

TRATTAMENTI INNOVATIVI OFTALMOLOGIA: IL CRO CORNEALE



TIVI IN OSS LINKING

Il *cross-linking* trova impiego prima come tecnica applicata in oftalmologia umana per il trattamento di patologie ectasiche della cornea di natura primaria o secondaria, ma nel 2013 un primo studio pilota presenta l'idea di introdurre il CXL in Medicina Veterinaria come trattamento efficace in casi di cheratiti collagenasiche nel cane e nel gatto.

© Koronov - shutterstock.com

La *cross-linking* corneale (CXL) è una tecnica innovativa, che utilizza una reazione di tipo foto-chimico per trattare alcune condizioni patologiche che affliggono la cornea. Si configura come un trattamento che non comporta un significativo grado di invasività e risulta di facile esecuzione.

La procedura prevede il trattamento della cornea, precedentemente impregnata da una sostanza foto-attivante, con un fascio di raggi ultravioletti. L'associazione di questi due elementi si traduce in una serie di effetti positivi a livello dello stroma corneale, correlati in particolare alla formazione di legami covalenti tra le catene di fibrille collagene ("cross-links").

La tecnica è stata sviluppata in Medicina Umana a partire dalla fine degli anni '90 per il trattamento di una condizione ectasica della cornea chiamata "cheratocono", dove si osserva una graduale perdita della rigidità dello stroma, a cui consegue una modificazione del profilo corneale. È stato successivamente compreso che lo stesso trattamento poteva comportare anche un'efficace azione di tipo antimicrobico nelle cornee irradiate; questo ha fatto sì che si considerasse una sua applicazione nella gestione delle cheratiti infettive. Dal momento che queste ultime condizioni, a differenza del cheratocono, sono di comune riscontro in Medicina Veterinaria, a partire dal 2013 il CXL è stato impiegato con risultati incoraggianti anche nel cane, nel gatto e nel cavallo.

CHE COSA È IL CROSS-LINKING?

Il termine *cross-linking* è utilizzato nelle scienze biologiche per indicare la formazione di legami ponte tra proteine e altre molecole a seguito di una reazione chimica. Tale reazione può originare a seguito di stimoli diversi quali calore, pressione o radiazioni. Il risultato è un cambiamento delle proprietà fisiche del materiale "cross-linkato" (Raikup&Spoerl, 2013).

La formazione di *cross-link* avviene naturalmente in diversi tessuti animali, con una frequenza che aumenta con l'invecchiamento. Tale fenomeno è alla base del graduale incremento di rigidità in tessuti ad alte percentuali di collagene come la cornea, il cristallino, la cute, i vasi sanguigni e le cartilagini articolari (Elsheikh et al., 2007). Un analogo effetto di irrigidimento si osserva anche a seguito di una continua esposizione ai raggi solari o al fumo (Kennedy et al., 2003).

STORIA DEL CROSS-LINKING CORNEALE

Prime applicazioni di *cross-linking*

Storicamente, diverse sono le applicazioni in cui è stato utilizzato il *cross-linking*: la concia del cuoio richiede, per esempio, la promozione del *cross-linking* all'interno del collagene di tipo I presente nella pelle; anche la fissazione dei tessuti in formaldeide è basata sulla capacità di quest'ultima di legare gli aminoacidi lisina, arginina, tirosina, asparagina, istidina, glutammina e serina tramite l'induzione del *cross-linking* (Sompuram et al., 2004).

Nel 1968, Christopher Foote ha divulgato il meccanismo attraverso cui avviene l'ossidazione fotosensibilizzata nei sistemi biologici (Foote, 1968). Fujimori, nel 1988, ha rivelato un ulteriore meccanismo del *cross-linking* nel collagene di tipo I che coinvolge sia l'ossidazione mediante l'ozono, sia la foto-ossidazione tramite irradiazione UV (Ashwin&McDonnell, 2010; Fujimori, 1988). L'induzione artificiale di *cross-linking* è stata in seguito largamente impiegata in bioingegneria per stabilizzare tessuti che contengono collagene, per la creazione di impianti a base di collagene (Chan & So, 2005) e ricostruzioni nel campo dell'ingegneria dei tessuti (Spoerl et al., 2004).

Introduzione del CXL in Medicina Umana

Il *cross-linking* trova impiego come tecnica applicata in oftalmologia umana per il trattamento di patologie ectasiche della cornea di natura primaria o secondaria: il cheratocono, la degenerazione marginale pellucida e la cheratectasia iatrogena (post-interventi di correzione della visione laser) (FarhadHafezi et al., 2007a, 2009; Theo Seiler&Hafezi, 2006; Gregor Wollensak, Spoerl, &Seiler, 2003a).

Questa sua applicazione è stata denominata Corneal Cross-Linking (CXL).

Tutte queste condizioni patologiche sono caratterizzate da una marcata riduzione della stabilità biomeccanica della cornea.

La teoria che l'induzione di legami crociati (*cross-linking*) nel tessuto corneale, potesse risultare in un irrigidimento e rafforzamento di un tessuto corneale ectasico si è diffusa nei tardi anni '90 (Ashwin&McDonnell, 2010; Randleman et al., 2015).

Le prime ipotesi sono partite da una serie di studi osservazionali che dimostravano una ridotta incidenza di cheratocono in pazienti colpiti da diabete; le indagini dimostravano che nelle cornee di questi soggetti si sviluppavano naturalmente reazioni di *cross-linking* attraverso una via di glicosilazione non enzimatica delle proteine stromali (Sady et al., 1995a; T Seiler et al., 2000).

Si attribuisce a Theo Seiler, oftalmologo tedesco e componente del gruppo di ricerca di Spoerl et al. dell'Università di Dresda, l'intuizione di utilizzare la luce ultravioletta (UV) per stimolare reazioni di *cross-linking* nella cornea. Nel farlo intendeva replicare il processo già utilizzato in odontoiatria per rafforzare le gengive (Theo Seiler, comunicazione personale, 2014).

Con una pubblicazione del 1997 in tedesco e del 1998 in inglese, i ricercatori presentano i risultati del loro primo studio per indurre legami di cross-link in occhi porcini (Spörl et al., 1997). Dopo la rimozione dell'epitelio la cornea era stata trattata con vari metodi quali luce UV (254 nm), riboflavina e UV (365 nm), riboflavina e luce blu (436 nm), luce solare, glutaraldeide. Ogni gruppo prevedeva dieci occhi. Tra i vari trattamenti solo l'associazione di UV con riboflavina e la glutaraldeide aveva prodotto un incremento nella rigidità delle cornee trattate comparato con il gruppo di controllo.

Gli esperimenti eseguiti in vitro su occhi porcini evidenziarono un aumento del 70% della rigidità delle cornee trattate rispetto ai controlli (Spoerl et al., 1998b; Spoerl, Wollensak&Seiler, 2004).

Gli stessi risultati sono stati poi confermati in ripetuti studi in vitro su cornee di suino, coniglio e uomo (Randleman et al., 2015; Shell, 1982b; Spoerl et al., 1998b; Spörl et al., 2000; Wollensak, Spoerl, &Seiler, 2003c).

Questi studi preliminari, oltre a dimostrare l'efficacia del trattamento, erano volti a valutarne la sicurezza come requisito per il passaggio ai primi trial in vivo. Veniva in particolare misurato quanto lo spessore della cornea proteggesse l'endotelio e le altre strutture oculari sottostanti dai possibili effetti collaterali dell'irradiazione UV (Wollensak, Spoerl, &Seiler, 2003d; Wollensak et al., 2003).

La prima applicazione clinica è stata contestuale ad uno studio pilota iniziato dal gruppo di Dresda nel 1998, seguito poi dalla pubblicazione nel 2003, in cui sono stati trattati 23 occhi di pazienti umani affetti da cheratocono progressivo. I risultati evidenziarono un arresto della progressione della patologia e una riduzione dell'ectasia corneale del 70% (Wollensak, Spoerl, &Seiler, 2003b).

Studi successivi hanno poi riportato risultati altrettanto promettenti nel suo utilizzo in pazienti affetti da ectasie corneali conseguenti a chirurgie refrattive (Hafezi et al., 2007b).

Nel 2014 viene coniato ufficialmente il termine PACK-CXL (Photo Activated Chromophore for Keratitis) per intendere l'applicazione specifica del CXL nel trattamento di cheratiti infettive (Hafezi&Randleman, 2014).

Questa distinzione nasce con lo scopo di differenziare le linee di ricerca e facilitare l'ottimizzazione di protocolli specifici per ogni indicazione del CXL.

Applicazione del CXL in Medicina Veterinaria

Nel 2013 viene pubblicato un primo studio pilota (Spiess et al., 2014) che presenta l'idea di introdurre il CXL in Medicina Veterinaria come trattamento efficace in casi di cheratiti collagenasiche nel cane e nel gatto.

A tal scopo, basandosi sui dati promettenti derivati dalla letteratura della medicina umana (Iseli et al., 2008; Makdoui et al., 2010) e dagli studi in vivo su modelli animali in termini di sicurezza ed efficacia (Spoerl et al., 2007; Wollensak et al., 2004; Wollensak et al., 2004), sono stati trattati 3 cani e 3 gatti con condizioni di cheratomalacia progressiva unilaterale che colpivano l'intera superficie corneale o risultavano resistenti alle terapie antibiotiche convenzionali. Il protocollo impiegato era il protocollo Dresden standard con un'irradiazione di 3 mW/cm² per 30 min.

I risultati mostrarono un arresto della progressione della patologia in tutti i casi senza che fosse necessario un ricorso alla stabilizzazione chirurgica della cornea (Spiess et al., 2014).

Un lavoro analogo è stato portato avanti parallelamente (Famose, 2014) (*vedere figura 1*) su altri 8 cani con criteri di inclusione simili. Lo studio

CENNI DI ANATOMIA DELL'OCCHIO

La cornea è una membrana trasparente, priva di vasi ematici e linfatici, che costituisce la porzione anteriore della tonaca fibrosa del bulbo oculare. Ha una forma ellittica e convessa anteriormente con diametro orizzontale lievemente maggiore rispetto al verticale. Il suo spessore nel cane e nel gatto è approssimativamente di 0,7 mm. Lo spessore può variare significativamente tra specie, razze e individui, inoltre non è omogeneo su tutta l'estensione della cornea, ma risulta lievemente meno spessa centralmente. (Samuelson, 2013).

Nel cane si considerano misure medie di 0,45-0,55 mm nel centro e 0,5-0,65 mm nella periferia (Gilger et al., 1991; Hoehn et al., 2018; Samuelson, 2013) (vedere tabella).

Nel gatto invece, per quanto si riscontri una simile disomogeneità nello spessore, si riportano valori medi di tra 0,546 e 0,578 mm (Gilger, 1993; Schoster et al., 1995).

STRUTTURA DELLA CORNEA

Strutturalmente la cornea è costituita, dall'esterno verso l'interno, da uno strato epiteliale superficiale con la sua membrana basale, dallo stroma o sostanza propria, dalla membrana di Descemet e dallo strato più interno, l'endotelio.

L'epitelio è pluristratificato con una porzione esterna di cellule squamose, una intermedia di cellule poligonali le "wingcells" ed infine uno strato profondo di cellule colonnari che producono la membrana basale. Gli strati epiteliali sono uniti alla membrana basale attraverso emidesmosomi, e la membrana basale è a sua volta collegata allo stroma superficiale da sottili fibrille. La maggiore attività staminale avviene nell'area del limbo, punto di giunzione tra la cornea e la sclera. Questa zona, che definisce il margine circolare esterno della cornea, genera una migrazione di cellule basali in senso centripeto che risulta simultanea al flusso dagli strati basali profondi a quelli superficiali (Maggs, 2018).

Lo stroma, costituito da cheratociti, fibre di collagene e sostanza propria, rappresenta il 90% dello spessore corneale. Le fibre di collagene sono organizzate in fasci appiattiti pluristratificati di lamelle che si incrociano tra di loro a circa 90°. Ogni lamella è data da un insieme di fasci di fibrille collagene, la cui direzione è parallela all'interno della stessa lamella, ma può differire molto tra lamelle adiacenti (Samuelson, 2013). Le fibrille sono uniformemente

Corneal Location	Dog (mm)			
	Young ^a	Adult ^a	Aged ^a	Cat (mm) ^d
Superior peripheral	0.557 ± 0.007	0.612 ± 0.005 0.780 ^a	0.617 ± 0.006	0.538 ± 0.039 0.694 ^a
Midsuperior-nasal peripheral				0.523 ± 0.041
Nasal peripheral				0.530 ± 0.042
Midnasal-inferior peripheral				0.538 ± 0.042
Inferior peripheral		0.773 ^a		0.539 ± 0.037 0.760 ^a
Midinferior-temporal peripheral				0.548 ± 0.040
Temporal peripheral	0.540 ± 0.006	0.581 ± 0.006	0.643 ± 0.006	0.559 ± 0.043
Midtemporal-superior peripheral				0.558 ± 0.037
Central	0.520 ± 0.005	0.560 ± 0.005 0.735 ^a	0.597 ± 0.006	0.546 ± 0.048 0.767 ^a

Tabella. Valori medi di spessore corneale registrati mediante pachimetria ultrasonica (secondo Gilger et al., 1991; Schoster et al., 1995).

posizionate, mantenendo la stessa spaziatura tra l'una e l'altra. Questa precisa organizzazione risulta essere il fattore più rilevante per la trasparenza del tessuto e permette un passaggio del 99% della luce in assenza di fenomeni di rifrazione (Hogan et al., 1971; Samuelson, 2013).

Nello stroma si riscontrano almeno cinque tipi di collagene. Il tipo I è il più diffuso e costituisce le fibrille. Le fibrille di collagene, insieme ai proteoglicani e gli associati glicosaminoglicani e glicoproteine, formano il 15 - 25% dello stroma e sono la fonte di supporto strutturale principale di tutta la cornea (Samuelson, 2013).

Nello stroma sono presenti alcune popolazioni cellulari di fibrociti, denominati cheratociti, che contribuiscono alla formazione e al mantenimento delle lamelle stromali. La presenza di cristalli all'interno del citoplasma di queste cellule facilita il passaggio di luce (Samuelson, 2013).

In caso di ferite corneali profonde i cheratociti possono trasformarsi in miofibroblasti e produrre tessuto cicatriziale, che perde la caratteristica trasparenza (Jester, 2008).

Lo stroma corneale è per il 75%-85% acqua, ma questa percentuale è relativamente bassa se comparata ad altri tessuti (Samuelson, 2013).

Questo stato di disidratazione (indicato come "deturgescenza") è dipendente dall'integrità e dall'attività sia dell'epitelio anteriore che dell'endotelio. Le cellule ivi presenti, attraverso pompe Na^+/K^+ ATP dipendenti, muovono attivamente l'acqua al di fuori dello stroma. Le *tight junctions* tra cellule adiacenti vanno a formare inoltre una barriera idrofobica (Samuelson, 2013).

Una rottura della barriera o una disfunzione delle pompe esita in un rapido spostamento di acqua nello stroma, che per costituzione è altamente idrofilico. I glicosaminoglicani (GAGs) presenti nella cornea concorrono a definirne il grado di idratazione agendo come leganti di cationi (Gum&MacKay, 2013b); e appaiono inoltre responsabili del mantenimento di un'organizzazione regolare delle fibrille collagene attraverso il controllo della distribuzione dell'acqua all'interno del tessuto (Cheng & Pinsky, 2013; Funderburgh et al., 1990).

La membrana di Descemet rappresenta la membrana basale dell'endotelio il quale contribuisce alla sua produzione. Essa ha caratteristiche di elasticità ed è costituita da sottili filamenti stratificati di collagene disposti parallelamente alla superficie.

L'endotelio corneale è un singolo strato di cellule appiattite, immediatamente posteriore alla membrana di Descemet e che delimita la camera anteriore dell'occhio (Samuelson, 2013).

Il suo ruolo principale è quello di pompare ioni dallo stroma all'umore liquido, mantenendo lo stato di disidratazione e la trasparenza della cornea (Maggs, 2018b).

Le cellule endoteliali hanno nell'animale adulto una limitata capacità di rigenerarsi; per questo il loro numero tende a ridursi con l'età e lo stroma corneale tende a diventare gradualmente più spesso per aumento il conseguente stato di edema (Baroody et al., 1987; Joyce, 2003).

L'innervazione corneale particolarmente concentrata nel suo terzo anteriore è esclusivamente sensitiva ed è costituita dalle branche ciliari lunghe del nervo oftalmico (prima branca del nervo trigemino).

prevedeva tuttavia l'impiego di un protocollo accelerato di CXL, con un tempo di soli 3 minuti a fronte di una più potente irradiazione di intensità 30 mW/cm². Valutazioni progressive in termini di aspetto clinico, dolore, estensione difetto epiteliale e infiltrazione cellulare hanno portato gli autori a concludere come tutti i casi presentassero lo stesso esito a prescindere dalla presenza o differente sensibilità dei batteri isolati e a prescindere dalla durata della condizione patologica prima del trattamento.

Gli stessi autori hanno pubblicato poi un corrispondente studio clinico applicato a 10 gatti con

cheratiti collagenasiche (Famose, 2015).

HellanderEdman et al. (2013) hanno usato il CXL per nove casi di cavalli con cheratiti ulcerative. Il trattamento è stato effettuato in sedazione senza ricorso all'anestesia generale. Non venne riscontrato alcun tipo di effetto collaterale e risultati furono promettenti, tuttavia come negli studi precedenti mancava la presenza di un controllo per poter confrontare in maniera attendibile risultati con quelli ottenibili secondo le terapie convenzionali.

Il primo studio caso-controllo (Pot et al., 2014) ha messo a confronto 19 occhi con cheratomalacia di

cani e gatti trattati con CXL con 30 non trattati. Entrambi i gruppi erano comunque sottoposti a terapia medica. Questo studio rivelò alcune criticità in termini di significatività statistica che portarono a una sua prematura interruzione. Oltre alla dimensione ridotta del campione venne constatato come *bias* di selezione avessero portato a una distribuzione non randomizzata e uniforme nei due gruppi, con ulcere significativamente più estese e profonde nel gruppo del CXL. Lo studio permise comunque di evidenziare come, nonostante condizioni di partenza peggiori, il tasso di fallimento terapeutico del gruppo CXL non risul-

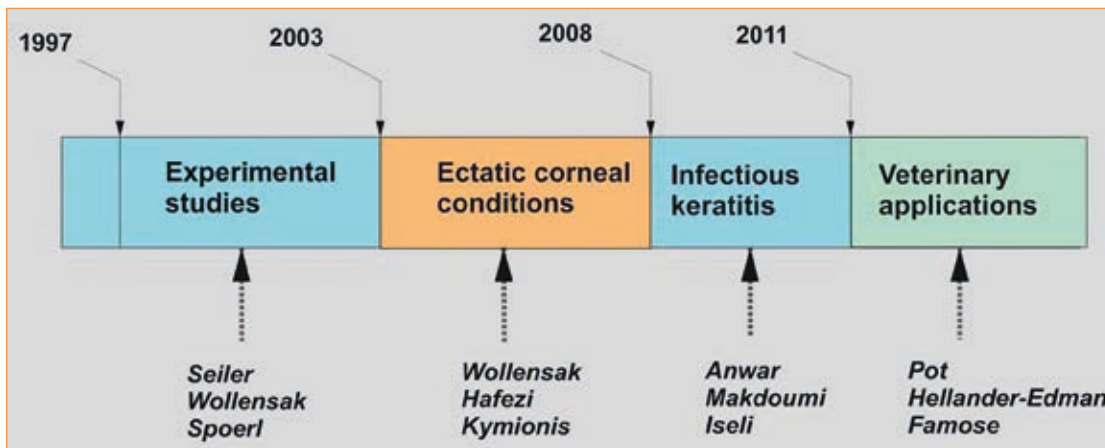


Figura 1. Sequenza temporale del CXL dalla nascita all'applicazione in Medicina Veterinaria (Famose, 2016).

tava più basso; inoltre 7 su 9 controlli nella quale la terapia medica aveva fallito furono recuperati e stabilizzati con successo mediante l'uso di CXL. Nel 2018 HellanderEdman et al. (2019), seguendo i risultati del loro studio preliminare completano un studio clinico caso-controllo su cavalli con cheratiti ulcerative con gruppi di 12 occhi trattati con PACK-CXL e 12 con la sola terapia medica standard. Anche in questo caso gli autori riscontrano problemi a riportare differenze significative. Evidenziano inoltre la necessità di affinare il metodo utilizzato. In alcuni casi si è osservata infatti la riacutizzazione dell'infezioni batterica alcuni giorni dopo il CXL; questo fa sospettare una non completa eliminazione dei microrganismi nello stroma profondo.

Nel 2015 sono stati trattati con CXL due cani con una condizione di cheratopatia bollosa bilaterale non rispondente alla terapia medica. Il protocollo impiegato riprendeva il lavoro di (Wollensak et al., 2009) con una modifica introdotta da (Hafezi et al., 2010) nell'applicazione di glicerolo al 70% per ridurre lo spessore corneale prima del trattamento in modo da aumentarne l'efficacia. I risultati mostrarono una considerevole efficacia nella risoluzione dell'erosione epiteliale e del dolore associato. È stato inoltre possibile osservare un immediato miglioramento della trasparenza corneale, ma l'effetto si è dimostrato solo temporaneo. Nel 2017 è stato presentato uno studio clinico preliminare che ha coinvolto 4 cani con distrofie endoteliali trattati con CXL secondo il protocollo classico. Tutte le cornee trattate mostravano un immediato miglioramento nella trasparenza e nell'entità dell'edema corneale; gli effetti tuttavia non si sono dimostrati stabili sul lungo termine, progressivamente attenuandosi nel corso di qualche mese rivelando un'efficacia finale del trattamento non significativa.

Ulteriori studi pilota recenti riguardano possibili nuove applicazioni del CXL in medicina veterinaria. Sono stati inclusi gruppi pazienti con ulcere corneali profonde (> 300 nm), trapianti corneali eterologhi a pieno spessore e cheratiti pigmentose diffuse in associazione a cheratectomia.

Altre linee di ricerca inerenti al PACK-CXL condotte da Pot et al. e Gilardoni et al. stanno attualmente valutando *in vitro* come i diversi parametri

influiscono sull'effetto antimicrobico e l'incremento di resistenza alla digestione enzimatica indotti dal trattamento. Questi due parametri sommati definiscono il grado di efficacia del CXL nella risoluzione di cheratiti collagenasiche (Papaioannou et al., 2016); di conseguenza tali studi potrebbero risultare basilari per l'ottimizzazione dei protocolli attualmente impiegati ed un futuro incremento nel tasso di successo della tecnica.

PRINCIPI FONDAMENTALI DEL CXL

Processo di formazione spontanea di *cross-linking*

Le fibrille di collagene sviluppano *cross-link* naturalmente come parte del loro processo di maturazione. Nel momento in cui vengono formate, presentano ad ogni estremità delle catene di collagene dei segmenti corti (teloipeptidi) che non assumono la conformazione a tripla elica. I residui di idrossilisina presenti in questi segmenti partecipano al *cross-linking* (Lodish et al., 2000). I *cross-link* sono formati attraverso la deaminazione degli ϵ -amino gruppi della lisina o idrossilisina presente nel teloipeptide del collagene; tale reazione è mediata dall'enzima lisil-ossidasi (Siegel, 1976).

Esiste una seconda modalità attraverso quale si formano fisiologicamente *cross-link* durante l'invecchiamento e questa coinvolge una reazione di glicazione non enzimatica.

Induzione artificiale di *cross-linking*

Il terzo meccanismo individuato per la formazione di *cross-linking* nel collagene non è né di tipo enzimatico né richiede glicazione. Prevede invece un processo di ossidazione (mediata da O_3) o di foto-ossidazione (mediata da UV) (Foote, 1968) (vedere figura 2).

Questi processi sono inducibili tramite due tipi di trattamento:

- agenti chimici (glutaraldeide, formaldeide, difenilfosforile, nitroalcol, genipina). Queste sostanze vengono impiegate in ingegneria tissutale per modificare le proprietà del collagene (Avila&Navia, 2010; Paik et al., 2008, 2009);
- agenti luminosi (UV, radiazioni ionizzanti) è il processo sfruttato negli interventi di *cross-linking* corneale (CXL).

La foto-ossidazione con impiego di raggi UV è il metodo scelto dagli oftalmologi per il trattamento corneale in quanto ha un effetto localizzato, una durata terapeutica breve e non intacca la trasparenza della cornea (Raiskup&Spoerl, 2013). Affinché le reazioni di *cross-linking* avvengano, sono necessari una serie di elementi ovvero:

- un foto-induttore,
- una fonte di luce ad intensità adeguata ma entro i parametri di sicurezza,
- una reazione fotochimica che induca la generazione di radicali liberi creando al contempo legami tra le fibrille collagene (Randleman et al., 2015).

ELEMENTI NECESSARI PER IL CXL FOTO-OSSIDATIVO

Il fotoinduttore

Il fotoinduttore standard impiegato nel CXL è la riboflavina (vitamina B2). La sua struttura permette l'assorbimento di una parte ampia dello spettro luminoso, con un picco di assorbimento in corrispondenza dell'intervallo dei raggi UV-A (Edwards, 2014).

Tutte le flavine, sebbene siano termostabili, sono fotosensibili, questo permette cambiamenti molecolari in un breve arco di tempo (Iseli et al., 2011). La riboflavina è sicura in caso di assorbimento sistemico, si trova infatti diffusa abbondantemente come colorante per alimenti o integratore (Randleman et al., 2015).

Non è idrosolubile, tuttavia nei protocolli di CXL viene impiegato comunemente un suo composto solubile, il riboflavin-5 fosfato (Randleman et al., 2015).

Per garantire un'efficacia di assorbimento di raggi UV-A a livello corneale è necessario che la riboflavina venga sufficientemente assorbita, tuttavia essendo una molecola di grosse dimensioni (peso molecolare di 376 g/mol), è limitata dalle giunzioni occludenti dell'epitelio corneale. I protocolli prevedono quindi generalmente una procedura preliminare di *debridement*, che consiste nella rimozione dell'epitelio (protocollo "epi-off") (Baiocchi et al., 2009).

Il tempo di immersione della cornea in riboflavina condiziona significativamente il grado di assorbimento (Iseli et al., 2011).

Dal punto di vista fotochimico la riboflavina ha due picchi di assorbimento, con radiazioni di 365 nm e 430 nm (Edwards, 2014).

La riboflavina è efficace come generatore di specie reattive dell'ossigeno in risposta all'assorbimento di luce UV, ma ha anche un ruolo importante nel tamponare concentrazioni troppo alte di radicali liberi. Nel corso delle reazioni si osserva quindi un equilibrio tra la formazione e la distruzione di specie reattive (Edwards, 2014).

L'incremento della concentrazione di riboflavina porta ad un aumento della quantità di radicali prodotti, ma questo è valido solo fino al raggiungimento di uno stato di saturazione (Randleman et al., 2015). Sarà quindi necessario che prima del trattamento UV la cornea sia pervasa da una sufficiente concentrazione di riboflavina.

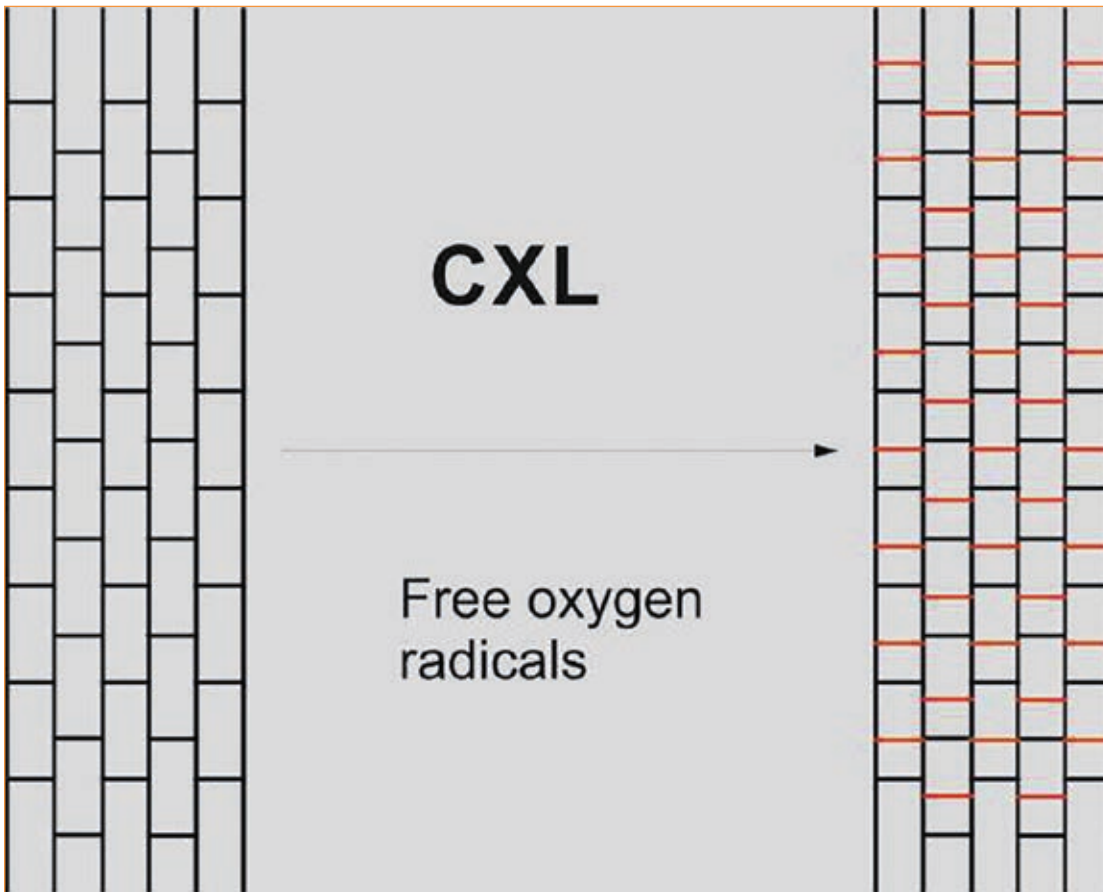


Figura 2. Aumento della quantità di legami interfibrillari a seguito di CXL.

La sorgente luminosa

Si impiegano raggi UV diretti - tramite un apposito macchinario - verso l'occhio in maniera localizzata.

È importante che l'irradiazione venga eseguita secondo determinati parametri considerati efficaci e sicuri (lunghezza d'onda, irradianza e tempo di irradiazione) (Hafezi&Randleman, 2014; Remé et al., 1996).

L'efficacia del *cross-linking* è massima con raggi di lunghezza d'onda di 365 nm, valore che corrisponde a uno dei due picchi di assorbimento della riboflavina (365 nm e 430 nm). Secondo il principio di Planck l'energia di un fotone diminuisce all'aumentare della sua lunghezza d'onda: è stato quindi scelto il picco più basso, che a parità di assorbimento, garantisce una maggiore trasmissione di energia (Raiskup&Spoerl, 2013). Questo parametro è quindi rilevante, ma si considera fisso e non varia nei differenti protocolli. Un parametro invece che può variare sulla base del protocollo di CXL scelto è l'**irradianza** (in letteratura a seconda degli autori si trovano riportati in maniera indistinta e talvolta ambigua i termini "*irradiance*", "*fluence*", "*treatment energy dose*", "*UV-A power*"). L'irradianza è definita in fisica come il flusso energetico distribuito per unità di area di una superficie irradiante oppure irradiata. L'unità di misura che la esprime è il W/m^2 , e corrisponde alla quantità di energia che investe in 1 secondo una superficie di $1 m^2$ (Martelli et al., 2009a).

Applicato al CXL, questo valore corrisponde quin-

di all'intensità dell'irradiazione UV che colpirà la cornea e le strutture sottostanti, ed è solitamente riportato con unità di misura mW/cm^2 . La possibilità di regolare questo valore è strettamente dipendente dal tipo di strumento utilizzato e dalla potenza massima che la lampada UV-A è in grado di raggiungere (Raiskup&Spoerl, 2013).

Il secondo parametro modificabile è il **tempo di irradiazione**. Dal momento che tale voce, corrispondente a 30 min nel protocollo standard, influisce in misura prevalente sulla durata complessiva del trattamento, numerosi tentativi sono stati svolti per ridurla al minimo preservando l'efficacia del CXL (Famose, 2014; Ting et al., 2019). In Medicina Veterinaria, in particolare, questa durata è determinante nel ridurre i tempi di anestesia generale e/o tolleranza a cui può dover essere sottoposto il paziente; tempi particolarmente brevi aprono inoltre alla possibilità di effettuare il trattamento in *standing*, senza necessità di addebormentare soggetti che risultano particolarmente collaborativi. (Pot et al., 2014).

Questo parametro è facilmente regolabile e sotto il controllo dell'operatore a prescindere dallo strumento di CXL a disposizione.

Il principale protocollo accelerato che è stato affinato prevede un'irradianza pari a $30 mW/cm^2$ e un tempo di irradiazione di 3 minuti. Anche in questo caso l'energia totale è di $5,4 J/cm^2$ (Famose, 2015; Hammer et al., 2014).

Al giorno d'oggi si trovano in commercio numerosi strumenti che si basano su un sistema di diodi emettenti luce UV per fornire un'irradiazione

omogenea e su un'area circoscritta. Il diametro dell'irradiazione è solitamente di 8 mm, valore scelto per garantire l'azione sulla cornea centrale evitando il coinvolgimento di limbo e sclera. Alcuni strumenti rendono tuttavia possibile la regolazione di tale diametro (Raiskup&Spoerl, 2013). L'omogeneità della radiazione è un fattore importante da considerare negli strumenti in quanto previene picchi localizzati di radiazioni che potrebbero arrecare danno nella cornea, in particolare all'endotelio sottostante (Raiskup&Spoerl, 2013).

La reazione fotochimica

La riboflavina (RbO), fotosensibile, assorbe energia dall'irradiazione UV-A e assume uno stato di eccitazione (prima 1Rb e poi 3Rb) (Huang et al., 2004). In questa forma può andare incontro a due tipi di reazioni: aerobica (tipo 2) e, in parte minore, anaerobica (tipo 1) (Raiskup&Spoerl, 2013). Nel tipo 2 è necessario ossigeno. Dall'interazione tra un O_2 e la riboflavina si forma ossigeno "singoletto" (1O_2), la forma fisicamente eccitata dell'ossigeno molecolare (nella sua forma più comune è "tripletto" 3O_2). In questo stato interagisce con i gruppi carbonili del collagene, predisponendo il legame covalente tra diverse molecole (Kamaev et al., 2012).

Se l'ossigeno viene esaurito nel processo, si attiva il processo di tipo 1 (Kamaev et al., 2012).

Nel corso del CXL quindi entrambi i processi hanno luogo. A livello delle catene di collagene si attivano siti che si legano con analoghi intramolecolari o intermolecolari, portando alla formazione di *cross-link* tra vari aminoacidi (in particolare istidina, idrossiprolina, idrossilisina, tirosina e treonina) (Balasubramanian&Kanwar, 2002; Kato et al., 1994; Marcovich et al., 2012). Nel CXL indotto con UV-riboflavina, a differenza di quello spontaneo, non sono tanto rilevanti gli amino-gruppi degli aminoacidi, quanto più i gruppi carbonili (McCall et al., 2010). Invece, analogamente al secondo meccanismo naturale di CXL visto precedentemente, anche questo prevede la formazione di *advanced-glycation-end-product cross-link* (Brummer et al., 2011).

L'ossigeno

Il ruolo dell'ossigeno è un prerequisito per l'effettivo sviluppo delle sue specie reattive che stimolano i *cross-link*, tuttavia è ancora da comprendere come la sua presenza e concentrazione influiscano sul risultato finale e quanto questi parametri possano essere tenuti in considerazione nello sviluppo di nuovi protocolli (Randleman et al., 2015). La concentrazione di ossigeno nella cornea è modulata dal valore di irradianza di UV-A e dalla temperatura che si sviluppa e si abbassa rapidamente all'inizio dell'esposizione ai raggi.

In uno studio (Hammer et al., 2014) è stato eseguito il CXL, *ex vivo* su cornee porcine, confrontando diversi livelli di irradianza. È stato concluso che l'effetto bio-meccanico del CXL calava significativamente con valori alti di irradianza emessa per un breve tempo.

DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA DI CLX

SENZA IONTOFORESI

1. Instillazione di una goccia di anestetico locale (oxibuprocaina cloridrato 0,4%, gocce) sulla cornea ogni 5 minuti per 4 volte prima della procedura.
2. Posizionamento del paziente in decubito dorsale.
3. Applicazione del blefarostato per mantenere divaricata la rima palpebrale se paziente in anestesia.
4. Rimozione dell'epitelio corneale con un applicatore con punta di cotone per un'area di variabile sulla base dell'estensione della lesione stromale.
5. Apertura sterile della soluzione oftalmica di riboflavina sodio fosfato ipotonica e somministrazione di una goccia sulla cornea ogni 3 minuti per 20 minuti (vedere foto 1)
6. Conferma della penetrazione della riboflavina nello stroma corneale tramite biomicroscopio con

lampada a fessura (vedere foto 2).

7. Applicazione dell'apparato di localizzazione in modo da centrare l'asse della lampada sulla cornea ad una distanza prefissata di 10 cm.
8. Irradiazione della cornea per 3 minuti ad un fascio di luce UV-A a 365 nm con un'irradianza pari a 30 mW/cm² e su un'area di diametro 9 mm (Vetuvir™, Vision Engineering Italsrl, Roma); particolare attenzione nel non coinvolgimento del limbo corneale per via della riserva di cellule staminali in quest'area essenziali per la riepitelizzazione (vedere foto 3).
9. Lavaggio della cornea con soluzione salina sterile.
11. Esecuzione di eventuale tarsorrafia.

DESCRIZIONE PROCEDURA CON IONTOFORESI

- 1 Applicazione di una goccia di anestetico locale (oxibuprocaina cloridrato 0,4%, gocce) sulla cornea

ogni 5 minuti per 4 volte prima della procedura

- 2 Posizionamento del paziente in decubito dorsale .
- 3 Applicazione del blefarostato per mantenere divaricata la rima palpebrale
- 4 Inserimento dell'ago ipodermico (elettrodo) dello strumento per la iontoforesi nel sottocute del canto laterale dell'occhio da trattare.
- 5 Collegamento tra l'applicatore, l'elettrodo e il generatore di corrente.
- 6 Posizionamento dell'applicatore sulla cornea e riempimento del serbatoio con riboflavina (vedere foto 4).
- 7 Accensione dello strumento, settaggio a 1 mA e avvio impulso elettrico per 5 minuti (vedere foto 5).
- 8 Rimozione dello strumento e lavaggio con soluzione salina.
- 9 Esecuzione del CXL secondo procedura precedentemente descritta.



Foto 1. Applicazione di riboflavina sulla cornea in un gatto da sveglio e in un cane in anestesia generale.

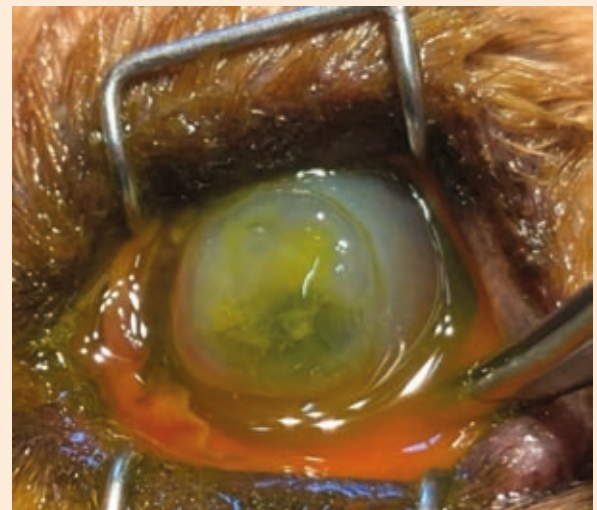


Foto 2. Aspetto della cornea dopo l'assorbimento di riboflavina.



Foto 3. Esposizione della cornea all'irradiazione UV-A tramite apposito applicatore che fissa la distanza dell'occhio rispetto alla lampada.



Foto 4. Applicazione di riboflavina tramite il metodo di iontoforesi.



Foto 5. Strumento impiegato per la iontoforesi.

Questo si spiegherebbe associando la maggiore irradianza a un maggiore consumo di ossigeno, e porta ad individuare questo parametro come un possibile fattore limitante per l'efficacia del trattamento (Randleman et al., 2015).

Sulla base di questo principio, Herekar et al. hanno proposto l'utilizzo di un'illuminazione "pulsata", brevettando un apposito strumento (Herekar, 2009). Fornendo con intermittenza l'irradiazione UV si permetterebbe infatti all'ossigeno di diffondere nello stroma corneale durante le fasi di pausa. Tale metodo è stato definito pl-ACXL (*pulsed Accelerated Corneal Cross-Linking*).

Sono stati svolti studi (Mazzotta et al., 2014) per comparare il trattamento accelerato a luce pulsata con quello a luce continua. I risultati hanno evidenziato benefici del trattamento pulsato, con un esito funzionale migliore e una penetrazione stromale più profonda; senza comunque riscontrare alcun danno alle cellule endoteliali.

Questi lavori nell'insieme confermano come l'ossigeno rappresenti un elemento estremamente rilevante per l'induzione di *cross-linking* (Vastardis et al., 2017).

EFFETTI DEL CXL

Alterazioni indotte a livello corneale

Il *cross-linking* indotto fotochimicamente non può essere evidenziato direttamente nella cornea tramite metodi di colorazione o microscopia; è tuttavia riscontrabile tutta una serie di cambiamenti a livello di proprietà fisiche e chimiche dalle quali si può dedurre l'efficacia del trattamento (Raiskup&Spoerl, 2013).

Ecco, di seguito, alcuni dei principali effetti del CXL evidenziati nel corso di studi.

Tali misurazioni derivano perlopiù da studi eseguiti nell'ambito dell'oftalmologia umana e destinati all'applicazione del CXL come terapia per il cheratocono; una grossa parte di questi tuttavia è stato eseguito *in vitro* su cornee animali (coniglio, suino), pertanto le conclusioni si ritengono altrettanto valide per la comprensione del trattamento in ambito veterinario e per altre patologie.

Rigidità (*stiffness*), resistenza alla deformazione (*bending stiffness*), modulo di elasticità

È stato il primo fattore indagato dal momento che per quanto riguarda il cheratocono la perdita di rigidità è l'elemento scatenante la patologia (Beshtawi et al., 2013).

Diversi studi hanno confermato l'incremento di rigidità in tutto il tessuto corneale sottoposto a CXL e questo si associa alla formazione dei legami covalenti all'interno e tra le diverse fibre collagene (Kohlhaas et al., 2006; Spoerl et al., 1998b; Wollensak, Spoerl, & Seiler, 2003c). Ciò potrebbe alterare consistentemente i risultati rispetto alla reale resistenza del tessuto integro (Ahearne et al., 2008).

Spessore delle fibre collagene

Le fibre collagene, concentrate nello stroma corneale, sono le principali responsabili della forza di tenuta e della rigidità corneale. Una normale

fibra collagene di una cornea sana dal punto di vista meccanico può sopportare un carico di 10 kg (Meek & Fullwood, 2001).

Uno dei cambiamenti morfologici più importanti osservato a seguito di CXL è il cambio nel diametro delle fibre collagene stesse.

Un aumento dello spessore delle fibre collagene è stato osservato tramite microscopia elettronica e un software morfometrico in uno studio (Wollensak et al., 2004), confrontando cornee di coniglio trattate con le controlaterali non trattate. Questo accade perché i *cross-links* formati distanziano le fibrille e inducono un aumento dello spazio intermolecolare e di conseguenza del diametro complessivo della fibra collagene (Tanaka et al., 1988).

Tale effetto si dimostra molto più marcato nello stroma anteriore rispetto allo stroma posteriore con rispettivamente un aumento del 12,2% e 4,6% (Wollensak et al., 2004).

La stessa differenza è stata riscontrata anche in uno studio (Mencucci et al., 2010) eseguito su cornee umane affette da cheratocono. In questo caso gli incrementi si attestavano al 22,6% e 16,1%; le differenze tra le due specie potrebbero essere motivate dalla più alta percentuale di *cross-links* generatisi nelle cornee umane (Wollensak, Spoerl, & Seiler, 2003c).

Temperatura di restringimento (*shrinkage*)

Il restringimento della cornea si reputa essere il risultato di una denaturazione delle fibre collagene per via del calore (Beshtawi et al., 2013).

Alcuni autori (Spoerl et al., 2004) hanno evidenziato come il trattamento di CXL su cornee porcine ne modificasse la tolleranza della cornea rispetto al restringimento da calore.

La temperatura di restringimento di una cornea sana non trattata si attestava intorno a 70 °C; il CXL con UVA-ribloflavina incrementava tale valore fino a 75 °C nella porzione anteriore della cornea; nella porzione posteriore tuttavia i valori rimanevano pressoché invariati.

Si è inoltre osservato come l'esecuzione di un CXL tramite glutaraldeide allo 0,1%, in cui l'induzione di *cross-linkage* è maggiore, aumentasse la soglia fino 90 °C.

A livello laboratoristico (*ex vivo*) questo costituisce un'altra prova del buon esito del trattamento, in quanto la temperatura di *shrinkage* è positivamente correlata con il grado di CXL (Raiskup&Spoerl, 2013).

Percentuale di edema (*swelling*)

L'edema corneale altera la trasparenza della cornea e di conseguenza la visione (Huang & Meek, 1999). Cornee *cross-linkate* dimostrano quindi una ridotta tendenza a fenomeni di edema e questo potrebbe essere di interesse per una sua applicazione in patologie come la cheratopatia bollosa o la distrofia endoteliale di Fuchs scompensata (Raiskup&Spoerl, 2013).

Resistenza alla digestione enzimatica

Durante uno studio (Spoerl, Wollensak, & Seiler,

2004) in 80 cornee porcine trattate è stata osservata un'aumentata resistenza alla digestione da parte di collagenasi, pepsina e tripsina. Fu notato in particolare come la resistenza della cornea fosse proporzionale al livello di irradiazione UV-A subita, espressa in termini di mW/cm², mentre sono state riscontrate differenze tra diverse porzioni dello stroma.

Il presunto fattore alla base dell'aumentata resistenza è stato individuato da Wollensak&Redl (2008) nello sviluppo, all'interno del collagene di tipo I, di una banda polimerica ad alto peso molecolare a seguito del trattamento. Tale elemento risulterebbe chimicamente stabile e resistente alla pepsina e ai trattamenti termici e potrebbe spiegare anche parte dell'aumento dello spessore delle fibre collagene e degli altri cambiamenti biochimici (Beshtawi et al., 2013).

Azione antimicrobica

L'irradiazione UV può direttamente danneggiare il DNA e l'RNA di vari tipi di microrganismi (Ting et al., 2019). Le specie reattive dell'ossigeno rilasciate dalla riboflavina foto-attivata determinano inoltre un forte stress ossidativo che colpisce il DNA e le membrane cellulari degli stessi microrganismi (Tsugita et al., 1965); il risultato è una potente azione sinergica antimicrobica (Ting et al., 2019). Alcuni autori hanno poi valutato l'azione antimicrobica *in vitro* testando diversi tipi di patogeni e differenti protocolli (Gilardoni et al., 2019; Makdoui et al., 2010; Schrier et al., 2009). Questo tipo di azione, unito all'aumento della resistenza enzimatica, ha portato gli autori a considerare il CXL uno strumento di grande potenziale nel trattamento di cheratiti infettive (batteriche e fungine) sia in Umana che in Veterinaria (Makdoui et al., 2010; Spiess et al., 2014).

Basando la sua azione antimicrobica su un meccanismo di natura foto-chimica, vengono aggirati i meccanismi di antibioticoresistenza che possono portare a insuccessi della terapia medica (Zloto et al., 2018).

Effetti dannosi

Il fatto che, come evidenziato dagli studi, gli effetti del CXL si concentrino nella porzione anteriore della cornea (grossa parte nei primi 200 µm e circa il 20% nei successivi 200 µm) suggerisce un'influenza minima in termini di tossicità e morte cellulare sull'endotelio corneale e sulle strutture posteriori dell'occhio (cristallino, vitreo, retina) (Beshtawi et al., 2013).

Sono esaminati tuttavia i singoli meccanismi che potrebbero costituire un potenziale danno alle varie strutture oculari.

Danno termico

Data la natura inizialmente lunga del trattamento (30 minuti) e gli alti livelli di energia trasmessi, ci si aspettava che la cornea potesse risentire di un danno termico (Beshtawi et al., 2013). Alcuni studi (Mencucci et al., 2007) condotti mediante una termocamera a infrarossi hanno misurato la temperatura di superficie di 6 occhi umani durante

la procedura di CXL per cheratocono. È stato osservato un costante aumento di temperatura che tuttavia non ha mai superato la soglia di sicurezza oltre la quale le fibre collagene subirebbero un danno (50 °C).

L'utilizzo di riboflavina contribuisce a mantenere bassa la temperatura in quanto la sua somministrazione è risultata associata ad un raffreddamento della superficie corneale di $4 \pm 0,3$ °C (Beshtawi et al., 2013).

Tali risultati suggeriscono che il CXL con UVA e riboflavina sia un trattamento che non causi un danno termico alle fibre collagene.

Danno diretto da UV

La capacità dell'irradiazione UV di causare un danno dipende da lunghezza d'onda dei raggi, irradianza e tempo di irradiazione (Eberhard Spoerl et al., 2007).

È stata dimostrata l'insorgenza di una fotocheratite che colpisce l'epitelio di cornee sottoposte a lunghezze d'onda da 270 a 315 nm e con densità di dose da 0,12 a 0,56 J/cm² (Spoerl et al., 2007). In assenza di un foto-induttore, raggi luminosi al di sopra dei 350 nm e con un'irradianza di 3mW/cm² non danneggiano l'endotelio corneale (Ringvold et al., 1982).

In tempi di irradiazione UV brevi, fino a 120 minuti, il danno fotochimico nel cristallino è limitato da meccanismi protettivi e anti-ossidativi (Andley & Clark, 1989); entro questa soglia si mantiene un equilibrio tra il danno cellulare, i meccanismi protettivi e la riparazione biologica (Ayala et al., 2000; Dong et al., 2005).

La retina può essere danneggiata da danno termico o foto-chimico con lunghezze d'onda tra 400 e 1.400 nm (Bass, 2010);

Confrontando tali valori con l'irradianza, la dose di UV e il tempo di esposizione impiegati durante il CXL (3 mW/cm² e 5,4J/cm², 30 min) non ci si aspetterebbe alcun tipo di danno a endotelio, cristallino e retina al di fuori della foto-cheratite a livello dell'epitelio corneale. Dal momento che nella maggior parte dei casi la procedura di CXL prevede comunque la rimozione dell'epitelio, tale effetto dannoso non si considera rilevante (Spoerl et al., 2007).

Danno da radicali liberi

Il processo indotto dal CXL nello stroma corneale prevede la formazione di radicali liberi mediata dalla riboflavina foto-attivata. Questi radicali possono creare un danno cellulare che sebbene non sia così rilevante nel caso dei cheratociti, non sarebbe accettabile nel caso dell'endotelio corneale data la sua scarsa capacità di rigenerazione (Spoerl et al., 2007).

Si è stimato che con l'applicazione del protocollo standard di CXL l'irradianza supera il valore soglia per i cheratociti solo nei primi 300 µm. L'irradianza che raggiunge invece l'endotelio, considerando una cornea di uno spessore di 400 µm, sarebbe di soli 0,18 mW/cm², all'incirca la metà della soglia di danno endoteliale sopraindicata (Spoerl et al., 2007). Questa valutazione è

allineata ai risultati riscontrati successivamente da studi in vivo.

L'osservazione tramite microscopia confocale di 10 cornee trattate con CXL ha rivelato la morte di cheratociti fino a 270-350 µm di profondità. La rivalutazione a distanza di sei mesi ha evidenziato tuttavia il ripopolamento dell'intero stroma fino al raggiungimento della densità cellulare originaria.

Scenari che si discostano dal trattamento standard

I lavori citati precedentemente considerano per il trattamento di CXL l'impiego del protocollo Dresden che prevede un'irradianza di 3 mW/cm² per 30 minuti; a questo corrisponde un totale di energia fornita pari a 5,4 J. Le linee guida prevedono inoltre di eseguire il trattamento su una cornea di spessore minimo pari a 400 µm.

Le situazioni che differiscono dallo scenario sopra descritto, quali ad esempio l'impiego di protocolli a più alta intensità di irradiazione, la presenza di cornee di spessore inferiore ai 400 µm o il mancato raggiungimento della concentrazione adeguata di riboflavina, richiedono un'accortezza maggiore.

È stato dimostrato sperimentalmente come il CXL eseguito su cornee più sottili di 400 µm o con insufficiente concentrazione di riboflavina (ad es. per un ridotto tempo di esposizione alla stessa) può causare danno all'endotelio (Wollensak et al., 2003; Zhang & Zhang, 2012).

Per quanto riguarda lo spessore, i valori dello spessore corneale centrale medio di una cornea sana nel cane e nel gatto sono abbastanza vicini a quelli umani (Gelatt et al., 2013). Si cita come nel caso di cornee equine, lo spessore centrale medio si attesti invece intorno agli 800 µm (Gelatt et al., 2013). Tale dimensione, se da una parte può comportare problemi di efficacia nel trattamento delle aree stromali più profonde, garantisce un margine di sicurezza significativamente maggiore in questa specie.

Si può osservare una rilevante riduzione di spessore localizzata in caso di ulcere corneali, le quali costituiscono peraltro l'indicazione principale del CXL in Medicina Veterinaria. Si citano i dati dello studio caso-controllo di Pot et al. su cani e gatti trattati con CXL; gli animali pretrattamento presentavano ulcere corneali che causavano una riduzione dello spessore medio stimata del 50% (con un intervallo di 25-70) per i cani e 50% (15-80) per i gatti. Le ulcere per le quali si era ricorso al trattamento erano inoltre statisticamente più profonde dei controlli gestiti con la sola terapia medica (Pot et al., 2014).

Le percentuali maggiori tra quelle presentate si possono tradurre in un spessore residuo della cornea dell'ordine dei 100 µm, quattro volte inferiore alla soglia di danno endoteliale definita dalla lettura (Spoerl et al., 2007).

Gli stessi autori, riferendo l'incidenza di scompenso endoteliale e cheratopatia bollosa in uno dei casi trattato con CXL, evidenziano come, data una perdita di spessore alla presentazione del 60%, il danno endoteliale possa essere stato iatrogeno

e associato all'irradiazione. Ciononostante, gli altri casi che risultavano analoghi in termini di spessore corneale non hanno manifestato la stessa complicità (Pot et al., 2014).

Sono stati sviluppati metodi per compensare un ridotto spessore della cornea. In particolare l'impiego di una soluzione di riboflavina ipo-osmolare permette di indurre un edema corneale tale da riportare cornee sottili entro i valori soglia (Hafezi et al., 2009).

Ulteriori studi si rendono necessari al fine di definire la gestione di questo tipo di casi in Medicina Veterinaria e valutare il rapporto tra benefici e rischi nella scelta del CXL applicato a cornee affette da ulcere profonde.

PARAMETRI DI SICUREZZA

I parametri di sicurezza per il *cross-linking* sono definiti con lo scopo di prevenire danni a livello di cellule staminali limbal, endotelio corneale, cristallino e retina.

Un protocollo sicuro richiede uno spessore corneale di almeno 400 µm prima dell'applicazione di riboflavina e dell'esposizione agli UV-A. Come detto però, sono state sviluppate alcune modifiche ai protocolli, come nel caso dell'impiego di riboflavina ipo-osmolare per indurre un fenomeno di edema e aumentare lo spessore di cornee sotto i limiti (Hafezi et al., 2009; Kymionis et al., 2012). Va tuttavia menzionato come una cornea sovra-idratata per via iatrogena potrebbe non rispondere in egual misura al trattamento. Una teoria a riguardo ipotizza come l'incremento della distanza intermolecolare del collagene possa limitare l'efficacia del *cross-linking* (Hafezi, 2011).

Anche in cornee di spessore adeguato, l'essiccazione durante il trattamento potrebbe causare un assottigliamento, per questo si rende necessario un attento monitoraggio (Holopainen & Krootila, 2011).

UTILIZZO DI CXL CORNEALE IN MEDICINA VETERINARIA

L'indicazione principale considerata attualmente in Medicina Veterinaria è la cheratite collagenica infettiva, patologia di frequente riscontro in oftalmologia animale, in particolare per razze di cani e gatti predisposte (Maggs, 2018b). La combinazione di un forte effetto antimicrobico e un significativo aumento della resistenza alla collagenolisi nello stroma corneale spiegano gli ottimi risultati evidenziati in letteratura per il trattamento di queste forme.

La gestione terapeutica convenzionale di questi casi comporta il ricorso ad antibiotici ad uso topico e anti-collagenasi, con risultati variabili e gestioni non di rado problematiche accentuate da un'inadeguata compliance da parte dei proprietari nel seguire le terapie. In un numero significativo di casi la malacia corneale esita in ulcerazioni progressive fino alla perforazione del globo, con ricorso in urgenza alla stabilizzazione chirurgica o all'enucleazione. Questi presupposti mostrano come il CXL, il cui impiego finora ha mostrato tassi di successo apparentemente superiori rispetto

alla sola terapia medica, possa apportare un considerevole beneficio alla clinica, sia in termini di risultati che di gestione; una terapia focalizzata in unico momento riduce infatti la responsabilità del proprietario nel definire il successo terapeutico finale.

Si riporta inoltre il problema sempre più centrale dell'antibioticoresistenza, che chiama a un senso di responsabilità condiviso da parte di tutte le branche mediche. Tra le linee guida redatte dall'OMS vengono sollecitati in particolare, oltre ad un uso razionale dell'antibiotico, lo sviluppo e l'adozione, laddove possibile, di tecniche innovative e alternative terapeutiche che non alimentino fenomeni di resistenza (comunicato AIFA, 2016). L'introduzione e la diffusione del *cross-linking* si muovono esattamente in questa direzione.

Altri campi di impiego in Medicina Veterinaria, a tutt'oggi in fase di studio, sono la cheratopatia bollosa e l'edema corneale secondario a distrofia corneale endoteliale.

PROCEDURE DI INTERVENTO

Protocollo anestesilogici utilizzato

In Medicina Umana la tecnica si esegue senza ricorso all'anestesia generale. In Veterinaria tale possibilità è strettamente condizionata dal grado di collaborazione dell'animale. L'esecuzione in *standing* ad animale cosciente è praticabile, in particolare in ippiatria (HellanderEdman et al., 2013) e con cani collaborativi, rivelandosi un'opzione terapeutica percorribile in maniera sicura per determinati soggetti ad elevato rischio anestesilogico. Nelle altre situazioni si può fare ricorso alla sedazione o all'anestesia per facilitare la gestione dell'intervento.

Nei pazienti svegli, la cornea viene anestetizzata mediante l'applicazione di un'anestesia locale con una goccia di oxibuprocaina cloridrato in soluzione 4 mg/ml ogni 5 minuti per 3 volte prima della procedura.

Nei pazienti nei quali si ritiene sufficiente solo una sedazione, questa può stata ottenuta dall'associazione metadone-dexmedetomidina.

Negli altri casi il protocollo anestesilogico completo prevede una premedicazione con metadone a 0,2 mg/kg e dexmedetomidina a dosaggio variabile da 0,5 a 5 mg/kg, seguita da un'induzione con profol.

Pazienti poco sedati o con particolari problematiche organiche (metaboliche o respiratori) vengono intubati e gestiti in anestesia gassosa con isofluorano.

Dispositivo per il CXL impiegato

Esistono vari tipi di dispositivi, alcuni portatili. Gli autori hanno esperienza con la lampada Vetuvir™ (Vision Engineering Italy srl, Roma), (vedere foto 1). Il dispositivo dispone di una lampada in grado di emettere una radiazione UV-A della frequenza di 365 nm, focalizzata su un'area di diametro 9 mm. Tale misura è mantenuta costante nel tempo con l'ausilio di un apparato di focalizzazione, fornito insieme allo strumento, che prendendo



Foto 1. Strumento utilizzato per il CXL (Vetuvir®).

contatto con il paziente a livello della periorbita dell'occhio da trattare, fissa la distanza tra lampada e cornea a 10 cm.

La portabilità della lampada e la maneggevolezza dell'apparato di focalizzazione rendono lo strumento adatto ad un utilizzo sia in clinica che eventualmente sul campo (in particolare in ippiatria).

Il valore di intensità luminosa (irradianza) emesso dal dispositivo è regolabile secondo due settaggi: 10 mW/cm² e 30 mW/cm².

I tempi di irradiazione sono scanditi automaticamente dallo strumento sulla base del valore di irradianza settato. Tali tempi sono in accordo con i protocolli attualmente più impiegati in letteratura, ma si riserva all'operatore la possibilità di variarli manualmente con facilità.

Come foto-induttore è stata utilizzata una soluzione di riboflavina 0,1%, ipotonica, priva di destrano e con aggiunta di *enhancers* (trometamina, EDTA) in grado di facilitare il passaggio della riboflavina stessa attraverso l'epitelio corneale integro. Quest'ultimo elemento consente un sufficiente grado di assorbimento della riboflavina da parte dello stroma corneale anche in procedure *epi-on*, ovvero senza previa rimozione dell'epitelio (Cruzat et al., 2017).

Protocollo di CXL

Per quanto concerne gli studi pubblicati in Medicina Veterinaria, a seconda degli autori sono stati adottati differenti protocolli. Il protocollo originale di Dresden, che prevede l'esposizione della cornea ad un fascio UV di irradianza 3 mW/cm² per un totale di 30 min, è stato seguito da due gruppi di ricerca (HellanderEdman et al., 2013, 2019; Pot et al., 2014).

Un altro gruppo di lavoro (Famose, 2014, 2015) ha tuttavia reputato che l'adozione di un protocollo accelerato (in cui si aumenta l'irradianza della fonte luminosa a 30 mW/cm² e si abbassa la durata di trattamento a soli 3 minuti) potesse comportare un considerevole vantaggio in Medicina Veterinaria. In questo modo si riduce infatti il tempo a cui l'animale è sottoposto ad anestesia, tanto che in soggetti selezionati si può considerare la stessa non più necessaria, data la relativa velocità della e l'assenza di particolari stimoli dolorosi.

Sulla base di questi principi nella pratica clinica si sceglie routinariamente di adottare tale protocollo.

Il trattamento è sempre preceduto da una fase preliminare necessaria per l'assorbimento della riboflavina all'interno dello stroma corneale. Tale fase è di fondamentale importanza nel determinare sia l'efficacia che la sicurezza del CXL. La sua durata convenzionale è di 20 minuti; instillando a livello corneale una goccia di riboflavina ogni 2 minuti. Considerando il tempo di irradiazione di 3 minuti nel protocollo accelerato, si può osservare come tale processo pesi considerevolmente sulla durata totale dell'intervento.

In letteratura è stato riportato l'utilizzo della tecnica di iontoforesi abbinato al CXL (Bouheraoua et al., 2015; Cantemir et al., 2017; Jia& Peng, 2018). Tale metodo si basa sulla trasmissione di un campo elettrico a bassa intensità sulla cornea che determina un aumento della permeabilità del tessuto e facilita così il passaggio di sostanze somministrate in concomitanza.

La iontoforesi può quindi essere impiegata abbinata al CXL con lo scopo di ridurre il tempo di assorbimento della riboflavina, migliorare l'omogeneità della diffusione e rendere non strettamente necessaria la preventiva rimozione dell'epitelio corneale.

Questa possibilità può essere applicata in maniera selettiva su alcuni casi, considerando le situazioni in cui la netta riduzione delle tempistiche o la non rimozione dell'epitelio potevano comportare significativi vantaggi.

Gestione del post-operatorio

I pazienti sono dimessi con collare Elisabetta per 24 ore dopo l'esecuzione della procedura o al risveglio dall'anestesia.

La terapia medica post operatoria varia a seconda del tipo di lesione iniziale.

Nei casi di cheratiti infettive la terapia antibiotica topica è stata portata avanti in tutti i casi fino al raggiungimento della stabilizzazione dello stroma. In caso di infezione fungina è stata invece impiegata una terapia antimicotica a base di miconazolo.

Alcuni casi possono necessitare di flap della terza palpebra per qualche giorno. Questa ultima possibilità si riserva ai pazienti che vengono sottoposti alla procedura in anestesia generale.

In conclusione il CXL corneale è un trattamento innovativo la cui introduzione in Medicina Veterinaria sta dimostrando risultati molto promettenti.

Il tipo di procedura apporta considerevoli vantaggi rispetto agli approcci chirurgici tradizionali tra cui la riduzione del tempo di anestesia o la non necessità della stessa, una minima invasività e risultati migliori sia in termini di estetica che di trasparenza corneale. L'ottimizzazione di protocolli specifici per la Medicina Veterinaria potrebbe aumentare il tasso di efficacia ed arrivare alla valutazione di unico trattamento in sostituzione della terapia antibiotica per le cheratiti infette. ■

Cristina Giordano*, Alessandro Matricardi*

* Oculistica Veterinaria Torino