

RELAZIONE SCIENTIFICA DEL PROGETTO:

***“SVILUPPO DI UNA BIOBANCA DI LENTICOLI STROMALI OTTENUTI POST-SMILE PER CHERATOPLASTICA
ADDITIVA IN PAZIENTI CON CHERATOCONO”***

INTRODUZIONE

Il cheratocono (dal greco keratos="cornea" e konos="cono") è una malattia progressiva, degenerativa, non infiammatoria della cornea che insorge solitamente fra i 14 e i 20 anni, caratterizzata da uno sfiancamento del tessuto della cornea; la cornea tende ad assottigliarsi e ad assumere una forma irregolarmente appuntita, a "cono". Si manifesta nell'infanzia o nella pubertà e progredisce in buona parte dei casi fino ai 40 anni. In genere colpisce entrambi gli occhi, anche se spesso in misura diversa. La cornea è la prima lente che i raggi luminosi incontrano nel loro percorso verso la retina ed è responsabile per più di 70% della messa a fuoco delle immagini. Per ottenere delle immagini perfettamente focalizzate, è necessario che la cornea abbia una forma regolare, più curva al centro e lievemente più piatta in periferia. Nel cheratocono sia l'entità, che la distribuzione della curvatura, risultano modificate (astigmatismo irregolare) e l'immagine risulta sfuocata. Le cause del cheratocono sono sconosciute, ma studi sperimentali hanno portato ad ipotizzare che alla sua base ci siano cause genetiche che ne condizionano l'insorgenza, mentre altri fattori di rischio sono alcune malattie oculari, come la retinopatia del prematuro, la retinite pigmentosa e le cheratocongiuntiviti primaverili, patologie sistemiche come la sindrome di Down o alcune malattie del collagene, l'atopia e lo strofinamento continuo degli occhi. Il cheratocono determina un disturbo visivo che tende a peggiorare con il passare del tempo. L'entità del difetto visivo dipende dalla localizzazione, dall'estensione e dal grado di ectasia (sfiancamento del tessuto) della cornea. La deformazione corneale causa un astigmatismo irregolare che impedisce una messa a fuoco ottimale degli oggetti, indipendentemente dalla distanza di osservazione.

Esistono diverse opzioni di trattamento per il cheratocono, compresi occhiali e lenti a contatto nelle fasi iniziali, il cross-linking per stabilizzare la progressione della malattia, gli anelli intrastromali corneali per ridurre gli errori refrattivi o appiattare la cornea, e procedure più invasive come la cheratoplastica penetrante e la cheratoplastica lamellare anteriore profonda. Gli sviluppi recenti nel settore comprendono tecniche innovative come il trapianto dello strato di Bowman, la cheratoplastica additiva e la rigenerazione stromale.



FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI DEL VENETO - ONLUS

La chirurgia refrattiva negli ultimi anni ha subito importanti evoluzioni, in particolare dal concetto di fotoablazione del laser ad eccimeri, si è passati a quello di reshaping della curvatura corneale attraverso il laser a femtosecondi, in grado di effettuare tagli di estrema predicibilità e precisione all'interno dello stroma corneale. Small Incision Lenticule Extraction (SMILE), è una tecnica chirurgica refrattiva descritta per la prima volta da Sekundo et al. per il trattamento della miopia e dell'astigmatismo miope.

Durante questo intervento, un lenticolo refrattivo dello spessore richiesto e dal valore di correzione voluto viene creato all'interno della cornea intatta usando il laser a femtosecondi e viene estratto attraverso una piccola incisione. La tecnica SMILE è l'ultima tecnica nata e ad oggi sono stati eseguiti più di tre milioni di interventi in tutto il mondo. Recentemente c'è stato un notevole interesse per il reimpianto del lenticolo estratto. Negli ultimi anni, sia il gruppo del Prof. Mehta a Singapore che quello dei Prof. Mastropasqua e Nubile a Chieti hanno presentato evidenze scientifiche e cliniche a supporto dell'uso di lenticoli stromali per interventi di cheratoplastica additiva con lo scopo di ridurre la curvatura ed aumentare lo spessore della cornea in pazienti con cheratocono.

SCOPO DEL PROGETTO

Nei casi avanzati di cheratocono viene indicato il trapianto di cornea, che nonostante una buona sopravvivenza a lungo termine del lembo, può essere associato a molte complicazioni che includono il rigetto, l'infezione o un elevato astigmatismo postoperatorio.

Il progetto oggetto di questa relazione scientifica ha come scopo quello di preservare lenticoli stromali ottenuti da pazienti sottoposti a interventi di SMILE (donatori viventi) per un potenziale uso clinico in cheratoplastica additiva in soggetti affetti da cheratocono. Il progetto dovrà valutare la fattibilità del *banking* e distribuzione di lenticoli stromali per applicazione clinica.

RISULTATI

Apprendimento della tecnica SMILE

Nel corso dell'ultimo anno sono state svolte le seguenti attività:

- Per garantire l'accesso a lenticoli stromali corneali freschi immediatamente dopo un intervento di chirurgia refrattiva, abbiamo avviato una collaborazione con l'Università degli Studi "G. d'Annunzio" di Chieti – Pescara. Questa collaborazione ha rappresentato un importante passo avanti nella



FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI
DEL VENETO - ONLUS

nostra capacità di ottenere campioni di lenticoli corneali stromali (LCS) derivanti da interventi di chirurgia refrattiva. Questa connessione ha facilitato il reperimento tempestivo e efficiente dei lenticoli stromali corneali freschi appena dopo il completamento dell'intervento, preservando così la loro integrità e idoneità per ulteriori studi e analisi.

- Durante la visita che ha avuto luogo dal 20/11/2022 al 03/12/2022, la Dott.ssa Raluca Bievel ha avuto l'opportunità di approfondire le conoscenze nel campo del Laboratorio di Biologia delle Cellule Vascolari e Staminali, situato presso il Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche dell'Università degli Studi "G. d'Annunzio, Chieti-Pescara". L'obiettivo principale di questa visita si è focalizzato sul processo di preparazione dei lenticoli stromali corneali post- SMILE, con una particolare enfasi sui procedimenti di congelamento e scongelamento.

Durante questo periodo, la Dott.ssa Bievel ha avuto l'opportunità di interagire con gli esperti del laboratorio, condividere conoscenze e ottenere una visione approfondita delle metodologie utilizzate nel trattamento e nella conservazione dei lenticoli stromali corneali. Durante la visita, è stato manifestato un particolare interesse per i processi di congelamento e scongelamento, sottolineando così la rilevanza e l'importanza della fase di conservazione dei tessuti corneali. La comprensione approfondita di tali procedure di conservazione è fondamentale per garantire la qualità e la durata dei tessuti utilizzati, contribuendo così al raggiungimento degli obiettivi del progetto.

- Successivamente, il 25/11/2022, si è svolta una visita al Centro EME (Centro di Eccellenza di Chirurgia Robotica, Pescara), un centro specializzato nella chirurgia refrattiva ReLEx. Durante tale visita, la Dott.ssa Bievel della Fondazione Banca degli Occhi ha avuto l'opportunità di assistere alla chirurgia intraoperatoria SMILE. La Dott.ssa Bievel ha avuto l'opportunità di assistere ai seguenti passaggi chiave durante la procedura SMILE:

- ✚ **Valutazione Preliminare:** Prima dell'intervento, il paziente è stato sottoposto a una dettagliata valutazione oftalmologica per determinare la correzione visiva necessaria.

- ✚ **Creazione del Lenticolo:** Utilizzando un laser a femtosecondi, è stato creato un piccolo lenticolo di tessuto corneale all'interno dello strato corneale più profondo.

- ✚ **Incisione Minima:** La SMILE si distingue per l'utilizzo di una piccola incisione, approssimativamente 2 mm, sulla superficie corneale. Questo contribuisce a ridurre il rischio di secchezza oculare post-operatoria e accelera i tempi di recupero.
- ✚ **Estrazione del Lenticolo:** Il lenticolo è stato delicatamente estratto attraverso la piccola incisione, consentendo la modellazione della cornea per correggere il difetto visivo.

La partecipazione della Dott.ssa Bievel a questi passaggi ha fornito un'opportunità unica per approfondire la comprensione e l'esperienza pratica della procedura SMILE nel contesto della chirurgia refrattiva presso il Centro EME

Messa a punto del protocollo per la caratterizzazione dei lenticoli stromali

In Fondazione Banca degli Occhi invece è stato messo a punto il protocollo per la caratterizzazione dei lenticoli stromali ottenuti post-SMILE. La caratterizzazione avviene mediante l'utilizzo delle seguenti analisi istologiche e molecolari:

1. Analisi Istologica:

- Colorazioni con ematosilina eosina per valutare la morfologia cellulare e tissutale.
- Reazione PAS (acido periodico - reattivo di Schiff) per identificare la presenza di glicogeno e altre macromolecole.
- Tricromica di Masson per analizzare la distribuzione e la composizione delle fibre di collagene.

2. Immunofluorescenza:

- Espressione di specifici antigeni e proteine dello stroma corneale sarà valutata tramite immunofluorescenza, utilizzando marcatori come:
 - MMP-2 (Metalloproteinasi di Matrice 2)
 - HLA-ABC e HLA-DR (Antigeni Leucocitari Umani di classe I e II)
 - CD45 (Antigene Comune dei Leucociti)
 - Proteina dell'actina del muscolo liscio alfa (α -SMA).

3. Valutazione della Vitalità e Struttura del Collagene:

- Utilizzo della microscopia elettronica a trasmissione (TEM) per valutare la vitalità dei cheratociti e la struttura del collagene nei lenticoli dello stroma corneale.

4. Misurazione dello Spessore dei Lenticoli Corneali:

- Tomografia a Coerenza Ottica del Segmento Anteriore (Anterior Segment Optical Coherence Tomography) per valutare lo spessore dei lenticoli corneali.

5. Valutazione della Trasparenza dei Lenticoli Corneali:

- Uso di microplate reader per valutare la trasparenza dei lenticoli corneali.

Questi test forniscono una panoramica completa delle caratteristiche istologiche, delle espressioni proteiche, della vitalità cellulare e di altre proprietà fondamentali dei lenticoli stromali corneali sottoposti alle diverse procedure di conservazione.

Ottenimento del parere positivo del Comitato Etico ad intraprendere il progetto di ricerca

È stato ottenuto il necessario consenso e l'autorizzazione per condurre il progetto di ricerca presso la Fondazione Banca degli Occhi. L'autorizzazione è stata concessa dal Comitato Etico per la Sperimentazione Clinica (CESC) della Provincia di Venezia e dall'IRCCS San Camillo in data di 28/03/2023. Questa autorizzazione è fondamentale per l'esecuzione del progetto, garantendo la conformità con gli standard etici e le normative vigenti.

È stato sviluppato e perfezionato un apposito consenso informato per i pazienti che si sottopongono all'intervento chirurgico refrattivo ReLEx SMILE. Questo documento informativo è stato progettato con cura per fornire informazioni chiare e dettagliate ai pazienti interessati a donare i lenticoli stromali dopo aver completato l'intervento. L'obiettivo principale di questo consenso informato è sostenere le attività di ricerca correlate ai lenticoli stromali corneali. Il consenso informato specifico comprende informazioni dettagliate sui seguenti aspetti:

- ✚ **Procedura Chirurgica ReLEx SMILE:** Spiegazione dettagliata dell'intervento chirurgico refrattivo ReLEx SMILE, comprese le fasi e gli obiettivi della procedura.
- ✚ **Donazione dei Lenticoli Stromali:** Informazioni sulla possibilità di donare i lenticoli stromali estratti durante l'intervento e sulla finalità della donazione per sostenere attività di ricerca.



FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI DEL VENETO - ONLUS

- ✚ Scopo della Ricerca: Chiara illustrazione degli obiettivi della ricerca che potrebbero beneficiare dalla donazione dei lenticoli stromali corneali.
- ✚ Riservatezza e Protezione dei Dati: Spiegazione dettagliata delle misure adottate per garantire la riservatezza dei dati del paziente e la protezione delle informazioni sensibili.
- ✚ Diritti del Paziente: Enumerazione dei diritti del paziente, compreso il diritto di ritirare il consenso in qualsiasi momento senza pregiudicare la qualità dell'assistenza medica ricevuta.
- ✚ Contatti e Informazioni Aggiuntive: Indicazione di contatti utili per ulteriori informazioni o domande in merito al consenso informato e alla donazione dei lenticoli stromali.

La messa a punto di questo consenso informato specifico mira a garantire che i pazienti siano pienamente informati e consapevoli della possibilità di contribuire alla ricerca attraverso la donazione dei lenticoli stromali, contribuendo così alla progressione della conoscenza nel campo oftalmologico.

Validazione del trasporto dei lenticoli stromali

Abbiamo effettuato con successo il trasporto dei lenticoli stromali freschi ottenuti dopo l'intervento SMILE dal Centro EME di Chieti alla Fondazione Banca degli Occhi, iniziando il 19/09/2023 e cercando di avere un tempo di trasporto inferiore alle 48 ore.

Sono stati condotti test su diversi liquidi di trasporto al fine di determinare quale fosse il più efficace nel trasportare i lenticoli stromali senza causare danni alla loro struttura. Questo processo di valutazione ha coinvolto una serie di esperimenti mirati a testare la compatibilità di vari liquidi con la conservazione e il trasporto dei tessuti corneali. Di seguito, sono descritte le fasi principali di questi esperimenti:

- ✚ **Selezione dei Liquidi di Trasporto**: Sono stati scelti diversi tipi di liquidi di trasporto, ognuno con caratteristiche uniche e potenziali impatti sulla conservazione e l'integrità dei lenticoli stromali.
- ✚ **Esperimenti di Immersione**: I lenticoli stromali sono stati immersi in diversi liquidi di trasporto selezionati per determinare la loro reazione a livello macroscopico e microscopico. È stata valutata l'integrità strutturale, la vitalità cellulare e la trasparenza. Abbiamo analizzato due tipi di terreni differenti: Coldix (che contiene destrano in una percentuale del 6%) e Storagix (che non contiene destrano). (Fig 1,2)

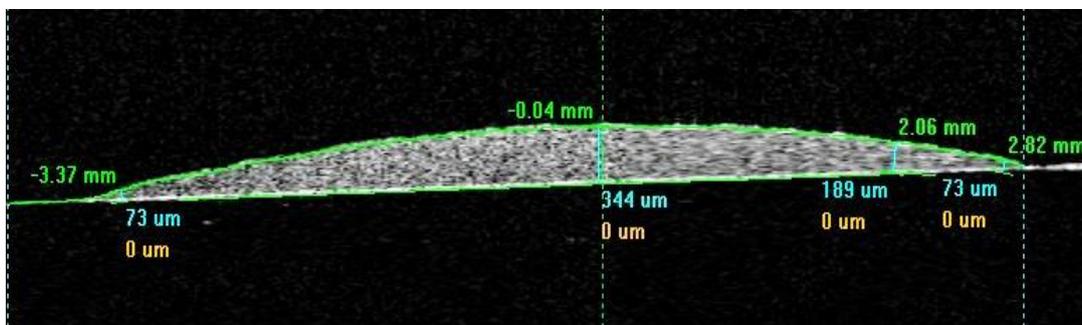


Fig.1. Lenticolo analizzato con AS-OCT dopo essere stato immerso in Coldix per 48 ore.

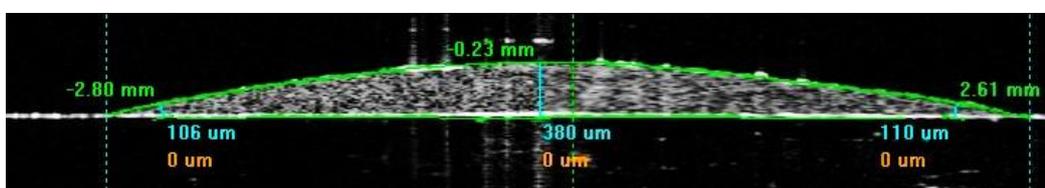


Fig.2. Lenticolo analizzato con AS-OCT dopo essere stato immerso in Storagix per 48 ore.

TAKE HOME MESSAGE: abbiamo notato che sia in Coldix che in Storagix lo spessore dei lenticoli aumenta in entrambi i casi.

- ✚ **Monitoraggio delle Condizioni Ambientali:** Durante gli esperimenti, sono state attentamente monitorate le condizioni ambientali, tra cui la temperatura, al fine di replicare il più fedelmente possibile le condizioni effettive del trasporto.

TAKE HOME MESSAGE: È stata selezionata una temperatura di 4 gradi per garantire il trasporto ottimale dei lenticoli.

- ✚ **Analisi Macro e Microscopiche:** L'integrità dei tessuti è stata valutata attraverso analisi istologica, che comprendeva immagini ad alta risoluzione per rilevare eventuali cambiamenti strutturali. Sono stati analizzati i lenticoli arrivati sia in Coldix che in Storagix.



FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI
DEL VENETO - ONLUS

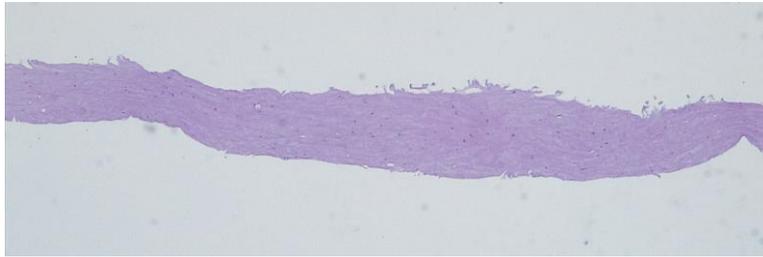


Fig.3 Lembo stromale corneale dopo 48 ore Coldix- struttura omogenea e profilo lievemente irregolare per area centrale più ispessita



Fig.4 Lembo stromale corneale dopo 48 ore Storagix- struttura omogenea e spessore regolare.

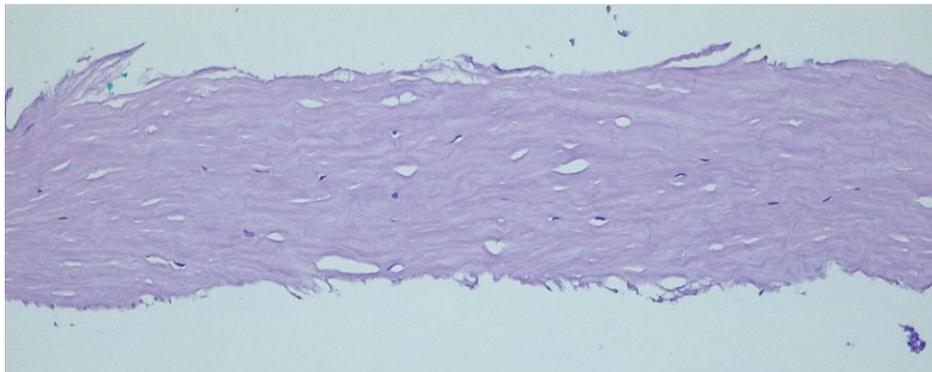


Fig.5 Lembo stromale corneale dopo 48 ore Storagix- struttura omogenea e spessore regolare.

TAKE HOME MESSAGE: basandoci sulle analisi istologiche macro e microscopiche, possiamo concludere che sia Storagix che Coldix mantengono la struttura e la trasparenza.

Gli step successivi includeranno uno studio di validazione che permetterà di determinare la tecnica migliore per la conservazione dei lenticoli corneali stromali e se decellularizzazione e/o disidratazione siano più efficaci del GOLD STANDARD, ovvero la crioconservazione.



FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI
DEL VENETO - ONLUS

CONCLUSIONI

A questo studio di validazione seguirà quindi, formale richiesta al Centro Regionale Trapianti (CRT) e al Centro Nazionale Trapianti (CNT) per autorizzazione a fare banking in Fondazione Banca degli Occhi del Veneto di lenticoli corneali stromali ottenuti da donatore vivente dopo interventi di chirurgia refrattiva SMILE. I lenticoli corneali stromali saranno conservati seguendo le procedure e i controlli di qualità e di sicurezza previsti dalle linee guida per la conservazione e distribuzione di tessuti da donatore vivente. Una volta autorizzati dalle autorità competenti, i lenticoli corneali stromali potranno pertanto essere distribuiti ai chirurghi per il trattamento dei pazienti affetti da cheratocono e altre ectasie corneale attraverso la tecnica chirurgica cheratoplastica additiva.

Il progetto di ricerca è finanziato con i fondi di A.I.Che. (Associazione Italiana CHeratoconici), il contributo 5xMille 2021 Enti della Ricerca Scientifica MUR ed il contributo 5xMille 2021 Enti della Ricerca Sanitaria (Ministero della Salute).