



Ospedale "Di Venere"
U O C. di Oculistica
Direttore: *Dr F Montrone*

SUPERFICIE OCULARE UP TO DATE



A T T I

Con il patrocinio di
S.I.C.S.S.O. - S.I.D.S.O. - S.I.T.R.A.C.

Bari, 26-27 giugno 2009

TERAPIA POSTOPERATORIA

L. Spadea, A. Di Gregorio

Clinica Oculistica, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi de L'Aquila

Il cross-linking del collagene corneale rappresenta una tecnica parachirurgica per il trattamento del cheratocono evolutivo in stadio rifrattivo, determinando l'aumento dei legami interfibrillari e del diametro delle fibre collagene nello stroma corneale anteriore ed intermedio, a circa 300 μm di profondità, senza alcun danno per l'endotelio grazie all'effetto concentrante della riboflavina.

La metodica prevede una rimozione meccanica dell'epitelio corneale centrale di 8-9 mm di diametro. La disepitelizzazione avviene meccanicamente, mediante spatola od uso di Brusher, proprio per il mantenimento di una Bowmann regolare per minimizzare i processi reattivi di tipo cicatriziale: si potrebbe verificare un edema postoperatorio e formazione di haze.

La terapia medica corneale postoperatoria permette di:

- a) Creare condizioni ottimali per ottenere il miglior effetto cross-linkante e favorire i processi di guarigione
- b) Ridurre o eliminare la sintomatologia dolorosa postoperatoria, unico e raro disturbo soggettivo per il paziente
- c) Accelerare la riepitelizzazione della cornea
- d) Ricostruire una normale architettura stromale ed incentivare la formazione dei cross-links intra ed intermolecolari del collagene

Tutti i pazienti sottoposti a cross-linking presso la nostra Clinica eseguono nei 5 giorni precedenti il trattamento una supplementazione orale di aminoacidi (L-Prolina 1.75 g; Glicina 1.5g; L-Lisina 0.25g die). È noto, infatti, da studi condotti *in vitro* come *in vivo* su cornee umane provenienti da occhi di banca, che la riepitelizzazione corneale, a seguito di lesioni patologiche, traumatiche, chirurgiche o parachirurgiche, avviene in modo ottimale quando si ottiene un incremento della concen-

trazione di aminoacidi nel siero e nel film lacrimale¹. Quindi, la somministrazione di tali aminoacidi permette di fornire alle cellule, nella fase di riparazione, la "materia prima" per il loro metabolismo, in modo tale che facilitano i tempi di recupero accelerando la riepitelizzazione corneale ed aumentando la biodisponibilità dei costituenti del collagene.

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 post-operatorio è stato il seguente:

- PRIMA SETTIMANA. aminoacidi orali (L-Prolina 1.75 g; Glicina 1.5g; L-Lisina 0.25g) 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 (circa 6 giorni)
- 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

Nel nostro protocollo l'utilizzo di antibiotici ad uso topico è stato reso opportuno per escludere una possibile aggressione batterica. La disepitelizzazione corneale costituisce una soluzione di continuo, anche se protetta da LaC, che impone una profilassi per eventuali infezioni. Infatti, l'epitelio corneale, in condizioni di normalità, rappresenta una barriera invalicabile per i batteri: la sua rimozione potrebbe portare alla localizzazione di germi che potrebbero indurre rapidamente gravi danni a carico dello stroma.

Dopo la prima settimana, alla rimozione della LaC, abbiamo riscontrato su un campione di 26 occhi trattati una percentuale di irregolarità epiteliali nel 79% 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 nel 27.7% e moderata nel 7.8%. Alla fine della seconda settimana di follow-up le irregolarità epiteliali presenti nel cam-

Cross Linking

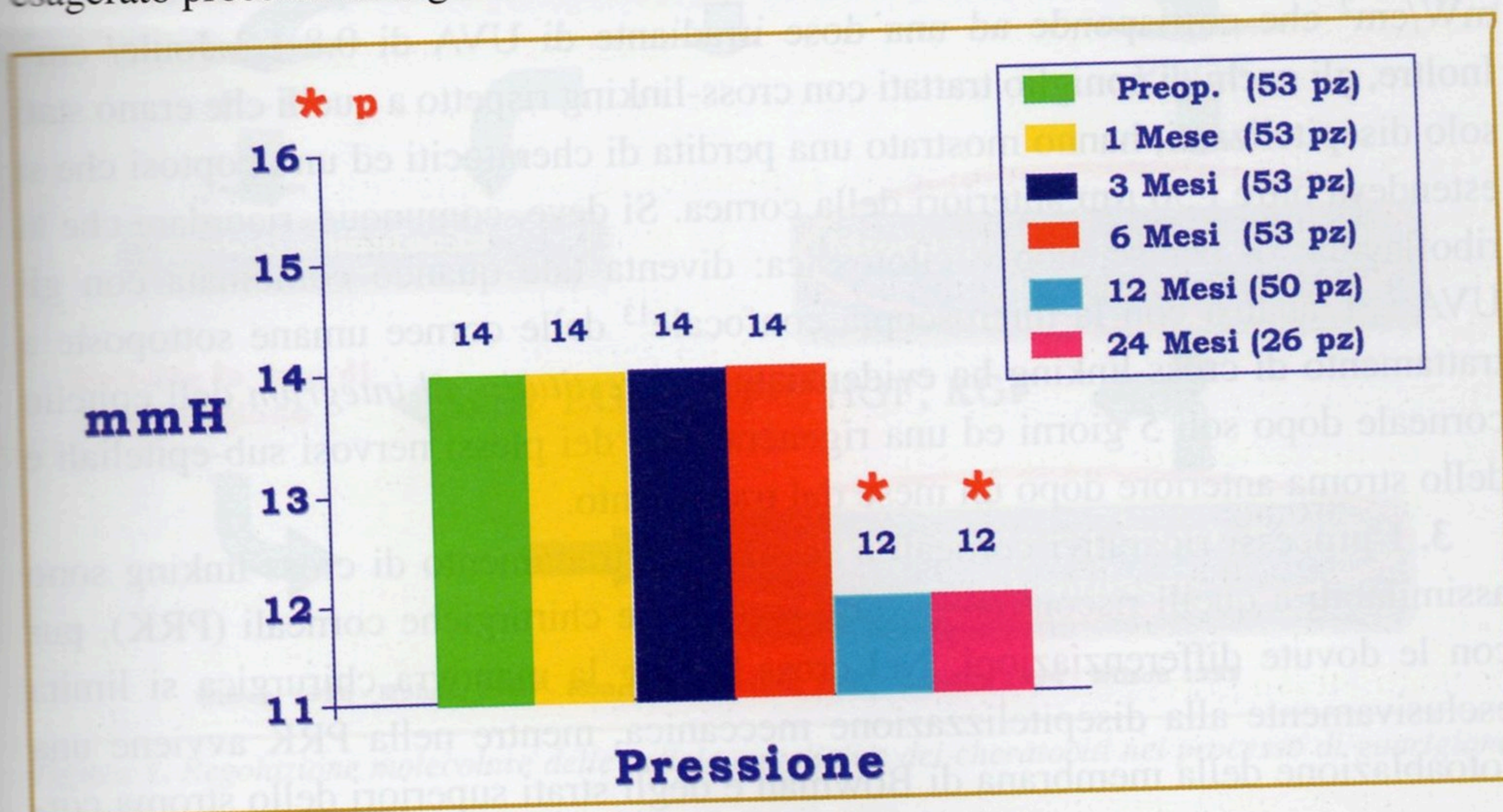
zione di pazienti sono state solo del 3.8% e, soprattutto, di grado lieve ed in via di risoluzione. In nessun paziente si è riscontrata un'eccessiva sintomatologia dolorosa, in quanto, rimanendo la membrana di Bowmann integra, a differenza della Cheratectomia Fotorifrattiva (PRK) con laser ad eccimeri, la velocità di riparazione dell'epitelio è risultato più rapido ed agevole. Inoltre, il bendaggio con LaC terapeutica, applicata a fine intervento, ha ridotto l'insorgenza del dolore, riducendo il discomfort oculare.

La IOP dopo la prima settimana di terapia con utilizzo di cortisonici topici non ha evidenziato incrementi (14.5mmHg +/- 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. Anche l'analisi dei valori della pressione intraoculare, nel follow-up di 24 mesi, non hanno mostrato differenze statisticamente significative fra i dati pre e postoperatori (grafico 1).

La scelta dell'introduzione, nel protocollo terapeutico, dello steroide topico si è basata su un preciso rationale: un migliore controllo della proliferazione e della migrazione dei cheratociti, della trasformazione dei cheratociti in fibroblasti e dell'attività fibroblastica. Ciò scaturisce dalle seguenti evidenze scientifiche:

1. Il trattamento viene effettuato su cornee patologiche, 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 cheratocono²⁻⁴, facendo supporre che il cheratocono possa essere determinato da un esagerato processo di degradazione delle fibre collagene dello stroma, con conseguen-



te riduzione dello spessore corneale ed alterazione della capacità di resistenza torsionale²⁻⁴ 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 Bowman⁶, 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 i 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 Bowman è distrutta⁷⁻⁹ 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 i 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 giorni ed una rigenerazione dei plessi nervosi sub-epiteliali e dello stroma anteriore dopo un mese dal trattamento.

3. I processi riparativi corneali a seguito del trattamento di cross-linking sono assimilabili a quelli riscontrati in altre metodiche chirurgiche corneali (PRK), 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 Bowman e degli strati superiori dello stroma cor-

neale; inoltre, le cornee trattate, sono ovviamente diverse dal punto di vista anatomico ed ultrastrutturale (patologiche nel primo caso, fisiologiche nel secondo). I 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 iperplastico, 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 i 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 *Transforming 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

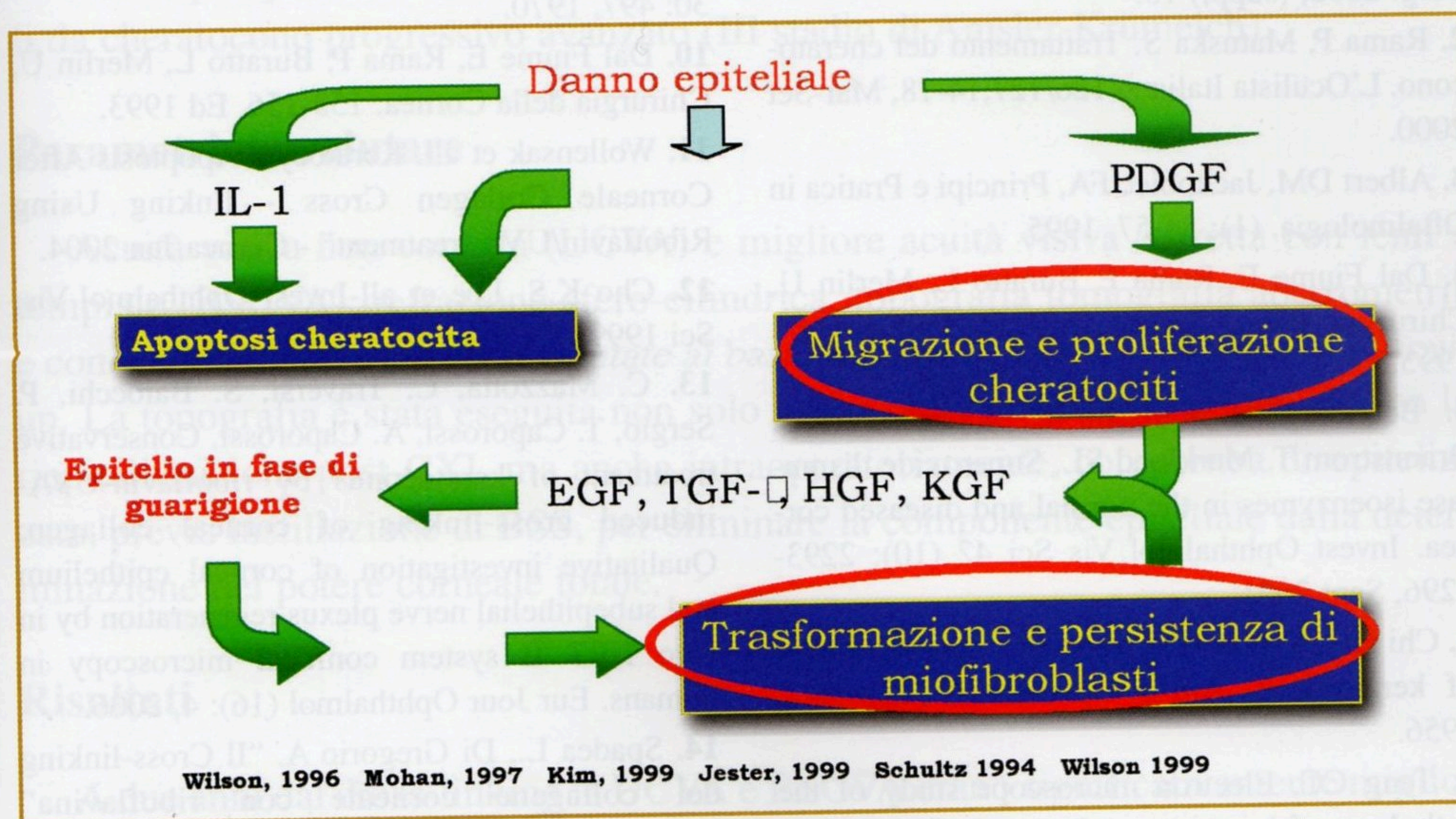


Figura 1. Regolazione molecolare delle cellule epiteliali e dei cheratociti nel processo di guarigione corneale.

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 anatomico-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 button-hole¹⁴

Infine, l'uso di sostituti lacrimali, preferibilmente monodose, per 2-3 mesi, si presenta utile in quanto, dopo il trattamento, si ha un'ipoestesia per la scomparsa delle terminazioni nervose che, normalmente, regolano la produzione delle lacrime: in questo modo si evitano problemi di irregolarità superficiali e di secchezza oculare.

BIBLIOGRAFIA

1. Vinciguerra P, Camesasca FI, Ponzin D, Use of amino acids in refractive surgery. *J. Refract. Surg.* 2002; (suppl) 18.
2. Rama P, Matuska S, Trattamento del cheratocono. *L'Oculista Italiano* 126/127,14-18, Mar-Set 2000.
3. Albert DM, Jackobiec FA, Principi e Pratica in Oftalmologia. (1): 54-57, 1995.
4. Dal Fiume E, Rama P, Buratto L, Merlin U, *Chirurgia della Cornea*-153-156 Fabiano Ed 1993.
5. 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.
6. Chi HH, Katzin HM, Teng CC, Hystopatology of keratoconus. *Am J Ophthalmol* (42): 847, 1956.
7. Teng CC, Electron microscope study of the pathology of keratoconus 2. *Am J. Ophthalmol* (55): 18, 1963.
8. Patone C, Joyon L, Rocher F, Ultrastructure of keratocone. *Arch Ophthalmol*, 30: 403, 1970.
9. Pouliquen Y, Graf B, De Kozok y, et al, Etude morphologique du keratocone. *Arch Ophthalmol* 30: 497, 1970.
10. Dal Fiume E, Rama P, Buratto L, Merlin U, *Chirurgia della Cornea*. 153-156, Ed 1993.
11. Wollensak et all. Keratocyte Apoptosis After Corneale Collagen Cross linking Using Riboflavin/UVA treatment" *Cornea* Jan 2004.
12. Cho K.S. Lee et all-*Invest Ophthalmol.Vis. Sci* 1999.
13. 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.
14. Spadea L., Di Gregorio A. "Il Cross-linking del collagene corneale con riboflavina" *Superficie Oculare*, Anno II, N. 2, 5, Aprile-Giugno 2008.