

Capitolo 16.3

Risultati dell'Università di L'Aquila e follow up post operatorio

Leopoldo Spadea, Angela Di Gregorio, B. Massimo Saviano, Arianna Fiasca

Università di L'Aquila

Dopo l'approvazione da parte del Comitato Etico Locale dell'Università di L'Aquila, nel periodo giugno - settembre 2006 sono stati selezionati 26 occhi di 26 pazienti per essere inclusi nello studio EYE-CROSS. Il criterio principale per l'inclusione nello studio è stato la presenza di cheratocono bilaterale diagnosticato clinicamente sia con il topografo corneale che con l'esame biomicroscopico, che deve evidenziare eventuali segni clinici come strie di Vogt, anello di Fleischer ed opacità corneale stromale.

26 pazienti (19 uomini e 7 donne) selezionati avevano un'età media di 32.26 anni \pm 8.97 DS (range, 18-52). I 26 occhi (12 OD e 14 OS) sono stati valutati con un esame oftalmologico completo, includente le videocheratografie computerizzate TMS-3 (Tomey), Eyesys, Keratron Scout (Optikon), le pachimetrie ad ultrasuoni e OLCR (Haag-Streit), la microscopia speculare non a contatto e la tonometria ad appianazione.

In tutti gli occhi non erano evidenziabili cicatrici subepiteliali, mentre in 3 casi erano presenti strie di Vogt, assenti nei rimanenti 23 occhi. Secondo la stadiazione di Krumeich 11 occhi erano classificati in stadio II, 6 in uno stadio II-III, 4 in stadio III e 4 in stadio III-IV.

Nell'occhio controlaterale di controllo non erano presenti cicatrici subepiteliali, in 1 si evidenziava stria di Vogt ed anello di Fleischer. 3 occhi non sono stati valutati come gruppo di controllo in quanto 2 di essi aveva subito una cheratoplastica perforante, mentre uno una cheratoplastica lamellare. La stadiazione secondo Krumeich classificava 8 occhi in stadio I, 1 in stadio I-II, 10 in stadio II, 1 in stadio II-III e 3 in stadio III. Tutti i pazienti sono stati informati per la natura sperimentale del nostro studio e naturalmente i consensi informati sono stati ottenuti prima del trattamento.

Pertanto presso la Clinica Oculistica - Ospedale S. Salvatore - Università degli Studi di L'Aquila 26 occhi di 26 pazienti sono stati trattati una sola volta con tecnica di cross-linking corneale con riboflavina fosfato allo 0.01% in soluzione di destrano

T500 al 20% (SOOFT Italia) utilizzando come da protocollo EYE-CROSS lo strumento CMB X-Linker (CSO, Firenze). Nel corso dell'intero follow-up non sono state notate complicanze, quali riepitelizzazioni tardive od infezioni. Il follow-up è stato di 6 mesi per 21 pazienti e di 3 mesi per 5 pazienti.

I dati numerici estrapolati da tutti gli esami sono stati tabulati in foglio elettronico (MS Excel XP) e sottoposti ad analisi statistica con test t di Student per dati appaiati.

Risultati

L'acuità visiva naturale (UCVA) ha mostrato un miglioramento statisticamente significativo ($p=0.05$) da un valore medio preoperatorio di 2.5/10 +/- 2.2 DS (range, 1/30-9/10) ad un valore medio postoperatorio, a 3 mesi per 26 pazienti, di 3.9/10 +/- 3.1 DS (range, 1/30-10/10) ed a 6 mesi per 21 pazienti, di 4/10 +/- 2.9 DS (range, 1/60-10/10) (*Grafico 1*).

L'acuità visiva corretta (BCVA) con lenti a tempiale è risultata nel preoperatorio di 7.2/10 +/- 2.1 DS (range, 2/10-10/10) mentre dopo 3 mesi era pari a 7.9/10 +/- 1.7 DS (range, 4/10-10/10) e dopo 6 mesi a 8/10 +/- 1.7 DS (range, 5/10-10/10) ($p=0.07$) (*Grafico 2*).

Pertanto i nostri risultati funzionali hanno mostrato un incremento sia della UCVA che della BCVA, anche se in questa ultima non si è evidenziata una franca significatività statistica. Nel *Grafico 3* si evidenziano le linee perse e guadagnate dai pazienti nel corso del follow-up.

La rifrazione, espressa in equivalente sferico, è passata da un valore medio preoperatorio di -3.05 D +/- 3.93 DS (range, +4 a -14.25 D) ad un valore medio postoperatorio a 3 mesi di -2.68 D +/- 3.30 DS (range, +2.75 a -12 D) ed a 6 mesi di -2.28 D +/- 3.17 DS (range, +3.50 a -12.50).

L'astigmatismo rifrattivo ha mostrato un minimo aumento nel corso del follow-up passando da un valore preoperatorio di 2.29 D +/- 3.41 DS (range, +5 a -8) ad un valore di 2.72 D +/- 2.88 DS (range, +5 a -8) a 3 mesi, ed a -2.50 D +/- 2.83 DS (range, +5 a -8) a 6 mesi.

Lo spessore corneale all'apice del cono preoperatorio, valutato sia con pachimetria ad ultrasuoni che OLCR, era pari, rispettivamente, a 456.11 μm +/- 42.05 DS (range, 392-526) ed a 469 μm +/- 38.29 DS (range, 393.3-546.4), mentre nel postoperatorio risultava essere di 436.54 μm +/- 38.10 DS (range, 384-508) e di 455.12 μm +/- 44.14 DS (range, 380.8-554.4) a 3 mesi, e di 449.28 μm +/- 43.42 DS (range, 380-530) e di 449.28 μm +/- 45 DS (range, 380.8-544.6) a 6 mesi.

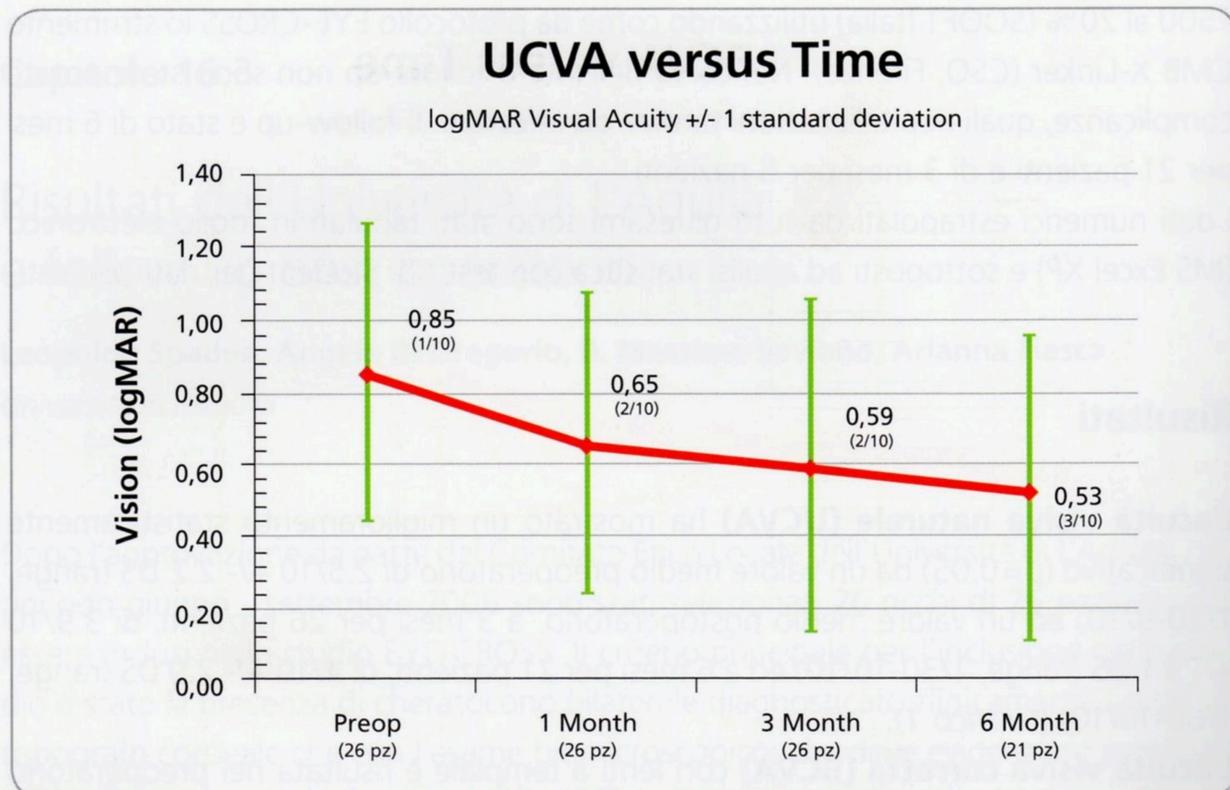


Grafico 1

Comparando dati pre e post-trattamento, riguardanti la **densità cellulare endoteliale media** ed il coefficiente di variazione cellulare non si sono registrate modificazioni significative nel corso del follow-up.

Anche l'analisi dei valori della **pressione intraoculare** non hanno mostrato differenze statisticamente significative fra dati pre e postoperatori.

Le informazioni fornite dai **topografi corneali** utilizzati comprendevano la valutazione del potere corneale medio centrale, dell'astigmatismo cheratometrico e del potere dell'apice del cheratocono.

Analizzando risultati ottenuti con il topografo **EyeSys** si è evidenziato che la media del potere corneale centrale medio era preoperatoriamente di 46.87 D +/-3.21 DS (range, 41.76-52.40) per poi essere, dopo 3 mesi dal trattamento, di 47.13 D +/-3.36 DS (range, 39.95-53.72) e dopo 6 mesi di 47.36 D +/-3.34 DS (range, 39.88-53.25). La media dell'astigmatismo cheratometrico nel preoperatorio era pari a 4.17 D +/-2.72 DS (range, 0.55-12.33), e nel postoperatorio a 3 mesi di 4.05 D +/-2.09 DS (range, 0.91-9.69) ed a 6 mesi di 3.74 D +/- 2.27 DS (range, 0.55-9.69). Il potere dell'apice del cheratocono preoperatoriamente risultava essere di 63.05 D +/- 9.12 DS (range, 53.61-85.47) per poi risultare essere pari a 62.12 D +/- 7.12 DS (range, 50.47-75.57) a 3 mesi, e pari a 61.36 D +/- 6.39 DS (range, 52.06-78.6) a 6 mesi (Grafico 4).

Prendendo in considerazione, invece, risultati ottenuti con il videokeratografo

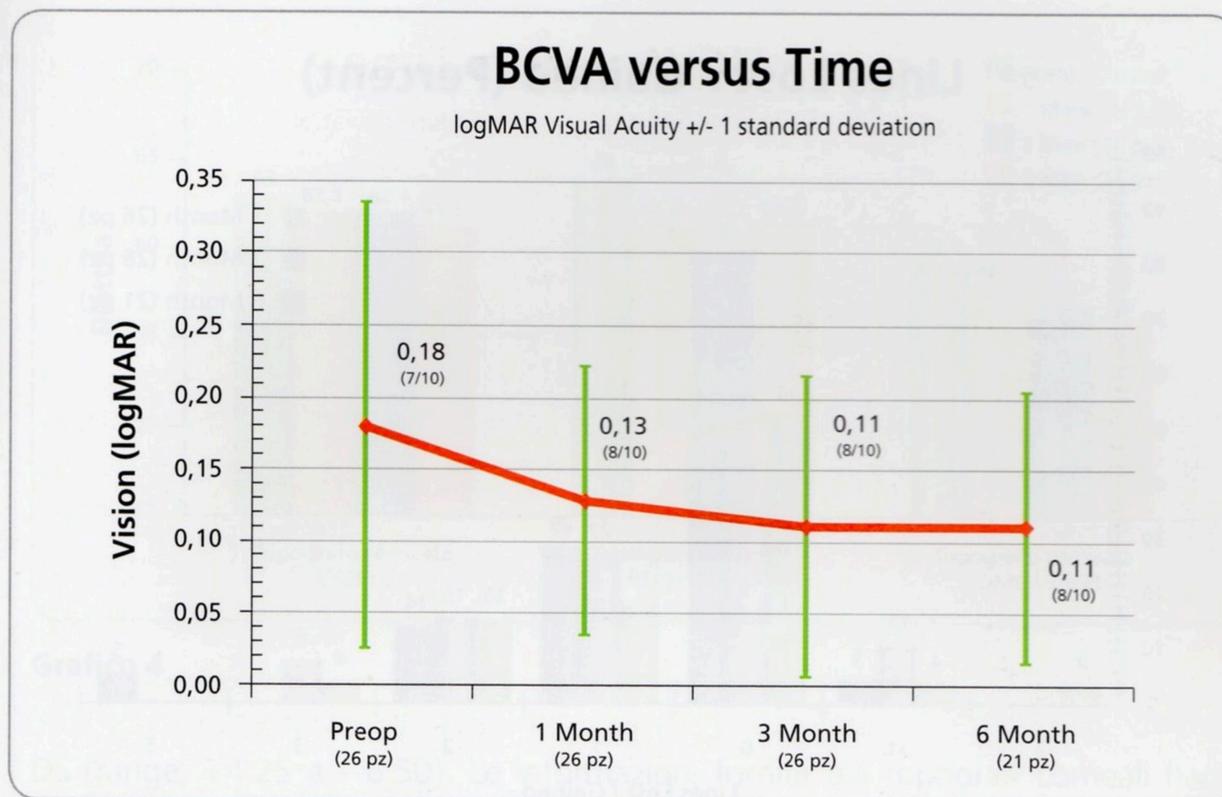


Grafico 2

computerizzato **Tomey-TMS3** si è evidenziato che la media del potere corneale centrale medio era prima del trattamento di 47.82 D +/- 4.03 DS (range, 41.77-52.38), dopo 3 mesi di 48.98 D +/- 4.03 DS (range, 40.01-57.47) e dopo 6 mesi di 48.35 D +/- 3.84 DS (range, 39.65-54.15). La media dell'astigmatismo cheratometrico nel preoperatorio era pari a 4.54 D +/- 3.25 DS (range, 0.39-12.05), nel postoperatorio a 3 mesi di 6.14 D +/- 3.98 DS (range, 0.91-14.43) ed a 6 mesi di 5.06 D +/- 3.10 DS (range, 0.16-13.49). Infine, il potere dell'apice del cheratocono preoperatoriamente risultava essere di 59.48 D +/- 8.14 DS (range, 48.75-81.14) per poi risultare essere pari a 56.98 D +/- 4.36 DS (range, 48.05-64.10) ($p < 0.05$) a 3 mesi e pari a 56.04 D +/- 4.33 DS (range, 48.32-64.10) ($p < 0.05$) a 6 mesi (Grafico 4). Con tale videokeratografo abbiamo anche valutato l'elevazione corneale apicale anteriore, impiegando come riferimento la best-fit sphere. Il valore preoperatorio era di 47.53 μm +/- 16.34 DS (range, 19.54 a 81.30), a 3 mesi di 43.72 μm +/- 16.98 DS (range, 7.57 a 77.99) ed a 6 mesi di 45.05 μm +/- 17.66 DS (range, 5.95 a 71.55).

Infine, utilizzando il topografo corneale **Keratron Scout** abbiamo evidenziato che la media del potere corneale centrale medio era preoperatoriamente di 49.22 D +/- 5.70 DS (range, 42.06-66.91) dopo 3 mesi di 47.99 D +/- 4.17 DS (range, 39.65-55.97) e dopo 6 mesi di 50.58 D +/- 5.15 DS (range, 40.97-61.54). La media dell'astigmatismo cheratometrico nel preoperatorio risultava essere di 4.32 D +/- 3.25

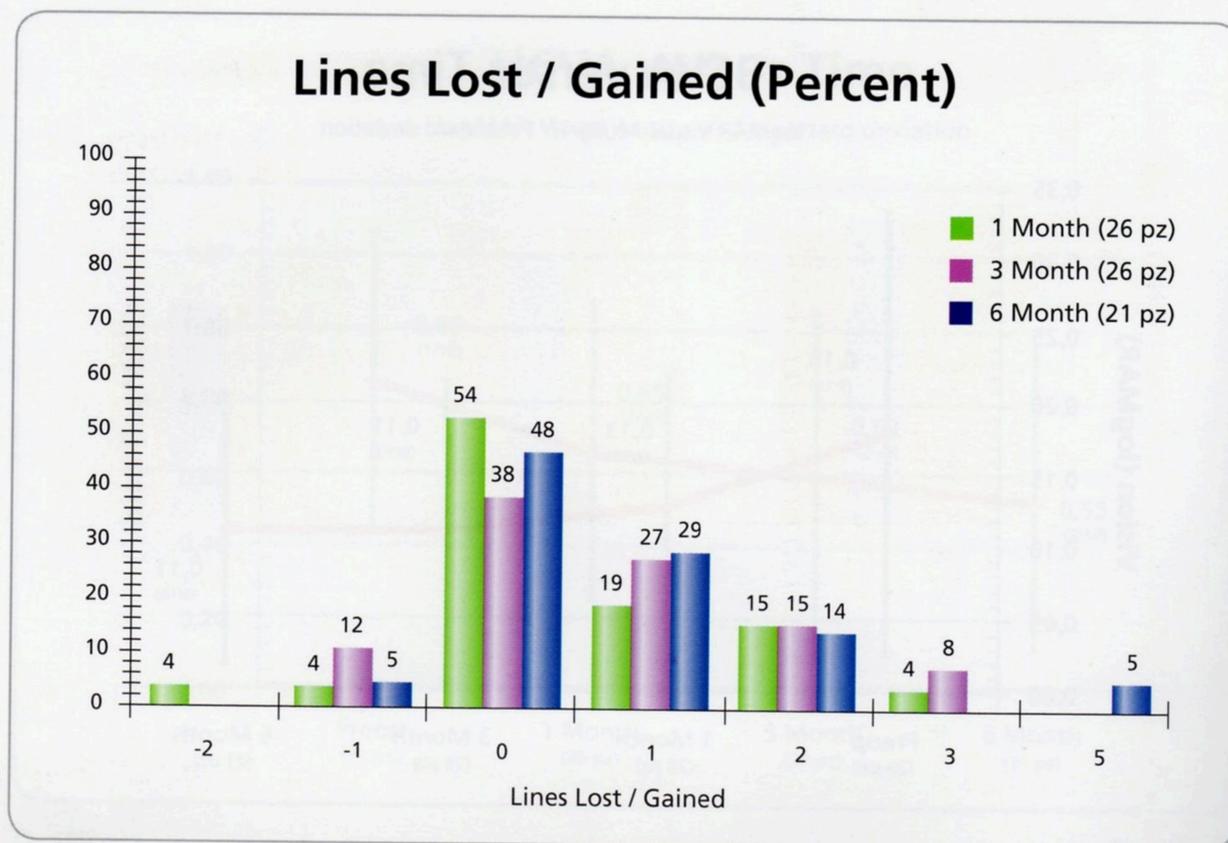


Grafico 3

DS (range, 0.57-14.57), e nel postoperatorio a 3 mesi di 3.95 D +/- 2.46 DS (range, 0.89-10.35) ed a 6 mesi di 4.60 D +/- 2.75 DS (range, 1.34-131.77). Il potere dell'apice del cheratocono preoperatoriamente era di 64.05 D +/- 8.64 DS (range, 53.99-84.58) per poi risultare essere pari a 60.09 D +/- 6.59 DS (range, 40.98-75.71) a 3 mesi e pari a 61.52 D +/- 5.94 DS (range, 53.12-74.03) a 6 mesi (Grafico 4). Questo topografo permette di calcolare il valore di curvatura media dell'area del cono e della sua distanza dal centro corneale, la cosiddetta *magnitudo del cheratocono*. Dalla nostra analisi è emerso che la media preoperatoria era di 59.30 D +/- 7.99 DS (range, 47.52-75.21), mentre a 3 mesi il valore passava a 55.51 D +/- 4.16 DS (range, 48.13-66.18) e a 6 mesi a 55.46 D +/- 4.28 DS (range, 47.78-65.50). Eseguendo l'analisi statistica dei dati abbiamo riscontrato una significatività statistica sia a 3 mesi (p=0.037) che a 6 mesi (p=0.05).

Per ciò che riguarda l'**occhio controlaterale** non si sono evidenziati cambiamenti né per l'UCVA né per il BCVA. Infatti l'UCVA è passata da un valore di 6.5/10 +/- 3.6 DS (range, 1/30- 10/10) a 6.5/10 +/- 3.4 DS (range, 1/30-10/10), mentre il BCVA passava da 8.9/10 +/- 1.4 (range, 6/10-9/10) ad un postoperatorio di 9.5/10 +/- 0.7 DS (range, 8/10-10/10). La rifrazione media, espressa in equivalente sferico, era pari a 1.53 D +/- 2.62 DS (range, +2.75 a 8) e dopo 6 mesi 1.62 D +/- 2.67

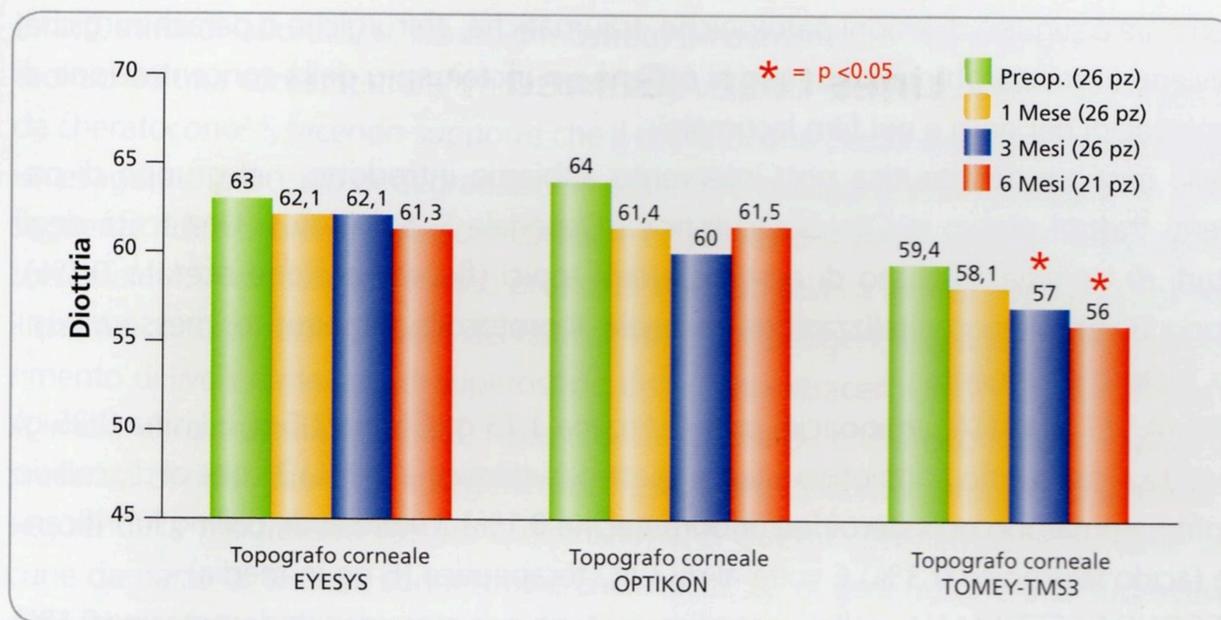


Grafico 4

DS (range, +4.25 a 6.50). Le informazioni fornite dai topografi corneali hanno messo in evidenza una modesta evoluzione del potere corneale medio centrale, dell'astigmatismo cheratometrico e del potere dell'apice del cheratocono. Ma l'analisi statistica con il t di Student non ha mostrato alcuna significatività statistica. Infine, comparando dati, riguardanti la densità cellulare media endoteliale, la pachimetria corneale che la pressione intraoculare, non si sono avute modificazioni significative nel corso del follow-up.

In conclusione dai nostri dati preliminari appare che la tecnica di cross-linking del collagene corneale con riboflavina nel cheratocono sembra innanzitutto sicura, non avendo riportato alcun effetto collaterale significativo. Inoltre i risultati nel corso del breve follow-up post-operatorio analizzato sembrano evidenziare una certa efficacia nel migliorare la morfologia corneale con conseguente miglioramento delle performance visive dei pazienti. Naturalmente tali dati vanno analizzati nell'ambito di casistiche allargate e numerose e con un follow-up molto più lungo.

Follow up post operatorio

Tutti i pazienti sottoposti a cross-linking presso il nostro centro hanno effettuato nei 5 gg precedenti il trattamento una supplementazione orale di aminoacidi (L-Prolina 1.75 g, Glicina 1.5 g; L-Lisina 0.25 g die). È noto, infatti, da studi condotti *in vitro* su cornee umane provenienti da occhi di banca come in vivo, che la riepitelizzazione

corneale a seguito di lesioni patologiche, traumatiche, chirurgiche o parachirurgiche, avviene in modo ottimale quando si ottiene un incremento della concentrazione di aminoacidi nel siero e nel film lacrimale¹

Nella gestione terapeutica post-intervento abbiamo introdotto, nel gruppo di pazienti trattati presso la Clinica Oculistica - Ospedale S. Salvatore - Università degli Studi di L'Aquila, l'utilizzo di corticosteroidi topici (fluorometolone acetato 0.1%), dopo la completa riepitelizzazione corneale. Il protocollo terapeutico, messo a punto, è stato il seguente:

PRIMA SETTIMANA. aminoacidi orali (L-Prolina 1.75 g; Glicina 1.5 g; L-Lisina 0.25 g) 1 volta al dì, collirio antibiotico a largo spettro (netilmicina 0.3%) 3 volte al dì, collirio antinfiammatorio non steroideo (indometacina 0.1%) 3 volte al dì; collirio lubrificante (acido ialuronico 0.3%) 6 volte al dì, LAC terapeutica (6 gg in media);

SECONDA SETTIMANA. collirio antinfiammatorio non steroideo (indometacina 0.1%) 3 volte al dì; collirio antinfiammatorio steroideo (fluorometolone acetato 0.1%) 3 volte al dì; collirio lubrificante (acido ialuronico 0.3%) 6 volte al dì; la terapia appena descritta è stata prescritta solo nel caso di una completa riepitelizzazione;

TERZA SETTIMANA. collirio antinfiammatorio steroideo (fluorometolone acetato 0.1%) 2 volte al dì; collirio lubrificante (acido ialuronico 0.3%) 6 volte al dì;

QUARTA SETTIMANA. collirio antinfiammatorio steroideo (fluorometolone acetato 0.1%) 1 volta al dì, collirio lubrificante (acido ialuronico 0.3%) 6 volte al dì,

Dopo la prima settimana, alla rimozione della LAC, abbiamo riscontrato su un campione di 26 occhi trattati una percentuale di irregolarità epiteliali nel 73% dei pazienti, di cui gravi nel 3.8% moderate nel 38.6% e lievi nel 57.6%. La sintomatologia dolorosa è risultata assente nel 65.3% lieve 27.7% e moderata nel 7.8%. Alla fine della seconda settimana di follow-up le irregolarità epiteliali presenti nel campione di pazienti sono state solo del 3.8% e, soprattutto, di grado lieve ed in via di risoluzione. In nessun paziente si è riscontrata sintomatologia dolorosa.

La IOP dopo la prima settimana di terapia con cortisonico topico non ha evidenziato incrementi (14.5 mmHg +/- 1.88 con un range 11-18 mmHg).

Nella terza e quarta settimana di follow-up si è osservata l'assenza, in tutti i pazienti trattati, di irregolarità epiteliali, di sintomatologia dolorosa e di aumenti della IOP. La scelta dell'introduzione, nel protocollo terapeutico, dello steroide topico si è basata su un preciso razionale: un migliore controllo della proliferazione e della migrazione dei cheratociti, della trasformazione dei cheratociti in fibroblasti e dell'attività fibroblastica in genere, soprattutto in considerazione delle seguenti evidenze scientifiche:

1) il trattamento viene effettuato su cornee malaciche, alterate da una patologia ectasizzante che le ha modificate sotto il punto di vista anatomico ed ultrastrutturale.

Infatti, studi di laboratorio, hanno dimostrato un aumento dei livelli degli enzimi proteolitici ed una contemporanea riduzione degli inibitori di questi nelle cornee affette da cheratocono^{2,4} facendo supporre che il cheratocono possa essere determinato da un esagerato processo di degradazione delle fibre collagene dello stroma, con conseguente riduzione dello spessore corneale ed alterazione della capacità di resistenza torsionale^{2,4}. Alcuni Autori hanno proposto una suggestiva ipotesi patogenetica per il cheratocono basata sul ruolo dei radicali liberi dell'ossigeno ed avvalorata dal reperimento di livelli dimezzati di superossido dismutasi extracellulare in cornee affette⁵. A livello ultrastrutturale, quindi, nelle cornee affette da cheratocono, osserviamo la presenza di rigonfiamento e degenerazione fibrillare della membrana di Bowmann⁶ seguiti dalla progressiva rottura e distruzione di questa con riempimento delle lacune da parte di tessuto connettivo e cheratociti. La degenerazione e la successiva distruzione delle cellule parenchimali provocano la liberazione di enzimi autolitici e proteolitici che distruggerebbero tessuti posteriori (fibre reticolari della membrana basale e di tutti gli strati posteriori fino alla membrana di Descemet). L'epitelio presenta uno spessore irregolare, le cellule basali si disorganizzano, si alterano e scompaiono, la membrana basale si frammenta e si rompe nelle aree dove la membrana di Bowmann è distrutta^{7,9}. Lo stroma presenta una riduzione ed un assottigliamento delle lamelle con aree di degenerazione fibrillare, distruzione e sostituzione da parte di tessuto connettivo intercalate da depositi di sostanza amiloide. I cheratociti non sono alterati nel numero ma assumono un aspetto variabile, in vari stadi di maturazione. Le cellule endoteliali si appiattiscono ed i loro nuclei si allontanano¹⁰. La scomparsa delle fibre collagene sarebbe la causa della riduzione del numero delle lamelle dello stroma centrale e quindi dell'assottigliamento di tale porzione; ad esso segue lo sfiancamento che fa acquistare alla cornea l'aspetto di un cono.

2) L'associazione della soluzione di riboflavina con l'irradiazione degli UVA ha mostrato un danno dei cheratociti stromali dose-dipendente¹¹ il livello di citotossicità, calcolato secondo la legge di Lambert-Beer è risultato compreso tra 0.49-0.77 mW/cm² che corrisponde ad una dose irradiante di UVA di 0.8-1.3 Joule/cm². Inoltre, gli occhi di coniglio trattati con cross-linking rispetto a quelli che erano stati solo disepitelizzati, hanno mostrato una perdita di cheratociti ed un'apoptosi che si estendeva oltre 50 µm anteriori della cornea. Si deve, comunque, ricordare che la riboflavina, di per sé, non è citotossica diventa tale quando combinata con gli UVA¹². L'analisi con la microscopia confocale¹³ delle cornee umane sottoposte a trattamento di cross-linking ha evidenziato una restitutio ad integrum dell'epitelio corneale dopo soli 5 gg ed una rigenerazione dei plessi nervosi sub-epiteliali e dello stroma anteriore dopo un mese dal trattamento.

3) processi riparativi corneali a seguito del trattamento di cross-linking sono assimilabili a quelli riscontrati in altre metodiche chirurgiche corneali (Cheratectomia fotorefrattiva con laser ad eccimeri), pur con le dovute differenziazioni. Nel cross-linking la manovra chirurgica si limita esclusivamente alla disepitelizzazione meccanica, mentre nella PRK avviene una fotoablazione della membrana di Bowmann e degli strati superiori dello stroma corneale; inoltre, le cornee trattate, sono ovviamente diverse dal punto di vista anatomico ed ultrastrutturale (patologiche nel primo caso, fisiologiche nel secondo). cheratociti attivati, assieme alle cellule epiteliali basali, danno luogo alla deposizione disordinata di tessuto subepiteliale, costituito da proteoglicani e collagene alterato tipo III e IV. Sono proprio queste alterazioni a carico delle cellule e della matrice extracellulare, insieme alla comparsa di un epitelio iperplasico ed alla migrazione ed incremento dei cheratociti, a determinare, nei soggetti che sviluppano haze, una diminuzione della trasparenza corneale. È noto, grazie agli studi condotti su occhi di coniglio da Wilson che il primo fenomeno osservabile in cornee sottoposte a disepitelizzazione è l'apoptosi dei cheratociti, rilevabile già dopo qualche minuto, ma che raggiunge l'acme dopo circa 4 ore. L'apoptosi dei cheratociti è mediata da citochine, come l'IL-1 e il Fas-ligando, rilasciate dalle cellule epiteliali danneggiate (Fig. 1). Nelle 24 ore successive cheratociti sopravvissuti all'apoptosi proliferano attivamente, probabilmente sotto lo stimolo mitogeno del Platelet-derived growth factor (PDGF), anch'esso rilasciato dalle cellule epiteliali danneggiate. L'azione di citochine, come il Trasforming Growth Factor β (TGF β) rilasciato dall'epitelio in fase di guarigione, e di fattori di crescita come l'Hepatocyte (HGF) ed il Keratocyte Growth Factor (KGF) sintetizzati dai cheratociti circostanti e coinvolti nella migrazione-proliferazione degli stessi altresì responsabili nella trasformazione e persistenza dei miofibroblasti. Ci sono molte evidenze che ci indicano come lo sviluppo dell'haze sia correlato al numero dei miofibroblasti presenti nello stroma anteriore ed alla loro capacità di sintetizzare collagene nei mesi successivi ad una procedura chirurgica di superficie corneale.

Il processo di guarigione corneale è il risultato di una stretta cooperazione tra le cellule dell'epitelio corneale ed i cheratociti stromali, che si influenzano a vicenda nello sforzo di ricostituire l'integrità anatomica della cornea. Si tratta, in definitiva, di un'unità anatomo-funzionale epitelio-stroma che funziona su di un delicato e complesso intreccio di segnali molecolari basati sull'attività di citochine e fattori di crescita; qualsiasi perturbazione a questo livello può favorire l'insorgenza di haze corneale. L'importanza dell'unità epitelio-stroma nella patogenesi dell'haze è rafforzata dall'evidenza clinica che gli interventi di LASIK non si complicano mai con haze se l'integrità dell'epitelio non viene compromessa, come con la comparsa di un difetto epiteliale o di un botton hole.

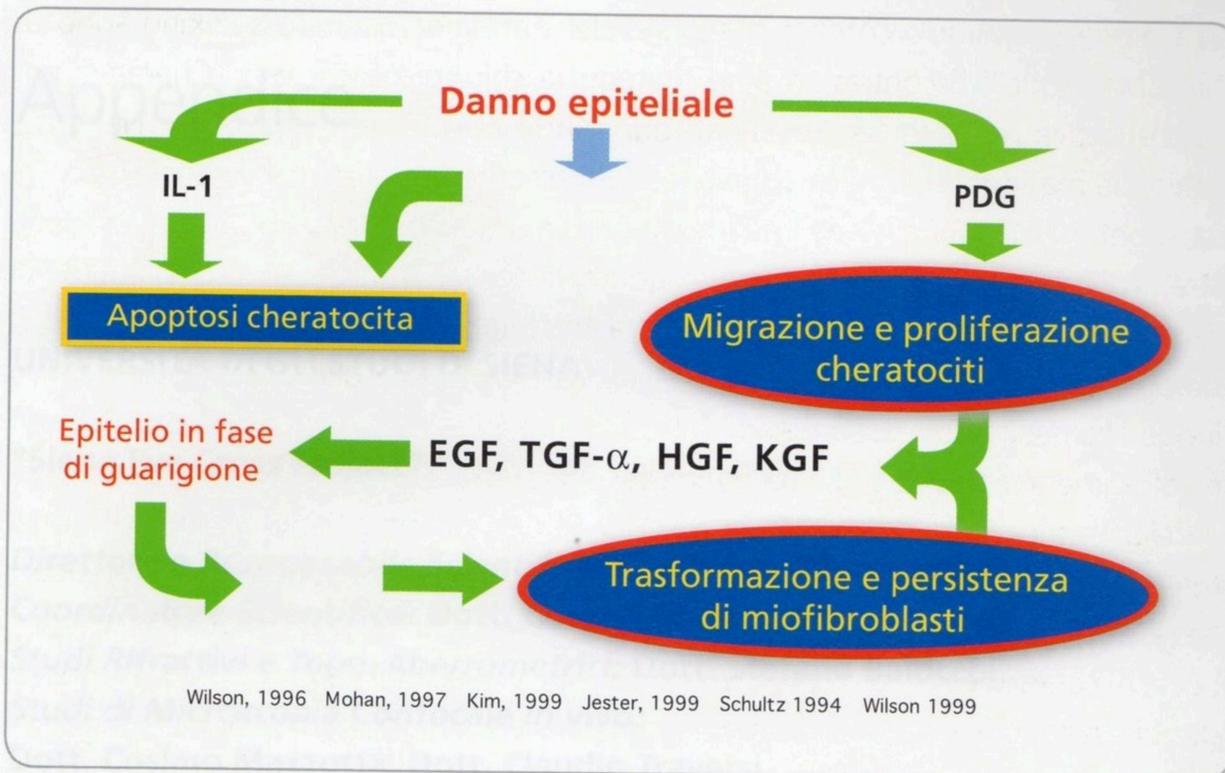


Fig. 1 Regolazione molecolare delle cellule epiteliali e dei cheratociti nel processo di guarigione corneale.

Bibliografia

- Vinciguerra P, Camesasca FI, Ponzin D. Use of amino acids in refractive surgery. *J. Refract. Surg.* 2002; (suppl) 18
- Rama P, Matuska S. Trattamento del cheratocono. *L'Oculista Italiano* 126/127 14-18, Mar-Set 2000
- Albert DM, Jackobiec FA. Principi e Pratica in Oftalmologia. (1):54-57 1995
- Dal Fiume E, Rama P, Buratto L, Merlin U: Chirurgia della Cornea-153-156 Fabiano Ed 1993
- Behnding A, Karlsson K, Johansson BO, Brannstrom T, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (10):2293-2296, Sept 2001
- Chi HH, Katzin HM, Teng CC: Hystopatolgy of keratoconus. *Am J Ophthalmol* (42): 847 1956
- Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus 2. *Am J. Ophthalmol* (55): 18, 1963
- Patone C, Joyon L, Rocher F. Ultrastructure of keratocone. *Arch Ophthalmol*, 30:403,1970
- Pouliquen Y, Graf B, De Kozok y, et al. Etude morphologique du keratocone. *Arch Ophthalmol* 30: 497 1970
- Dal Fiume E, Rama P, Buratto L, Merlin U: Chirurgia della Cornea. 153-156 Ed1993
- Wollensak et all. Keratocyte Apoptosis After Corneale Collagen Cross- linking Using Riboflavin/UVA treatment"- *Cornea* Jan 2004
- Cho K.S. Lee et all- *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 1999
- C. Mazzotta, C. Traversi, S. Baiocchi, P. Sergio, T. Caporossi, A. Caporossi Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: Qualitative investigation of corneal epithelium and subepithelial nerve plexus regeneration by in vivo HRT II system confocal microscopy in humans. *Eur Jour Ophthalmol* (16): 4, 2006.