

Dimostrata la somiglianza geometrica e comportamentale delle cornee porcine rispetto alle umane, ovvero quelle di interesse per questo elaborato, si vogliono riportare i risultati ottenuti in un recente lavoro del 2021 [113] avente come obiettivo quello di valutare quantitativamente gli effetti della dose di irradiazione nella procedura Epi-Off-CXL sull'irrigidimento stromale delle cornee di maiale.

In questo lavoro sono stati eseguiti due test di inflazione su ognuna delle 90 cornee porcine escisse e disepitelizzate protagoniste dello studio, uno pretrattamento e uno post reticolazione indotta dall'Epi-Off-CXL eseguito a irradiazione costante di  $9 \text{ mW/cm}^2$ . I tempi di esposizione ai raggi UV-A erano variabili e proporzionali alla dose di irradiazione:

Tempo di esposizione	2.5 min	5.0 min	10 min	15 min	20 min
Dose di irraggiamento	1.35 J/cm <sup>2</sup>	2.7 J/cm <sup>2</sup>	5.4 J/cm <sup>2</sup>	8.1 J/cm <sup>2</sup>	10.4 J/cm <sup>2</sup>

Tabella 5.1: Protocolli di irraggiamento sperimentati in [113].

Dividendo ogni valore della dose di irraggiamento per il tempo di esposizione corrispondente si ottengono i  $9 \text{ mW/cm}^2$  di irradianza.

La relazione quantitativa tra l'incremento dei parametri di rigidezza e la dose di irraggiamento è stata stabilita grazie a un modello teorico basato sulla teoria del guscio linearizzato di cui si tratterà in

maniera approfondita nel paragrafo seguente (paragrafo 5.3). Durante i test di pressurizzazione, i campioni di cornea sono stati sottoposti a una pressione posteriore indotta da una colonna di soluzione di cloruro di sodio (NaCl) che andava da 1.8 a 30 mmHg a passi di 2.5 mmHg per simulare l'effetto di una pressione intraoculare crescente. Prima di condurre i test, ogni campione è stato sottoposto a tre cicli di pressione carico scarico nell'intervallo di pressioni appena citato. Il pre-condizionamento è necessario poiché fornisce una storia di carico nota portando all'ottenimento di risultati confrontabili e riproducibili. Esso consiste in una procedura volta ad orientare la struttura del tessuto corneale, riportandola al suo allineamento naturale in vivo e permettendogli di adattarsi al carico. Inoltre, è di fondamentale importanza sottolineare che per applicare la teoria del guscio, su ciascuna cornea sono state effettuate delle misurazioni geometriche corrispondenti alla configurazione non sollecitata, al valore minimo di pressione applicato negli esperimenti (1.839 mmHg). I parametri necessari per la costruzione della cornea non sollecitata sono:

- Diametro medio nel piano  $D=2S$  (considerando sia il meridiano nasale-temporale NT che quello supero-inferiore SI)
- Curvatura media  $R$  (considerando sia il meridiano nasale-temporale NT che quello supero-inferiore SI)
- Spessore all'apice
- Elevazione all'apice

I parametri geometrici delle cornee di maiale misurati in quest'analisi di biomeccanica corneale condotta da F. Boschetti et al. [113] sono:

<i>Parametri</i>	<i>mm</i>
$D_{NT}^A$	$17.996 \pm 1.160$
$D_{NT}^P$	$16.571 \pm 1.2016$
$R_{NT}^A$	$11.827 \pm 0.974$
$R_{NT}^P$	$10.412 \pm 1.035$
$D_{SI}^A$	$14.852 \pm 0.996$
$D_{SI}^P$	$13.436 \pm 0.915$
$R_{SI}^A$	$9.926 \pm 1.242$
$R_{SI}^P$	$8.459 \pm 0.839$
$H$	$4.165 \pm 1.652$
$t_l$	$1.350 \pm 0.363$
$t_a$	$0.994 \pm 0.198$

*Tabella 5.2: parametri geometrici di un campione parziale di 47 cornee esaminate in [113].*

Nella precedente tabella sono riportati i valori medi e la deviazione standard misurati alla pressione di 1.83 mmHg su un campione parziale di 47 cornee. I parametri sono riferiti alla seguente rappresentazione geometrica:



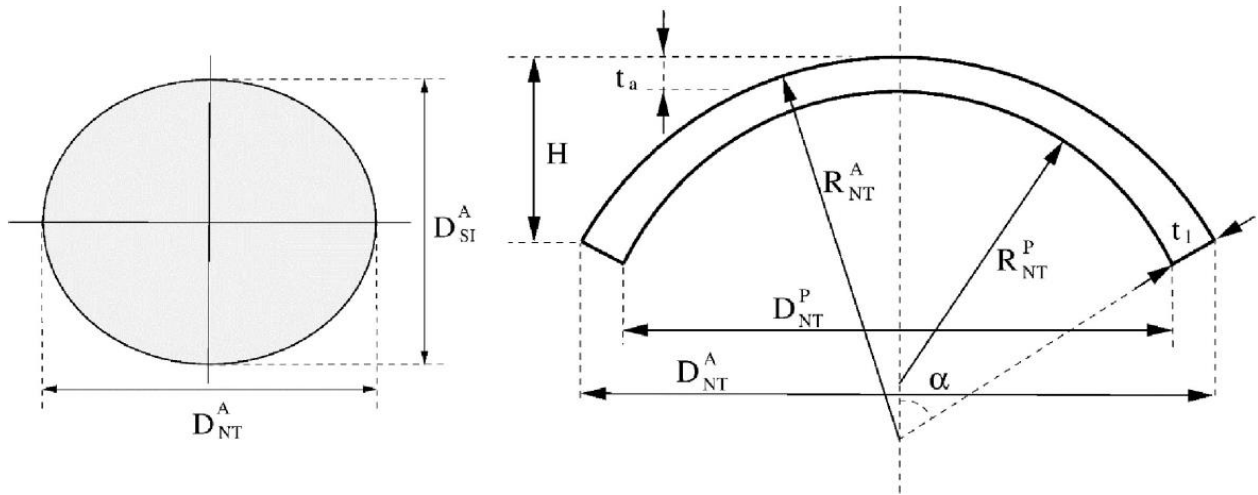


Figura 5.11: A sinistra, la vista planare della forma ellittica della cornea del maiale. A destra, la sezione corneale lungo la direzione NT [113].

In sintesi, durante i test di inflazione sono stati misurati gli spostamenti corneali per poi elaborarli mediante la teoria del guscio linearizzato al fine di ottenere una stima della risposta meccanica media della cornea. Queste misure di spostamento sono state eseguite dopo aver condotto la procedura di CXL sulle cornee campione, le quali sono state imbevute in una soluzione isotonica di riboflavina allo 0.1% priva di destrano più idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) per 10 min (2 gocce ogni 3 min). La riboflavina è stata poi attivata mediante irraggiamento UV-A eseguito con una lampada AVEDRO, capace di fornire un irraggiamento costante di  $9\text{mW/cm}^2$  a  $370\text{ nm}$  di lunghezza d'onda su un'area circolare di  $7.5\text{ mm}$  di diametro [113].

Per fornire una breve descrizione della teoria del guscio, si può affermare che essa si basa sull'ipotesi di una calotta perfettamente sferica, sottesa da un angolo pari a  $2\alpha$  (vedere Fig. 5.11), di spessore uniforme  $t$ , raggio medio della superficie  $R$ , raggio nel piano  $S=D/2$ , vincolata ai bordi con dei perni, che segue la legge di materiale isotropo elastico lineare (legge di Hooke) con modulo elastico  $E$ , coefficiente di Poisson  $\nu$ .

Le espressioni utili a costruire le curve stress-deformazione idealizzate per il materiale corneale prima del CXL sono:

$$\sigma_\varphi = \frac{N_\varphi}{t}, \sigma_\theta = \frac{N_\theta}{t} \quad (5.1)$$

$$\varepsilon_\varphi = \frac{N_\varphi - \nu N_\theta}{Et}, \varepsilon_\theta = \frac{N_\theta - \nu N_\varphi}{Et} \quad (5.2)$$

Con  $\sigma_\varphi$  si indicano gli stress lungo il meridiano; con  $\sigma_\theta$ , lo stress circonferenziale; con  $\varepsilon_\varphi$  ed  $\varepsilon_\theta$ , le deformazioni meridiane e circonferenziali, rispettivamente.

Mentre, per stimare il modulo elastico secante medio del tessuto alla IOP fisiologica ( $15\text{ mmHg}$ ) prima e dopo CXL viene usata la seguente equazione:

$$E = \frac{pR^2}{w \cdot 2 \cdot t} (1 - \nu) (1 - e^{-\lambda\psi} \cos\lambda\psi) \quad (5.3)$$

La costante  $\lambda$  e l'angolo  $\psi$  verranno analizzate nel dettaglio in seguito (paragrafo 5.4), assieme all'analisi matematica mirata alla definizione della relazione costitutiva.

Il protocollo appena citato è servito agli autori de "Experimental in-vitro investigation on Epi-Off-Crosslinking on porcine corneas" [113] ad ottenere gli spostamenti apicali, derivanti dai test di

inflazione, in funzione della pressione, per cornee naturali e per cornee reticolate, con differenti tempi di esposizione e dosi di irradianza. I loro risultati sono presentati in tabella:

Pressure [mmHg]	Apex displacement [mm]					
	Untreated	2.5 min 1.35 J/cm <sup>2</sup>	5.0 min 2.7 J/cm <sup>2</sup>	10 min 5.4 J/cm <sup>2</sup>	15 min 8.1 J/cm <sup>2</sup>	20 min 10.4 J/cm <sup>2</sup>
1,839	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
4,045	0.037 ± 0.025	0.019 ± 0.015	0.019 ± 0.011	0.018 ± 0.014	0.014 ± 0.010	0.014 ± 0.008
6,252	0.065 ± 0.035	0.032 ± 0.019	0.032 ± 0.013	0.030 ± 0.016	0.026 ± 0.015	0.021 ± 0.010
8,459	0.087 ± 0.043	0.044 ± 0.018	0.046 ± 0.014	0.047 ± 0.019	0.036 ± 0.017	0.031 ± 0.009
10,665	0.105 ± 0.049	0.061 ± 0.018	0.059 ± 0.015	0.058 ± 0.025	0.043 ± 0.016	0.038 ± 0.011
12,872	0.124 ± 0.055	0.074 ± 0.019	0.070 ± 0.014	0.069 ± 0.026	0.053 ± 0.016	0.042 ± 0.008
15,078	0.138 ± 0.061	0.082 ± 0.020	0.081 ± 0.016	0.083 ± 0.029	0.062 ± 0.021	0.052 ± 0.011
17,285	0.155 ± 0.066	0.092 ± 0.019	0.089 ± 0.016	0.093 ± 0.034	0.069 ± 0.020	0.059 ± 0.008
19,492	0.168 ± 0.071	0.102 ± 0.018	0.097 ± 0.016	0.104 ± 0.034	0.079 ± 0.023	0.068 ± 0.009
21,698	0.184 ± 0.077	0.109 ± 0.018	0.105 ± 0.019	0.113 ± 0.033	0.086 ± 0.022	0.074 ± 0.012
23,905	0.195 ± 0.082	0.120 ± 0.019	0.114 ± 0.020	0.120 ± 0.031	0.092 ± 0.023	0.082 ± 0.012
26,112	0.208 ± 0.087	0.130 ± 0.018	0.123 ± 0.024	0.127 ± 0.034	0.102 ± 0.026	0.088 ± 0.012
28,318	0.220 ± 0.092	0.137 ± 0.020	0.132 ± 0.029	0.136 ± 0.034	0.107 ± 0.025	0.096 ± 0.014
30,525	0.233 ± 0.097	0.146 ± 0.022	0.137 ± 0.028	0.145 ± 0.036	0.117 ± 0.029	0.104 ± 0.012

*Tabella 5.3: valori medi e deviazioni standard dei risultati dei test di gonfiaggio eseguiti su cornee non trattate e trattate sperimentalmente in vitro seguendo la procedura epi-off [113].*

Questa tabella sarà utile per effettuare una prima verifica del modello numerico analitico determinante il modulo elastico della porzione di cornea trattata dal Cross-Linking del collagene corneale.

### 5.3 Caratterizzazione geometrica e meccanica della cornea

La cornea si presenta come una lente menisco con una superficie anteriore convessa ed una posteriore concava e la si può considerare come un guscio di forma ellittica. Differendo da una sfera, è caratterizzata da diversi raggi sul piano e da diversi raggi di curvatura. Le due superfici corneali possono essere descritte relativamente bene da superfici biconiche, caratterizzate lungo il meridiano più piatto da una massima curvatura definita come  $R_{cx}^{ext}$  ed  $R_{cx}^{int}$ , rispettivamente, e lungo il meridiano più ripido da una curvatura massima definita come  $R_{cy}^{ext}$  ed  $R_{cy}^{int}$ , rispettivamente.

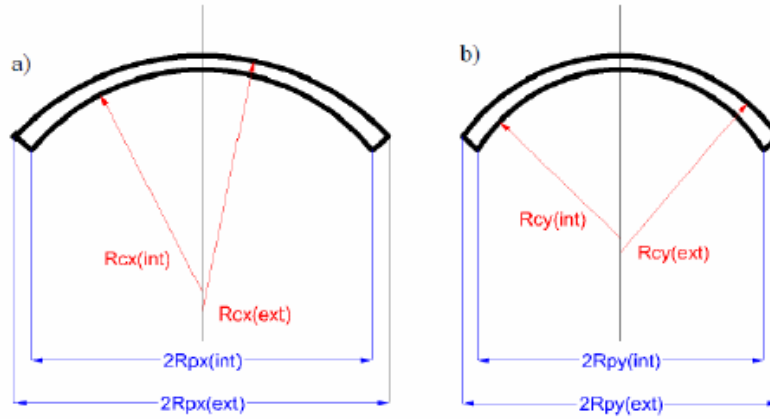


Figura 5.12: (a) sezione corneale lungo l'asse maggiore; (b) sezione corneale lungo l'asse minore.

L'intersezione della superficie biconica con un piano passante per il limbus identifica un'ellisse, i quali assi principali ed ortogonali sono definiti dalla proiezione sul piano del meridiano più piatto e più ripido. Nel piano dell'ellisse, la direzione del meridiano più piatto è identificata dall'angolo  $\theta_x$  prendendo come riferimento la direzione nasale-temporale NT. Per le cornee porcine, nella maggior parte dei casi,  $\theta_x$  è pari a zero. Il raggio esterno ed interno sul piano nella direzione del meridiano più piatto, vengono chiamati  $R_{px}^{ext}$  ed  $R_{px}^{int}$ , come viene mostrato nella figura sovrastante. Il meridiano più ripido è definito dall'angolo  $\theta_y$ , ed i corrispondenti raggi sul piano sono definiti come  $R_{py}^{ext}$  ed  $R_{py}^{int}$ . Il simbolo  $H$  (Fig. 5.13) definisce l'elevazione apicale rispetto al limbus. Il raggio sul piano riferito alla superficie interna corneale si può calcolare sottraendo lo spessore corneale a livello del limbus dal raggio sul piano riferito alla superficie esterna corneale:

$$R_p^{int} = R_p^{ext} - t_{limbus} \sin(\alpha),$$

dove  $\alpha=45$  deg è la pendenza assunta della cornea all'interfaccia con la sclera. Successivamente, le curvature interne vengono calcolate scrivendo l'equazione di una circonferenza interpolando tre punti fissi A, B e C (Fig. 5.13). Il sistema di riferimento è situato al centro della migliore approssimazione della circonferenza esterna. Le coordinate dei tre punti A, B e C sono:

$$A = \left[ 0, R_c^{ext} - t_{apex} \right]$$

$$B = \left[ R_p^{int}, R_c^{ext} - H - t_{limbus} \sin(\alpha) \right],$$

$$C = \left[ -R_p^{int}, R_c^{ext} - H - t_{limbus} \sin(\alpha) \right],$$

dove  $t_{apex}$  è lo spessore corneale [121].

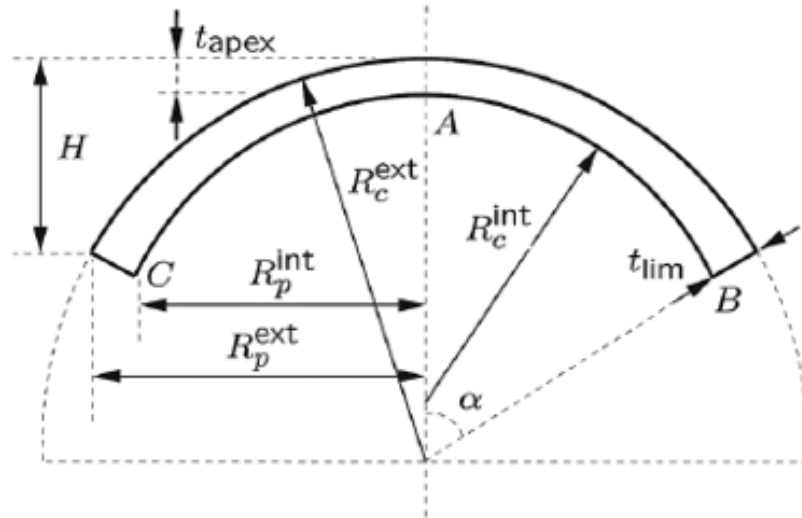


Figura 5.13: illustrazione lungo la direzione NT dei parametri geometrici usati per la descrizione della geometria delle superfici e posizione dei 3 punti base A, B e C per la costruzione della circonferenza interpolante.

Per quanto concerne la valutazione matematica del comportamento meccanico, si può approssimare la cornea ad una struttura sferica omogenea a spessore costante e ci si basa sulla teoria dei gusci [122]. Il modello matematico derivante da questa teoria serve per ottenere la relazione costitutiva del materiale, ovvero del tessuto corneale.

In generale, le equazioni costitutive rappresentano la relazione tra gli sforzi applicati e le deformazioni risultanti del materiale. Una delle più comunemente utilizzate, per la cornea, è il modello di Hooke, che considera la cornea come un materiale elastico lineare ed isotropo. Ciò significa che la risposta meccanica corneale è proporzionale agli sforzi applicati ed indipendente dalla direzione di applicazione. È di fondamentale importanza considerare che il modello di Hooke rappresenta solo un'approssimazione semplificata del comportamento della cornea, non tenendo conto della non-linearità e dell'anisotropia discusse al paragrafo precedente.

L'analisi basata sulla teoria dei gusci inizia considerando un generico elemento sferico delimitato da due meridiani e due paralleli, mostrati in figura:

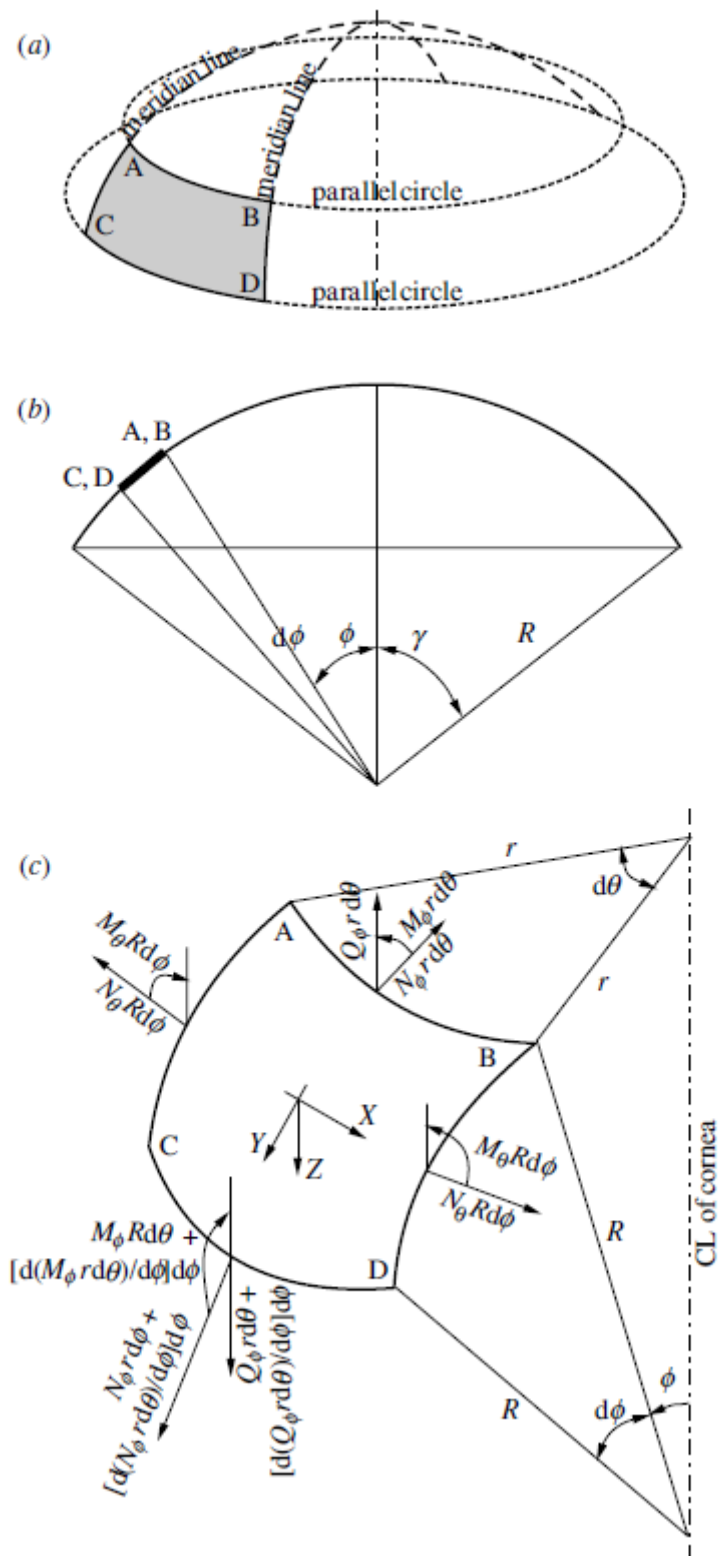


Figura 5.14: (a) elemento ABCD delimitato da due meridiani e due paralleli; (b) sezione lungo un meridiano; (c) sforzi agenti sull'elemento ABCD

L'elemento è caratterizzato sia da una rigidezza assiale che flessionale e viene analizzato sotto il carico di una IOP uniforme,  $p$ , agente con segno negativo lungo la direzione locale  $Z$  [123].

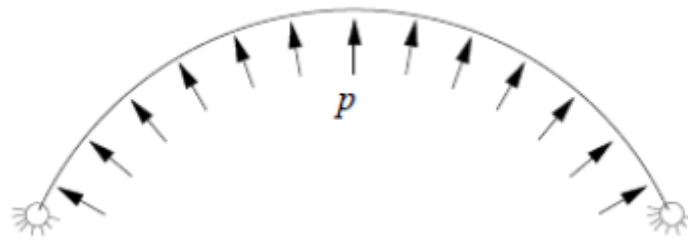


Figura 5.15: guscio sferico vincolato ai bordi sottoposto a una pressione uniforme.

Si effettua l'analisi all'equilibrio nelle tre direzioni X, Y, Z.

Le forze di equilibrio lungo Y (direzione del meridiano) si esplicano come:

$$\frac{d(N_{\varphi} r d\theta)}{d\varphi} d\varphi - N_{\theta} R d\varphi d\theta \cos(\varphi) - Q_{\varphi} r d\theta d\varphi = 0 \quad (5.4)$$

Oppure come:

$$\frac{d(N_{\varphi} r)}{d\varphi} - N_{\theta} R \cos(\varphi) - Q_{\varphi} r = 0, \quad (5.5)$$

dove  $r = R \sin \varphi$  ed  $R$  è il raggio della superficie corneale media (Fig. 5.16).

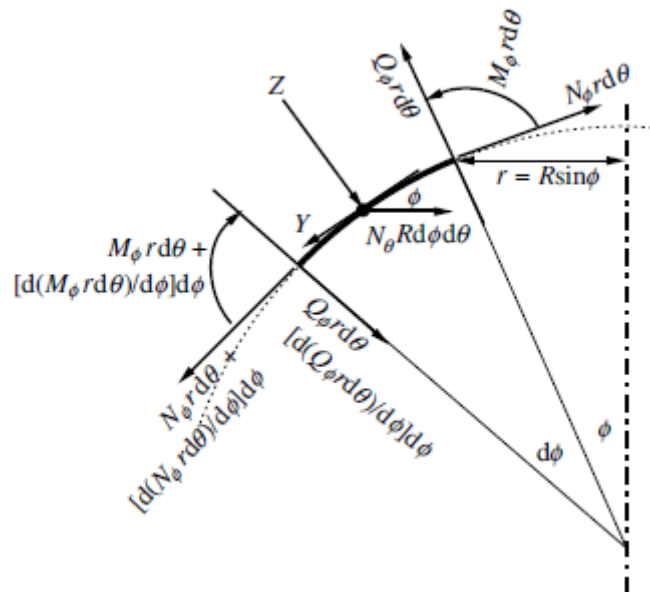


Figura 5.16: sforzi agenti lungo la direzione del meridiano.

Le forze di equilibrio in direzione Z risultano essere:

$$\frac{d(Q_{\varphi} r d\theta)}{d\varphi} d\varphi + N_{\theta} R d\varphi d\theta \sin(\varphi) + N_{\varphi} r d\theta d\varphi - p R d\varphi r d\theta = 0 \quad (5.6)$$

Oppure

$$\frac{d(Q_{\varphi} r)}{d\varphi} + N_{\theta} R \sin(\varphi) + N_{\varphi} r - p R r = 0 \quad (5.7)$$

Infine, l'equilibrio dei momenti lungo l'asse X risulta essere:

$$\frac{d(M_{\varphi} r d\theta)}{d\varphi} d\varphi - Q_{\varphi} r d\theta (R d\varphi) - M_{\theta} (R d\varphi) d\theta \cos(\varphi) = 0, \quad (5.8)$$

Che si può scrivere anche:

$$\frac{d(M_\varphi r)}{d\varphi} - Q_\varphi rR - M_\theta R \cos(\varphi) = 0 \quad (5.9)$$

Dato che le precedenti equazioni non sono in numero sufficiente per determinare i valori delle cinque incognite  $N_\theta, N_\varphi, Q_\varphi, M_\theta$  e  $M_\varphi$ , si considera lo stato deformato dell'elemento ABCD, mostrato in figura, in modo da avere a disposizione un numero maggiore di equazioni.

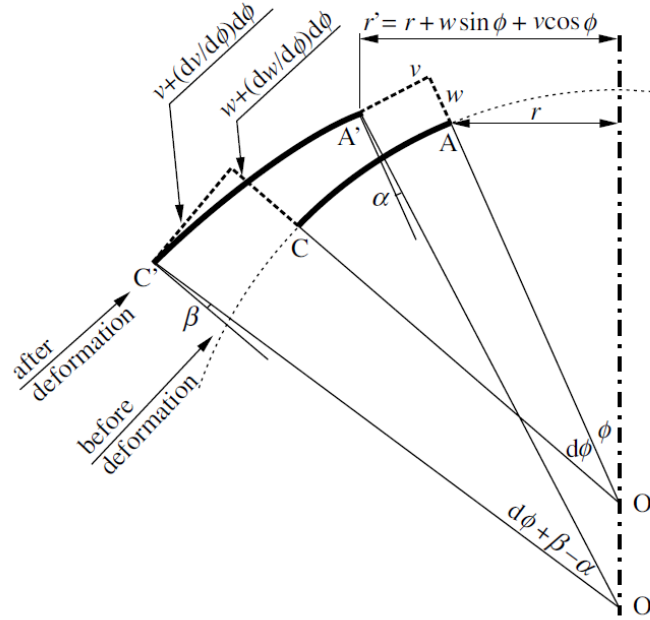


Figura 5.17: spostamenti e rotazioni nel piano Y-Z.

Considerando ancora  $r = R \sin \varphi$  ed indicando con  $\varepsilon$  la deformazione, lo studio della precedente illustrazione (Fig. 5.17) rivela che:

$$\varepsilon_\varphi = \frac{A'C' - AC}{AC} = \frac{\left(\frac{dv}{d\varphi}\right)d\varphi + (R+w)d\varphi - R d\varphi}{R d\varphi} = \frac{dv}{R d\varphi} + \frac{w}{R}, \quad (5.10)$$

$$\varepsilon_\theta = \frac{2\pi r' - 2\pi r}{2\pi r} = \frac{2\pi(r + w \sin(\varphi) + v \cos(\varphi)) - 2\pi r}{2\pi r} = \frac{w \sin(\varphi) + v \cos(\varphi)}{r} = \frac{w + v \cot(\varphi)}{R} \quad (5.11)$$

dove  $v$  e  $w$  coincidono rispettivamente con lo spostamento lungo l'asse Y e lungo Z. Con la rotazione dell'elemento, il punto centrale O si muoverà verso O' risultando in un cambiamento dell'angolo centrale da  $d\varphi$  a  $d\varphi + \beta - \alpha$ . Perciò, mentre la lunghezza AC risulta pari a  $R d\varphi$ , la lunghezza dell'arco deformato A'C' sarà  $R'(d\varphi + \beta - \alpha)$ . La variazione di curvatura nella direzione meridiano può essere calcolata come:

$$\chi_\varphi = \frac{1}{R'} - \frac{1}{R} = \frac{(d\varphi + \beta - \alpha)}{A'C'} - \frac{d\varphi}{AC} \quad (5.12)$$

Sostituendo il valore di AC e A'C' dall'equazione (5.10), è possibile ottenere il valore  $\chi_\varphi$  come:

$$\chi_\varphi \cong \frac{-1}{R^2} \left( w + \frac{dv}{d\varphi} \right) \quad (5.13)$$

Allo stesso modo, considerando la deformazione nella direzione parallela, la corrispondente variazione di curvatura è:



$$\chi_{\theta} \cong \frac{\cot(\varphi)}{R^2} \left( v + \frac{dw}{d\varphi} \right) \quad (5.14)$$

Le deformazioni meridiane e parallele,  $\varepsilon_{\varphi}$  ed  $\varepsilon_{\theta}$ , possono essere messe in relazione a  $N_{\varphi}$  ed  $N_{\theta}$  in accordo alla legge di Hooke:

$$\varepsilon_{\varphi} = \frac{1}{Et} (N_{\varphi} - \nu N_{\theta}) \quad (5.15)$$

$$\varepsilon_{\theta} = \frac{1}{Et} (N_{\theta} - \nu N_{\varphi}) \quad (5.16)$$

in cui  $E$  è il modulo di elasticità del materiale,  $\nu$  il modulo di Poisson e  $t$  è lo spessore medio della cornea, il quale risulta essere la media tra lo spessore all'apice CCT e al limbus (PCT).

Dunque, le reazioni vincolari sono:

$$N_{\varphi} = \frac{Et}{(1-\nu^2)} (\varepsilon_{\varphi} + \nu \varepsilon_{\theta}) \quad (5.17)$$

$$N_{\theta} = \frac{Et}{(1-\nu^2)} (\varepsilon_{\theta} + \nu \varepsilon_{\varphi}) \quad (5.18)$$

Inoltre, i momenti  $M_{\varphi}$  ed  $M_{\theta}$  possono essere correlati alle variazioni di curvatura nella forma seguente:

$$M_{\varphi} = -D(\chi_{\varphi} + \nu \chi_{\theta}) \quad e \quad M_{\theta} = -D(\chi_{\theta} + \nu \chi_{\varphi}) \quad (5.19)$$

$D$  rappresenta la rigidità flessionale per unità di larghezza della superficie corneale ed è pari a:

$$\frac{Et^3}{12(1-\nu^2)} \quad (5.20)$$

I valori di  $\varepsilon_{\varphi}$ ,  $\varepsilon_{\theta}$ ,  $\chi_{\varphi}$  e  $\chi_{\theta}$  in funzione di  $v$  e  $w$ , come date nelle equazioni (5.10-5.14), possono essere sostituite nell'equazioni (5.17-5.19) al fine di ottenere quattro nuove equazioni che, insieme alla (5.5), (5.7) e (5.9), danno sette equazioni in sette incognite  $N_{\theta}$ ,  $N_{\varphi}$ ,  $Q_{\varphi}$ ,  $M_{\theta}$ ,  $M_{\varphi}$ ,  $v$  e  $w$ .

Risolvendo queste equazioni applicando le condizioni al contorno del caso sperimentale, in cui il bordo del provino è fissato mediante l'afferraggio, e dunque dove a  $\varphi = \gamma$ , sia  $M_{\varphi}$  che lo spostamento orizzontale sono uguali a zero, le reazioni vincolari e i momenti sono pari a:

$$N_{\varphi} = \frac{pR}{2} \quad (5.21)$$

$$N_{\theta} = \frac{pR}{2} - \frac{pR}{2} (1-\nu) e^{\beta\eta} (\cos(\beta\eta)) \quad (5.22)$$

$$M_{\varphi} = \frac{pR^2}{4\beta^2} (1-\nu) e^{\beta\eta} (\sin(\beta\eta)) \quad (5.23)$$

$$M_{\theta} = \nu M_{\varphi} \quad (5.24)$$

Perciò, lo spostamento all'apice  $w_a$  (uguale a  $w$  per  $\varphi = 0$ ) si esprime come:

$$w_a = \frac{pR^2}{2Et} (1-\nu) - \frac{\nu R}{Et} \frac{pR}{2} (1-\nu) e^{-\beta\gamma} \cos(\beta\gamma) \quad (5.25)$$

Dove  $\beta = \left( \frac{R}{t} \right)^2 [3(1-\nu^2)]^{\frac{1}{4}}$  e  $\eta = \varphi - \gamma$ .

Le equazioni (5.21-5.25) possono essere semplificate nel caso in cui la rigidità flessionale della cornea può essere ignorata e la cornea possa essere considerata come una membrana. In questo caso,

$$N_{\theta} = N_{\varphi} = \frac{pR}{2} \quad (5.26)$$

$$M_{\theta} = M_{\varphi} = 0 \quad (5.27)$$

e

$$w_a = \frac{pR^2}{2Et}(1-\nu) \quad (5.28)$$

Grazie all'espressione dello spostamento apicale (5.25) è possibile calcolare il modulo di Young del tessuto corneale in funzione della pressione applicata col battente idraulico.

Al punto di gonfiaggio, l'altezza corneale ( $H_0$ ) e il diametro dell'interfaccia corneo-sclerale ( $D$ ), vedi (Fig. 5.18), possono essere misurati sperimentalmente e il raggio iniziale di curvatura esterno si può determinare come:

$$R_0^2 = \left(\frac{D}{2}\right)^2 + (R_0 - H_0)^2$$

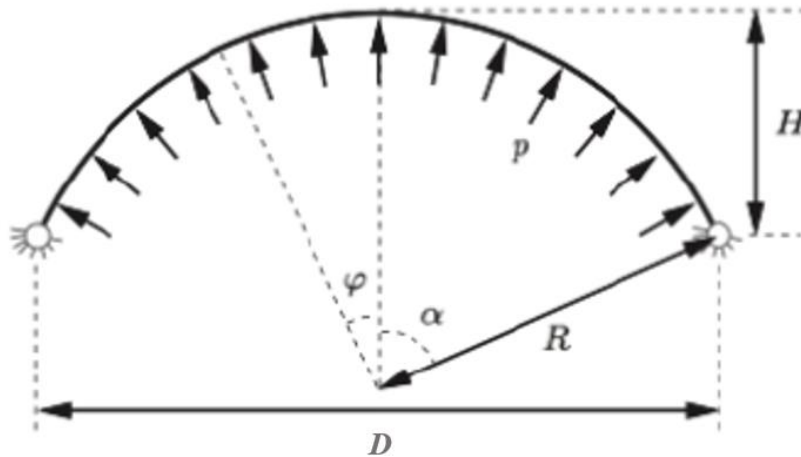


Figura 5.18: rappresentazione dell'altezza,  $H$ , del guscio sferico bloccato ai bordi, del raggio di curvatura esterno  $R$  e del diametro  $D$ .  $\alpha$  è l'angolo corrente e  $\varphi$  l'angolo di azimut, il quale definisce la posizione di un meridiano a partire da un meridiano origine arbitrario

Dopo la prima applicazione di carico pressorio,  $p_1$ , l'altezza corneale aumenterà dello spostamento apicale misurato sperimentalmente,

$$H_1 = H_0 + w_{a1} \quad (5.29)$$

e il raggio corrispondente risulterà pari a:

$$R_1 = \left[ \left(\frac{D}{2}\right)^2 + (R_1 - H_1)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5.30)$$

Assumendo che il volume del tessuto corneale non vari conseguentemente all'applicazione del carico, si può scrivere:

$$2\pi R_0 H_0 t_0 = 2\pi R_1 H_1 t_1 \quad (5.31)$$

Perciò, il nuovo spessore medio risulta:

$$t_1 = \frac{R_0 H_0 t_0}{R_1 H_1} \quad (5.32)$$

E l'angolo  $\gamma$  diventa:

$$\gamma_1 = \sin^{-1} \left( \frac{D}{2R_1} \right) \quad (5.33)$$

Sostituendo i valori di  $R_1$ ,  $p_1$ ,  $t_1$  e  $\gamma_1$  nella (5.25) si ottiene il valore del modulo elastico corrente,  $E_1$ . La deformazione corrispondente,  $\varepsilon_1$ , può essere determinata usando l'equazione (5.15) dopo aver ricavato i valori di  $N_\varphi$  ed  $N_\theta$  dalla (5.21) e (5.22). Lo sforzo corrispondente sarà ricavato come

$$\sigma_1 = \varepsilon_1 E_1 \quad (5.34)$$

Questo processo viene ripetuto per ogni incremento di pressione ed i valori di spostamento apicale in funzione della pressione vengono utilizzati per ottenere il relativo valore di sforzo e deformazione [124].

## 5.4 Derivazione matematica del modulo elastico della porzione trattata dal CXL

L'obiettivo del trattamento di crosslinking corneale è quello di aumentare la rigidità dello stroma per contenere la progressione del cheratocono. Nell'ottica delle simulazioni numeriche si introduce un semplice modello meccanico che assume un modulo elastico costante a tratti attraverso lo spessore corneale, col fine ultimo di poter stimare l'effettivo incremento della rigidità del materiale nello stroma anteriore e la profondità effettiva dell'incremento di rigidità. Recentemente è stata stimata la rigidità equivalente della cornea porcina prima e dopo CXL in termini di modulo elastico secante dello stroma a diversi livelli di IOP [125].

In questo studio condotto da A. Comaggia et al. [125], per calcolare il modulo elastico equivalente secante medio ( $E$ ) è stata utilizzata la relazione (5.3) e i valori ricavati sperimentalmente di spostamento apicale corneale ( $w$ ) alla IOP fisiologica pari a 15 mmHg.

Riproponendo la (5.3):

$$E = \frac{pR^2}{w \cdot 2 \cdot t} (1 - \nu) (1 - e^{-\lambda\psi} \cos\lambda\psi)$$

si ricorda che  $R$  è il raggio di curvatura nasale-temporale,  $t$  è lo spessore corneale all'apice,  $\nu$  (pari a 0.5) è il coefficiente di Poisson dello stroma e la costante  $\lambda$  e l'angolo  $\psi$ , relativi all'angolo di elevazione  $\varphi$  di un sistema di riferimento in coordinate sferiche e al raggio corneale nel piano, sono definiti come:

$$\lambda = \left(\frac{R}{t}\right)^{\frac{1}{2}} [3(1 - \nu^2)]^{\frac{1}{4}}, \quad \psi = \sin^{-1}\left(\frac{S}{R}\right), \quad (5.35)$$

dove  $S$  è pari alla metà di  $D$  in riferimento alla Fig. (5.18).

La (5.3) esiste solo per un materiale elastico lineare, isotropo ed omogeneo e per una calotta completamente sferica di spessore uniforme  $t$ , raggio medio della superficie  $R$  e raggio nel piano  $S$ . Tuttavia, questi presupposti della teoria del guscio linearizzata non corrispondono al campione reale di cornea in esame. Pertanto, la significatività del modulo elastico risultante è molto limitata e deve essere considerata solo da un punto di vista qualitativo come indicatore della rigidità corneale globale. È ormai noto, grazie a indagini cliniche e di laboratorio [126], che il CXL rinforza la porzione anteriore della cornea, mentre quella posteriore rimane inalterata. La meccanica strutturale permette di ottenere una stima della profondità del trattamento applicando la teoria linearizzata delle travi ed assumendo che il materiale sia isotropo elastico lineare con  $t$  che costituisce la profondità della sezione trasversale all'apice.

Per descrivere la cornea dopo il cross-linking si considera un modello di trave a due strati, caratterizzato da due valori differenti di moduli elastici ( $E_b$ : modulo elastico posteriore,  $E_c = cE_b$ : modulo elastico anteriore). Il modulo anteriore si estende sino ad una profondità di  $(1-d)t$ . La teoria

della trave fornisce un sistema di due equazioni per le due costanti, considerando i range  $c > 1$  e  $0 < d < 1$ .

Denotando il modulo elastico medio ed uniforme pre-CXL descritto nella (5.3) come  $E_a$ , sotto l'ipotesi di piccole deformazioni ed elasticità lineare, si può stimare l'ampiezza del modulo elastico rinforzato  $E_c$  e la profondità effettiva  $t_c = (1 - d)t$ . Si considera una porzione di cornea di spessore  $t$  in prossimità dell'apice. Per un materiale elastico lineare, la relazione costitutiva uniassiale risulta

$$\sigma(z) = E(z)\varepsilon(z) \quad (5.36)$$

Nel caso di estensione uniforme  $\bar{\varepsilon}$ , la compatibilità richiede

$$\varepsilon(z) = \bar{\varepsilon} \quad (5.37)$$

Nel caso di flessione pura caratterizzata da curvatura  $\bar{\chi}$

$$\varepsilon = \bar{\chi}(z - z_c) \quad (5.38)$$

Dove  $z$  è l'ascissa dello spessore trasversale misurata dalla superficie posteriore e  $z_c$  si riferisce al baricentro meccanico (non geometrico) della cornea, dato da

$$z_c = \frac{2(1 - d^2) + d^2}{2[c(1 - d) + d]}t \quad (5.39)$$

Nonostante in condizioni normali, a causa della distribuzione delle fibrille di collagene, il modulo elastico prima del trattamento di CXL risulta maggiore nella regione anteriore della cornea piuttosto che in quella posteriore, il modulo elastico dello stroma è assunto costante attraverso lo spessore in modo da non dover incorrere a calcoli complessi. Per questo motivo, la distribuzione degli sforzi attraverso lo spessore è continua e segue la distribuzione delle deformazioni, come si può osservare nella seguente figura:

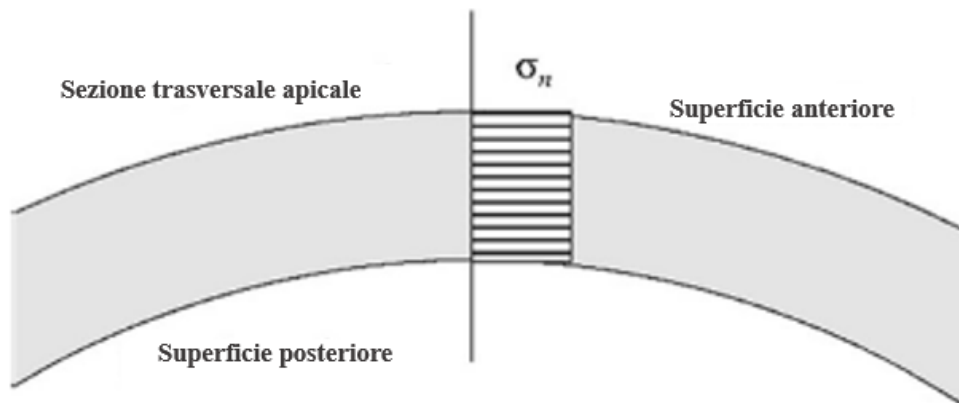


Figura 5.19: sezione trasversale della cornea prima del trattamento, assunta con modulo elastico lineare, deformazione uniforme e distribuzione degli stress dovuti alla forza normale. Le forze di flessione sono considerate trascurabili.

A titolo semplificativo, si presume che il CXL aumenti uniformemente il modulo elastico dello stroma al valore  $E_c = cE_b$ , con  $c > 1$ , sino alla profondità  $t_c$ ; conseguentemente,  $dt$  è lo spessore dello stroma non trattato:

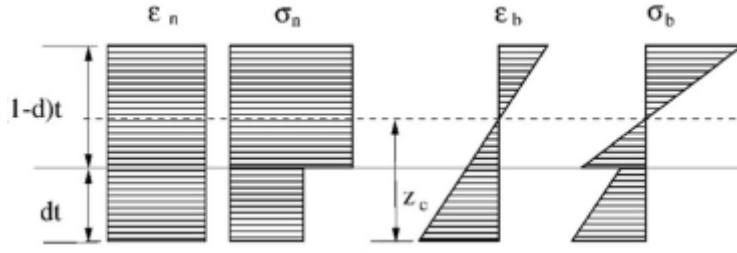


Figura 5.20: distribuzioni idealizzate delle sollecitazioni e deformazioni normali attraverso la sezione apicale della cornea dovuti alla forza normale ( $\epsilon_n, \sigma_n$ ) e al momento flettente ( $\epsilon_b, \sigma_b$ ) post CXL.

La disomogeneità della rigidità post-CXL attraverso lo spessore porta alla modifica della distribuzione delle tensioni, che diventa a tratti lineare.

L'equilibrio lineare del momento impone

$$\int_0^t E(z) \bar{\epsilon} dz = [E_c (1-d) + E_b d] t \bar{\epsilon} = E_a t \bar{\epsilon} \quad (5.40)$$

Che da

$$E_a = E_b [c(1-d) + d] \quad (5.41)$$

L'equilibrio del momento angolare impone

$$\int_0^t E(z) \bar{\chi} (z - z_c) dz = \frac{d^4 - 2cd(d^3 - 2d^2 + 3d - 2) + c^2(1-d)^4}{c(1-d) + d} \bar{\chi} E_b \frac{t^3}{12} = \bar{\chi} E_a \frac{t^3}{12} \quad (5.42)$$

Il quale, considerando la (5.41) da

$$E_b^2 [d^4 - 2cd(d^3 - 2d^2 + 3d - 2) + c^2(1-d)^4] = E_a^2 \quad (5.43)$$

Le equazioni (5.41) ed (5.43) ammettono soluzione in forma chiusa:

$$c = \frac{\eta(1+\eta)}{3-\eta}, \quad d = \frac{2\eta}{3+\eta}, \quad 3 > \eta = \frac{E_a}{E_b} > 1 \quad (5.44)$$

con il vincolo che il valore di  $\eta$  stia nel range tra 1 e 3.

La soluzione esplicitata nella (5.44) si ottiene senza tener conto della curvatura della cornea. Una distribuzione non uniforme delle sollecitazioni lungo la sezione origina un momento flettente che si associa ad una curvatura geometrica della cornea. Nel caso in cui aumenti il modulo elastico sugli strati anteriori, il momento flettente risultante estenderà le fibre anteriori della cornea aumentando la curvatura geometrica. In caso contrario, in cui il modulo elastico risulta essere incrementato negli strati posteriori, il momento flettente risultante porta ad una riduzione dello spostamento corneale in avanti. Considerando quest'ultima osservazione, per controbilanciare l'aumentata compliance della cornea dovuta alle effettive curvature della cornea, il coefficiente  $c$  deve essere aumentato (quasi raddoppiato) rispetto alla stima della (5.44).

In conclusione, il modulo elastico equivalente  $E_a$  è la media ponderata di  $E_c$  ed  $E_b$  rispetto ai due spessori  $(1-d)t$  e  $dt$ .

L'analisi analitica appena trattata, finalizzata alla determinazione del modulo elastico della porzione di cornea sottoposta all'irraggiamento, nasce dall'osservazione della linea di demarcazione (DL: demarcation line), la quale delimita il confine tra lo stroma corneale reticolato e non reticolato. Nello svolgimento di questo lavoro di tesi è stato possibile osservare gli effetti post-operatori del CXL di vari pazienti operati presso l'azienda ospedaliera di Alessandria. Un esempio di DL acquisita tramite OCT (tomografia ottica computerizzata) è riportato qui sotto:

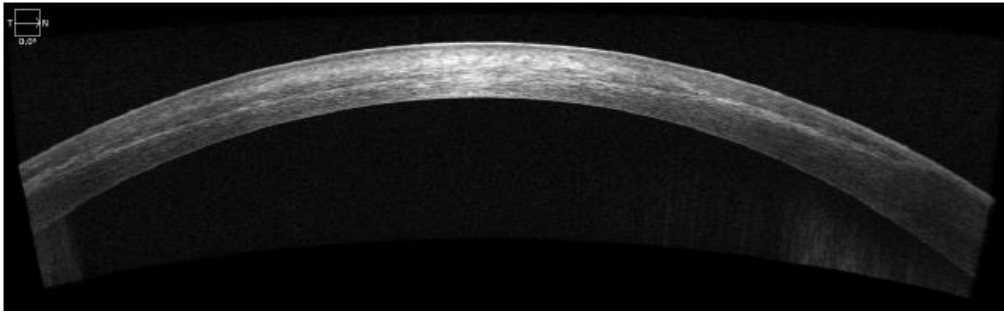


Figura 5.21: Demarcation Line dell'occhio destro di una paziente di 24 anni a soli 21 giorni dall'intervento di CXL eseguito secondo la procedura epi-off.

Dunque, tutti i calcoli riportati in questo paragrafo si basano sul fatto che, a seguito del CXL, solo la parte anteriore dello spessore corneale è interessata alla formazione di legami tra le fibrille di collagene e questi stessi legami, con l'avanzare della reazione di CXL fungeranno da schermo per la penetrazione dei raggi UV-A. Quest'azione schermante fa sì che la rigidità del tessuto corneale lungo tutto lo spessore non incrementi in maniera uniforme, ma che l'aumento sia via via minore con la profondità. Per rendere la derivazione del modello analitico di più facile lettura si può indicare con  $t_1$  lo spessore della cornea anteriore ed è quello che costituisce la profondità efficace del trattamento; con  $t_2$ , invece, pari a  $t-t_1$ , si indica lo spessore della cornea posteriore. Naturalmente, con  $t$  s'intende sempre lo spessore della cornea e con  $E$  il modulo elastico pre-CXL uniforme lungo tutto  $t$ . Successivamente al trattamento, nella parte posteriore della cornea il modulo elastico sarà pari ad  $E$ , mentre nella zona anteriore aumenta al valore  $E_1$ . Una stima di  $E_1$  e  $t_1$  la si ottiene tramite le equazioni di equilibrio alla traslazione ed alla rotazione della porzione considerata. Riprendendo la distribuzione delle sollecitazioni e delle deformazioni di Fig. (5.22), ora si avrà:

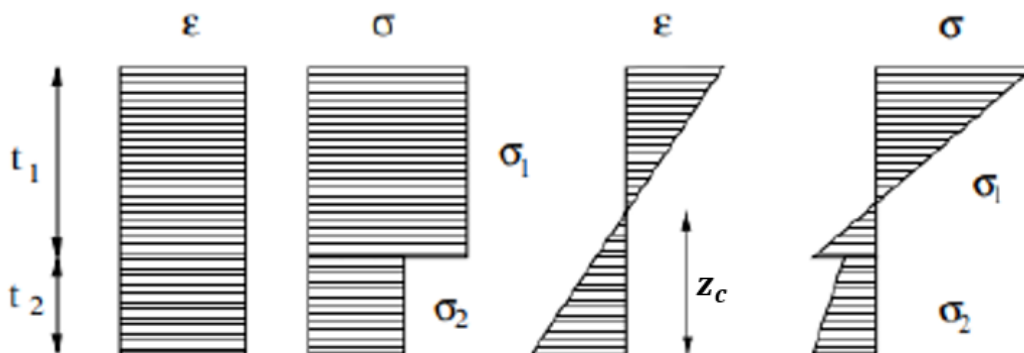


Figura 5.22: casi di deformazione semplice e corrispondente distribuzione non uniforme degli sforzi per uno spessore corneale non omogeneo [58].

Tenendo conto che il pedice 1 fa riferimento alla cornea trattata e il pedice 2 alla cornea non trattata, per un materiale elastico lineare vale sempre la relazione di Hooke:

$$\sigma_1 = E_1 \varepsilon_1, \quad \sigma_2 = E_2 \varepsilon_2 = E \varepsilon_2 \quad (5.45)$$

Nel caso di trazione pura

$$\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = \varepsilon \quad (5.46)$$

L'equilibrio globale attorno allo spessore considerato sarà pari a:

$$N_\varepsilon = \sigma_1 t_1 + \sigma_2 (t - t_1) \quad (5.47)$$

Il momento flettente che la reazione  $N_\varepsilon$  genera è:



$$M_{\varepsilon} = \sigma_1 t_1 \left( t - \frac{t_1}{2} \right) + \sigma_2 \frac{(t-t_1)^2}{2} \quad (5.48)$$

E, indicando il modulo elastico equivalente come  $E_{eq}$ ,

$$N_{\varepsilon} = E_{eq} t \varepsilon \quad (5.49)$$

Di conseguenza,

$$E_{eq} = \frac{E_1 t_1 + E(t-t_1)}{t} \quad (5.50)$$

## CAPITOLO 6: Modello fenomenologico per analisi dati

L'obiettivo di questa tesi di laurea magistrale è lo studio della risposta elastica di cornee affette da cheratocono a seguito del trattamento di cross-linking. Tramite la teoria dei gusci elastici riportata nel capitolo 5, è stato possibile calcolare numericamente la rigidità delle cornee prima e dopo il trattamento parachirurgico di CXL, in termini di modulo elastico di Young. Questa teoria rende possibile l'analisi meccanica strutturale della cornea considerando le seguenti ipotesi geometriche e di proprietà biomeccaniche del tessuto in esame:

- Cornea come calotta perfettamente sferica
- Spessore corneale uniforme dalla zona centrale alla periferia
- Materiale elastico ed isotropo, che obbedisce alla legge di Hooke

La teoria dei gusci elastici viene esplicitata nelle relazioni matematiche che vanno dalla (5.4) alla (5.34), in cui viene eseguita l'analisi di equilibrio delle forze agenti lungo le direzioni X, Y e Z di un generico elemento sferico corneale delimitato da due meridiani e due paralleli, sotto il carico di una IOP uniforme. L'analisi, dalla relazione (5.10), considera lo stato deformato dello stesso elemento, al fine di ricavare la relazione costitutiva del tessuto corneale che si basa sulla defezione della legge di Hooke:

$$E = \frac{pR^2}{w \cdot 2 \cdot t} (1 - \nu) (1 - e^{-\lambda \psi} \cos \lambda \psi)$$

La relazione appena riportata, contrassegnata nell'elaborato come (5.3), ha permesso di evidenziare quantitativamente l'irrigidimento corneale di cornee cheratoconiche di un campione di pazienti in cura presso il Dipartimento di Oculistica dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.

Ciò è risultato possibile, in quanto la (5.3) si basa principalmente sulla geometria della cornea. I dati geometrici sono stati acquisiti direttamente dalle mappe topografiche dei pazienti di Alessandria risultanti dall'esame di topografia corneale, svolto sia precedentemente che successivamente al Cross-Linking del collagene corneale. Il calcolo numerico basato sul modello meccanico derivato dalla teoria dei gusci elastici è stato sviluppato tramite codice su software Matlab, il cui listato viene presentato in appendice.

L'utilizzo del modello analitico da cui emerge la (5.3), oltre a essere soggetto alle ipotesi geometriche e di proprietà del materiale corneale in esame, è caratterizzato da ulteriori assunzioni, principalmente di natura clinica.

Innanzitutto, è di fondamentale importanza sottolineare che il carico di pressione intraoculare di ogni paziente è stato assunto costante prima e dopo il trattamento parachirurgico di cross-linking. Nelle cartelle cliniche dei pazienti presi in analisi in questo lavoro di tesi non era presente la misura del tono oculare subito dopo l'effettuazione della terapia, in quanto questa misurazione provoca una sensazione poco tollerabile per il paziente, il quale potrebbe sentire anche forte dolore durante l'applicazione del tonometro poiché, specialmente nei primi 3 giorni dopo l'intervento, si possono manifestare senso di bruciore e di corpo estraneo nell'occhio trattato, in particolare in caso di procedura *Epi-off*, che include la rimozione dell'epitelio. Tuttavia, nel calcolo si è deciso di accettare l'ipotesi di IOP costante poiché dalla ricerca bibliografica sono emersi dei lavori mirati all'analisi del tono oculare dopo CXL, tra cui lo studio di un approccio teorico biofisico per gli effetti del cross-

linking sulla pressione di occhi affetti da cheratocono trattati sia mediante la tecnica *Epi-Off* che *Epi-On* [127]. I risultati del lavoro appena citato sono i seguenti:

Patient n.	15 min before cross-linking surgery	15 min after cross-linking surgery	The morning of the day after cross linking	The afternoon of the day after cross-linking
1	12	14	14	12
2	13	16	14	12
3	12	19	16	12
4	14	15	16	12
5	15	18	16	16
6	8	16	14	14
7	13	14	11	10
8	13	16	17	13
9	11	14	19	13
10	8	12	10	11
11	12	16	14	12
12	14	16	12	12
13	12	16	12	12

Figura 6.1: IOP in mmHg delle 13 cornee affette da cheratocono pre e post CXL analizzate in [127].

Da questa tabella si può notare come la IOP sia diversa per ogni paziente e come dopo soltanto 15 min dalla terapia di cross-linking aumenti in tutti i casi. Allo stesso modo, i dati suggeriscono che dopo un solo giorno dal trattamento, l'occhio di tutti i 13 pazienti oggetto di questo studio tende a ripresentare la IOP che aveva prima dell'intervento, la quale risulta fisiologica (10-21 mmHg) per tutti, esclusi il paziente 6 e il paziente 10. Questi ultimi probabilmente presentavano delle cornee sottili e ciò potrebbe aver implicato una sottostima della pressione intraoculare come spiegato nel paragrafo 1.2 del capitolo 1. Perciò, sono i dati geometrici quelli che caratterizzano maggiormente il cheratocono.

## 6.1 Analisi dati e risultati

Sono stati acquisiti i dati di topografia corneale di 10 cornee di pazienti in cura presso il Dipartimento di Oculistica dell'ospedale di Alessandria. Il campionamento soffre di alcune limitazioni cliniche dettate dalla disponibilità dei dati presenti in archivio, non risultando omogeneo. I dati di pressione intraoculare differiscono da paziente a paziente, la stadiazione della patologia ectasica non risulta la stessa per ognuna delle 10 cornee esaminate, inoltre sono stati utilizzati dati di cornee affette da cheratocono e trattate con la terapia di cross-linking sia in caso di KC presente nell'occhio destro che nell'occhio sinistro. Sono stati considerati i dati oculari di pazienti sia di sesso maschile che femminile (6 maschi e 4 femmine) di età differente, bensì compresa tra i 19 e 29 anni. Tuttavia, il risultato del calcolo è positivo in quanto dimostra che, nonostante il campione sia disomogeneo includendo diverse casistiche di cheratocono, tutte le cornee presentano un aumento della rigidità a livello stromale a seguito delle sollecitazioni termiche indotte dal cross-linking del collagene corneale, effettuato sia mediante procedura standard *Epi-Off* che tramite iontoforesi *i-Epi-On*.

Il codice Matlab è stato costruito partendo dai dati geometrici di ognuna delle 10 cornee. Per prima cosa si è calcolato il raggio di curvatura del meridiano nasale-temporale di ogni cornea, indicato con il simbolo **rf** in Fig. (6.2) nel pannello "Asfericità Corneale". Lo si è calcolato come media tra il valore del raggio di curvatura NT della superficie anteriore e quello della superficie posteriore della cornea.

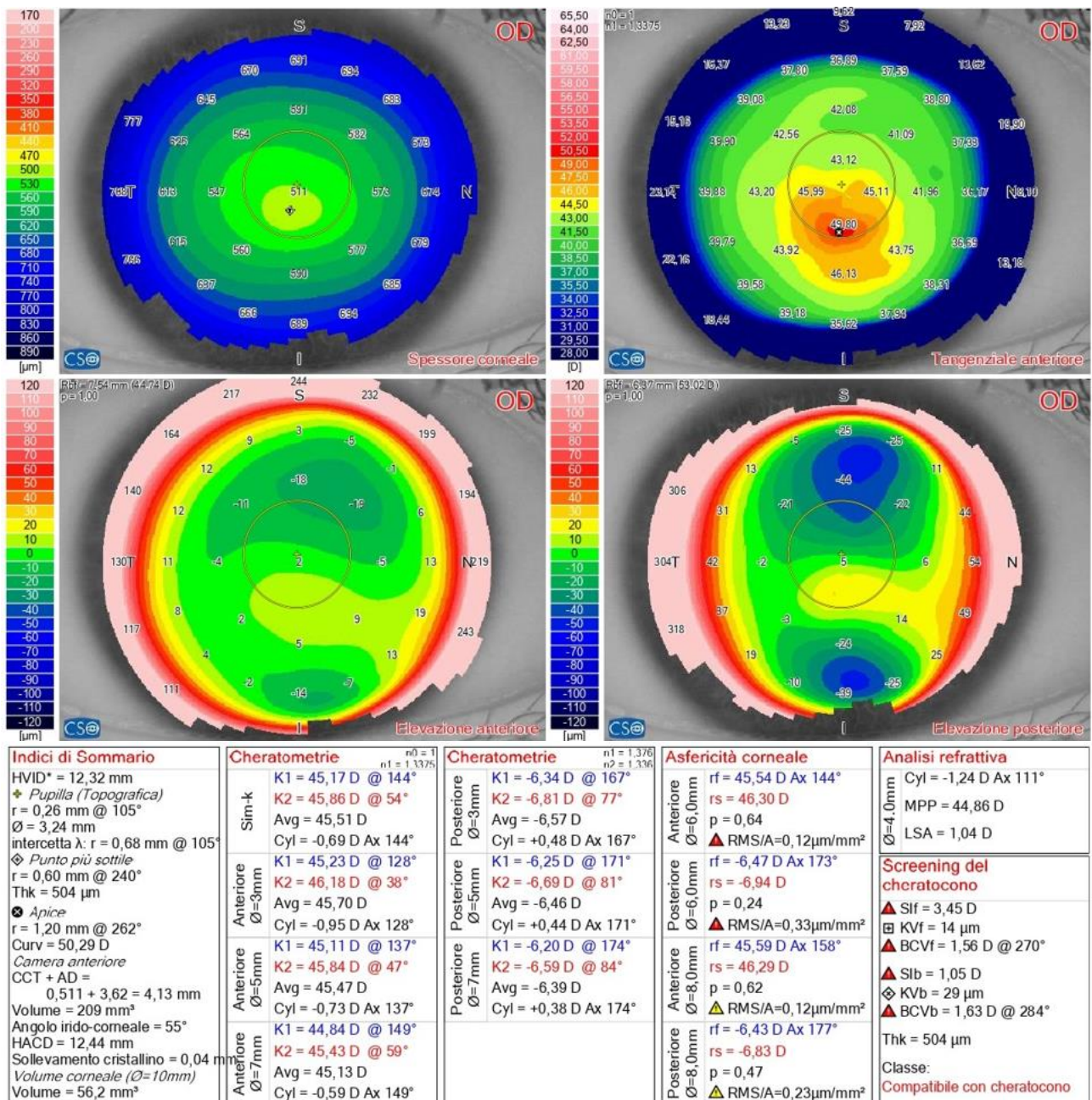


Figura 6.2: Schermata riassuntiva dell'esame di topografia corneale generata dal software presente nel Topografo corneale Sirius (CSO) relativa a un paziente di 19 anni, 10 giorni prima dell'Epi-Off CXL all'occhio destro.

Una volta riportati i valori numerici di **rf** espressi in diottrie (D), essi sono stati convertiti in mm tramite la (2.7), come mostrato nel listato di codice A.1. Questi passaggi sono stati eseguiti sia per i valori di curvatura superficiale relativi a un periodo antecedente al trattamento di reticolazione delle fibre di collagene, ma anche analizzando le schermate riassuntive di acquisizione topografica corneale delle stesse cornee relative al post trattamento (minimo 1 mese dopo il CXL).

I raggi di curvatura della superficie corneale calcolati, sia nella condizione pre-CXL che post-CXL, sono accettabili in quanto paragonabili ai dati presenti in letteratura (7.8 mm):

R_pre in mm	R_post in mm
8.638	9.014
8.416	8.205
8.450	8.047
9.072	8.825
9.072	9.053
7.749	7.991
8.374	9.097
8.997	9.016
10.54	10.69
11.99	11.85

Figura 6.3: Raggi di curvatura derivanti dalle mappe topografiche delle 10 cornee cheratoconiche trattate ad Alessandria

In A.1 vengono riportati anche i valori di spessore di ognuna delle 10 cornee che fanno riferimento alle acquisizioni topografiche delle stesse giornate in cui è stato effettuato l'esame di topografia corneale pre e post trattamento. Lo spessore è stato ricavato osservando il valore centrale mostrato nella mappa di spessore corneale, situata in alto a sinistra in Fig. (6.2).

Nello script Matlab in A.1 viene indicato con S il raggio planare della cornea, su cui il topografo ha calcolato il raggio di curvatura, che risulta per tutte le cornee pari a 3 mm dato che il diametro (D) è uguale 6 mm, visibile sempre nel pannello di Asfericità corneale in Fig. (6.2). La lettura dell'Asfericità corneale è spiegata nel paragrafo 4.2.3 del capitolo 4. Il diametro D è esattamente il diametro raffigurato nella Fig. (5.18) di questo elaborato.

In appendice viene poi mostrato il listato A.2 relativo ai dati di tonometria oculare, in cui vengono riportati i valori delle IOP dei singoli pazienti espresse in mmHg acquisiti attraverso l'utilizzo del tonometro di Goldmann trattato nel capitolo 1, ricavati direttamente dalle cartelle cliniche dei pazienti.

### 6.1.1 Modello di regressione lineare

Continuando a fare riferimento alla relazione (5.3), di cui se ne riporta la formulazione matematica:

$$E = \frac{pR^2}{w \cdot 2 \cdot t} (1 - \nu) (1 - e^{-\lambda \psi} \cos \lambda \psi)$$

Si può notare come a numeratore sia presente un termine indicato con la lettera  $w$ , la quale rappresenta lo spostamento apicale corneale conseguente al carico di pressione interna oculare, esplicitata in (5.25). Questo dato non viene fornito da un esame clinico dedito al controllo dell'andamento del tessuto corneale in caso di cheratocono; dunque, è stato ricavato sviluppando un modello di regressione lineare partendo dai risultati di un particolare studio relativo a prove sperimentali *in vitro* effettuate su un campione di cornee porcine mirato alla valutazione quantitativa degli effetti della dose di irradianza fornita dalla terapia di CXL a livello della rigidità stromale [113]. I risultati a cui

si sta facendo riferimento sono esattamente quelli della Tabella 5.3 mostrata nel precedente capitolo, che ora, per semplicità, verrà chiamata Tabella 6.1:

Pressure [mmHg]	Apex displacement [mm]					
	Untreated	2.5 min 1.35 J/cm <sup>2</sup>	5.0 min 2.7 J/cm <sup>2</sup>	10 min 5.4 J/cm <sup>2</sup>	15 min 8.1 J/cm <sup>2</sup>	20 min 10.4 J/cm <sup>2</sup>
1,839	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
4,045	0.037 ± 0.025	0.019 ± 0.015	0.019 ± 0.011	0.018 ± 0.014	0.014 ± 0.010	0.014 ± 0.008
6,252	0.065 ± 0.035	0.032 ± 0.019	0.032 ± 0.013	0.030 ± 0.016	0.026 ± 0.015	0.021 ± 0.010
8,459	0.087 ± 0.043	0.044 ± 0.018	0.046 ± 0.014	0.047 ± 0.019	0.036 ± 0.017	0.031 ± 0.009
10,665	0.105 ± 0.049	0.061 ± 0.018	0.059 ± 0.015	0.058 ± 0.025	0.043 ± 0.016	0.038 ± 0.011
12,872	0.124 ± 0.055	0.074 ± 0.019	0.070 ± 0.014	0.069 ± 0.026	0.053 ± 0.016	0.042 ± 0.008
15,078	0.138 ± 0.061	0.082 ± 0.020	0.081 ± 0.016	0.083 ± 0.029	0.062 ± 0.021	0.052 ± 0.011
17,285	0.155 ± 0.066	0.092 ± 0.019	0.089 ± 0.016	0.093 ± 0.034	0.069 ± 0.020	0.059 ± 0.008
19,492	0.168 ± 0.071	0.102 ± 0.018	0.097 ± 0.016	0.104 ± 0.034	0.079 ± 0.023	0.068 ± 0.009
21,698	0.184 ± 0.077	0.109 ± 0.018	0.105 ± 0.019	0.113 ± 0.033	0.086 ± 0.022	0.074 ± 0.012
23,905	0.195 ± 0.082	0.120 ± 0.019	0.114 ± 0.020	0.120 ± 0.031	0.092 ± 0.023	0.082 ± 0.012
26,112	0.208 ± 0.087	0.130 ± 0.018	0.123 ± 0.024	0.127 ± 0.034	0.102 ± 0.026	0.088 ± 0.012
28,318	0.220 ± 0.092	0.137 ± 0.020	0.132 ± 0.029	0.136 ± 0.034	0.107 ± 0.025	0.096 ± 0.014
30,525	0.233 ± 0.097	0.146 ± 0.022	0.137 ± 0.028	0.145 ± 0.036	0.117 ± 0.029	0.104 ± 0.012

Tabella 6.1: Risultati dei test di gonfiaggio eseguiti su un campione di cornee porcine trattate e non trattate tramite *epi-off* CXL sperimentalmente *in vitro* in [113].

Nella Tabella 6.1 sono riportati i valori medi e le deviazioni standard dei risultati dei test di gonfiaggio eseguiti su cornee porcine non trattate e trattate sperimentalmente *in vitro* seguendo la procedura *epi-off* a diverse dosi di irradiazione.

Gli spostamenti apicali delle 10 cornee umane oggetto di questo lavoro di tesi sono stati generati partendo dai dati presenti nella seconda colonna della Tabella 6.1 relativa alle cornee non trattate e alla quinta colonna relativa a cornee trattate tramite esposizione di raggi UV-A della durata di 10 min con un erogatore della potenza di 9mW/cm<sup>2</sup> rilasciando una dose totale di energia pari a 5.4 J/cm<sup>2</sup>.



Pressure [mmHg]	Apex displacement [mm]					
	Untreated	2.5 min	5.0 min	10 min	15 min	20 min
		1.35 J/cm <sup>2</sup>	2.7 J/cm <sup>2</sup>	5.4 J/cm <sup>2</sup>	8.1 J/cm <sup>2</sup>	10.4 J/cm <sup>2</sup>
1,839	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
4,045	0.037 ± 0.025	0.019 ± 0.015	0.019 ± 0.011	0.018 ± 0.014	0.014 ± 0.010	0.014 ± 0.008
6,252	0.065 ± 0.035	0.032 ± 0.019	0.032 ± 0.013	0.030 ± 0.016	0.026 ± 0.015	0.021 ± 0.010
8,459	0.087 ± 0.043	0.044 ± 0.018	0.046 ± 0.014	0.047 ± 0.019	0.036 ± 0.017	0.031 ± 0.009
10,665	0.105 ± 0.049	0.061 ± 0.018	0.059 ± 0.015	0.058 ± 0.025	0.043 ± 0.016	0.038 ± 0.011
12,872	0.124 ± 0.055	0.074 ± 0.019	0.070 ± 0.014	0.069 ± 0.026	0.053 ± 0.016	0.042 ± 0.008
15,078	0.138 ± 0.061	0.082 ± 0.020	0.081 ± 0.016	0.083 ± 0.029	0.062 ± 0.021	0.052 ± 0.011
17,285	0.155 ± 0.066	0.092 ± 0.019	0.089 ± 0.016	0.093 ± 0.034	0.069 ± 0.020	0.059 ± 0.008
19,492	0.168 ± 0.071	0.102 ± 0.018	0.097 ± 0.016	0.104 ± 0.034	0.079 ± 0.023	0.068 ± 0.009
21,698	0.184 ± 0.077	0.109 ± 0.018	0.105 ± 0.019	0.113 ± 0.033	0.086 ± 0.022	0.074 ± 0.012
23,905	0.195 ± 0.082	0.120 ± 0.019	0.114 ± 0.020	0.120 ± 0.031	0.092 ± 0.023	0.082 ± 0.012
26,112	0.208 ± 0.087	0.130 ± 0.018	0.123 ± 0.024	0.127 ± 0.034	0.102 ± 0.026	0.088 ± 0.012
28,318	0.220 ± 0.092	0.137 ± 0.020	0.132 ± 0.029	0.136 ± 0.034	0.107 ± 0.025	0.096 ± 0.014
30,525	0.233 ± 0.097	0.146 ± 0.022	0.137 ± 0.028	0.145 ± 0.036	0.117 ± 0.029	0.104 ± 0.012

Tabella 6.2: In arancione chiaro, le colonne tabellari mostranti i valori utili alla creazione del modello di regressione lineare.

La dose totale di energia per area di superficie corneale considerata nel caso sperimentale di questo studio su cornee suine è uguale a quella erogata dall'emettitore di raggi UV presente nella sala operatoria dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, con cui sono stati trattati i 10 occhi affetti da cheratocono del campione di pazienti considerato.

Si è scelto di prendere come riferimento questo particolare studio di F. Boschetti et al. condotto nel 2021 [113] e non altri lavori emersi dalla ricerca bibliografica in quanto anche la durata di esposizione (10 min) della cornea imbibita di Riboflavina risulta paragonabile a quella del protocollo seguito presso l'ospedale di Alessandria (9 min). La scelta è dunque ricaduta sulla quinta colonna della tabella evidenziata in arancione (Tabella 6.2) perché è quella relativa agli esperimenti effettuati sulle cornee di maiale a cui è stata somministrata la stessa dose derivante dall'irradiazione in un tempo prossimo a 10 min.

Pertanto, si è deciso di sviluppare un modello lineare di rango pieno come la **regressione lineare semplice** che coinvolge una sola variabile esplicativa per prevedere una variabile di risposta continua. La variabile esplicativa viene anche chiamata *variabile predittiva* o *variabile indipendente* e in questo caso corrisponde alla pressione (P) con la quale sono stati eseguiti i test di gonfiaggio delle cornee porcine in [113]. La variabile di risposta continua viene definita anche *variabile target* o *variabile dipendente* e coincide con lo spostamento apicale.

La forma generale di un modello di regressione lineare semplice è la seguente:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n \quad (6.1)$$

La relazione rappresenta un modello statistico con un predittore quantitativo che assume diversi valori  $x_1, \dots, x_n$  in corrispondenza dei quali vengono osservate le risposte  $y_1, \dots, y_n$  soggette a errori omoschedastici e additivi [128]. L'intercetta,  $\beta_0$ , è una costante che indica l'effetto di base della variabile predittiva sul valore della variabile target quando la variabile predittiva stessa non ha influenza, cioè quando è uguale a zero.

In appendice A.3 si può osservare come è stato primariamente provato un modello di regressione lineare con intercetta del tipo

$$w = \beta_0 + \beta_1 \cdot P \quad , P = \text{pressioni indicate nella prima colonna della tabella 6.1} \quad (6.2)$$

per poi confrontarlo con quello che non considera l'intercetta scritto nella forma:

$$w = P \cdot \beta_1 \quad (6.3)$$

Questo confronto è stato eseguito sia per i dati relativi le cornee non trattate tramite CXL che per quelli delle cornee trattate. Riferendosi al listato di codice in A.3, nel primo caso lo spostamento apicale  $w$  viene indicato con la lettera  $x$ , mentre nel secondo caso con la lettera  $w$ .

Per entrambi i modelli (con e senza intercetta) è stata determinata la stima dei minimi quadrati di  $\beta$  come:

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'Y \quad (6.4)$$

Nella (6.4)  $X$  è la matrice delle osservazioni, chiamata anche *design matrix*, e  $Y$  rappresenta la variabile risposta e dunque il vettore di variabili casuali osservabili. Lo stimatore  $\beta$  è il coefficiente angolare che dice quanto varia il valore atteso di  $Y$  al variare di un'unità del valore di  $X$ .

Questo stimatore è stato determinato per tutte le quattro casistiche, le quali, schematizzate, risultano:

1. Modello di regressione lineare per determinazione spostamento apicale nella forma (6.2) cornee non trattate (caso A)
2. Modello di regressione lineare per determinazione spostamento apicale nella forma (6.3) cornee non trattate (caso B)
3. Modello di regressione lineare per determinazione spostamento apicale nella forma (6.2) cornee trattate (caso C)
4. Modello di regressione lineare per determinazione spostamento apicale nella forma (6.3) cornee trattate (caso D)

Rispettivamente, nel listato di codice A.3, gli stimatori sono nominati nel seguente modo:

- A. beta\_notratt
- B. beta1\_notratt
- C. beta
- D. beta1

Nel caso B e D, la relazione dello stimatore, al posto della matrice  $X$ , presenta direttamente il vettore colonna  $P$  contenente i 14 valori di pressione utilizzati nei test di pressurizzazione del lavoro citato precedentemente [113].

Ogni stimatore è stato utilizzato per calcolare il valore predetto della variabile dipendente, ovvero dello spostamento apicale  $w$ , nominato nei quattro casi come segue:

- A. xstar
- B. xstar1

- C. wstar
- D. wstar1

Questo valore è il prodotto tra la variabile predittiva e lo stimatore.

La scelta del modello è stata effettuata grazie al calcolo del coefficiente di determinazione  $r^2$  che in tutti i casi si è presentato maggiore di 0.9:

Rsq	0.9857
Rsq1	0.9852
Rsq1_notratt	0.9647
Rsq_notratt	0.9749

Figura 6.4: coefficienti di determinazione relativi ai 4 casi descritti, estratti dal workspace Matlab.

Il coefficiente di determinazione è stato determinato come segue:

$$r^2 = 1 - \frac{\sum (Y_i - Y'_i)^2}{\sum (Y_i - \text{media}(Y))^2} \quad (6.5)$$

Nella frazione presente nella (6.5), al numeratore viene esplicitata la devianza residua e al denominatore la devianza totale. Il coefficiente di determinazione rappresenta, infatti, un indice che misura il legame tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico usato [129].

Con  $Y_i$  si indicano i valori di spostamento apicale derivati dagli esperimenti *in vitro* del campione di cornee porcine dello studio preso come riferimento, estrapolati dalle colonne evidenziate in Tabella 6.2. Mentre, con  $Y'_i$  si indicano i valori predetti della variabile target.

Facendo riferimento alla Fig. (6.4), i coefficienti di determinazione per le 4 casistiche sopra descritte nel listato di codice A.3 appaiono come:

- A. Rsq\_notratt
- B. Rsq1\_notratt
- C. Rsq
- D. Rsq1

Alla fine, è stato scelto il modello di regressione lineare nella forma (6.2) poiché ha presentato il coefficiente  $r^2$  maggiore, visibile anche graficamente nei seguenti plot:

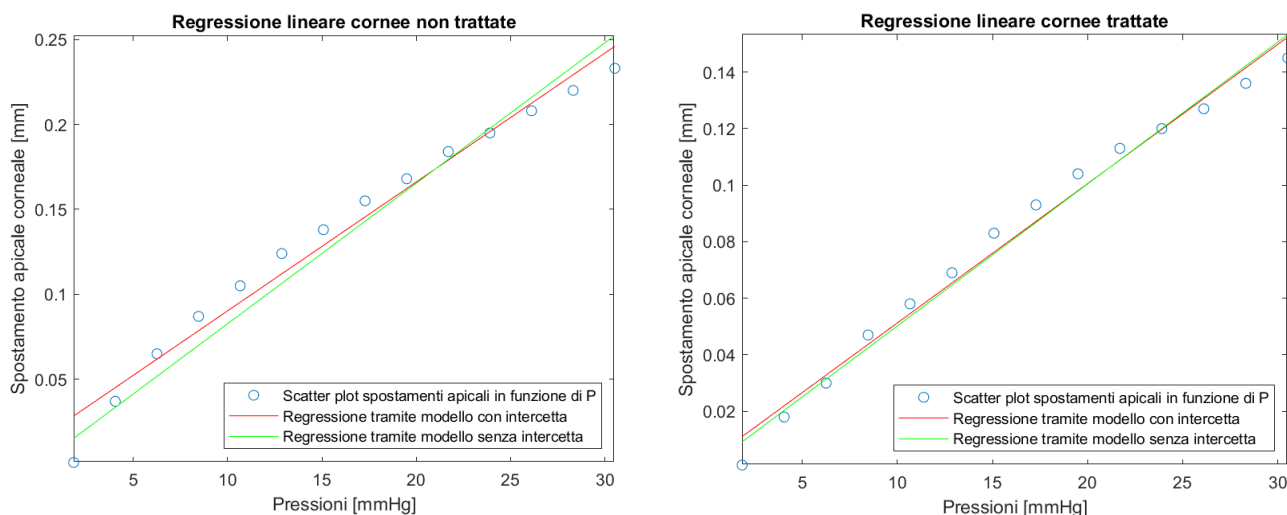


Figura 6.5: verifica grafica del modello di regressione lineare. In rosso viene rappresentata la regressione lineare nella forma (6.2), in verde quella nella forma (6.3). Attraverso lo scatter plot si può notare come i dati sperimentali ottenuti in [113] relativi alle cornee non trattate e trattate con raggi UV-A seguono un andamento pressoché lineare

### 6.1.2 Applicazione del modello ai dati clinici

Lo spostamento apicale conseguente al carico di pressione intraoculare (IOP) delle 10 cornee analizzate in questo elaborato è stato ricavato applicando il modello di regressione lineare scelto e mostrato nel precedente paragrafo.

In appendice A.4 viene mostrato il listato di codice in cui è stata creata una *design matrix* (10 x 2) denominata  $x\_osp$ , che nella seconda colonna presenta le IOP in mmHg ricavate dalle cartelle cliniche dei pazienti:

1	16
1	8
1	14
1	16
1	16
1	16
1	14
1	16
1	15
1	14

Figura 6.6: Design matrix relativa alle IOP delle 10 cornee affette da cheratocono trattate presso l'ospedale di Alessandria.

La matrice delle osservazioni di Fig. 6.6 contiene, nella seconda colonna le pressioni intraoculari dei pazienti, le quali equivalgono a quelle mostrate in appendice A.2.

Attraverso il prodotto tra gli stimatori  $\beta_{notratt}$  e  $\beta$  relativi ai casi A e C del modello di regressione lineare con intercetta descritto in (6.2) e la *design matrix*, si sono calcolati gli spostamenti apicali corneali dei 10 occhi affetti da cheratocono prima e dopo il trattamento CXL, chiamati rispettivamente  $x\_osp$  e  $w\_osp$  in appendice A.4.

Gli spostamenti espressi in mm sono comparabili a quelli della letteratura:

Spostamento apicale in mm di cornee non trattate ottenuto da prove sperimentali <i>in vitro</i>
0.001
0.037
0.065
0.087
0.105
0.124
0.138
0.155
0.168
0.184
0.195
0.208
0.220
0.233

Spostamento apicale in mm conseguente alla IOP misurata presso l'ospedale di Alessandria degli occhi dei 10 pazienti in studio pre-CXL
0.135
0.075
0.120
0.135
0.135
0.135
0.120
0.135
0.128
0.120

Figura 6.7: a sinistra vengono evidenziati i valori di spostamento apicale per le cornee non trattate, ottenuti in [113] a seguito di carico pressorio fisiologico. A destra gli spostamenti apicali per le 10 cornee non trattate dei pazienti di Alessandria ottenuti dall'applicazione del modello di regressione lineare mostrato in appendice A.3

Spostamento apicale in mm di cornee trattate ottenuto da prove sperimentali <i>in vitro</i>
0.001
0.018
0.030
0.047
0.058
0.069
0.083
0.093
0.104
0.113
0.120
0.127
0.136
0.145

Spostamento apicale in mm conseguente alla IOP misurata presso l'ospedale di Alessandria degli occhi dei 10 pazienti in studio post-CXL
0.081
0.041
0.071
0.081
0.081
0.081
0.071
0.081
0.076
0.071

Figura 6.8: a sinistra vengono evidenziati i valori di spostamento apicale per le cornee trattate, ottenuti in [113] a seguito di carico pressorio fisiologico. A destra gli spostamenti apicali per le 10 cornee trattate dei pazienti di Alessandria ottenuti dall'applicazione del modello di regressione lineare mostrato in appendice A.3

### 6.1.3 Stima del modulo elastico stromale

Una volta acquisiti tutti i dati geometrici delle 10 cornee patologiche si è proceduto con il calcolo della costante  $\lambda$  e dell'angolo  $\psi$  come descritto nelle relazioni (5.35), descritte nel capitolo 5 di questo elaborato. Il coefficiente di Poisson stromale  $\nu$  viene imposto uguale a 0.5 per giustificare la quasi incomprimibilità delle fibre di collagene. A livello di codice, si è deciso di soprannominare la costante  $\lambda$  semplicemente come `lambda_pre` e `lambda_post` e l'angolo  $\psi$  come `phi_pre` e `phi_post`. Ci si è serviti della funzione *rad2deg* di Matlab per avere l'angolo  $\psi$  in gradi e non in radianti.

In appendice A.5 viene presentato il listato di codice in cui è stata sviluppata la (5.3), in modo da ottenere il modulo elastico corneale per ognuna delle 10 cornee, sia prima di essere sottoposte all'azione dei raggi UV-A che dopo; dunque, prima e dopo il trattamento di cross-linking del collagene corneale.

Moduli di Young ottenuti:

In appendice A.5 viene presentato il listato di codice in cui è stata sviluppata la (5.3), in modo da ottenere il modulo elastico corneale per ognuna delle 10 cornee, sia prima di essere sottoposte all'azione dei raggi UV-A che dopo; dunque, prima e dopo il trattamento di cross-linking del collagene corneale.

Moduli di Young ottenuti:

Paziente n.	E_pre in Mpa	Paziente n.	E_post in Mpa
1	0.573	1	1.311
2	0.583	2	1.146
3	0.621	3	1.129
4	0.624	4	1.110
5	0.711	5	1.341
6	0.516	6	0.941
7	0.533	7	1.327
8	0.662	8	1.192
9	0.800	9	1.435
10	0.807	10	1.405

*Figura 6.9: A sinistra, i moduli elastici delle 10 cornee affette da KC prima dell'intervento. A destra, i moduli elastici delle 10 cornee affette da KC dopo l'intervento.*

È stato determinato anche il modulo elastico equivalente alla porzione effettivamente trattata dalla tecnica parachirurgica di CXL tramite la (5.50) assumendo che il materiale sia isotropo elastico lineare, ottenendo i seguenti risultati:

Paziente n.	E_eq in MPa
1	1.164
2	1.077
3	1.052
4	1.058
5	1.231
6	0.932
7	1.172
8	1.159
9	1.415
10	1.377

Figura 6.10: moduli elastici calcolati utilizzando la (5.50).

Nella sezione di verifica del listato di codice in appendice A.5, si sono sviluppati due cicli **for** atti all'accertamento che, per ognuno dei 10 pazienti, la rigidità corneale sia aumentata a seguito di trattamento CXL. Ciò è stato verificato con successo e se ne riporta il risultato visibile sul pannello della *Command Window*:

```
Command Window
Ogni valore di E_pre è minore del corrispondente valore di E_post.
Ogni valore di E_eq è minore del corrispondente valore di E_post perchè si considera la disomogeneità delle distribuzioni delle sollecitazioni attraverso lo spessore corneale.
Ogni valore di E_eq è maggiore del corrispondente valore di E_pre.
```

Dunque, non solo ogni valore di modulo elastico relativo a un periodo antecedente all'intervento ( $E_{pre}$ ) è risultato minore al corrispondente valore relativo a un periodo successivo l'intervento ( $E_{post}$ ), dimostrando l'efficacia dell'azione sinergica tra Riboflavina e irraggiamento con luce UV-A; bensì viene verificata anche la teoria linearizzata delle travi trattata nel paragrafo 5.4. Viene, infatti, dimostrato che  $E_{eq}$  è minore del corrispondente valore  $E_{post}$ , ma, allo stesso tempo, maggiore del corrispondente valore  $E_{pre}$ , il quale rappresenta la rigidità della cornea affetta da cheratocono prima dell'intervento.

Inoltre, i risultati riportati nelle Fig. (6.9) e (6.10) sono paragonabili ai valori di moduli elastici corneali ottenuti in altri lavori presenti in letteratura, tra cui uno studio condotto nel 2017 in cui è stato verificato che il modulo elasticità di Young dell'occhio umano sano risulta in media pari a 0.696 MPa [130]. In un altro lavoro pubblicato nel 2013, è stata quantificata l'elasticità stromale tramite indentazione con microscopio a forza atomica (AFM) di 24 cornee di cadavere umano [131]. I risultati medi ottenuti in questo studio sono: 0.246 MPa e 0.468 MPa per il modulo di elasticità della cornea anteriore, rispettivamente non trattata e trattata tramite CXL; 0.100 MPa e 0.066 MPa per il modulo di elasticità della cornea posteriore, rispettivamente non trattata e trattata tramite CXL. Chiaramente, i valori corrispondono con quelli ottenuti in questo lavoro di tesi a livello di ordine di grandezza, ma non possono risultare uguali numericamente, per via delle differenze presenti nel campione considerato e nel metodo di misura utilizzato per il calcolo del modulo di Young. È necessario ricordare che i dati utilizzati nella stima della rigidità corneale dei 10 pazienti in cura presso l'ospedale di Alessandria derivano da misure topografiche di occhi patologici eseguite *in vivo*.



I risultati visibili in Fig. (6.9) e (6.10) risultano confrontabili con quelli dello studio preso come riferimento principale nello stilare l'elaborato:

Time	Secant Elastic Modulus [MPa]		
	Untreated	After CXL	T.Test
2.5 min	0.480 ± 0.247	0.788 ± 0.116	4,96E-04
5 min	0.590 ± 0.237	0.855 ± 0.200	1,05E-04
10 min	0.505 ± 0.342	0.978 ± 0.150	1,09E-04
15 min	0.716 ± 0.394	1.413 ± 0.234	9,12E-08
20 min	0.562 ± 0.522	1.732 ± 0.119	3,29E-04

*Figura 6.11: Valori medi e deviazioni standard dei moduli elastici secanti per il campione di 90 cornee porcine, ottenuti dai dati sperimentali di [113] attraverso la teoria dei gusci linearizzata. Viene evidenziata esclusivamente la riga relativa al protocollo di CXL in cui la durata di esposizione ai raggi UV si avvicina notevolmente a quella utilizzata nel protocollo di trattamento CXL presso l'ospedale di Alessandria.*

In appendice A.5 è presente anche la relazione che ha reso possibile il calcolo della variazione percentuale della rigidità stromale di ognuna delle 10 cornee affette da KC dallo stato pre-CXL a quello post-CXL, di cui se ne riportano i valori:

Paziente n.	Aumento %
1	102.89
2	84.57
3	69.38
4	69.58
5	73.10
6	80.61
7	119.94
8	74.95
9	76.98
10	70.63

*Figura 6.12: aumento percentuale della rigidità stromale delle 10 cornee colpite da cheratocono a seguito del cross-linking del collagene corneale. È evidente che per tutte le cornee si è riscontrato un aumento di robustezza rilevante e significativo, maggiore del 69% in tutti i casi.*

#### **6.1.4 Determinazione del lavoro compiuto dal tessuto corneale tramite approccio termofisico**

Il Cross-linking del collagene corneale provoca un aumento del modulo elastico della cornea. Il cambiamento di questo modulo costituisce una variazione delle condizioni elastiche prima e dopo l'intervento atto a fermare la progressione del cheratocono. Partendo da questo semplice concetto si può pensare di determinare il lavoro meccanico compiuto dal tessuto corneale. Il trattamento con

raggi UV-A fornisce calore, il quale implica un lavoro meccanico tissutale calcolabile come la differenza delle condizioni elastiche prima e dopo il trattamento parachirurgico. La differenza tra il calore assorbito e il lavoro compiuto si traduce in una variazione di energia interna del sistema in esame (la cornea) che passa da uno stato A ad un secondo stato B. Il primo stato A è caratterizzato da una riduzione dei legami covalenti tra le fibre collagene e da un assottigliamento delle stesse a livello dello stroma corneale affetto da cheratocono. Ciò porta ad un modulo elastico indicato come  $E_{pre}$  nel listato di codice in appendice. Lo stato B è quello conseguente all'irraggiamento con luce UV-A per 9 min. Esso è caratterizzato da un aumento dei legami incrociati interlamellari tra le fibre corneali e porta ad un modulo elastico indicato come  $E_{post}$  nel listato di codice in appendice. Pertanto, si è applicato il primo principio della termodinamica effettuando una differenza di energie (energia meccanica sottratta all'energia termica).

Nel listato in appendice A.6 si può vedere come si è determinata per prima l'energia termica derivante dal protocollo CXL utilizzato in ospedale. La dose totale di energia per area di superficie corneale è nota, pari a  $5.4 \text{ J/cm}^2$ . Si ricorda che essa deriva dal prodotto tra la potenza della macchina ( $10 \text{ mW/cm}^2$ ) per la durata di esposizione al fascio di raggi ultravioletti di tipo A ( $9 \text{ min}=540 \text{ s}$ ).

L'energia termica totale espressa in Joule è stata determinata moltiplicando la dose energetica di irradiazione per l'area circolare di cornea irraggiata dall'emettitore di raggi UV. Dato che il dispositivo utilizzato in sala operatoria irraggia un'area circolare corneale di diametro pari a 9 mm, si è calcolata l'area del cerchio in  $\text{cm}^2$  ( $\pi \cdot r^2$ , dove  $r$  è pari a 0.45 cm). Il valore di energia termica equivale a 3.4353 J.

Continuando a fare riferimento all'appendice A.6, si passa al calcolo dell'energia meccanica espressa in Joule. Per definire il lavoro meccanico compiuto dal tessuto corneale si è ragionato partendo dal concetto di modulo di elasticità in tensione/compressione, o più comunemente conosciuto come modulo di Young ( $E$ ). Quest'ultimo quantifica la relazione tra la tensione, intesa come forza per unità di superficie ( $\sigma$ ), e la deformazione assiale ( $\varepsilon$ ) nella regione elastica lineare del materiale in esame:

$$E = \frac{\sigma(\varepsilon)}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0} = \frac{F L_0}{A \Delta L} \quad (6.6)$$

$E$  è il modulo di elasticità,  $F$  è la forza esercitata sulla cornea,  $A$  è l'area corneale perpendicolare alla sollecitazione,  $\Delta L$  è lo spostamento dell'apice corneale,  $L_0$  è la lunghezza iniziale del materiale, ovvero lo spessore corneale.

L'obiettivo ultimo è giungere alla determinazione del lavoro meccanico compiuto dalla cornea passando da uno stato A non trattato a uno stato B trattato. Pertanto, si passa attraverso l'integrale della legge di Hooke. Quest'ultima è definita come segue:

$$F = \frac{E A \Delta L}{L_0} \quad (6.7)$$

$$F = \left( \frac{E A}{L_0} \right) \Delta L = k x \quad (6.8)$$

L'integrale della legge di Hooke fornisce l'energia potenziale elastica immagazzinata in un materiale elastico lineare:

$$U_e = \int kx \, dx = \frac{1}{2} k x^2 \quad (6.9)$$

$$U_e = \int \frac{EA \, \Delta L}{L_0} d\Delta L = \frac{EA}{L_0} \int \Delta L \, d\Delta L = \frac{EA \, \Delta L^2}{2L_0} \quad (6.10)$$

La densità di energia potenziale elastica per unità di volume sarà pari a:

$$\frac{U_e}{AL_0} = \frac{E \Delta L^2}{2L_0^2} \quad (6.11)$$

$$U_e = \frac{1}{2} \left( \frac{EA}{L_0} \right) \Delta L^2 \quad (6.12)$$

$$\frac{U_e}{AL_0} = \frac{1}{2} E \varepsilon^2 \quad (6.13)$$

Utilizzando la (6.12) e la (6.13) si è definita l'energia potenziale elastica relativa agli stati prima e dopo il trattamento CXL come:

$$U_{preCXL} = \frac{1}{2} \frac{E_{pre} \pi r^2}{t_{pre}} x^2 \quad (6.14)$$

$$U_{postCXL} = \frac{1}{2} \frac{E_{post} \pi r^2}{t_{post}} w^2 \quad (6.15)$$

Siccome il lavoro è pari alla variazione di energia interna  $\Delta U$  cambiata di segno, il lavoro compiuto dal tessuto corneale è stato determinato attraverso la seguente relazione matematica:

$$L = - \Delta U = \frac{\pi r^2}{2} \left[ \left( \frac{E_{pre} x^2}{t_{pre}} \right) - \left( \frac{E_{post} w^2}{t_{post}} \right) \right] \quad (6.16)$$

Nella relazione (6.16) appena riportata:

- $E_{pre}$  ed  $E_{post}$  sono i moduli elastici corneali riportati in Fig. (6.9)
- $x$  è lo spostamento apicale corneale pre-CXL derivante dall'applicazione del modello di regressione lineare sviluppato in A.3 ed equivale alla seconda tabella mostrata in Fig. (6.7) indicato come  $x_{osp}$  in A.4
- $w$  è lo spostamento apicale corneale post-CXL derivante dall'applicazione del modello di regressione lineare sviluppato in A.3 ed equivale alla seconda tabella mostrata in Fig. (6.8) indicato come  $w_{osp}$  in A.4
- $t_{pre}$  e  $t_{post}$  sono gli spessori corneali delle 10 cornee affette da cheratocono mostrati in A.1

La relazione (6.16) è stata applicata per tutte le 10 cornee oggetto di questo lavoro di tesi, ottenendo i seguenti risultati espressi in Joule:

Paziente n.	Lavoro compiuto dal tessuto corneale [J]
1	0.669
2	0.872
3	1.985
4	2.314
5	2.179
6	2.298
7	0.263
8	2.741
9	2.772
10	2.057

*Figura 6.13: lavoro meccanico espresso in Joule compiuto da ciascuna delle 10 cornee affette da KC a seguito del CXL.*

La variazione di energia oculare  $\Delta H$  (indicata come  $\Delta H$  nel listato di codice) è stata calcolata come differenza tra l'energia termica fornita dal trattamento di cross-linking e l'energia potenziale elastica immagazzinata nella cornea:

Paziente n.	Variazione di energia oculare [J]
1	2.765
2	2.563
3	1.450
4	1.121
5	1.255
6	1.136
7	3.172
8	0.695
9	0.663
10	1.377

*Figura 6.14: Variazione di energia oculare dallo stato corneale pretrattato a quello post-trattato tramite protocollo CXL vigente presso l'azienda ospedaliera di Alessandria.*

### 6.1.5 T-test di Welch

Al fine di verificare e confermare la validità del modello meccanico applicato e dei risultati ottenuti, si è utilizzato un importante strumento statistico quale il *t-test*. In particolare, si è fatto uso di un adattamento del *t-test di Student*, ovvero il *t-test di Welch*, utile a valutare la significatività delle differenze tra medie campionarie quando i campioni presentano varianze disuguali. Il modello meccanico tramite il quale è stato possibile determinare la risposta elastica corneale delle 10 cornee cheratoconiche trattate presso l'ospedale di Alessandria si è basato su uno studio mirato a valutare gli effetti biomeccanici del CXL su un campione di 90 cornee di maiale analizzate in [113].

Segue la descrizione teorica del codice in appendice A.7, in cui viene effettuata una comparazione di natura statistica tra i risultati delle simulazioni analitico-numeriche e i dati presenti in letteratura relativi a prove sperimentali *in vitro*.

Da [113], sono note media  $\mu_2$  e deviazione standard  $\sigma_2$  dei moduli elastici delle cornee porcine a seguito del trattamento di cross-linking, evidenziate in Fig. (6.9) nell'elaborato.

Dunque, si hanno a disposizione due gruppi: il *control group* (cornee di maiale) e il *treatment group* (cornee umane). Bisogna assumere che i due gruppi presentino rispettivamente una numerosità pari a  $n_1$  ( $n=11$ ) e  $n_2$  ( $m=10$ ) e che le variabili dei due gruppi, indicate come

$$(X_i)_{i=1}^{n_1} \text{ e } (Y_i)_{i=1}^{n_2},$$

siano indipendenti identicamente normalmente distribuite con medie uguali a  $\mu_1$  e  $\mu_2$ , e varianze  $\sigma_1^2$  e  $\sigma_2^2$ , rispettivamente. Si è costruita la statistica:

$$\bar{X} = \frac{1}{n_1} \sum_i X_i \sim N\left(\mu_1, \sigma_1^2 / n_1\right)$$

$$\bar{Y} = \frac{1}{n_2} \sum_i Y_i \sim N\left(\mu_2, \sigma_2^2 / n_2\right)$$

$\bar{X}$  e  $\bar{Y}$  rappresentano le medie campionarie e sono distribuite come una normale N a media  $\mu$  e varianza  $\sigma^2$ . Nel caso di questo lavoro di tesi  $\sigma_1^2$  e  $\sigma_2^2$  non sono note e vanno stimate.

Quindi, si è proceduto col calcolo della media campionaria (*media\_u*) dei moduli elastici delle 10 cornee umane post-trattamento, presentati in Fig. (6.7) e della deviazione standard degli stessi (*s1*). Data la differenza di numerosità dei campioni e non disponendo dei dati delle singole 90 cornee di maiale trattate in [113], si è proceduto con una tecnica statistica di ricampionamento conosciuta sotto il nome di *bootstrap* utile effettuare un *downsampling*. Essa ha permesso, partendo dall'assunzione di normalità del t-test di simulare un numero più piccolo ma comparabile di osservazioni per le cornee di maiale, in particolare 11. Nel procedimento di sotto campionamento, per replicabilità dei risultati si è utilizzato il *random seed*, che consiste in uno specifico valore da cui gli algoritmi di generazione di numeri casuali partono per inizializzare il generatore casuale, in modo da garantire che la sequenza di numeri casuali sarà la stessa ogni volta che si esegue lo script. Esso è stato utile in quanto, successivamente, si è utilizzata la funzione *normrnd* di Matlab che ha permesso di simulare i moduli elastici delle cornee di maiale partendo da una distribuzione normale con media e varianza ricavate da [113]:

Numerosità <i>control</i> <i>group</i>	E in MPa simulati
1	0.916
2	1.117
3	1.348
4	1.027
5	1.536
6	1.218
7	1.111
8	1.018
9	1.006
10	0.935
11	1.117

Figura 6.15: Moduli elastici post-CXL delle cornee di maiale simulati grazie alla funzione **normrnd** di Matlab.

I valori mostrati nella seconda colonna della figura soprastante costituiscono il vettore colonna  $y$  dello script in appendice A.7, di cui si è poi calcolata la media campionaria ( $media\_m$ ) e la deviazione standard ( $s2$ ).

Avendo a disposizione il *control group* (cornee di maiale) e il *treatment group* (cornee umane), sotto le ipotesi citate in precedenza, si è proceduto con il calcolo degli intervalli di confidenza al 95% per la differenza delle medie.

Nell'analisi è stato condotto un test di ipotesi a una coda, in cui si testa l'ipotesi nulla  $H_0 (\mu_1 = \mu_2)$  contro l'ipotesi alternativa  $H_A (\mu_2 > \mu_1)$ .

Essendo i due gruppi eteroschedastici con varianze stimate tramite lo stimatore di varianza campionaria, è stato portato avanti il *t-test di Welch*, in particolare la statistica test (T):

$$\frac{\bar{X} - \bar{Y} - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (6.17)$$

$\bar{X}$  e  $\bar{Y}$  sono le medie campionarie delle variabili aleatorie,  $\mu_1$  e  $\mu_2$  sono i valori teorici della media delle due popolazioni,  $S_1^2$  e  $S_2^2$  sono le varianze e  $n_1$   $n_2$  rappresentano le numerosità dei due campioni. Per stimare le varianze si usano le seguenti statistiche:

$$S_1^2 = \frac{1}{n_1 - 1} \sum_i (X_i - \bar{X})^2 \quad (6.18)$$

$$S_2^2 = \frac{1}{n_2 - 1} \sum_i (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (6.19)$$

La relazione (6.17) vale sotto l'ipotesi nulla e distribuzione come una *t di Student* con  $\nu$  gradi di libertà uguali a:

$$\nu \cong \frac{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}{s_1^2/n_1(n_1-1) + s_2^2/n_2(n_2-1)} \quad (6.20)$$

La (6.20) vale sotto approssimazione di Satterthwaite [128].

Pertanto, è stato possibile calcolare il  $p\_value$  per il test di ipotesi, secondo la definizione:

$$p\_value = P(T | x_i, y_i) \geq T(x_i, y_i) | H_0 \text{ vera} \quad (6.21)$$

$$P(\bar{X} - \bar{Y} \geq \bar{x} - \bar{y}) | H_0 \quad (6.22)$$

$$P = \left( \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2}} \geq \frac{(\bar{x} - \bar{y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}} | H_0 \right) \quad (6.23)$$

Il  $p\_value$  rappresenta la probabilità che una *T di Student* con  $\nu$  gradi di libertà sia  $\geq$  della statistica test *t* sotto l'ipotesi nulla  $H_0$  che le medie  $\mu_1$  e  $\mu_2$  siano uguali.

Dato che il  $p\_value$  è risultato uguale a 0.75596, maggiore di 0.05 (alpha), si è accettata l'ipotesi nulla che le medie sono uguali, dimostrando che i valori medi dei moduli elastici delle cornee porcine analizzate in [113] e delle cornee dei 10 pazienti di Alessandria non hanno differenze statisticamente rilevanti.

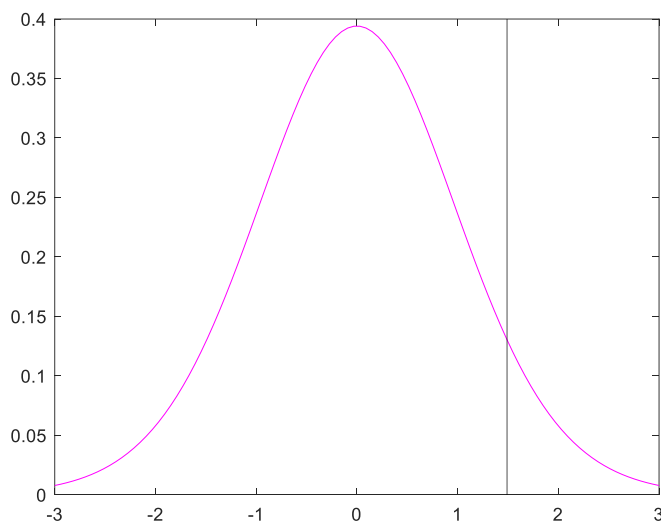


Figura 6.16: In rosa, la funzione di densità di probabilità di una *t di Student* con  $\nu$  gradi di libertà. In nero una linea verticale che indica il punto in cui cade la statistica osservata; pertanto, l'area a destra di tale linea rappresenta il  $p\_value$ .

Un ulteriore conferma è data dal fatto che l'intervallo di confidenza (ic) al 95% include lo zero con estremo inferiore denominato  $ic\_inf$  ed estremo superiore denominato  $ic\_sup$ .

Intervallo di confidenza = [-0.0440: 0.2659].



Quest'ultimo è un intervallo di tipo t con approssimazione di Satterthwaite [128].  
L'intervallo di confidenza è stato determinato tramite:

$$\bar{x} - \bar{y} \pm t_{\alpha/2}(v) \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \quad (6.24)$$

$t_{\alpha/2}(v)$  indica il quantile, calcolato con la funzione **tinu** di Matlab.

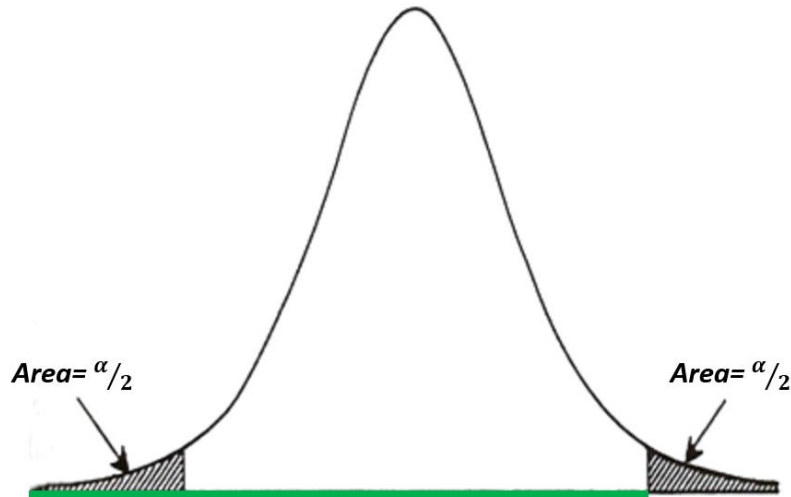


Figura 6.17: Densità  $t$  di Student. In verde, la zona dell'area  $p$  pari a  $1 - \alpha/2$ .

### 6.1.6 Risultati per campioni omogenei

I risultati mostrati in Fig. (6.9), (6.10), (6.12), (6.13), (6.14), sono tutti soddisfacenti in quanto dimostrano l'efficacia del trattamento di Cross-linking del collagene corneale che aumenta la rigidità del tessuto corneale di ciascuna delle 10 cornee prese in esame.

In questo paragrafo si vogliono mostrare i risultati inerenti a due campioni omogenei derivati dal campione disomogeneo di partenza. Si ricorda che in quest'ultimo sono stati considerati i dati topografici delle 10 cornee affette da KC pre e post trattamento effettuato sia secondo procedura *Epi-Off* che *i-Epi-On*, in cui differiscono le tempistiche di acquisizione dell'esame di topografia corneale successivo all'intervento. Pertanto, si sono analizzati due gruppi di cornee cheratoconiche trattate con la stessa tipologia di intervento, le cui acquisizioni topografiche post-CXL risalgono al medesimo periodo temporale. Per entrambi i campioni corneali, si sono calcolati i moduli elastici prima e dopo il trattamento parachirurgico di CXL, il lavoro compiuto dal tessuto corneale e la variazione di energia oculare indotta dalla terapia di cross-linking. Il calcolo segue quanto già mostrato da appendice A.1 ad appendice A.6 e descritto dal sottoparagrafo 6.1.1 a 6.1.4.

Il primo gruppo omogeneo è costituito dalle cornee dei pazienti indicati come numero 1, 4 e 5 nel paragrafo 6.1.3 in cui si stima il modulo elastico stromale. Questi occhi cheratoconici sono stati trattati presso l'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria tramite procedura *Epi-Off* con rimozione dell'epitelio. La stima dei moduli elasticità stromale relativi

alla condizione tissutale dopo aver subito il CXL è stata eseguita con dai topografici corneali acquisiti a un solo mese dall'intervento. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Paziente n.	E_pre in Mpa	Paziente n.	E_post in Mpa	Paziente n.	E_eq in MPa
1	0.573	1	1.239	1	1.124
4	0.624	4	1.112	4	1.079
5	0.711	5	1.342	5	1.231

Figura 6.18: Da sinistra: moduli elastici di cornee affette da KC prima dell'intervento, moduli elastici delle cornee affette da KC 1 mese dopo Epi-Off CXL, moduli elastici delle cornee equivalenti alla porzione di tessuto corneale effettivamente trattate tramite CXL derivati dalla (5.50).

I valori dimostrano l'aumento di rigidità corneale a seguito del cross-linking con un aumento percentuale pari a:

Paziente n.	Aumento %
1	96.02
4	72.94
5	73.10

Figura 6.19: aumento percentuale della rigidità stromale delle 3 cornee colpite da cheratocono a seguito dell'Epi-Off CXL. È evidente che per tutte le cornee si è riscontrato un aumento di rigidità tissutale rilevante e significativo, maggiore del 72% in tutti i casi.

Attraverso approccio termofisico descritto nel paragrafo 6.1.4 si è ottenuto il lavoro compiuto dalle 3 cornee analizzate e la variazione di energia oculare a seguito delle sollecitazioni termiche indotte dall'irraggiamento con luce UV di tipo A:

Paziente n.	Lavoro compiuto dal tessuto corneale [J]	Paziente n.	Variazione di energia oculare [J]
1	1.058	1	2.376
4	2.421	4	1.014
5	2.179	5	1.255

Figura 6.20: A sinistra, lavoro meccanico espresso in Joule compiuto da ciascuna delle 3 cornee affette da KC a seguito di Epi-Off CXL. A destra, variazione di energia oculare dallo stato corneale pretrattato a quello post-trattato.

Il secondo gruppo omogeneo che è stato considerato consta di due cornee affette da KC (pazienti n. 7 e 9 del paragrafo 6.1.3) trattate tramite la procedura di iontoforesi (*i-Epi-On*), i cui parametri elastici ed energetici sono stati stimati considerando i dati topografici a 4 mesi dal trattamento.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Paziente n.	E_pre in Mpa	Paziente n.	E_post in Mpa	Paziente n.	E_eq in MPa
7	0.516	7	0.941	7	0.932
9	0.800	9	1.435	9	1.416

Figura 6.21: Da sinistra: moduli elastici di cornee affette da KC prima dell'intervento, moduli elastici delle cornee affette da KC 4 mesi dopo *i-Epi-On CXL*, moduli elastici delle cornee equivalenti alla porzione di tessuto corneale effettivamente trattate tramite *CXL* derivati dalla (5.50).

Anche in questo caso i valori dimostrano l'aumento di rigidità corneale a seguito del cross-linking con un aumento percentuale pari a:

Paziente n.	Aumento %
7	80.62
9	76.98

Figura 6.22: aumento percentuale della rigidità stromale delle 2 cornee colpite da cheratocono a seguito dell'*i-Epi-On CXL*. È evidente che per tutte le cornee si è riscontrato un aumento di rigidità tissutale rilevante e significativo, maggiore del 76% in tutti i casi.

Attraverso approccio termofisico descritto nel paragrafo 6.1.4 si è ottenuto il lavoro compiuto dalle 2 cornee analizzate e la variazione di energia oculare a seguito delle sollecitazioni termiche indotte dall'irraggiamento con luce UV di tipo A:

Paziente n.	Lavoro compiuto dal tessuto corneale [J]	Paziente n.	Variazione di energia oculare [J]
7	2.298	7	1.137
9	2.772	9	0.663

Figura 6.23: A sinistra, lavoro meccanico espresso in Joule compiuto da ciascuna delle 2 cornee affette da KC a seguito di *i-Epi-On CXL*. A destra, variazione di energia oculare dallo stato corneale pretrattato a quello post-trattato.

## 6.2 Mappe corneali patologiche

In quest'ultimo paragrafo si vogliono evidenziare graficamente le differenze geometriche della superficie corneale a seguito del trattamento di Cross-Linking. In appendice A.8 viene riportato il codice Matlab che ha permesso di simulare graficamente la superficie anteriore dell'occhio del paziente numero 1 di anni 19, la cui cornea destra affetta da cheratocono è stata trattata presso il Dipartimento di Oculistica dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria tramite procedure Epi-Off CXL.

La superficie è stata ricostruita settando ogni punto della mappa di elevazione anteriore acquisita tramite topografo corneale. La mappa di elevazione rappresenta l'altezza della superficie anteriore della cornea rispetto ad una superficie di riferimento sferica (best-fit) in cui le differenze vengono rappresentate in micron.

Segue la rappresentazione grafica della cornea affetta del cheratocono del paziente 1 di questo studio:

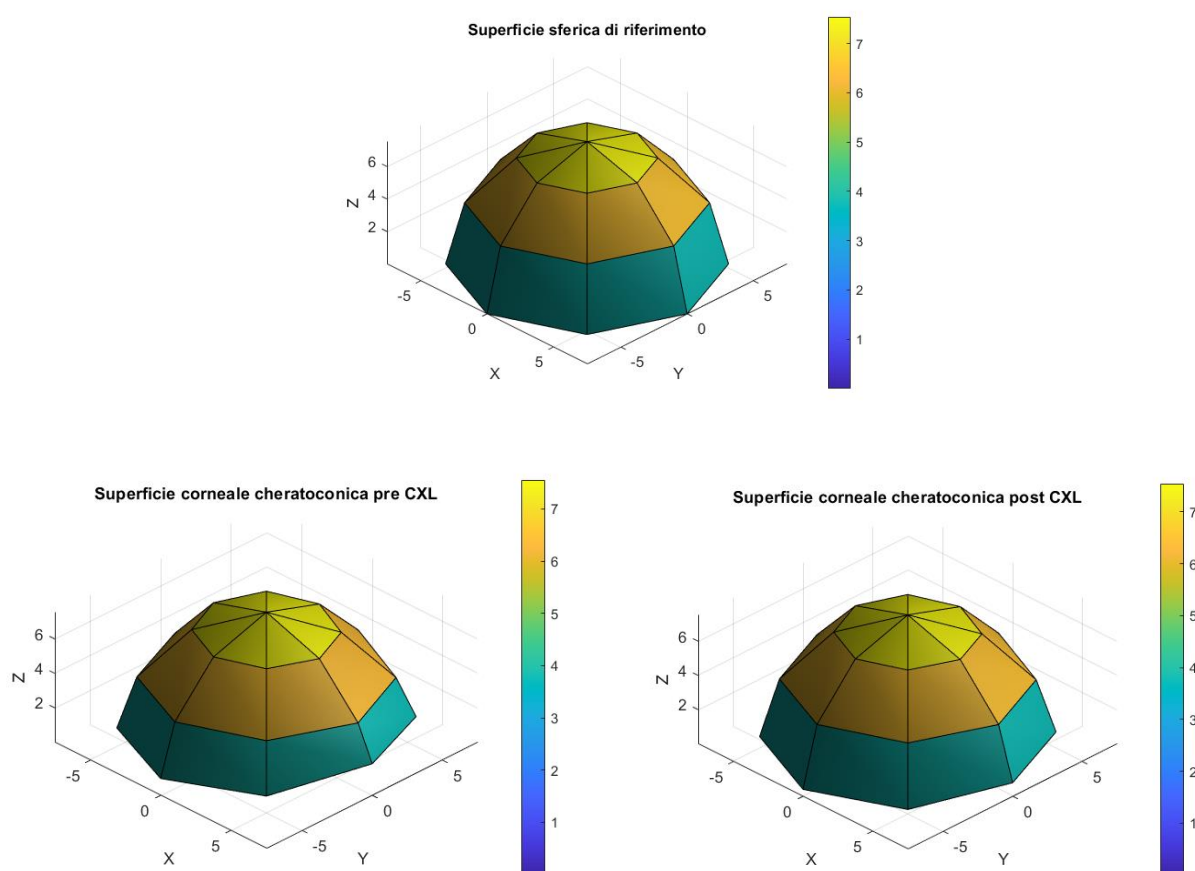


Figura 6.24: In alto, superficie sferica di riferimento: in basso a sinistra, superficie corneale affetta da KC pretrattamento; in basso a destra, superficie corneale affetta da KC a 3 mesi dal trattamento di CXL.

Guardando la figura si può apprezzare come la superficie corneale appaia irregolare quando colpita da cheratocono, ma allo stesso tempo, si vede come solo dopo 3 mesi dal Cross-linking del collagene corneale, la cornea appaia geometricamente più regolare e simile alla superficie di riferimento.

## CONCLUSIONE

Le fonti letterarie e i risultati ottenuti dal modello meccanico studiato e utilizzato in questo lavoro di tesi dimostrano l'efficacia del trattamento parachirurgico di Cross-Linking del collagene corneale. Il CXL mediato da vitamina B2 e raggi UV-A porta alla formazione di nuovi ponti di legame tra le lamelle dello stroma corneale, inducendo un aumento di rigidità nel tessuto corneale in tutti i casi. Questo incremento è apprezzabile anche a distanza di solo un mese dall'intervento. Dai valori numerici di modulo elastico di Young, stimati attraverso il listato di codice Matlab mostrato in appendice, emerge che non esiste una differenza significativa tra la rigidità stromale risultante dalla procedura di *Epi-Off* CXL e quella di *i-Epi-On* CXL (iontoforesi).

Il protocollo CXL accelerato in modalità continua adottato presso il Dipartimento di Oculistica dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria in cui viene esposta un'area circolare di 9 mm di diametro di cornea affetta da KC per 9 min alla luce UV-A con lunghezza d'onda di 370 nm, utilizzando una potenza di irradiazione per unità di area di 10 mW/cm<sup>2</sup>, mostra risultati soddisfacenti in caso di pazienti con cornee cheratoconiche in stadio evolutivo. In futuro si mira a raccogliere un numero di dati geometrici corneali derivati dall'esame di topografia corneale maggiore, in modo da poter effettuare un campionamento più omogeneo e divisibile in più casistiche comuni (sesso, età, stadiazione del cheratocono, tempistiche di intervento). L'aumento della numerosità del campione, da sottoporre a studio biomeccanico, è utile anche al fine di effettuare una statistica maggiormente dettagliata rispetto a quanto ottenuto in questo lavoro, rendendo i risultati confrontabili con quanto presente in letteratura senza dover adottare particolari tecniche di sotto campionamento.

Prendendo in considerazione i dati di variazione di energia oculare ricavati tramite approccio termofisico, essi possono essere sottoposti ad un approfondimento di natura biochimica mirato a una più completa comprensione della natura della dipendenza dell'energia interna della cornea e delle conseguenze fisiologiche a livello della camera anteriore, a seguito di sollecitazione termica indotta dal trattamento di cross-linking del collagene corneale.

Quello che si evince dai risultati delle simulazioni analitico-numeriche presentate nell'elaborato è che il compimento di lavoro positivo da parte del tessuto corneale si traduce in una risposta efficace del tessuto stesso alla terapia fotochimica, basata sull'azione combinata della Riboflavina diffusa attraverso uno spessore corneale di 400 µm e dei raggi ultravioletti di tipo A. Pertanto, si deduce che in tutte le 10 cornee analizzate in questo studio si sia verificato un aumento dei legami interfibrillari delle lamelle di collagene, irrobustendo la struttura della cornea.

È importante sottolineare che il cross-linking del collagene corneale risulta ad oggi l'unico trattamento per la cura del cheratocono capace di arrestare la progressione dello stesso, ma la ricerca in questo campo è in continua evoluzione, partendo dalla scelta della migliore sostanza fotosensibilizzante al protocollo più sicuro ed efficace da attuare in sala operatoria a livello di dose energetica totale fornita alla cornea colpita da KC sottoposta all'azione dei raggi UV.

# BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] L. B. F. B. e. a. G. Barbatelli, «ANATOMIA UMANA: Fondamenti: con istituzioni di istologia,» Edi.Ermes, 2018.
- [2] G. B. G. A. C. e. a. M. Bentivoglio, ANATOMIA UMANA & ISTOLOGIA, Torino: Edizioni Minerva Medica S.p. A., 2010.
- [3] «Structure of Human Eye,» Vision Technician.
- [4] R. Diabete, «Com'è fatto il nostro occhio?,» 2022. [Online]. Available: <https://www.diabete.com/come-fatto-il-nostro-occhio/>.
- [5] B. A. S. Bruce M. Koeppen, FISILOGIA, Casa Editrice Ambrosiana, 2019.
- [6] «Camere oculari,» Dynoptic, [Online]. Available: <https://www.dynoptic.ch/it/da-sapere/l-occhio/anatomia/camere-oculari.php#:~:text=La%20camera%20oculare%20anteriore%20pi%C3%B9,iride%20e%20posteriormente%20dal%20cristallino.>
- [7] G. Bertelli, «Umor Acqueo,» [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/umor-acqueo.html>.
- [8] T. Farma, «Anatomia dell'occhio,» [Online]. Available: <https://www.thea.it/patologie-delloocchio/anatomia-occhio/>.
- [9] T. D. Frederick H. Silver, «Measurement of the Elastic Modulus of Cornea, Sclera and Limbus:The Importance of the Corneal-Limbus-Scleral Biomechanical Unit,» *Front. Biosci. (Schol Ed)*, 2022.
- [10] [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/pressione-oculare.html> .
- [11] [Online]. Available: <https://www.gruposandonato.it/news/2023/marzo/tonometria-oculare-cos-e-a-cosa-serve> .
- [12] G. Asimellis, Visual Optics, Bellingham, Washington USA: SPIE PRESS, 2022.
- [13] M. Idrees, «FUNDAMENTAL OPTICS OF THE HUMAN EYE AND AGING EFFECTS ON VISUAL ACUITY: AN OVERVIEW,» *International Journal of Preclinical & Pharmaceutical Research*, 2015.
- [14] «DIOTTRIE E DECIMI: COSA SONO E COSA MISURANO,» [Online]. Available: <https://www.fasda.it/diottrie-e-decimi/>.
- [15] «Percezione dei colori: come funziona la vista umana,» CORBS centro sulistico refrattivo bresciano, 2019. [Online]. Available: <http://www.corbs.it/blog/curiosita/percezione-dei-colori-come-funziona-la-vista-umana>.
- [16] V. Pasquali, «L'OCCHIO UMANO E LA FOTOCAMERA: UN PARALLELO,» 2017. [Online]. Available: <https://www.nadir.it/tecnica/COLORIMETRIA/visione-umana-spazi-colore.htm>.
- [17] «Occhio umano e macchina fotografica: analogie, differenze e caratteristiche,» [Online]. Available: <https://www.fotografareperstupire.com/occhio-umano-e-macchina-fotografica/#:~:text=Le%20palpebre%2C%20da%20sempre%20decidono,retina%20C3%A8%20il%20nostro%20sensore..>
- [18] I. I. Wikipedia, «Luce,» [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Luce>.
- [19] E. C. T. Network, «La luce e la materia,» [Online]. Available: <http://www.whatischemistry.unina.it/it/lucecolor.html>.
- [20] H. G. M. D. Shreyas Angcheekar, «An overview study of various re-coloring and wavelength adjustment algorithm for color vision deficient individuals,» 2017.
- [21] G. D. i. G. d. C. . 2. O. 2012, «Percezione del Colore, Modello HSB e CIE1931, Diagramma delle Cromaticità,» *Gestione del Colore*, 2012. [Online]. Available: <https://gabrieledanesi.com/blog/?percezione-colore-modello-cie1931-diagramma-cromaticita#:~:text=Come%20risultato%20dell'assorbimento%2C%20i,sono%20detti%20Segnali%20di%20Tristimolo..>
- [22] I. I. Wikipedia, «Emmetropia,» [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Emmetropia>.
- [23] M. Idrees, «Fundamental optics of the human eye and aging effects on visual acuity: an overview,» *International Journal of Preclinical & Pharmaceutical Research*, 2015.
- [24] «I vizi di refrazione,» [Online]. Available: <https://www.grvision.com/i-vizi-di-refrazione/#:~:text=Nei%20difetti%20di%20refrazione%20le,l'astigmatismo%20e%20la%20presbiopia.>
- [25] «Chirurgia refrattiva: come correggere miopia, astigmatismo, ipermetropia e presbiopia,» 2021. [Online]. Available: <https://iapb.it/chirurgia-refrattiva/>.
- [26] D. K. Dhaliwal, «Panoramica sui difetti di rifrazione,» 2022. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-oculari/difetto-di-rifrazione/panoramica-sui-difetti-di-rifrazione>.
- [27] A. Pandolfi, «Modeling of the Human Cornea,» 2018.
- [28] I. I. Da Wikipedia, «Cornea,» [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Cornea#:~:text=La%20cornea%20anteriormente%20C3%A8%20coperta,un%20lieve%20solco%20detto%20limbo..>

- [29] M. S. Sridhar, «Anatomy of cornea and ocular surface,» *Indian Journal of Ophthalmology*, 2018.
- [30] M. W. J. A. M. R. a. W. J. D. Brecken J. Blackburn, «A Review of Structural and Biomechanical Changes in the Cornea in Aging, Disease, and Photochemical Crosslinking,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019.
- [31] F. C. F. e. a. HOMAS L. A. VOLATIER, «Keratoconus at a Molecular Level: A Review,» *THE ANATOMICAL RECORD*, 2020.
- [32] D. E. B. Edgar M. Espana, «Composition, structure and function of the corneal stroma,» *Experimental Eye Research*, 2020.
- [33] Y. K. a. T. Ushik, «The Three-Dimensional Organization of Collagen Fibrils in the Human Cornea and Sclera,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1991.
- [34] A. Pandolfi, «Computational Biomechanics of the Human Cornea,» 2014, p. Chapter 15.
- [35] C. B. Keith M. Meek, «The organization of collagen in the corneal stroma,» *Experimental Eye Research*, 2004.
- [36] W. Kokott, «Übermechanisch-funktionelle Strikturen des Auges.,» *Albrecht von Graefes Arch. Ophthalmol*, 1938.
- [37] A. D. a. P. Fratzl, «Collagen Fibril Orientation in the Human Corneal Stroma and Its Implication in Keratoconus,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1997.
- [38] R. H. N. a. K. M. Meek, «The Integration of the Corneal and Limbal Fibrils in the Human Eye,» *Biophysical Journal*, 1998.
- [39] K. M. M. a. R. H. Newton, «Organization of collagen fibrils in the corneal stroma in relation to mechanical properties and surgical practice.,» *Journal of Refractive Surgery*, 1999.
- [40] T. B. e. a. Keith M.Meek, «The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study,» *Current Eye Research*, 1987.
- [41] A. P. a. G. A. Holzapfel, «Three-Dimensional Modeling and Computational Analysis of the Human Cornea Considering Distributed Collagen Fibril Orientations,» *Journal of Biomechanical Engineering*, 2008.
- [42] A. Pandolfi, «Cornea modelling,» *Eye and Vision*, 2020.
- [43] D. Antonio Calossi, «Corneal Asphericity and Spherical Aberration,» *Journal of Refractive Surgery*, vol. 23, 2007.
- [44] A. J. T. R. C. & T. B. J. Bron, Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. Eighth Edition., London, 2001.
- [45] D. A. M. P. L. W. Forrester J, «The eye: basic sciences in practice.,» *W. B. Saunders, London*, 1999.
- [46] D. Ljubimova, «Biomechanics of the Human Eye and Intraocular Pressure Measurements,» 2009.
- [47] W. H. v. d. H. R. V.-D. H. Dubbelman M, «Radius and asphericity of the posterior corneal surface determined by corrected Scheimpflug photography,» *Acta Ophthalmol Scand* 80:379–383, vol. 80, p. 379–383, 2002.
- [48] G. F. F. M. Anna Pandolfi, «Finite element simulations of laser refractive corneal surgery,» *Engineering with Computers*, 2009.
- [49] A. P. Irene Simonini, «Customized Finite Element Modelling of the Human Cornea,» *PLOS ONE*, 2015.
- [50] R. Navarro, «The Optical Design of the Human Eye: a Critical Review,» *J Optim*, 2009.
- [51] [Online]. Available: <https://www.sedesoi.com/occhio-vista-accomodazione/>.
- [52] T. Olsen, «Calculation of intraocular lens power: a review,» *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 2007.
- [53] G. C. e. a. Jacinto Santodomingo-Rubido, «Keratoconus: An updated review,» *Contact Lens and Anterior Eye*, 2022.
- [54] R. Y. e. a. Wang Y, «Genetic epidemiological study of keratoconus: Evidence for major gene determination.,» *Am J Med Genet*, 2000.
- [55] A. G. e. a. Joyce J. Mathan, «Topographic screening reveals keratoconus to be extremely common in Down syndrome,» *Clin Experiment Ophthalmol*, 2020.
- [56] G. B. e. a. Ishith Seth, «The association between keratoconus and allergic eye diseases: A systematic review and meta-analysis,» *Clin Experiment Ophthalmol*, 2023.
- [57] F. C. F. e. a. THOMAS L. A. VOLATIER, «Keratoconus at a Molecular Level: A Review,» *THE ANATOMICAL RECORD*, 2020.
- [58] E. M. S. Debora Conti, «EFFETTO DEL CROSS-LINKING TERAPEUTICO SULLA BIOMECCANICA CORNEALE: INDAGINE SPERIMENTALE IN-VITRO E MODELLAZIONE NUMERICA,» Politecnico di Milano, 2019.
- [59] [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/cheratocono.html>.
- [60] [Online]. Available: <https://polivisus.com/vetsservices/tomografia-corneale/>.



- [61] [Online]. Available: [https://www.amedeolucente.it/pdf/CIRRUS\\_HD-OCT\\_brochure\\_it.pdf](https://www.amedeolucente.it/pdf/CIRRUS_HD-OCT_brochure_it.pdf).
- [62] [Online]. Available: <https://www.sedesoi.com/vademecum-cheratocono/>.
- [63] «CHERATOCONO PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO ASSISTENZIALE.» Ospedale Oftalmico e Policlinico “Umberto I”, 2012.
- [64] [Online]. Available: <https://www.assoheratocono.org/il-cheratocono/classificazione.html>.
- [65] [Online]. Available: <http://www.lentipercheratocono.it/Lenti-Cheratocono.html>.
- [66] [Online]. Available: <https://www.gaspamonaco.it/cheratocono/cura-cheratocono/>.
- [67] [Online]. Available: <https://www.assoheratocono.org/images/INFOinVISTA.pdf>.
- [68] [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/salute/cross-linking-corneale.html>.
- [69] [Online]. Available: <https://www.amedeolucente.it/cross-linking.html>.
- [70] E. A. e. a. PAOLO VINCIGUERRA, «wo-Year Corneal Cross-Linking Results in Patients Younger Than 18 Years With Documented Progressive Keratoconus.» *E LSEVIER I NC. ALL RIGHTS RESERVED*, 2012.
- [71] T. R. e. a. Philip Maier, «Corneal Collagen Cross-Linking in the Stabilization of Keratoconus.» *Deutsches Ärzteblatt International | Dtsch Arztebl Int*, 2019.
- [72] E. S. e. a. Gregor Wollensak, «Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit.» *J Cataract Refract Surg*, 2003.
- [73] G. W. e. a. Eberhard Spoerl, «increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion.» *Curr Eye Res*, 2004.
- [74] R. M. Leopoldo Spadea, «Transepithelial corneal collagen cross-linking in ultrathin keratoconic corneas.» *Clinical Ophthalmology*, 2012.
- [75] A. i. Cheratoconici, «Cheratocono e la sua terapia.» [Online]. Available: <https://www.assoheratocono.org/images/INFOinVISTA.pdf>.
- [76] [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Riboflavina>.
- [77] [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Flavine>.
- [78] J. B. R. Marcony R. Santhiago, «The biology of corneal cross-linking derived from ultraviolet light and riboflavin.» *Experimental Eye Research*, 2020.
- [79] R. S. e. a. Sami Saad, «Corneal crosslinking in keratoconus management.» *Elsevier*, 2020.
- [80] M. D. F. e. a. Pavel Kamaev, «Photochemical Kinetics of Corneal Cross-Linking with Riboflavin.» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012.
- [81] S. T. e. a. Vishal Vohra, «Collagen Cross Linking for Keratoconus.» *StatPearls*, 2023.
- [82] [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Cross-linking>.
- [83] M. M. e. a. F. Cifariello, «Epi-Off versus Epi-On Corneal Collagen Cross-Linking in Keratoconus Patients: A Comparative Study through 2-Year Follow-Up.» *Journal of Ophthalmology*, 2018.
- [84] R. L. E. Ciro Caruso, «Topography and Pachymetry Guided, Rapid Epi-on Corneal Cross-Linking for Keratoconus: 7-year Studt Results.» *Cornea*, 2019.
- [85] C. C. e. al., «Corneal Cross-Linking for Keratoconus: Current Knowledge and Practice and Future Trends.» *Asia-Pacific Academy of Ophthalmology*, 2020.
- [86] [Online]. Available: [https://www.treccani.it/enciclopedia/roscoe-sir-henry-enfield\\_%28Dizionario-delle-Scienze-Fisiche%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/roscoe-sir-henry-enfield_%28Dizionario-delle-Scienze-Fisiche%29/).
- [87] S. O. I. (SOI), «SCHEDE INFORMATIVE PER INTERVENTO DI UV-A CROSS-LINKING CORNEALE (CXL),» 2019.
- [88] [Online]. Available: <https://www.assoheratocono.org/images/studio-clinico-CLX-iontoforesi.pdf>.
- [89] [Online]. Available: <https://www.stefanoferrandi.it/cross-linking-con-iontoforesi/>.
- [90] [Online]. Available: <https://albertobellone.it/iontoforesi/>.
- [91] [Online]. Available: [https://www.optomedica.com/wp-content/uploads/Vega\\_CBM\\_X\\_LINKER\\_ITA.pdf](https://www.optomedica.com/wp-content/uploads/Vega_CBM_X_LINKER_ITA.pdf).
- [92] [Online]. Available: [https://servimed-industrial.it/wp-content/uploads/CXL-Brochure-2021\\_ITA\\_Iq.pdf](https://servimed-industrial.it/wp-content/uploads/CXL-Brochure-2021_ITA_Iq.pdf).
- [93] I. group, *CF X\_LINKER, Manuale Utente*.
- [94] R. L. E. e. a. Ciro Caruso, «Customized Corneal Cross-Linking— A Mathematical Model.» *Cornea*, 2017.
- [95] CSO, *Manuale Phoenix*.

- [96] K. T. Uma Sridhar, «Corneal Topography,» *StatPearls*, 2022.
- [97] T. C. C. F. e. a. Rachel Fan MBBS, «Applications of corneal topography and tomography: a review,» *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2018.
- [98] D. P. Pinero, «Technologies for Anatomical and Geometric Characterization of the Corneal Structure and Anterior Segment: A Review,» *Seminars in Ophthalmology*, 2015.
- [99] B. H. F. Gaurav Prakash, «Corneal Topography,» *America Academy of Ophthalmology*, 2023.
- [100] [Online]. Available: <https://www.aktivision.it/servizi-diagnostici/topografia-corneale/>.
- [101] [Online]. Available: <https://www.csoitalia.it/app/public/files/prodotto/sirius.pdf>.
- [102] N. K. T. e. al, «Assessment of Radial Aspheres by the Arc-Step Algorithm as Implemented by the Keratron Keratoscope,» *AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY*, 1995.
- [103] [Online]. Available: [https://www.optomedica.com/wp-content/uploads/Sirius\\_ITA.pdf](https://www.optomedica.com/wp-content/uploads/Sirius_ITA.pdf).
- [104] S. Francia, *Cheratocono: problematiche cliniche, diagnostiche e terapeutiche in relazione alle proprietà fisiche della cornea*, Politecnico di Torino, 2018.
- [105] «Manuale Utente, PHOENIX v.3.0 – CSO srl».
- [106] P. F. A. Q. e. a. Nery Garcia-Porta, «Corneal Biomechanical Properties in Different Ocular Conditions and New Measurement Techniques,» *ISRN Ophthalmology*, 2014.
- [107] K. W. a. Z. L. Fanshu Li, «In Vivo Biomechanical Measurements of the Cornea,» *Bioengineering*, 2023.
- [108] G. Holzapfel, «Biomechanics of Soft Tissue,» *BIOMECH PREPRINT SERIES*, n. 7, 2000.
- [109] P. F. A. Q. e. a. Nery Garcia-Porta, «Corneal Biomechanical Properties in Different Ocular Conditions and New Measurement Techniques,» *ISRN Ophthalmology*, 2014.
- [110] R. D. W. I. A. A. P. D. R. M. H. Abyaneha, «A hybrid approach to determining cornea mechanical properties in vivo using a combination of nano-indentation and inverse finite element analysis,» *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2013.
- [111] X. L. F. B. e. a. JunJie Wang, «Review of ex-vivo characterisation of corneal biomechanics,» *Medicine in Novel Technology and Devices II*, vol. 11, 2021.
- [112] A. E. a. K. Anderson, «Comparative study of corneal strip extensometry and inflation tests,» *The Royal Society Interface*, vol. 2, p. 177–185, 2005.
- [113] D. C. M. S. C. M. A. P. Federica Boschetti, «Experimental in-vitro investigation on Epi-Off-Crosslinking on porcine corneas,» *PLOS ONE*, 2021.
- [114] L. R. A. P.-E. J. M.-L. a. S. M. Sabine Kling, «Corneal Biomechanical Changes after Collagen Cross-Linking from Porcine Eye Inflation Experiments,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 51, n. 8, 2010.
- [115] S. A. R. T. G. S. e. a. Isaak Fischinger, «Analysis of Biomechanical Response After Corneal Crosslinking with Different Fluence Levels in Porcine Corneas,» *Taylor & Francis Group*, 2023.
- [116] R. M. F. U. I. F.-B. Irene Sanchez, «The parameters of the porcine eyeball,» *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, vol. 249, p. 475–482, 2011.
- [117] I. T. O. T. Shuichiro Hayashi, «Comparative observations on corneas, with special Reference to Bowman's Layer and Descemet's Membrane in Mammals and Amphibians,» *JOURNAL OF MORPHOLOGY* 254:247–258 (2002), p. 254:247–258, 2002.
- [118] J. Y. e. a. Yanjun Zenga, «A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea,» *Journal of Biomechanics* 34 (2001) 533–537, n. 34, p. 533–537, 2001.
- [119] \*. D. A. a. P. R. Ahmed Elsheikh a, «Biomechanical properties of human and porcine corneas,» *Experimental Eye Research*, pp. 783-790, 2008.
- [120] M. B. D. A. e. a. Ahmed Elsheikh, «Experimental Assessment of Corneal Anisotropy».
- [121] V. T. L. S. A. P. F. Boschetti, «Mechanical Characterization of Porcine Corneas,» *Journal of Biomechanical Engineering*, 2012.
- [122] S. Timoshenko, *Theory of plates and shells*, 1989.
- [123] J. E. Gibson, *Thin shells: computing and theory*, Oxford, 1980.
- [124] A. E.-S. a. T. N. Kevin Anderson, «Application of structural analysis to the mechanical behaviour of the cornea,» *The Royal Society*, 2004.
- [125] F. B. C. M. A. P. Aram Cornaggia, «Numerical investigation on epi-off crosslinking effects on porcine corneas,» *Mechanics of Soft Materials*, 2020.
- [126] G. W. F. R. A. P. a. E. S. C. Mazzotta, «The Meaning of the Demarcation Line after Riboflavin-UVA Corneal Collagen Crosslinking,» *Expert Rev. Ophthalmol*, vol. 14, pp. 115-131, 2019.

- [127] G. G. e. a. Umberto Lucia, «Theoretical biophysical approach to cross-linking effects on eyes pressure,» *Physica A*, 2019.
- [128] M. Gasparini, *Modelli probabilistici e statistici*, Torino: CLUT, 2014.
- [129] [Online]. Available: [https://it.wikipedia.org/wiki/Coefficiente\\_di\\_determinazione](https://it.wikipedia.org/wiki/Coefficiente_di_determinazione).
- [130] S.-C. L. e. a. Arthur J. Sit, «In Vivo Non-Invasive Measurement of Young's Modulus of Elasticity in Human Eyes: A Feasibility Study,» *J Glaucoma*, 2017.
- [131] J. D. e. al, «Anterior and posterior corneal stroma elasticity after corneal collagen crosslinking treatment,» *Experimental Eye Research*, 2013.
- [132] A. Pandolfi, «Modeling of the Human Cornea».
- [133] B. T. Long-yuan Li \*, «The anisotropic material constitutive models for the human cornea,» vol. 153 , 2006.
- [134] S. T. a. M. Talu, «An Overview on Mathematical Models of Human Corneal Surface,» *MEDITECH*, n. 26, p. pp. 291–294, 2009.
- [135] F. M. A. Pandolfi, «A model for the human cornea: constitutive formulation and numerical analysis,» *Biomechan Model Mechanobiol*, 2006.
- [136] P. Ahmed Elsheikh, M. Defu Wang e M. David Pye, «Determination of the Modulus of Elasticity of the Human Cornea,» *J Refract Surg.*, 2007.
- [137] T. R. e. a. Philip Maier, «Corneal Collagen Cross-Linking in the Stabilization of Keratoconus,» *Deutsches Ärzteblatt International | Dtsch Arztebl Int* , 2019.
- [138] E. T. e. a. Leopoldo Spadea, «Corneal stromal demarcation line after collagen cross-linking in corneal ectatic diseases: a review of the literature,» *Clinical Ophthalmology* , 2016.
- [139] [Online]. Available: [https://it.wikipedia.org/wiki/Coefficiente\\_di\\_determinazione](https://it.wikipedia.org/wiki/Coefficiente_di_determinazione).

## APPENDICE: CODICE MATLAB

Lo scopo di questa appendice è di fornire al lettore un utile riferimento del codice Matlab utilizzato per la stima di rigidità dello stroma corneale del campione considerato (10 pazienti in cura presso il Dipartimento di Oculistica dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria). Tramite il seguente listato di codice è possibile vedere come si è calcolato il modulo elastico di Young delle 10 cornee prima e dopo il trattamento, come è stata svolta una comparazione di natura statistica con i dati presenti in letteratura relativi a prove sperimentali *in vitro* e, infine come si è stimato il lavoro compiuto dal tessuto corneale. Quest'ultimo è stato considerato come variazione delle condizioni elastiche prima e dopo il trattamento parachirurgico.

### A.1 Dati geometrici

```
close all
clear variables
clc
format long e
% Dati utili al calcolo del modulo elastico pre e post CXL ricavati direttamente dalla
lettura delle mappe topografiche corneali

% Raggi di curvatura
rf_a_pre=[45.54, 47.43, 47.16, 43.19, 41.68, 49.27, 46.76, 44.07, 36.56, 32.23];
%raggio di curvatura anteriore dei pazienti pre-CXL in diottrie
rf_p_pre=[-6.47,-7.33,-7.22, -5.99, -5.81, -5.72, -6.46, -6.56,-4.55, -4.10]; %raggio
di curvatura posteriore dei pazienti pre-CXL in diottrie
rf_a_post=[43.99, 48.00, 49.11, 44.18, 42.16, 48.41, 43.66, 44.22, 36.37, 32.92];
%raggio di curvatura anteriore dei pazienti post-CXL in diottrie
rf_p_post=[-6.55,-6.87,-7.17, -5.94, -4.88, -6.18, -6.56, -6.79, -4.82, -4.46]; %raggio
di curvatura posteriore dei pazienti post-CXL in diottrie

% Potere diottrico totale
rf_pre=rf_a_pre+rf_p_pre;
rf_post=rf_a_post+rf_p_post;

% Conversione dei raggi in mm
n0=1; %indice di rifrazione aria
n1=1.3375; %indice di rifrazione cheratometrico
R_pre=((n1-n0)./rf_pre); %raggi di curvatura della superficie corneale dei 10 pazienti
analizzati pre-CXL
R_post=((n1-n0)./rf_post);%raggi di curvatura della superficie corneale dei 10 pazienti
analizzati post-CXL

% Spessori medi in metri

t_pre= [511, 431, 445, 518, 489, 457, 509, 480, 542, 690].*10^-6;
t_post= [409, 378, 377, 463, 403, 448, 410, 450, 525, 658].*10^-6;

% Raggio in piano dell'area corneale su cui è stata calcolato il raggio di curvatura
S=3*10^-3; %espresso in metri (diametro pari a 6 mm)
```

### A.2 Pressioni intraoculari

```
% Pressioni intraoculari in mmHg dei pazienti
IOP= [16, 8, 14, 16, 16, 16, 14, 16, 15, 14]';
```

### A.3 Modello di regressione lineare

```
% Modello di regressione lineare per determinazione dello spostamento apicale corneale
dalla letteratura
% spostamento apicale nella forma:  $w=b_0+b_1*Pressione$ 

%DATI LETTERATURA
%pressioni in mmHg
P=[1.839, 4.045, 6.252, 8.459, 10.665, 12.872, 15.078, 17.285, 19.492, 21.698, 23.905,
26.112, 28.318, 30.525 ]';
% cornee non trattate
x=[1, 37, 65, 87, 105, 124, 138, 155, 168, 184, 195, 208, 220, 233]';
x=x*10^-3;%spostamento apicale in mm delle cornee NON trattate
n=length(x);
X=[ones(n,1),P]; %design matrix (matrice delle osservazioni)

beta_notratt=(inv(X'*X))*X'*x;
xstar=X*beta_notratt; %valore predetto della variabile dipendente
Rsqr_notratt= 1 - sum((x - xstar).^2)/sum((x- mean(x)).^2);%coefficiente di
determinazione

%provo regressione lineare del tipo  $x=P*b_1$  (senza intercetta)

beta1_notratt=(inv(P'*P))*P'*x;
xstar1=P*beta1_notratt;
Rsqr1_notratt=1 - sum((x - xstar1).^2)/sum((x- mean(x)).^2);

%SCELTA DEL MODELLO PER LE CORNEE TRATTATE CON CXL
% cornee trattate
w=[1, 18, 30, 47, 58, 69, 83, 93, 104, 113, 120, 127, 136, 145]';
w=w*10^-3; %spostamento apicale in mm delle cornee trattate
beta=(inv(X'*X))*X'*w;
wstar=X*beta; %valore predetto della variabile dipendente
Rsqr = 1 - sum((w - wstar).^2)/sum((w- mean(w)).^2); %coefficiente di determinazione

%provo regressione lineare del tipo  $w=IOP*b_1$  (senza intercetta)
beta1=(inv(P'*P))*P'*w;
wstar1=P*beta1;
Rsqr1=1 - sum((w - wstar1).^2)/sum((w- mean(w)).^2); %coefficiente di determinazione

%scelgo il modello con intercetta dato che R quadro è maggiore, sia per le
%cornee non trattate che trattate

% VERIFICA GRAFICA DEL MODELLO DI REGRESSIONE LINEARE

%cornee non trattate
figure
plot(P,x,'o')
hold on
plot(P,xstar,'r')
hold on
plot(P,xstar1,'g')
hold off
legend('Scatter plot spostamenti apicali in funzione di P', 'Regressione tramite
modello con intercetta','Regressione tramite modello senza intercetta');
xlabel ('Pressioni [mmHg]')
ylabel('Spostamento apicale corneale [mm]')
title ('Regressione lineare cornee non trattate')
```

```

axis ('tight')

%cornee trattate
figure
plot(P,w,'o')
hold on
plot(P,wstar,'r')
hold on
plot(P,wstar1,'g')
hold off
legend('Scatter plot spostamenti apicali in funzione di P', 'Regressione tramite
modello con intercetta','Regressione tramite modello senza intercetta');
xlabel ('Pressioni [mmHg]')
ylabel('Spostamento apicale corneale [mm]')
title ('Regressione lineare cornee trattate')
axis ('tight')

```

%è ragionevole che il modello con l'intercetta sia migliore perchè  
%effettivamente quando la y è quasi nulla la x è molto diversa da zero, è  
%un valore comparabile con gli altri. Graficamente interpola molto bene

## A.4 Applicazione del modello

```

%Applicazione del modello ai dati clinici dei pazienti di Alessandria
X_osp=[ones(10,1),IOP];

```

```

x_osp=X_osp*beta_notratt;%stima degli spostamenti apicali corneali pre_CXL con
regressione in mm

```

```

w_osp=X_osp*beta; %stima degli spostamenti apicali corneali post_CXL con regressione in
mm

```

## A.5 Stima del modulo elastico stromale

```

%% Stima del modulo elastico espresso in Pascal
v= 0.5; %coefficiente di Poisson stromale

```

```

lambda_pre=((R_pre./(t_pre)).^(1/2))*(3*(1-((v)^2))).^(1/4));
lambda_post=((R_post./(t_post)).^(1/2))*(3*(1-((v)^2))).^(1/4));

```

```

phi_pre=asin(S./R_pre);
phi_pre= rad2deg(phi_pre);
phi_post=asin(S./R_post);
phi_post= rad2deg(phi_post);

```

```

% conversione spostamenti apicali in metri
x_osp=x_osp.*10^-3;
w_osp=w_osp.*10^-3;

```

```

%moduli elastici
E_pre=((IOP'.*133.322).*((R_pre).^2)./((x_osp'.*2).*t_pre)).*(1-v).*(1-exp(-
lambda_pre.*phi_pre).*cos(lambda_pre.*phi_pre));
E_post=((IOP'.*133.322).*((R_post).^2)./((w_osp'.*2).*t_post)).*(1-v).*(1-exp(-
lambda_post.*phi_post).*cos(lambda_post.*phi_post));

```

```

E_eq=((E_post.*t_post)+E_pre.*(t_pre-t_post))./t_pre;

```

```

%verifica

```

```

E_minori = true;

for i = 1:length(E_pre)
    if E_pre(i) >= E_post(i)
        E_minori= false;
        break;
    end
end

if E_minori
    disp('Ogni valore di E_pre è minore del corrispondente valore di E_post.');
```

```

else
    disp('Almeno un valore di E_post non è maggiore del corrispondente valore di
E_pre.');
```

```

end

minori = true;

for i = 1:length(E_eq)
    if E_eq(i) >= E_post(i)
        minori= false;
        break;
    end
end

if minori
    disp('Ogni valore di E_eq è minore del corrispondente valore di E_post perché si
considera la disomogeneità delle distribuzioni delle sollecitazioni attraverso lo
spessore corneale.');
```

```

else
    disp('Almeno un valore di E_post non è maggiore del corrispondente valore di
E_eq.');
```

```

end

E_maggiori = true;

for i = 1:length(E_pre)
    if E_pre(i) >= E_eq(i)
        E_maggiori= false;
        break;
    end
end

if E_maggiori
    disp('Ogni valore di E_eq è maggiore del corrispondente valore di E_pre.');
```

```

else
    disp('Almeno un valore di E_eq non è maggiore del corrispondente valore di
E_pre.');
```

```

end

%variazione percentuale
var=((E_eq-E_pre)./E_pre)*100;
```

## A.6 Lavoro compiuto dal tessuto corneale

```

%energia termica del CXL
dose=5.4; % dose di irradiazione fornita dalla macchina per CXL espressa in J/cm^2
```



```

r=0.45; %raggio in cm dell'area corneale irraggiata dall macchina per CXL
A_irraggiata=pi*(r^2);
calore=dose*A_irraggiata; %joule

%energia meccanica
c=(pi*(r)^2)/2; %costante moltiplicativa
L=c.*(((E_pre'.*((x_osp).^2))'./t_pre)-((E_eq'.*((w_osp).^2))'./t_post));

%variazione di energia oculare a seguito del CXL
deltaH=calore-L; %joule

```

## A.7 T-test di Welch

```

%% t-test di Welch
%t-test per campioni indipendenti per determinare se le differenze osservate tra le
medie dei
% campioni sono più grandi di quanto ci si potrebbe aspettare casualmente. il test t è
uno strumento statistico importante per valutare la significatività delle differenze
tra medie campionarie

m=10; %numero campioni umani
n=11; %numerosità campioni di maiale (downsampling)
media_u=mean(E_post.*10^-6); %media campionaria moduli elastici cornee umane in MPa
s1= std(E_post.*10^-6); %deviazione standard moduli elastici cornee umane

%dati cornee porcine dalla (campione di 90 cornee)
mu2=0.978; %media dei moduli elastici dei 90 campion di cornee
sigma2=0.150;

%bootstrap
seed=1124;
rng(seed)
y=normrnd(mu2,sigma2,[n,1]); %moduli elastici dei maiali simulati da una distribuzione
normale con media e varianza preso dalla letteratura
media_m=mean(y); %media campionaria moduli elastici delle cornee di maiale
s2=std(y); %deviazione standard moduli elastici cornee di maiale
nu=((s1^2/m)+(s2^2/n))/(s1^2/(m*(m-1)))+(s2^2/(n*(n-1))); %gradi di libertà
alpha=0.05;
p=1-alpha/2;
quantile=tinv(p,nu);
ic_inf=media_u-media_m-quantile*sqrt((s1^2/m)+(s2^2/n)); %estremo inferiore
ic_sup=media_u-media_m+quantile*sqrt((s1^2/m)+(s2^2/n));
ic=ic_inf:0.01:ic_sup; %intervallo di confidenza

t=(media_u-media_m)/sqrt((s1^2/m)+(s2^2/n));
% il p_value è la probabilità che la statistica T (variabile aleatoria) sia maggiore
del
% valore calcolato della statistica (t) sotto h0 (assumo che le medie siano
% uguali) se p_value è sotto 0.05 rifiuto il caso in cui le medie siano
% uguali
p_value=1-tcdf(t,nu); %tcdf è la funzioni di distribuzione cumulativa della t di
Student's.
% La distribuzione cumulata è la probabilità che il valore sia<=,
% per quello metto 1-tcdf (tcdf mi fornisce l'area a destra)

%plot sotto h0
ascissa=linspace(-3,3,100);
figure
plot(ascissa,tpdf(ascissa,nu),"m")

```

```

hold on
xline(t,"k")
hold off

% la vera differenza tra i due campioni, al 95% di probabilità, giace
% nell'intervallo ic
disp(['Valore p: ', num2str(p_value)]);
disp(['Intervallo di confidenza: [', num2str(ic_inf), ', ', num2str(ic_sup), ']']);
disp(['Statistiche t: ', num2str(t)]);

```

## A.8 Mappe corneali

```

% griglia polare deve avere 8 spicchi e il raggio è suddiviso in 3 segmenti

% Definisco il raggio della sfera
radius = 7.54; %mm

% Definisco le coordinate polari
theta = linspace(0, 2*pi, 9); % Angolo di azimuth (0 a 2*pi)
phi = linspace(0, pi/2, 4); % angolo polare (0 a pi/2 per la semisfera superiore)

% Creazione della griglia dei valori di theta e phi
[THETA, PHI] = meshgrid(theta, phi);

% Conversione delle coordinate polari a cartesiane
X = radius * sin(PHI) .* cos(THETA);
Y = radius * sin(PHI) .* sin(THETA);
Z = radius * cos(PHI);

% Creo un 3D surface plot
figure(1);
surf(X, Y, Z);

% Setto le caratteristiche del plot
title('Superficie sferica di riferimento');
xlabel('X');
ylabel('Y');
zlabel('Z');
axis equal;
grid on;

% Regolo l'angolo di visuale
view(45, 30); % è possibile regolare quest' angoli per cambiare il punto di vista

% Aggiungo lighting fper una visualizzazione migliore
lighting gouraud;
light('Position', [1 1 1]);

%color map
colormap('parula');

%color bar
colorbar;
%% Personalizzazione dei punti in accordo alla mappa topografica del paziente
% la mappa fornisce la variazione sopra la coordinata di Z per ogni paziente tuttavia
% conosciamo la posizione corrispondente in theta e phi

%Cornea pre-CXL
dz=zeros(size(Z));

```

```

%apice
dz(1,:)=2*ones(1,9); %matlab legge anche il primo anello (che è un solo punto)
                        %come 8 valori collassati

%Primo anello
dz(2,[1,9])=-18;
dz(2,2)=-19;
dz(2,3)=-5;
dz(2,4)=9;
dz(2,5)=5;
dz(2,6)=2;
dz(2,7)=-4;
dz(2,8)=-11;

%Secondo anello
dz(3,[1,9])= 3;
dz(3,2)=-1;
dz(3,3)= 13;
dz(3,4)= 13;
dz(3,5)= -14;
dz(3,6)=4;
dz(3,7)=11;
dz(3,8)=12;

%Terzo anello
dz(4,[1,9])= 244;
dz(4,2)=199;
dz(4,3)= 219;
dz(4,4)= 243;
dz(4,5)= 0;
dz(4,6)=111;
dz(4,7)=130;
dz(4,8)=164;

dz=dz*0.75*10^-2; %le differenze sono molto piccole e quasi impercettibili,
% si potrebbe amplificarle gioca con il fattore 10^-3 (per esempio), ma cambiare valore
% in modo casuale non ha fisicamente senso

Z_p=Z+dz;

figure(2);
surf(X, Y, Z_p);

% Setto le caratteristiche del plot
title('Superficie corneale cheratoconica pre CXL');
xlabel('X');
ylabel('Y');
zlabel('Z');
axis equal;
grid on;

% Regolo l'angolo di visuale
view(45, 30); % è possibile regolare quest' angoli per cambiare il punto di vista
% Aggiungo lighting per una migliore visualizzazione
lighting gouraud;
light('Position', [1 1 1]);
% Mappa dei colori
colormap('parula');
% Barra dei colori
colorbar;

```

```

%Cornea post-CXL
dz=zeros(size(Z));
%apice
dz(1,:)=1*ones(1,9); %matlab legge anche il primo anello (che è un solo punto)
                        %come 8 valori collassati

%Primo anello
dz(2,[1,9])=-13;
dz(2,2)=-21;
dz(2,3)=-9;
dz(2,4)=7;
dz(2,5)=3;
dz(2,6)=2;
dz(2,7)=-5;
dz(2,8)=-9;

%Secondo anello
dz(3,[1,9])= 5;
dz(3,2)=-5;
dz(3,3)= 10;
dz(3,4)= 15;
dz(3,5)= -10;
dz(3,6)=5;
dz(3,7)=6;
dz(3,8)=10;

%Terzo anello
dz(4,[1,9])= 176;
dz(4,2)=154;
dz(4,3)= 174;
dz(4,4)= 195;
dz(4,5)= 0;
dz(4,6)=94;
dz(4,7)=90;
dz(4,8)=112;

dz=dz*0.45*10^-2;
Z_p=Z+dz;

figure(3);
surf(X, Y, Z_p);

% Setto le caratteristiche del plot
title('Superficie corneale cheratoconica post CXL');
xlabel('X');
ylabel('Y');
zlabel('Z');
axis equal;
grid on;

% Regolo l'angolo di visuale
view(45, 30); % è possibile regolare quest' angoli per cambiare il punto di vista
% Aggiungo lighting per una migliore visualizzazione
lighting gouraud;
light('Position', [1 1 1]);
% Mappa dei colori
colormap('parula');
% Barra dei colori
Colorbar;

```