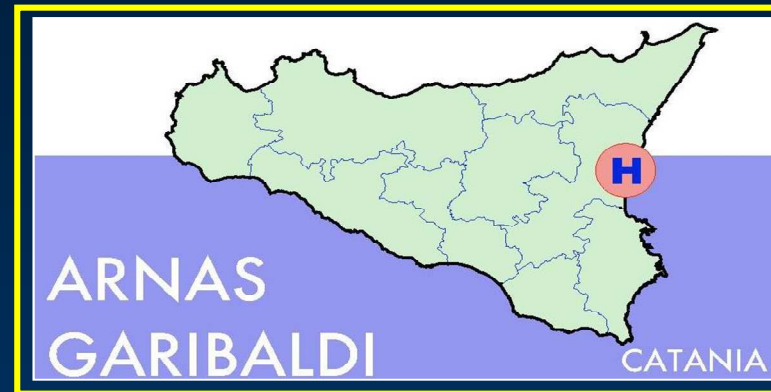


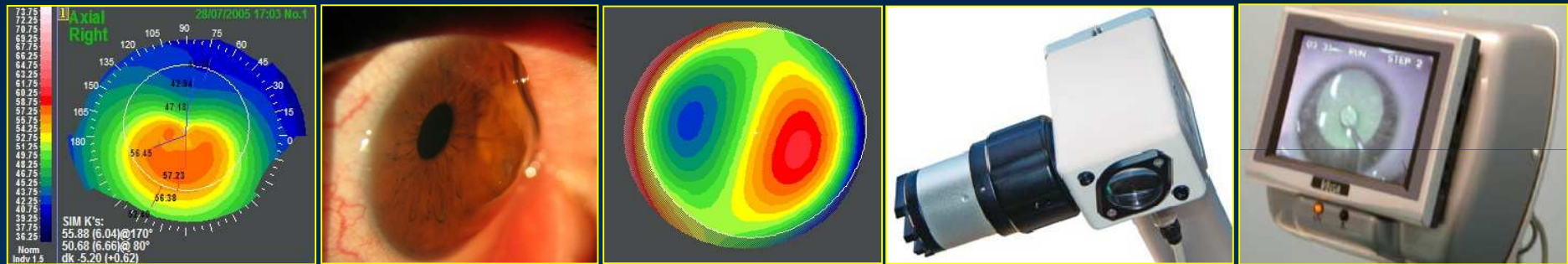
# Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale e di Alta Specializzazione Garibaldi Catania



Unità Operativa Complessa di Oftalmologia

*Direttore: Dott. Antonio Rapisarda*

# Trattamento del cheratocono con crosslinking con riboflavina: nostra esperienza



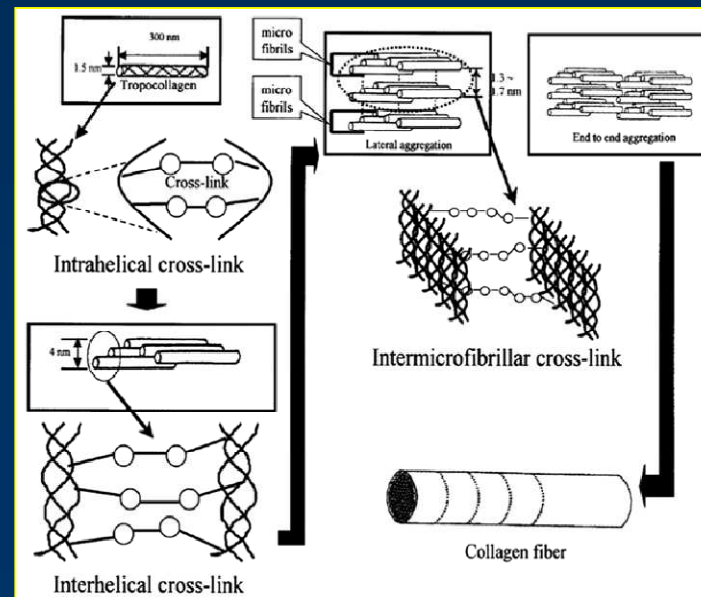
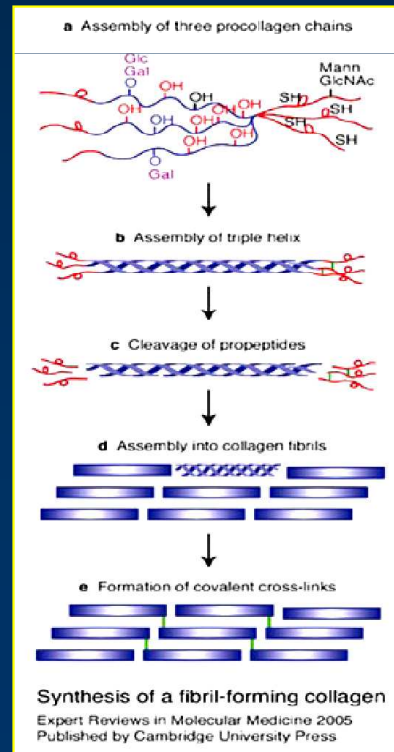
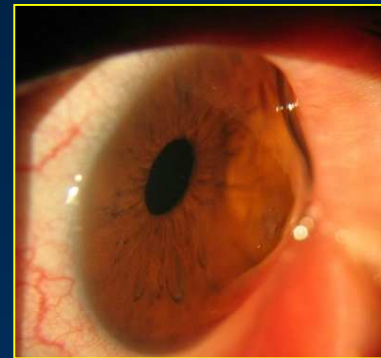
Valeria Distefano, Mariella Lombardo, Giuseppa Romano, Lorenzo Rapisarda

XXXV Congresso S.O.Si.

*Terrasini 15 – 17 Aprile 2010*



# Biomeccanica corneale: cornea normale versus cheratocono



# Cross Linking

Metodica che incrementa i ponti molecolari tra le fibre del collagene stromale

- **Enzimatico:** l'enzima lisilossidasi (LOX) → CL fisiologico del collagene
- **Chimico:** gluteraldeide, formaldeide; per es. le aldeidi del glucosio attraverso gli AGEs (Advanced End-products) → CL nel diabete tipo I e II (reazione di Maillard)
- **Fotochimico:** raggi UV, radiazioni ionizzanti
- **Foto-ossidativo:** RIBOFLAVINA – UVA

- **Fisiologico:** età-dipendente
- **Patologico:** dismetabolico
- **Terapeutico:** fotobiologicamente indotto

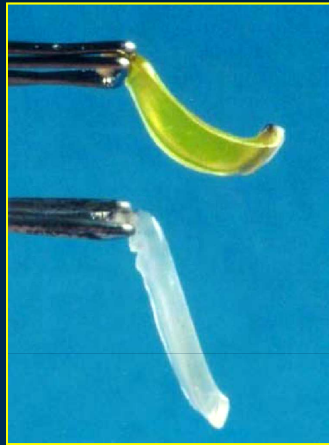
# Studi preclinici sul Cross-Linking corneale

- Primi anni '90 studi fotobiologia per individuazione di “*collanti biologici*” attivabili con sorgenti termiche o luminose per incrementare la resistenza del collagene stromale (l'azione collante è mediata da un meccanismo ossidativo indotto dalla liberazione di radicali ossidrilici)
- Metà anni '90 gruppo di ricercatori dell'Università di Dresda (Germania) (Gregor Wollensak, Theo Seiler ed Eberhard Spoerl) studi per rallentare o bloccare la progressione del cheratocono

- Aumento di resistenza allo stramento
- Il comportamento termo-meccanico
- Aumento della resistenza alla proteolisi enzimatica
- Aumento di spessore delle fibre collagene
- Apoptosi dei cheratociti
- Densità delle cellule endoteliali

## Aumento di resistenza allo stiramento

*Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking*



*Wollensak G et al. J Cataract Refract Surg 2003*

- Aumento di resistenza strutturale della cornea sottoposta a cross-linking che mantiene la sua forma rispetto a quella non trattata
- Incremento di resistenza allo stiramento della cornea dopo cross-linking del collagene, rispetto alla cornea di controllo (**stress-strain test**)
- La resistenza è maggiore a carico dei 300  $\mu$  più anteriori dello stroma corneale grazie all'assorbimento a questo livello della riboflavina che aumenta l'efficacia dei raggi UVA nel collagene corneale

## Comportamento termo-meccanico

*Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light*

*Kohlhass M et al. J Cataract Refract Surg 2006*

- Il 65-70% dei raggi UVA viene assorbito dai 200  $\mu$  più anteriori della cornea



*Termomechanical behaviour of collagen-cross-linked porcine cornea*

*Spoerl E et al. Ophthalmologica 2004*

- Cornee trattate più resistenti alla degradazione termica (75°) rispetto alle non trattate (70°) e la porzione anteriore rispetto alla posteriore = **preservazione dell'endotelio e della curvatura corneale**



## Aumento della resistenza alla proteolisi enzimatica

*Increased resistance of cross-linked cornea against enzymatic digestion*

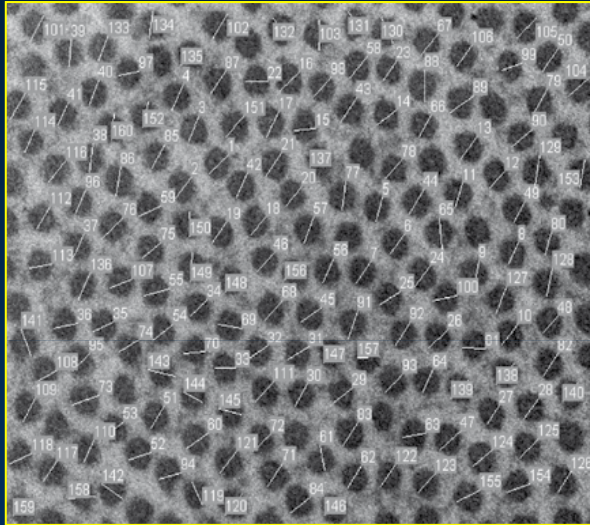
*Spoerl E et al. Curr Eye Res 2004*

- Maggiore resistenza all'azione delle collagenasi rispetto alle cornee non trattate (↑ attività collagenasica = assottigliamento cornee)
- Tempo di digestione enzimatica maggiore nelle cornee trattate rispetto alle non trattate
- Tempo di digestione enzimatica aumenta in base all'energia irradiata, risultando ad un'energia di 3 mW/cm<sup>2</sup> pari al doppio (15 giorni) rispetto alle cornee non trattate (6 giorni)



## Aumento di spessore delle fibre di collagene

*Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen cross-linking by riboflavin/UVA*



*Wollensak G et al. Cornea 2004*

- Aumento di spessore delle fibre di collagene stromale (metà anteriore dello stroma > metà posteriore) = **maggiore resistenza e stabilità biomeccanica**
- Il diametro delle fibre dello stroma anteriore aumenta di ~ 12.2%, mentre quello delle fibre posteriori di ~ 4.6% con formazione di finissime microfibrille che compattano le fibre collagene = **maggiore regolarità e rigidità strutturale**

## Apoptosi dei cheratociti

*Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment*

*Wollensak G et al. Cornea 2004*

- Il danno apoptotico è dose-dipendente
- La dose di UVA di 3 mW/cm<sup>2</sup> provoca apoptosi cellulare fino ad una profondità di 300 μ = **giusta quantità di UVA da utilizzare**

*Treatment of progressive keratoconus by Riboflavin-UVA-Induced Cross-Linking of Cornea Collagen: Ultrastructural Analysis By Heidelberg Retinal Tomograph II In Vivo Confocal Microscopy In Humans*

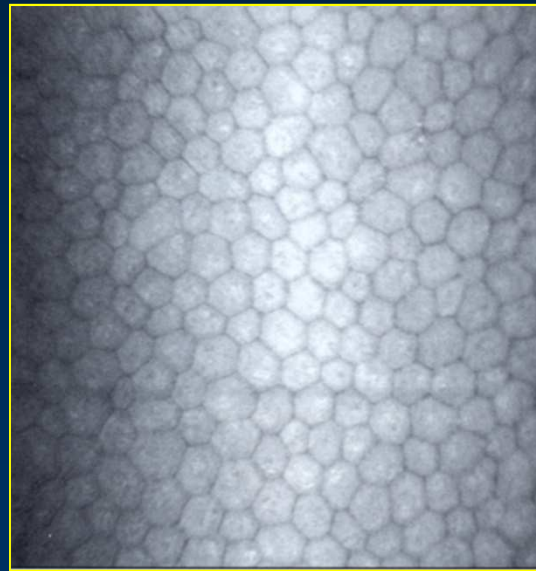
*Mazzotta C et al. Cornea 2007*

- Alle 24 dal trattamento l'apoptosi è limitata alla sola porzione anteriore (assenza totale dei cheratociti), mentre la porzione posteriore presenta una densità stromale cheratocitaria normale

## Densità delle cellule endoteliali

*Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen cross-linking for the treatment of keratoconus*

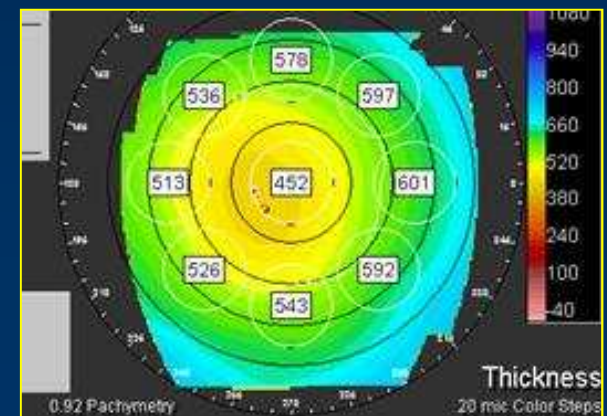
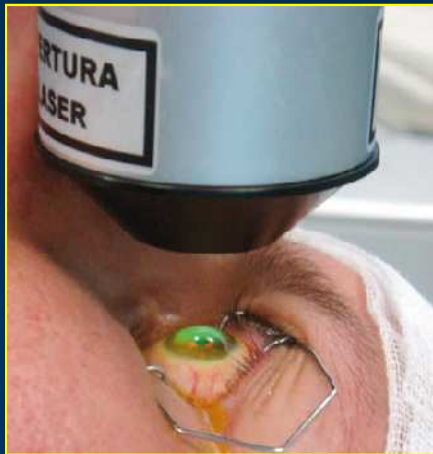
*Wollensak G et al. Am J Ophthalmol 2003*



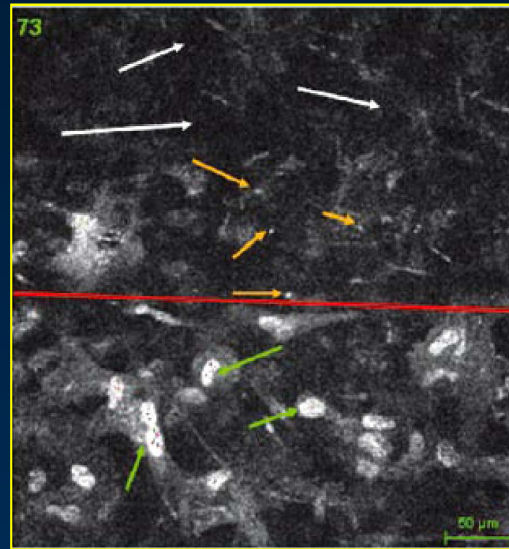
- Nelle cornee con spessore  $< 400 \mu$  l'effetto citotossico sull'endotelio viene raggiunto con la dose di UVA pari a  $3 \text{ mW/cm}^2$  = **danni irreparabili del cross-linking su cornee di spessore  $< 400 \mu$**

# 3 cardini fondamentali del CXL

- Densità di potenza da trasferire al tessuto pari a  $3 \text{ mW/cm}^2$  per 30 minuti
- Concentrazione della soluzione fotosensibilizzante e del filtro UVA (Riboflavina fosfato allo 0.1% in soluzione di Destrano T 500 al 20%)
- Spessore corneale minimo pari a  $400 \mu$  (epitelio compreso)



# Meccanismo d'azione del CXL foto-ossidativo

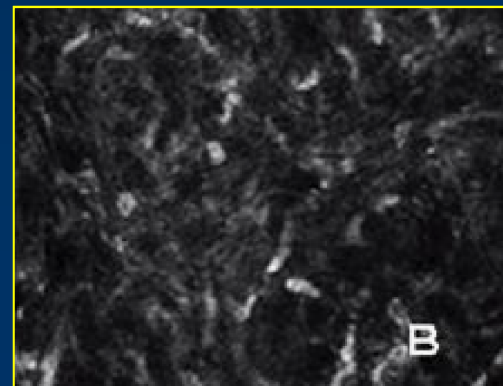


- **Prima fase del processo di fotopolimerizzazione:** *deaminazione ossidativa* con formazione dei legami fra filamenti di collagene adiacenti contenuti all'interno della stessa fibrilla
- **Seconda fase del processo di fotopolimerizzazione:** ripopolamento cellulare con cheratociti “sani” provenienti dalla porzione corneale posteriore e (solo parzialmente) periferica della cornea con durata ben superiore al tempo di rinnovamento del collagene corneale (24 – 36 mesi)

# Valutazione preoperatoria

## ➤ Importanza dell'esame di microscopia confocale

- La presenza di strie reticolari è considerata fattore di rischio per lo sviluppo di haze postoperatorio
- La presenza di nuclei attivati di cheratociti nello stroma anteriore rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di haze precoce, frequentemente correlato all'età (< 20 anni)





# Indicazioni

## ➤ Elettive

- Età 12 – 26 anni
- Curvatura corneale media  $< 53$  D
- Progressione clinica e strumentale (refrattiva, topografica, pachimetrica, aberrometrica e confocale) negli ultimi 6 – 12 mesi
- Spessore corneale  $\geq 400$   $\mu$  in thinnest point
- “Clear cornea” biomicroscopicamente e confocalmente
- Ectasie iatrogene (post – LASIK, post – PRK)

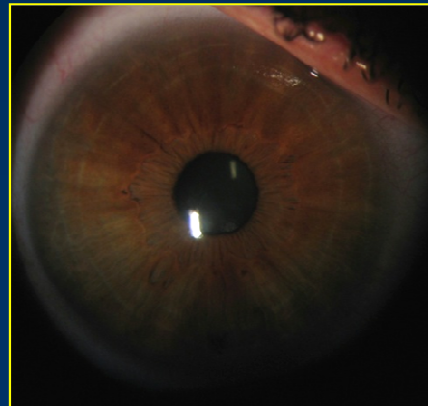
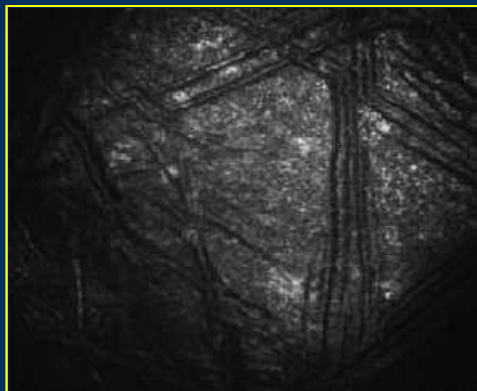
## ➤ Non elettive

- Età 26 – 40 anni
- Curvatura corneale media  $> 53$  D
- Strie di Vogt (anche lievi)
- Significativa ametropia sferica e anisometropica ( $> 4$  D)
- Intolleranza alle lenti a contatto
- Peggioramento soggettivo non strumentalmente evidente
- Melting corneale



# Controindicazioni

- Età > 40 anni
- Stabilità clinica e strumentale (refrattiva, topografica, pachimetrica, aberrometrica e confocale) negli ultimi 6 – 12 mesi
- Spessore corneale < 400  $\mu$  in thinnest point
- Cicatrici corneali centrali
- Ridotta compliance del paziente
- Infezioni concomitanti e pregressa cheratite erpetica
- Malattie autoimmuni
- Dry eye severo



# Siena staging based therapeutic approach in keratoconus

## STAGE I

- Optical/HRGP correction +++
- Cross-linking (pathogenetic approach) +++
- Intrastromal rings segments ++ -
- Lamellar keratoplasty + - -
- Penetrating Keratoplasty - - -

## STAGE II

- Cross-linking + + +
- Intrastromal rings ++ -
- Lamellar keratoplasty + + +
- Penetrating keratoplasty + - -

## STAGE III

- Cross-linking + - - (adjuvant)
- I C R S - - -
- DALK + + + +
- PK + + + -

## STAGE IV

- Cross-linking - - -
- I C R S - - -
- DALK + - -
- PK + + + +

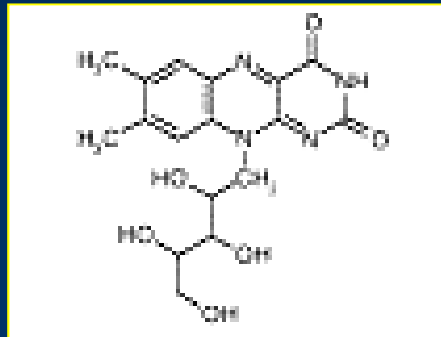
# Nostro approccio terapeutico per CXL

- Cheratocono
- Età compresa fra 10 e 40 anni
- Progressione documentata clinica e strumentale
- Peggioramento dell'acuità visiva non corretta (UCVA) e corretta (BSCVA) negli ultimi 3-6 mesi ( $\geq 1$  linee di Snellen)
- Aumento topografico dei K ( $> 0.5$  D) e/o riduzione della pachimetria nel punto più sottile ( $\geq 10$   $\mu\text{m}$ )
- Valore dei K value  $< 55$  D
- Pachimetria US ed ottica  $\geq 400$   $\mu\text{m}$  nel punto più sottile
- Assenza di opacità corneali e strie di Vogt (in cornea chiara) all'esame con LF

# Strumentario

## ➤ **RICROLIN®** (Riboflavina 0.1% e Destrano T500 20%)

- Soluzione oftalmica per uso parachirurgico a PH 7.25
- Non ha controindicazioni né effetti collaterali
- **Riboflavina (Vitamina B2)** (isolata nel 1927 da Paul Gyorgy, sintetizzata nel 1935 da Richard Kuhn; composto eterociclico ottenuto da una molecola di isoallossazina cui è legata una catena formata da ribitolo; di colore giallo, poco solubile in acqua, stabile al calore e fluorescente se sottoposta a luce ultravioletta; se colpita dalla luce si ha una reazione di fotolisi con distacco di un radicale ribitolo e perdita dell'azione vitaminica)



# Funzioni nel CL

## ➤ Riboflavina 0.1%

- Favorisce l'assorbimento e la concentrazione della radiazione UV a livello dello stroma corneale anteriore-intermedio
- Funge da agente fotosensibilizzante con produzione di specie reattive dell'ossigeno
- Garantisce la protezione dell'endotelio e delle altre strutture sensibili dell'occhio (effetto barriera) riducendo del 95% l'intensità di energia (**senza Riboflavina 30% di assorbimento energetico sull'endotelio e 50% sul cristallino**)

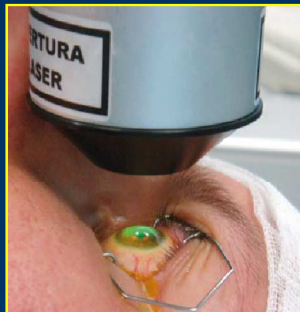
## ➤ Destrano T500 20%

- Mantenimento della osmolarità stromale (no imbibizione e rigonfiamento corneale durante il trattamento)

# Strumentario

## ➤ CSO C.B.M. VEGA Medical Device (2006)

- Sorgente luminosa a diodi
- Emissione UVA con  $\lambda$  di picco 370 nm con uniformità  $> 90\%$
- Densità di potenza di 3 mW/cm<sup>2</sup>
- Diaframma di emissione da 4.5 a 11 mm di  $\varnothing$
- Distanza focale 54 mm
- Sistema di collimazione con 2 LED intermittenti a luce rossa
- Mira luminosa di fissazione coassiale alla telecamera integrata nella testa ottica
- Schermo LCD di controllo (taratura dello strumento, fase di staining con relativo timer da 10 a 30 minuti, contaminuti del tempo di esposizione a step di 5 minuti con evidenziazione dello step da 1 a 6)
- Comando a pedale per il sistema di accensione e spegnimento dell'illuminatore



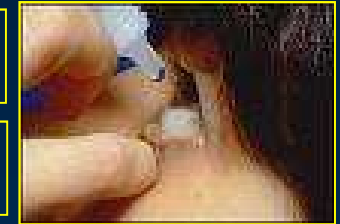
# Tecnica

1. Apertura sterile in sala operatoria



2. Verifica dell'energia UVA mediante power – meter

3. Pre-medicazione con pilocarpina 1% ( 120 – 60 – 30 minuti prima)



4. Anestesia topica (lidocaina 4% coll.)ogni 15 minuti per 1 ora prima

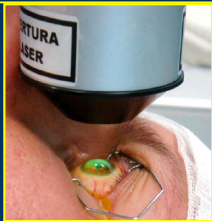


5. Posizionamento blefarostato e disepitelizzazione corneale



6. Instillazione di lidocaina 4% collirio

7. Instillazione di riboflavina ogni 2 minuti per 10 – 15 minuti



8. Instillazione di riboflavina ogni 2 – 3 minuti per 30 minuti (6 steps da 5 minuti) durante l'irradiazione corneale dei 9 mm centrali



9. Lavaggio con BSS, medicazione con colliri, bendaggio con LAC



# Rischi per le strutture dell'occhio

- Nessun effetto collaterale per l'endotelio corneale allo stato attuale
- Nessun effetto collaterale per la lente allo stato attuale
- Nessun effetto collaterale per la retina allo stato attuale
- Dolore post-operatorio e sensazione di corpo estraneo per 24 – 48 ore fino alla riepitelizzazione completata
- Iperlacrimia per 24 – 72 ore
- Edema corneale transitorio con appannamento visivo per 30 – 60 giorni
- Edema corneale persistente oltre il secondo mese
- Haze corneale



# Protocollo terapeutico

## ➤ Pre cross-linking

- Aminoacidi per os (1 settimana)  
(L-Prolina 1.75g/die, Glicina 1.5g/die, L-Lisina 0.25g/die)

## ➤ Post cross-linking

- Aminoacidi per os (1 settimana)  
(L-Prolina 1.75g/die, Glicina 1.5g/die, L-Lisina 0.25g/die)
- Ciclopentolato collirio
- Paracetamolo-codeina, ketorolac
- Fluorochinolonici ad uso topico per 20 giorni  
(Ofloxacina, Levofloxacina, etc.)
- FANS (Flurbiprofene, Diclofenac, Indometacina, etc.) per 40 giorni
- Sostituti lacrimali a base di acido ialuronico e di fosfolipidi
- Corticosteroidi in casi selezionati

# Scopo della terapia medica nel CL

- Creare le condizioni ottimali perché si possa avere il miglior effetto cross-linkante e contemporaneamente favorire i processi di guarigione
- Eliminare o comunque rendere sopportabile la sintomatologia dolorosa post-operatoria, unico raro disturbo soggettivo fastidioso per il paziente
- Accelerare la riepitelizzazione della cornea “denudata” dall’epitelio perché la riboflavina penetri in modo ottimale nello stroma a tutto spessore
- Ricostruire, a breve – medio termine, una normale cito-architettura dello stroma
- Non interferire e possibilmente incentivare la formazione dei cross-links intra ed intermolecolari del collagene a breve termine
- Non inibire e possibilmente promuovere la neo-sintesi di collagene, fondamentale per ottenere un risultato positivo e stabile a medio – lungo termine

# Valutazione postoperatoria

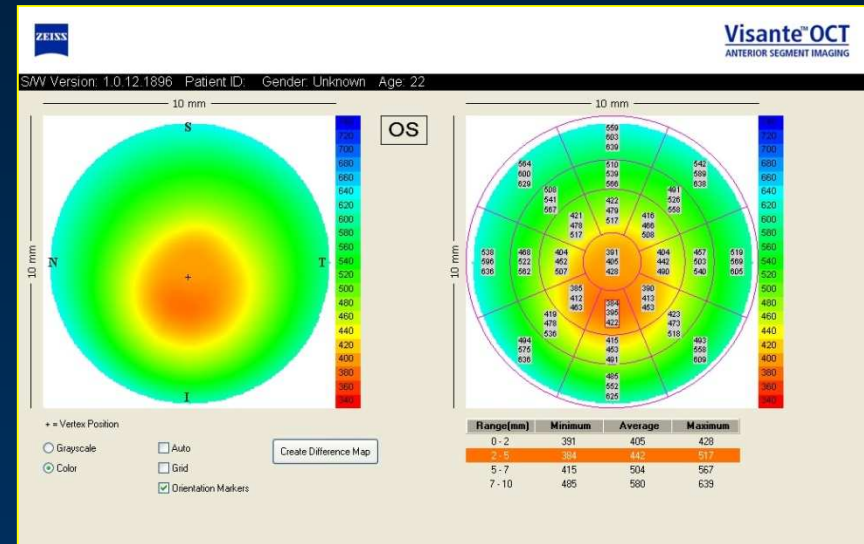
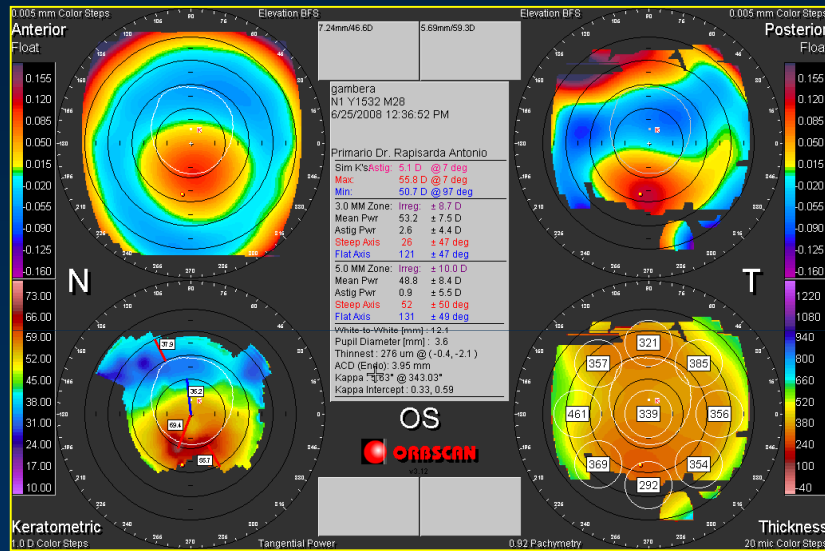
## ➤ Timing

- 1, 3, 6, 12 e 24 mesi

## ➤ Esami clinico-strumentali

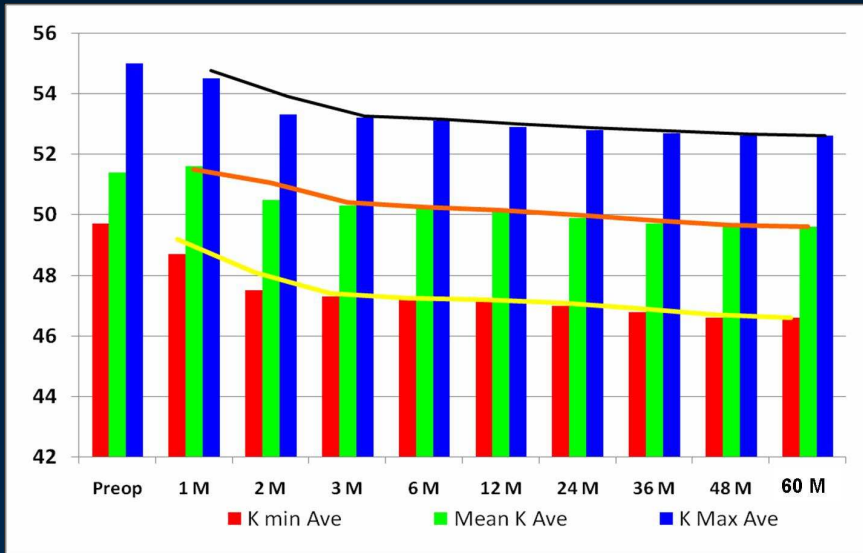
- Esame del visus (UCVA, BSCVA)
- Biomicroscopia
- Foto del segmento anteriore
- Tonometria ad applanatio
- Topografia
- Topo-aberrometria
- Pachimetria ottica
- Micro-morfologia (Confoscan)

Dopo crosslinking non si ha una riduzione della pachimetria: i dati da Orbscan sono solo apparenti e correlati a limitazioni fisiche della sorgente luminosa dovute al cambiamento nella densità e riflettività stromali (multiple scattering)

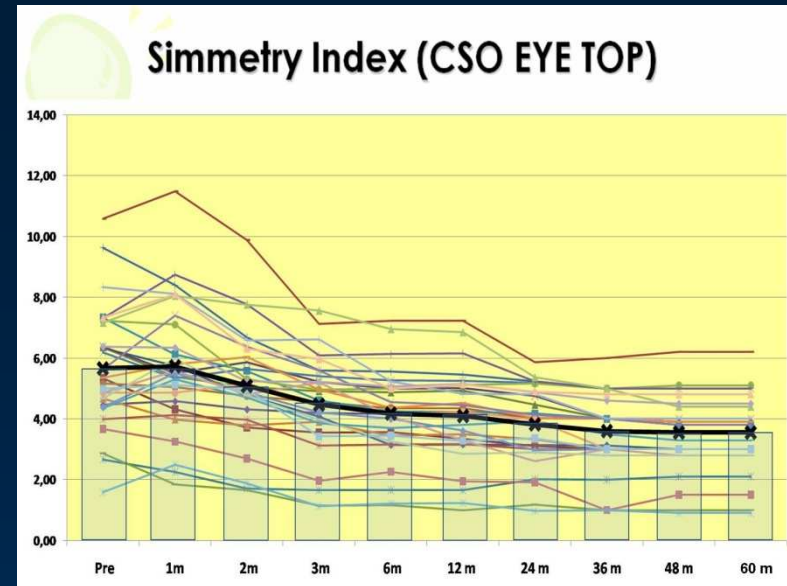


# Pazienti trattati

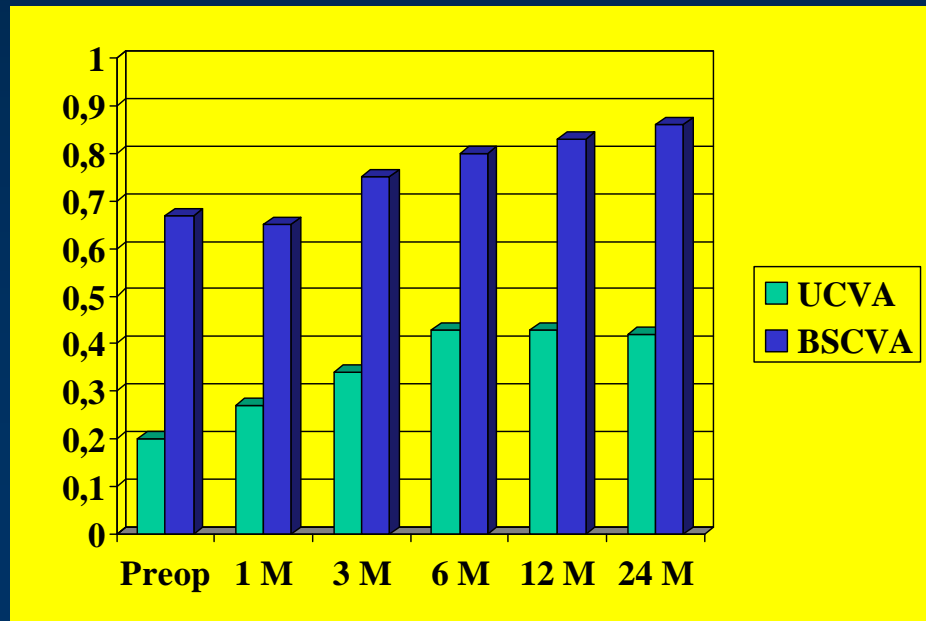
- Occhi : 35 (15 OD/20 OS)
- Età media: 29.75 anni (21 – 40 anni)
- Sesso: ♂ 16 ♀ 8
- Pazienti affetti da cheratocono progressivo
- Trattamento di crosslinking UVA con riboflavina (secondo il protocollo di Siena – Dresden modificato)
- Valutazione: Pre-op, 1, 3, 6, 12, 24 mesi
- Pachimetria: 458,7  $\mu\text{m}$  (402 – 577 $\mu\text{m}$ )
- IOP: 13,9 mmHg (11 – 18 mm Hg)
- Conta cellule endoteliali: 2348 cell/ $\text{mm}^2$  (media)
- Follow – up: 11.3 mesi (6/24 mesi)
- Occhi trattati con follow – up di 6 – 11 mesi: 18 occhi
- Occhi trattati con follow – up di 12 – 23 mesi: 16 occhi
- Occhi trattati con follow – up di 24 mesi: 1 occhio



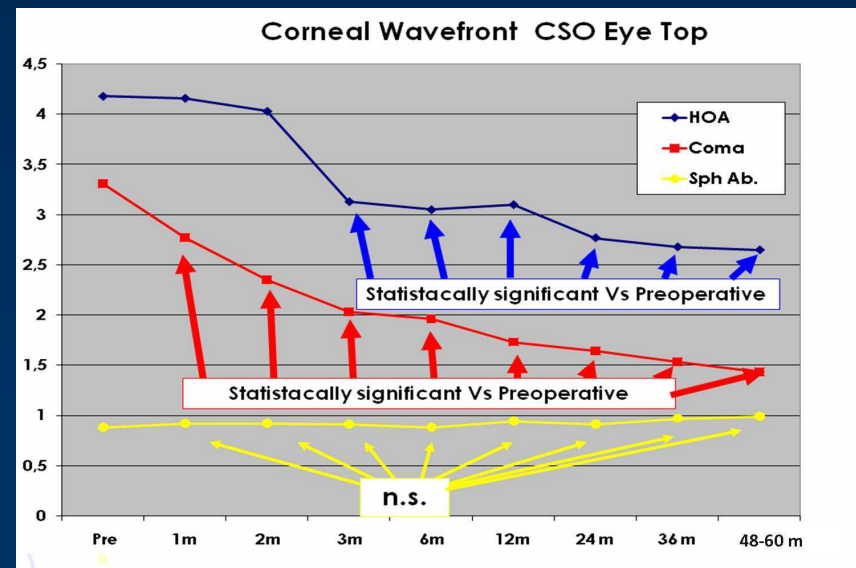
Mean K during follow-up



Simmetry Index Results



Mean functional results in follow-up



Corneal Wavefront Results



# Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin–ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen

## Preliminary refractive results in an Italian study

Aldo Caporossi, MD, Stefano Baiocchi, MD, Cosimo Mazzotta, MD,  
Claudio Traversi, MD, Tomaso Caporossi, MD

The reduced mean K can explain the increased UCVA but only the increased symmetry of the cornea help to explain the improvement in BSCVA.

## ➤ Risultati

- Scarsi e transitori effetti collaterali osservati
- Riduzione del Mean K topografico:  $> 3 D$
- Miglioramento UCVA m: 2 Snellen lines
- Miglioramento BSCVA m: 2.5 Snellen lines
- Miglioramento della simmetria:  $> 80\%$
- Riduzione significativa dell'aberrazione comatica
- Stabilità refrattiva a 12 – 24 mesi, senza ripresa di malattia (topografica e funzionale)

## ➤ Complicanze

- Edema corneale (7 giorni/3 mesi): 20/35 (57%)
- Edema persistente ( $> 6$  mesi): 02/35 (5.7%)
- Ritardo di riepitelizzazione ( $> 6$  giorni): 05/35 (14.2%)
- Perdita  $> 2$  Snellen lines: (1° mese) 03/35; ( $> 6$  mesi) 0/35
- Haze alla biomicroscopia: (0 – 6 mesi) 05/35; ( $> 6$  mesi) 2/35 (5.7%)
- Melting corneale: 00/35.
- Ipertono (primi 3 mesi) 02/35; ( $> 6$  mesi) 00/35
- Danno endoteliale: 00/35
- Progressione del cheratocono: 00/35.

# Conclusioni

- Procedura scarsamente invasiva, di facile esecuzione, ripetibile nel tempo, semplice e sicura se si seguono le giuste indicazioni
- Effetti limitati localmente e nessun danno per l'endotelio corneale (trasparenza della cornea)
- Nessuna controindicazione all'esecuzione di eventuali procedure chirurgiche di cheratoplastica
- Capacità di **stabilizzare le cornee con cheratocono progressivo** (aumento della resistenza strutturale allo stiramento meccanico, incremento di temperatura e dell'attività degli enzimi litici)
- **È l'unica terapia con finalità etio-patogenetica**
- Impatto socio-sanitario di grande rilievo (potenziale **riduzione** della necessità di **trapianti corneali intorno al 50%**)
- Importanza della **diagnosi precoce** con revisione della strategia attendista fino ad oggi in uso per lo **spostamento dell'obiettivo terapeutico dall'effetto** (decadimento proprietà ottiche) **alla sua causa** (indebolimento strutturale della cornea)



Grazie



Grazie