



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TESI DI LAUREA

**ANALISI *IN VIVO* DEI DEPOSITI SU LENTI A CONTATTO
MORBIDE A RICAMBIO FREQUENTE: DUE
BIOMATERIALI IN SILICONE-IDROGEL A CONFRONTO**

Relatore:

Ch.ma Prof.ssa Monica Dettin

Laureando:

Stefano Mescalchin

Anno accademico 2011/2012

A mamma e papà

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Il film lacrimale	4
1.2 Principali caratteristiche fisico-chimiche delle lenti a contatto morbide.....	5
1.3 Materiali utilizzati in contattologia.....	9
1.4 Il problema dei depositi	12
1.5 Stato dell'arte sui metodi di rilevazione dei depositi proteici e lipidici	16
1.5.1 Metodi per la deposizione proteica.....	16
1.5.2 Metodi per la deposizione lipidica.....	17
1.6 Spettroscopia nell'ultravioletto.....	17
1.7 La determinazione proteica su lenti a contatto mediante spettroscopia.....	21
2. SCOPO DELLA TESI.....	23
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 Materiali utilizzati.....	25
3.2 Strumentazioni utilizzate per effettuare i test	26
3.3 Proprietà e caratteristiche delle lenti a contatto utilizzate	27
3.3 Schema dell'esperimento	28
3.4 Protocollo Clinico	28
3.5 Saggi per la quantificazione proteica.....	29
3.5.1 Assorbanza UV 280nm.....	29
3.5.2 Saggio alla Ninidrina	32
3.6 Saggio per la quantificazione del colesterolo	35
4. RISULTATI	39
4.1 Prove preliminari per la messa a punto del protocollo sperimentale.....	39
4.2 Analisi dei depositi	41
4.2.1 Quantificazione dei depositi proteici.....	41
4.2.2 Quantificazione del colesterolo	45
5. DISCUSSIONE	49
6. CONCLUSIONI.....	55
7. APPENDICE	57
8. ABBREVIAZIONI.....	61
9. BIBLIOGRAFIA	63

ABSTRACT

Valutare i depositi proteici e lipidici su lenti a contatto morbide a ricambio mensile di materiale Lotrafilcon B e Comfilcon A, entrambi silicone-idrogel. Le lenti a contatto di un campione di 30 soggetti, dopo 10 ore di porto, sono state analizzate al fine di quantificare e comparare i depositi di tipo proteico e lipidico nei due materiali.

1. INTRODUZIONE

Le lenti a contatto costituiscono una valida alternativa agli occhiali da vista o alla chirurgia refrattiva per la correzione delle ametropie e sono utilizzabili in sicurezza fin dalla prima adolescenza. Considerando che si stima che la popolazione con difetti di vista a livello mondiale sia compresa tra 0,8 e 2,3 miliardi è facile comprendere come ci possa essere un discreto interesse nei materiali utilizzati in contattologia che costituiscono un piccolo microcosmo nel mondo dei biomateriali³⁶.

Le lenti a contatto morbide rappresentano il 90% del mercato mondiale della contattologia e in particolare le morbide in idrogel con silicone, oggetto di questo lavoro, incidono per il 33% del mercato delle lenti morbide²⁶.

Le lenti morbide in idrogel senza silicone, ovvero la maggior parte delle lenti morbide tuttora utilizzate, ha dato grande soddisfazione sia ai produttori sia ai portatori. Infatti queste lenti conferiscono un elevato *comfort* all'utilizzatore e l'inserimento nel mercato di prodotti a ricambio frequente (15gg, 30gg) ne ha favorito la diffusione in particolare a partire dagli anni novanta²¹.

Il lancio nel mercato delle lenti al silicone idrogel è avvenuto alla fine degli anni novanta e da allora questa categoria di lenti ha raccolto un consenso sempre più diffuso da parte degli utilizzatori e dei professionisti che operano nell'ambito della visione. Un tale incremento nella diffusione di queste lenti è dovuto principalmente a due ordini di motivi.

In primo luogo i materiali di cui sono costituite sono in grado di rispettare meglio alcune necessità fisiologiche della cornea, ovvero la sua ossigenazione. Infatti le lenti tradizionale non garantivano un corretto apporto di ossigeno alla cornea³ e tale condizione comportava ipossia corneale, con conseguenze cliniche rilevanti.

Inoltre le aziende costruttrici hanno dovuto riformulare e rivedere la composizione dei primi materiali usciti nel mercato che se da un lato miglioravano le esigenze di ossigeno della cornea, dall'altro risultavano meno sopportabili da parte degli utenti che avvertivano la sensazione di corpo estraneo durante l'uso.

1.1 Il film lacrimale

Il film lacrimale consiste in un sottile strato di fluido che ricopre la superficie oculare si adagia sopra la cornea e non risente della forza di gravità.

Il motivo per cui le lenti a contatto aderiscono alla superficie corneale è dovuto alla tensione superficiale del film lacrimale, infatti la lente è bagnata dal film lacrimale su entrambe le sue superfici.

Pertanto il film lacrimale gioca un ruolo fondamentale nella contattologia e in generale nella salvaguardia della salute dell'occhio, infatti una sua anomalia di tipo qualitativo o quantitativo può portare a perdita di trasparenza, vascolarizzazione e ulcerazione della cornea.

La struttura del film lacrimale è divisibile in tre componenti che però presentano una certa commistione tra loro: strato lipidico, acquoso e mucoso²⁹.

Lo strato lipidico ha uno spessore variabile che in media è di 0,1µm e la sua composizione consta prevalentemente di esteri del colesterolo e acidi grassi, inoltre sono presenti fosfolipidi e oli neutri³⁰ ma in minor quantità.

Questo strato assolve la funzione di stabilizzare e ispessire il film lacrimale, riducendo anche l'evaporazione dell'acqua. Inoltre lo strato lipidico forma una barriera idrofoba lungo il bordo palpebrale per impedire la fuoriuscita del fluido lacrimale stesso e provvede al mantenimento dell'idratazione della superficie oculare durante il sonno anche se la chiusura della palpebra non è completa.

Lo strato acquoso è il più spesso, circa 8 µm, e le sue caratteristiche e proprietà condizionano quelle del film lacrimale nella sua totalità. Il pH è variabile tra 6,5 e 7,6³¹ e la pressione osmotica che è regolata da ioni e proteine gestisce il flusso d'acqua tra il film lacrimale e l'epitelio corneale. Inoltre è caratterizzato da una tensione di ossigeno indicativamente 150 mmHg e bassa viscosità per evitare danni all'epitelio corneale. È composto per il 98% da acqua, elettroliti disciolti, molti tipi di proteine, cellule epiteliali esfoliate, linfociti e residui cellulari.

Le proteine predominanti sono lisozima, lipocaina, lattoferrina e immunoglobulina secretoria A (sIgA)³³.

Ognuna delle succitate proteine svolge un ruolo preventivo nei confronti delle infezioni e del mantenimento della salute oculare.

Il lisozima elimina i batteri dopo averli circondati e attaccati con enzimi specifici, in particolare svolge una potente azione contro le specie di Streptococco e Stafilococco che causano congiuntiviti³⁴. La lipocaina ha un'alta affinità per gli acidi grassi e si lega ai lipidi del film lacrimale determinando la tensione superficiale del film lacrimale e prevenendo l'inattivazione del lisozima da parte degli acidi grassi a catena lunga. La lattoferrina si lega alle membrane cellulari di batteri sia Gram positivi che Gram negativi e così riesce ad inibire la crescita di svariate specie di batteri. Infine la sIgA è coinvolta nel sistema di risposta adattivo all'ambiente, infatti protegge l'occhio dall'adesione dei batteri sulla superficie oculare.

Lo strato mucoso è il più profondo ed è costituito principalmente dalla mucina prodotta dalle cellule caliciformi della congiuntiva. Il ruolo preminente di questo strato è quello di garantire la bagnabilità della superficie oculare. Infatti la mucina riducendo la tensione superficiale del film lacrimale rende possibile l'umidificazione del rivestimento idrofobo dell'epitelio corneale³⁵.

1.2 Principali caratteristiche fisico-chimiche delle lenti a contatto morbide

Uno degli aspetti fondamentali nell'analisi delle lenti a contatto morbide in silicone-idrogel è il modulo. Per modulo di una lente a contatto morbida si intende il modulo di elasticità noto anche come "modulo di Young", che è un valore tipico della tecnologia dei materiali e descrive il rapporto tra sforzo e deformazione nella distorsione di un corpo solido in una reazione lineare di elasticità (Fig.1-1).

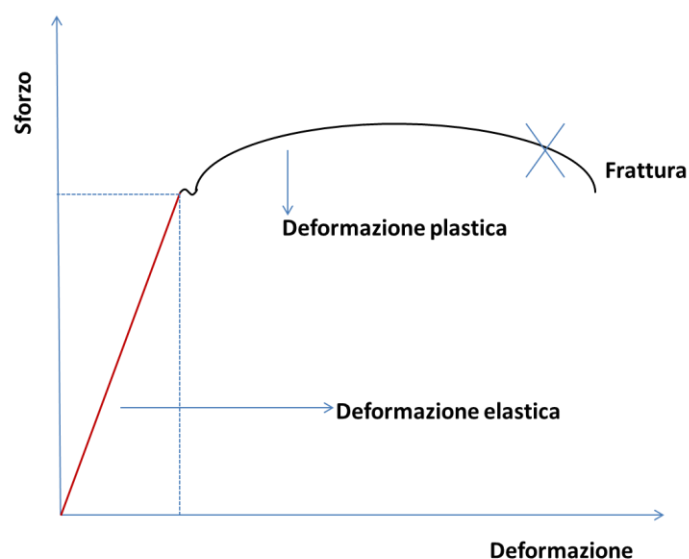


Figura 1-1 Diagramma sforzo-deformazione.

Il modulo si misura come la tensione in megapascal [1 MPa = 1 N/mm²]. Si definisce come una costante data dal rapporto tra la trazione meccanica e la deformazione:

$$E = \frac{d\sigma}{d\varepsilon} = \text{cost}$$

Va ricordato che il modulo non è costante rispetto a tutte le dimensioni fisiche e dipende da condizioni ambientali come la temperatura, l'umidità e la frequenza di deformazione. I moduli delle lenti a contatto morbide variano tra 0,4 e 1,2 MPa e per avere un'idea pratica del significato di tale valore basti pensare che il modulo del vetro è mediamente di 50000 MPa³⁸.

Un altro parametro importante per una lente a contatto è la bagnabilità e dal punto di vista quantitativo il fenomeno della bagnabilità si può comprendere considerando una goccia di liquido depositata su una superficie solida. Dopo aver riunito nel punto di contatto delle tre fasi aria-liquido-solido i vettori caratterizzanti le forze superficiali (che sono tangenti alle rispettive superfici), li proiettiamo parallelamente alla superficie del solido in modo da poter formulare la seguente condizione di equilibrio:

$$\gamma_{sa} = \gamma_{la} \cdot \cos \theta + \gamma_{sl}$$

Nella equazione θ rappresenta l'angolo di contatto tra il mezzo liquido e quello solido, γ_{sa} indica la tensione interfacciale solido-aria $\gamma_{la} \cdot \cos \theta$ la tensione interfacciale liquido-aria e γ_{sl} rappresenta la tensione interfacciale solido-liquido. Si noti che la componente verticale di γ_{la} è neutralizzata dalla forze di adesione fra solido e liquido. Le forze si possono apprezzare in Fig.1.2.

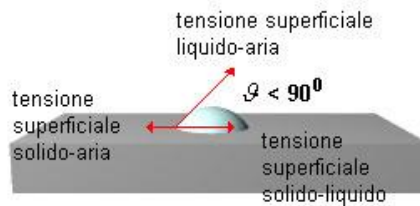


Figura 1-2 Rappresentazione delle forze nel punto di contatto. Autore Marcello Guidotti
<http://www.galenotech.org/chimfis4.htm>

Dall'equazione della condizione di equilibrio, si ricava la relazione di Young:

$$\cos \vartheta = \frac{\gamma_{sa} - \gamma_{sl}}{\gamma_{la}}$$

Pertanto quando una goccia di liquido è posta su una superficie solida, il suo perimetro si sposta, allargandosi o contraendosi, fino a quando l'angolo θ assume il valore dato dalla equazione della relazione di Young. Si può correlare la bagnabilità con la misura dell'angolo θ e si possono esaminare quattro casi limite possibili.

La bagnabilità è massima quando $\theta=0$ ($\cos\theta=1$); In tal caso si ha una bassa tensione superficiale del liquido, una bassa tensione interfacciale e una grande tensione superficiale del solido. E' quello che si verifica, per esempio, quando l'olio si spande sul vetro (Fig.1-3).

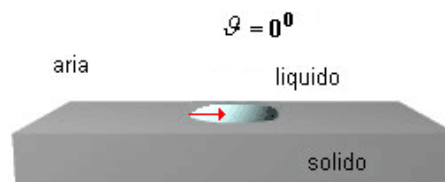


Figura 1-3 Caso massima bagnabilità. Autore Marcello Guidotti <http://www.galenotech.org/chimfis4.htm>

la bagnabilità è parziale quando $\theta < 90^\circ$ ($\cos\theta < 1$). Questa situazione si presenta quando $\gamma_{sl} > \gamma_{sa}$ ed è particolarmente evidente quando la tensione superficiale del liquido è elevata: un esempio è il film lacrimale su di una lente a contatto (Fig.1-4).

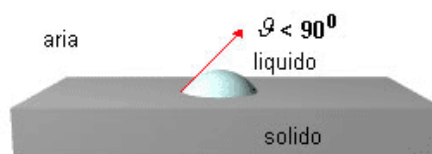


Figura 1-4 Caso bagnabilità parziale. Autore Marcello Guidotti <http://www.galenotech.org/chimfis4.htm>

la bagnabilità è scarsa quando $\theta > 90^\circ$ ($\cos\theta < -1$);
 Si verifica se $\gamma_{sl} \gg \gamma_{sa}$ (Fig.1-5).

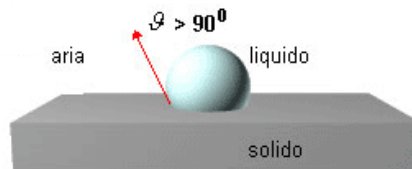


Figura 1-5 Caso bagnabilità scarsa. Autore Marcello Guidotti
<http://www.galenotech.org/chimfis4.htm>

non si ha bagnabilità quando $\theta = 180^\circ$ ($\cos \theta = - 1$). Un esempio si ha nel caso di mercurio su vetro (Fig. 1-6): questa situazione è conseguente all'elevata tensione interfacciale mercurio-vetro, che in questo caso eguaglia la somma delle tensioni interfacciali vetro-aria e mercurio-aria.

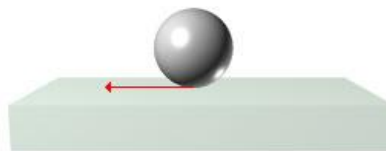


Figura 1-6 Caso bagnabilità nulla. Autore Marcello Guidotti
<http://www.galenotech.org/chimfis4.htm>

La bagnabilità è una caratteristica estremamente importante nelle lenti a contatto, in quanto il mantenimento del film lacrimale, nella forma di un sottile strato capillare, è una necessità fondamentale per la compatibilità fisiologica tra il portatore e la lente. L'acqua ha una tensione superficiale più grande della maggior parte dei liquidi, a causa del legame idrogeno che si instaura tra le sue molecole. Ad esempio, il film lacrimale ha una tensione superficiale (46 dine/cm) minore di quella dell'acqua pura ($72,8 \text{ dine/cm}$).

Infine la trasmissibilità all'ossigeno è un parametro altrettanto importante che caratterizza una lente a contatto morbida, infatti la lente ostacola il passaggio dell'ossigeno atmosferico ai danni del metabolismo corneale e può anche far aumentare lo stesso fabbisogno di ossigeno della cornea perché ne aumenta la temperatura³⁰.

Il passaggio di un gas attraverso un materiale si definisce permeabilità che è il prodotto del coefficiente di diffusione D per il coefficiente di solubilità k . Diffusione e solubilità sono riferite al comportamento del gas in quello stesso materiale. La permeabilità Dk è una caratteristica propria di ogni materiale e si esprime in $[(\text{cm}^2/\text{s}) \cdot (\text{mlO}_2)/\text{mL} \cdot \text{mmHg}]$ anche se nell'ambito contattologico si usa un'unità che non fa parte del Sistema Internazionale che è il Barrer.

$$1 \text{ Barrer} = 10^{-11} (\text{cm}^3 \text{ O}_2) \text{ cm cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$$

Nei valori di permeabilità è opportuno che sia sempre indicata la temperatura alla quale sono stati condotte le misure perché il Dk varia appunto con la temperatura.

Nei materiali silicone idrogel i valori di Dk variano da 60 a 140 Barrers ma il valore da un'informazione relativa al passaggio di ossigeno attraverso un campione standard, pertanto per sapere quanto ossigeno arriva alla cornea è necessario considerare lo spessore di una lente a contatto. Lo spessore medio di una lente morbida per la correzione della miopia (si tratta della maggioranza delle lenti a contatto utilizzate) di potere -3,00 diottrie è pari a 0,1mm. Pertanto il Dk rapportato allo spessore t (dall'inglese thickness) rappresenta la trasmissibilità all'ossigeno: Dk/t

1.3 Materiali utilizzati in contattologia

Le lenti in silicone idrogel costituiscono un'evoluzione dei precedenti tipi di idrogel che non contenevano silicone.

Gli idrogel sono dei poliacrilati contenenti gruppi ossidrilici nella loro struttura che si rigonfiano assorbendo acqua, il capostipite di questa famiglia di materiali è l'unità monomerica costituita dall'HEMA (2-idrossietil metacrilato) in Fig.1-7 la sua formula di struttura.

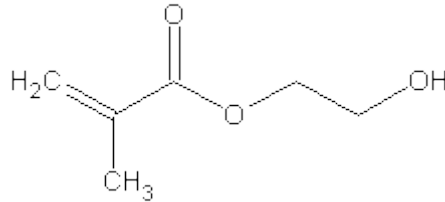


Figura 1-7 Formula di HEMA (2-idrossietilmetacrilato).

La polimerizzazione dell'HEMA avviene nel 1961 che sviluppò il poli-idrossimetil metacrilato (pHEMA). In origine il materiale assorbiva acqua per circa il 38% del suo peso e aveva un Dk di 7,5 Barrers, infatti è proprio per la presenza di acqua che permette la diffusione dell'ossigeno. In seguito la gamma degli idrogel si ampliò con l'inserimento di vari monomeri idrofilici come il PVP (polivinilpirrolidone) o NVP (N-vinilpirrolidone) e molti altri. Una lista interessante è riportata in tabella 1-1 dove sono presenti i principali idrogel commercializzati. Va sottolineato come la Food and Drug Administration statunitense (FDA) abbia suddiviso gli idrogel in quattro gruppi a seconda del contenuto d'acqua e della carica elettrostatica. Quando presente, il gruppo carbossilico si dissocia formando lo ione carbossilato che lega l'acqua: pertanto i materiali carichi trattengono l'acqua.

Tabella 1-1 Classificazione Food and Drug Administration statunitense (USA).

FDA Lens Group	United States Adopted Name	Dk*	Water Content	Chemical composition
I non-ionic, low water content	polymacon	7.5	36%	HEMA
	tetrafilcon	9.0	43.5%	HEMA, MMA, NVP
	lotrafilcon A	140	24%	DMA, TRIS, siloxane
	lotrafilcon B	110	33%	DMA, TRIS, siloxane
	galyfilcon A	60	47%	Unpublished
II non-ionic, high water content	omafilcon A	19.6	62%	HEMA, PC
	alphafilcon A	22.9	66%	HEMA, NVP
	hilafilcon A	26.9	70%	HEMA, NVP
III Ionic, low water content	butilcon A	16.0	45%	HEMA, DA, MAA
	balafilcon A	99	36%	NVP, TPVC, NCVE, PBVC
IV Ionic, high water content	ocufilcon D	19.7	55%	HEMA, MAA
	etafilcon A	17.0	58%	HEMA, MAA
	vifilcon A	16.0	55%	HEMA, PVP, MAA
HEMA	2-Hydroxyethyl methacrylate	NVP	N-vinyl pyrrolidone	
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacrylamide	PBVC	poly[dimethylsiloxyl] di [silylbutanol] bis[vinyl carbamate]	
DA	diacetone acrylamide	PC	phosphorylcholine	
MMA	methyl methacrylate	TPVC	tris-(trimethylsiloxysilyl) propylvinyl carbamate	
MAA	methacrylic acid	TRIS	tris (hydroxymethyl) aminomethane	
NCVE	<i>N</i> -carboxyl vinyl ester			

* oxygen permeability ($\times 10^{-11}$)

Sempre in tabella 1-1 si può notare come nel gruppo I siano presenti due materiali con Dk molto più alto degli altri materiali nello stesso gruppo. Si tratta di silicone-idrogel ovvero di materiali che sono il risultato della polimerizzazione tra il classico poliidrossietilmetacrilato e il silicone acrilato.

La ragione che ha incoraggiato lo sviluppo di nuovi materiali polimerizzando con il silicone è la richiesta di ossigeno da parte della cornea. I materiali per lenti morbide a base di pHEMA sono scarsamente permeabili ai gas e con l'utilizzo di tali lenti la cornea si trova in una condizione di ipossia che può comportare svariate complicanze¹⁰.

Il silicone è stato scelto per la sua naturalmente alta permeabilità ai gas. Le prime lenti al silicone risalgono agli anni '70. Tali lenti risolvevano il problema del passaggio d'ossigeno ma presentavano elevata idrofobicità ed elevata formazione di depositi con i componenti del film lacrimale, pertanto non hanno avuto un grande seguito.

Pertanto la sfida era riuscire a combinare il silicone con i monomeri dell'idrogel.

I silossani sono dei composti dove si ripete il gruppo funzionale (-Si(CH₃)₂-O-) e i polimeri dei silossani sono detti siliconi. Per reazione diretta tra silicio e cloruro di metile si ottiene dimetilclorosilano più altri distillati. Per successiva idrolizzazione del

dimetilclorosilano si ottengono silossani ciclici e lineari che successivamente polimerizzati danno luogo ai polisilossani. Il polimero siliconico più comune è il polidimetilsilossano (PDMS). Il PDMS combinato con monomeri idrofilici come NVP ed HEMA ha caratterizzato i primi siliconi idrogel.

Questi primi materiali presentavano ridotta bagnabilità perché il silicone è idrofobico, forte attrazione per i lipidi del film lacrimale e un modulo abbastanza elevato. I problemi legati alla scarsa bagnabilità ed elevata affinità ai lipidi sono stati discretamente risolti con opportuni trattamenti di superficie. Le lenti di materiale Lotrafilcon B, i cui monomeri principali sono il DMA (N-N-Dimetilacrilammide) e il TRIS (trimetilsilossi silano) sono state modificate in modo irreversibile da un trattamento di gas al plasma utilizzando un composto di trimetilsilano, ossigeno e metano. Il prodotto finale è un rivestimento spesso 25nm idrofilico ed ad alto indice di rifrazione²¹.

Ogni azienda ha sviluppato una strategia propria per ovviare all'inconveniente dell'idrofobicità. Il materiale Comfilcon A è stato ottenuto aggiungendo nuovi componenti (M3U, FM0411M, HOB, IBM, NVP, TAIC, VMA)^a ed è stata sfruttata la formazione di legami idrogeno con la componente di ossigeno delle molecole d'acqua. Il materiale è risultato avere una buona bagnabilità senza ricorrere a trattamenti di superficie o agenti umettanti interni³⁸.

1.4 Il problema dei depositi

La lente a contatto applicata nell'occhio è effettivamente immersa nel film lacrimale. I risultati di tale interazione sono da individuare da un lato in un certo grado di assorbimento da parte della lente di proteine e lipidi presenti nel film lacrimale e dall'altro, in una risposta del film stesso e dei tessuti oculari come la cornea o la congiuntiva al contatto ripetuto e prolungato con la superficie della lente. Infatti le lenti a ricambio frequente, mensile nel caso dei materiali che abbiamo considerato in questo

^a FM0411M (2-ethyl[2-(2-methylprop-2-enoyl)oxy]ethyl)carbamate HOB ((2RS)-2-hydroxybutyl 2-methylprop-2-enoate) IBM(Isobornyl methacrylate) M3U (α -[3-(2-[2-(methacryloyloxy)ethyl] carbamoyloxy]ethoxy)propyl]dimethylsilyl)- ω -[3(2[[2(methacryloyloxy)ethyl]carbamoyloxy]ethoxy)propyl]poly([oxy[(methyl) [3-[ω methylpoly(oxyethylene)oxy]propyl]silylene]/[oxy[(methyl)(3,3,3-trifluoropropyl)]silylene]/oxy(dimethylsilylene)))] NVP (N-vinyl pyrrolidone) TAIC (1,3,5-triprop-2-enyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione) VMA N-Vinyl-N-methylacetamide

studio, prevedono che il portatore utilizzi per un massimo di 30 giorni consecutivi le lenti rimuovendole per dormire. Una volta rimosse le lenti vanno inserite in un contenitore ed è necessario immergerle in una soluzione per la disinfezione, ovvero si cerca di neutralizzare i germi patogeni in quanto una loro eliminazione con tali prodotti non è possibile.

L'assorbimento di depositi da parte delle lenti a contatto in generale è stato correlato a riduzioni del *comfort* per il portatore e aumento di una risposta infiammatoria dell'occhio. Da un punto di vista delle superfici della lente a contatto la presenza di proteine denaturate, lipidi, mucine e contaminanti inorganici comporta una forte riduzione della bagnabilità e una riduzione della capacità antisettica dei prodotti di disinfezione. Inoltre si formano delle irregolarità sulla superficie della lente e non è di poca importanza ricordare la crescita batterica in tali condizioni è favorita.

L'intensità dei sintomi soggettivi non è uniforme bensì è altamente variabile a seconda del tipo di lente^{13,18,19} e risente di una marcata variabilità individuale. Il portatore può avvertire sensazione di corpo estraneo, secchezza, prurito, bruciore e lamentare una riduzione della visione.

Da un punto di vista clinico si possono riscontrare: disepitelizzazione corneale e congiuntivale, lacrimazione riflessa, minore stabilità del film lacrimale, secrezioni mucoidi e congiuntivite papillare gigante.

Nelle figure 1-8 e 1-9 è riportata la scala graduata del Prof. Natan Efron uno dei massimi studiosi delle reazioni avverse dall'uso delle lenti a contatto. Per ognuno dei segni oggettivi riscontrabili nel portatore esiste una scala di intensità rappresentata da disegni molto verosimili: la prima colonna a sinistra comprende la situazione normale o fisiologica e spostandosi a destra si intensifica la gravità del problema. I segni di cui si è accennato poco sopra sono rappresentati nella ultime tre file della figura 1-8.

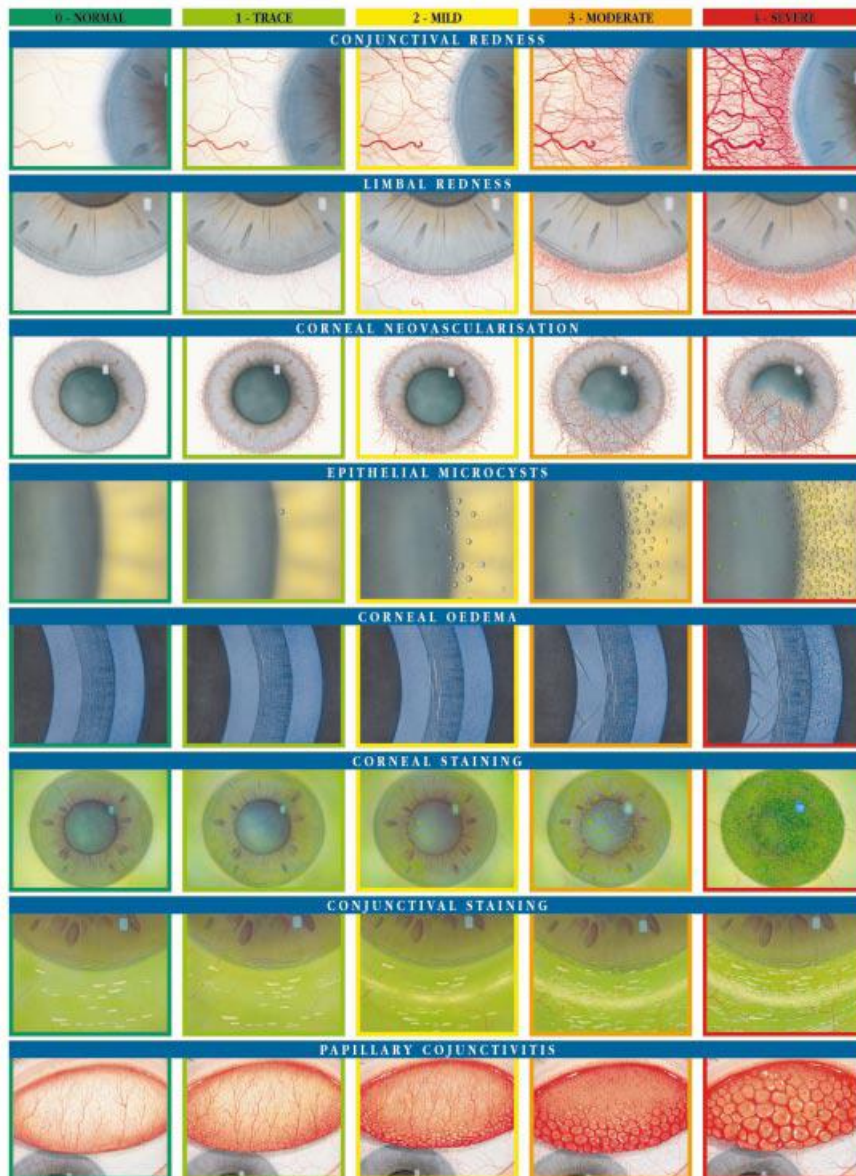


Figura 1-8 Scala graduata Efron per le complicazioni da lenti a contatto prima parte

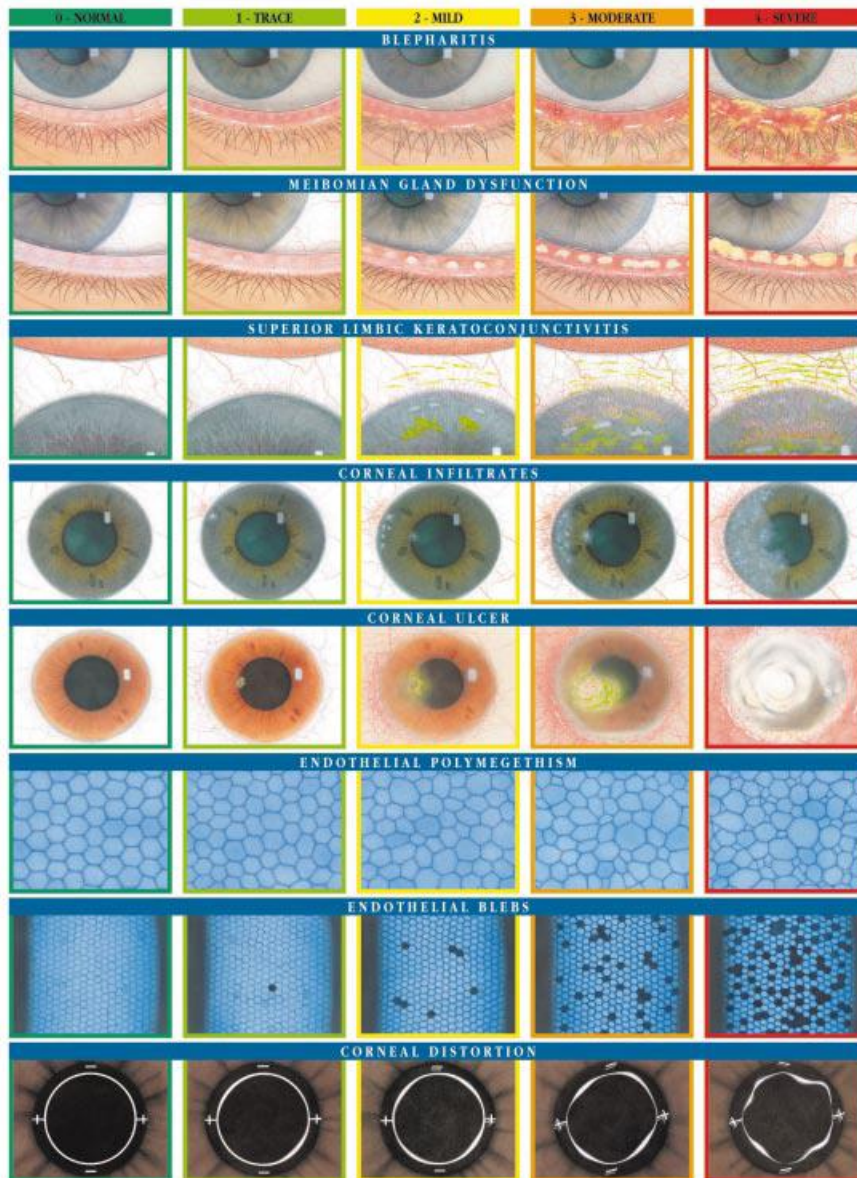


Figura 1-9 Scala graduata Efron per le complicazioni da lenti a contatto seconda parte

1.5 Stato dell'arte sui metodi di rilevazione dei depositi proteici e lipidici

1.5.1 Metodi per la deposizione proteica

Per analizzare la deposizione proteica sulle lenti a contatto sono stati proposti differenti metodi sia di tipo qualitativo che quantitativo. Tali metodi si possono suddividere in valutazioni cliniche, analisi biochimiche di laboratorio e analisi per immagini.

Le valutazioni cliniche consistono nella stima soggettiva dell'intensità della deposizione visibile sulle lenti a contatto attraverso il biomicroscopio. La scala di valutazione più diffusa e utilizzata è quella di Rudko ma in letteratura è riportata una scarsa correlazione tra le valutazioni ottenute con tale scala e gli effettivi quantitativi di depositi.

Le tecniche di analisi biochimiche forniscono informazioni dettagliate sulla quantità e/o tipo di deposizione presente. I saggi per la quantificazione proteica in genere richiedono l'estrazione delle proteine dalle lenti a contatto prima di procedere con l'analisi. I reagenti chimici che vengono utilizzati per realizzare l'estrazione sono urea, perclorato di potassio, sodio duodecilsulfato e acetonitrile/acqua acida. Una volta estratte le proteine sono spesso quantificate mediante dell'acido bicinconico o il Test di Bradford per poterne effettuare una quantificazione. Mentre per l'identificazione e la quantificazione delle proteine depositate si utilizzano tecniche come l'elettroforesi su gel (SDS-PAGE). Infine, un'altra tecnica molto sensibile per identificare i diversi tipi di proteine è la cromatografia (HPLC) che fornisce risultati di tipo quantitativo.

Le tecniche per analisi di immagini forniscono principalmente risultati qualitativi ma in alcuni casi è possibile avere delle informazioni quantitative. La microscopia a scansione elettronica (SEM) e la microscopia a trasmissione elettronica (TEM) sono state adottate per ottenere immagini ad alta risoluzione. La microscopia a forza atomica (AFM) è stata utilizzata per studiare l'interazione tra la rugosità della superficie e la deposizione del film lacrimale. La microscopia confocale a scansione laser (CLSM) è l'unica tecnica che permette all'esaminatore di analizzare la matrice del polimero direttamente al suo interno, rendendo così possibile la profondità di adsorbimento delle proteine. Sfruttando l'assorbimento o l'emissione di energia per identificare proteine, carboidrati o lipidi dall'analisi di specifiche bande di assorbimento sono state utilizzate anche tecniche come la spettroscopia elettrica per analisi chimiche (ESCA) e la spettroscopia di massa (MALDI).

1.5.2 Metodi per la deposizione lipidica

In letteratura anche per la deposizione lipidica sono presenti svariati metodi differenti tra loro. Alcuni di questi forniscono informazioni di tipo quantitativo mentre altri di tipo qualitativo. L'elenco che segue comprende i metodi usati principalmente: spettroscopia UV, spettroscopia a fluorescenza, cromatografia seguita da analisi densitometrica, cromatografia a gas associata spettrometria di massa, reazione con la vanillina e tecnologia radiochimica.

Una gamma così ampia di metodi analitici rende complicato comparare i risultati tra diversi studi e inoltre molti dei metodi sopracitati sono stati sperimentati solo *in vitro*.

L'attenzione e l'interesse alla deposizione di tipo lipidico è più recente di quello proteico ed è cresciuto parallelamente alla diffusione dei materiali silicone-idrogel. Pertanto in futuro saranno sicuramente identificate le metodiche più attendibili e ripetibili per poter meglio comprendere i processi di deposizione lipidica su questi materiali.

1.6 Spettroscopia nell'ultravioletto

La spettrofotometria è una delle branche della spettroscopia dove si misura l'assorbimento di diverse sostanze nell'intervallo di lunghezze d'onda comprese tra i 190 nm e i 780 nm. In questo intervallo di lunghezze d'onda l'assorbimento della radiazione elettromagnetica è causato dall'eccitazione di elettroni di legame e non di legame di ioni o molecole.

Atomi o molecole, trovandosi in campi energetici possono assorbire quantità definite e caratteristiche di energia quando atomi o molecole vengono eccitati da adatte radiazioni elettromagnetiche, passando a stati energetici maggiori, si ha il fenomeno di assorbimento mentre quando dagli stati eccitati, ritornano allo stato fondamentale, gli atomi e le molecole emettono quanti di energia sotto forma di radiazioni elettromagnetiche e si ha il fenomeno di emissione (fluorescenza).

In genere per l'assorbimento nell'UV e nel Visibile sono interessati, nelle transizioni energetiche, gli elettroni esterni della molecola assorbente sia impegnati che non impegnati in un legame.

La parte della sostanza assorbente chiamata *cromoforo* interessata a tali transizioni è generalmente costituita da *anelli eterociclici aromatici, doppi legami coniugati, ponti disolfuri e gruppi chimici funzionali come COOH, NH₂*.

Il grafico di Fig.1-10 rappresenta un esempio di due spettri di assorbimento.

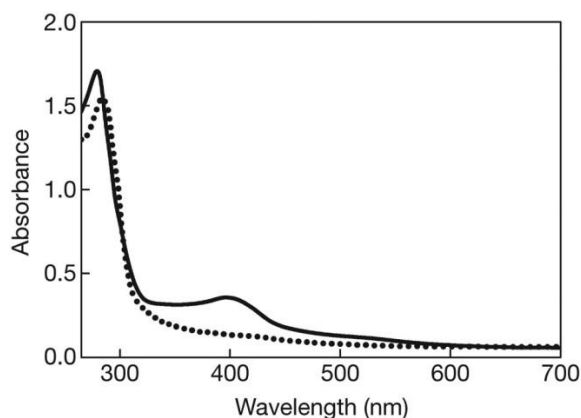


Figura 1-10 Esempio di uno spettro di assorbimento. Tratto da SS Kamat et al. Nature 000, 1-4 (2011)
doi:10.1038/nature10622

Le tecniche spettrofotometriche sono usate per indagini sia qualitative che quantitative sui campioni. La lunghezza d'onda al picco dell'assorbimento fornirà informazioni inerenti la struttura della molecola e l'area sottesa al picco di assorbimento è proporzionale alla quantità delle specie che assorbono la luce.

Le misure quantitative si basano sulla Legge di Beer (anche Lambert-Beer) che si esprime nel seguente modo:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dove ϵ è il coefficiente di estinzione molare che dimensionalmente è il reciproco di una concentrazione per una lunghezza e si esprime in $[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$, b è la lunghezza del cammino ottico (ovvero lo spessore della soluzione attraversata) in $[\text{cm}]$ e c la concentrazione della soluzione in $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, quindi tale legge correla la quantità di luce

che viene assorbita da un mezzo alla natura chimica, concentrazione e spessore del mezzo attraversato.

Come rappresentato in Fig.1-11 una radiazione incidente I_0 è in parte assorbita dal campione e la radiazione uscente I_1 ha intensità minore.

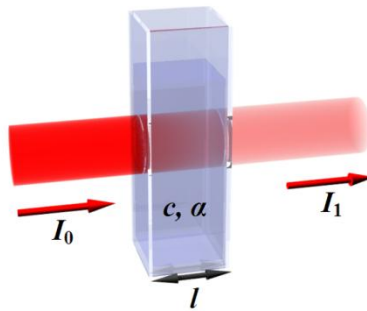


Figura 1-11: Rappresentazione di una radiazione incidente una soluzione.

Per condurre delle misure di tipo quantitativo si utilizza una radiazione monocromatica della quale si misura l'intensità in uscita del campione che poi andrà confrontata con quella in entrata e il risultato che si ottiene è correlato alla quantità di sostanza che ha dato luogo all'assorbimento. A tale scopo si ritiene utile definire le seguenti grandezze:

- $T = I_1 / I_0$
dove T è la Trasmittanza che esprime quale porzione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita.
- $A = \text{Log}(1/T) = \text{Log}(I_0 / I_1)$
dove A è l'Assorbanza dove la radiazione assorbita è rapportata alla radiazione trasmessa.

Gli strumenti che si utilizzano per la spettrofotometria sono chiamati spettrofotometri. In Fig. 1-12 è rappresentato uno schema di principio di tali strumenti.

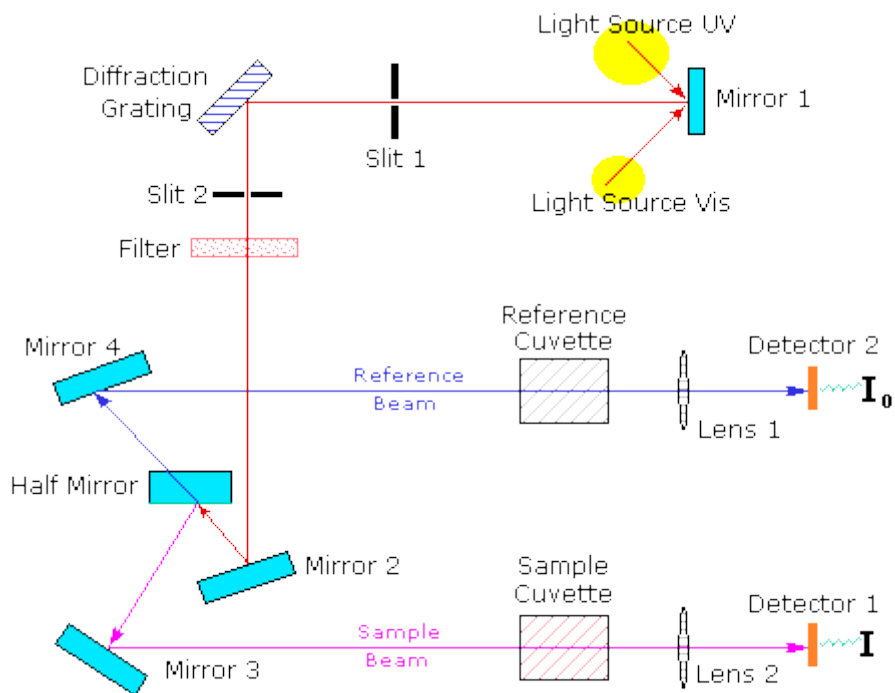


Figura 1-12 Schema di principio di uno spettrofotometro.

La sorgente di radiazione (in alto a destra di Fig.3) è costituita da una o più lampade che producono una radiazione policromatica (linea rossa) che sarà diretta sul campione. Tale radiazione viene poi separata nelle lunghezze d'onda che la compongono da un prisma o un reticolo diffrattivo. Un raggio monocromatico (di una singola lunghezza d'onda) per volta è diviso in due raggi della medesima intensità dei quali uno (linea rosa) passerà attraverso un piccolo contenitore trasparente (cuvetta) che contiene una soluzione del composto che si intende analizzare in un solvente trasparente. L'altro raggio (linea blu) passerà attraverso un'altra identica cuvette che contiene solo il medesimo solvente. Le intensità dei due raggi sono misurate da dei rilevatori elettronici e confrontate. L'intensità del raggio di riferimento (linea blu) dovrebbe fornire uno scarso assorbimento della luce e viene definito I_0 , mentre l'intensità del raggio del campione viene definito I_1 . In poco tempo lo strumento può analizzare la regione UV tra 200 e i 400nm e la regione visibile tra i 400 e gli 800nm.

1.7 La determinazione proteica su lenti a contatto mediante spettroscopia

In letteratura sono presenti molti modi di valutare la deposizione proteica sui materiali delle lenti a contatto e i metodi che utilizzano tecniche spettroscopiche ne costituiscono un discreto sottoinsieme.

I lavori di Maissa³⁹ e Jones¹⁹ prevedono l'inserimento diretto della lente a contatto da analizzare in cuvetta. E' allettante avere la possibilità di effettuare misure di assorbanza direttamente sulle lenti portate e confrontarle con lenti non utilizzate, perché le misure si possono eseguire velocemente e i campioni non devono subire troppe manipolazioni. Pertanto efficacia, sensibilità e ripetibilità di tale metodo sono state testate al fine di valutare se potesse essere adottato come standard per questo studio, realizzando un piccolo esperimento con alcune lenti portate e corrispondenti controlli.

I risultati hanno dimostrato che esistono variabili di difficile o impossibile controllo come, ad esempio, trovare un posizionamento univoco delle lenti nelle cuvette. Infatti la lente immersa nel liquido all'interno della cuvetta tende a muoversi e tale fatto inficia la riproducibilità delle misure di assorbanza. Inoltre esiste una critica di fondo a tal modo operandi: la lente immersa in un liquido non costituisce una soluzione e quindi non è corretto utilizzare leggi che correlano l'assorbanza alla concentrazione di analita in soluzione.

Tranne gli studi citati la tendenza principale è quella di estrarre i depositi dalle lenti con dei solventi organici per far seguire poi l'analisi spettroscopica per la quantificazione. Nei lavori di Boone⁴⁰ dopo l'estrazione viene utilizzato il Bradford, un noto saggio di quantificazione mentre in quello di Christine⁴¹ è stato utilizzato il saggio dell'acido bicinconinico (BCA). Altri lavori come quello di Michaud⁴² hanno utilizzato un kit al blu di Coomassie a confronto con il test alla ninidrina.

2. SCOPO DELLA TESI

Le lenti a contatto morbide in silicone idrogel rappresentano l'ultima famiglia di biomateriali in contattologia e godono di proprietà diverse rispetto a tutti i materiali precedentemente utilizzati²¹. L'incorporazione di gruppi silossanici al materiale idrogel di base ha prodotto lenti a contatto morbide con una trasmissibilità all'ossigeno notevolmente migliorata rispetto a quella dei materiali convenzionali e i risultati di numerosi studi clinici dimostrano che le complicanze fisiologiche derivate dall'utilizzo prolungato di tali lenti sono notevolmente diminuite¹⁻⁷.

I depositi di sostanze derivate dal film lacrimale sulle lenti a contatto sono una problematica assai nota che si manifesta in una diminuzione del comfort per il portatore e in un aumento della risposta infiammatoria dei tessuti oculari⁸⁻¹⁰. Lo scopo di questo studio è valutare l'affinità ai depositi proteici e lipidici di due lenti a contatto in silicone idrogel a ricambio mensile presenti nel mercato internazionale.

Le lenti a contatto di 30 soggetti sono state analizzate mediante differenti metodi per valutare i depositi proteici e lipidici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali utilizzati

Le lenti a contatto indicate da qui in avanti di tipo “A”, il cui nome commerciale é *AirOptix Aqua* di materiale Lotrafilcon B sono state fornite da *CibaVision Italia srl* (Milano, Italia).

Le lenti a contatto indicate da qui in avanti di tipo “B”, il cui nome commerciale é *Biofinity* di materiale Lotrafilcon B sono state fornite da *CooperVision Italia srl* (Lainate, Italia).

I contenitori porta lenti a contatto il cui nome commerciale è *MicroBlock* sono stati forniti da *CibaVision Italia srl* (Milano, Italia).

I contenitori *Kartell* per l'estrazione dei depositi sono stati forniti dalla ditta *Sacco* (Cadorago, Italia).

I contenitori *Eppendorf SafeLock Tubes* per la suddivisione in aliquote sono stati forniti da *Eppendorf* (Amburgo, Germania)

L'Acido Cloridrico è stato fornito dalla *Riedel De Haen* (Riedel, Germania)

Il Cloruro stannoso e l'etilenglicole sono stati forniti dalla ditta *Farmitalia Carlo Erba Spa* (Milano, Italia).

Acetonitrile, Etanolo assoluto, Acido acetico e BSA sono stati forniti dalla *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germania)

Acido Trifluoroacetico è stato fornito dalla *Biosolve* (Valkenswaard, Olanda)

La ninidrina è stata fornita dalla ditta *Merck* (Darmstadt, Germania)

L'acqua utilizzata è stata bidistillata con un sistema messo a punto dalla ditta *Cecchinato* (Mestre, Italia) , ulteriormente desalificata e privata degli organi con il sistema MilliQ della *Waters Millipore* (Vimodrone, Italia).

Il materiale è stato seccato tramite DNA Speed Vac della *Savant* (Farmingdale (NY)).

3.2 Strumentazioni utilizzate per effettuare i test

Test UV 280nm:

L'assorbimento delle soluzioni è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 della Perkin Elmer (Monza, Italia).

Test alla ninidrina:

Per condurre la reazione a 100°C è stato impiegato un blocco termico fabbricato dalla Pierce (utilizzato anche per l'idrolisi) modello Reacti-Therm heating module, mentre l'assorbimento delle soluzioni è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 della Perkin Elmer (Monza, Italia).

Test per la quantificazione del colesterolo:

Per determinare la quantità di colesterolo è stato utilizzato il EnzyChrom™ AF Cholesterol Assay Kit (E2CH-100) della BioAssay, CA USA. Le assorbanze sono state misurate utilizzando il lettore di piastre DV990BV6 della NT Laboratory (Sesto F.no, Italia).

3.3 Proprietà e caratteristiche delle lenti a contatto utilizzate

Nella tabella 3-1 seguente sono riassunte le principali proprietà e caratteristiche delle lenti a contatto utilizzate nello studio.

Tabella 3-1 Caratteristiche principali delle lenti a contatto utilizzate nello studio

<i>Abbreviazione scelta</i>	Tipo A	Tipo B
<i>Nome Commerciale</i>	Air Optix Aqua ¹¹	Biofinity ¹²
<i>Produttore</i>	Ciba Vision	Cooper Vision
<i>Materiale</i>	Lotrafilcon B	Comfilcon A
<i>Gruppo FDA</i>	I (non ionico a basso contenuto d'acqua)	I (non ionico a basso contenuto d'acqua)
<i>Contenuto d'acqua</i>	33%	48%
<i>Trattamento di superficie</i>	25nm plasma	No
<i>Indice di rifrazione</i>	1.42	1.40
<i>Trasmissione della luce</i>	>96%	>97%
<i>Permeabilità all'Ossigeno(Dk)</i>	110 x10 ^{-11b}	128 x10 ^{-11a}
<i>Modulo di elasticità</i>	1.0 ± 0.1 MPa	0.8 ± 0.1 MPa
<i>Resistenza a trazione</i>	0.73 ± 0.16 MPa	0.5 ± 0.07 MPa
<i>Elongazione a rottura</i>	186 ± 39 %	130 ± 2 %
<i>Colore additivo</i>	Phthalocyanine Blue	Phthalocyanine Blue
<i>Processo di colorazione</i>	IMT	IMT
<i>Diametro totale</i>	14.2 mm	14.0 mm
<i>Curva Base</i>	8.6 mm	8.6 mm
<i>Spessore al centro</i>	0.08mm @-3.00 D	0.08 @-3.00 D
<i>Principali monomeri</i>	DMA+TRIS+macromeri silossani	M3U, FM0411M, HOB, IBM,NVP, TAIC, VMA

^b a 34°C [(cm²/s)·(mlO₂)/mL·mmHg] con metodo coulometrico.

3.3 Schema dell'esperimento

In Fig.3-1 è riportato un diagramma di flusso che sintetizza le tappe principali che sono state percorse per la realizzazione dell'esperimento.

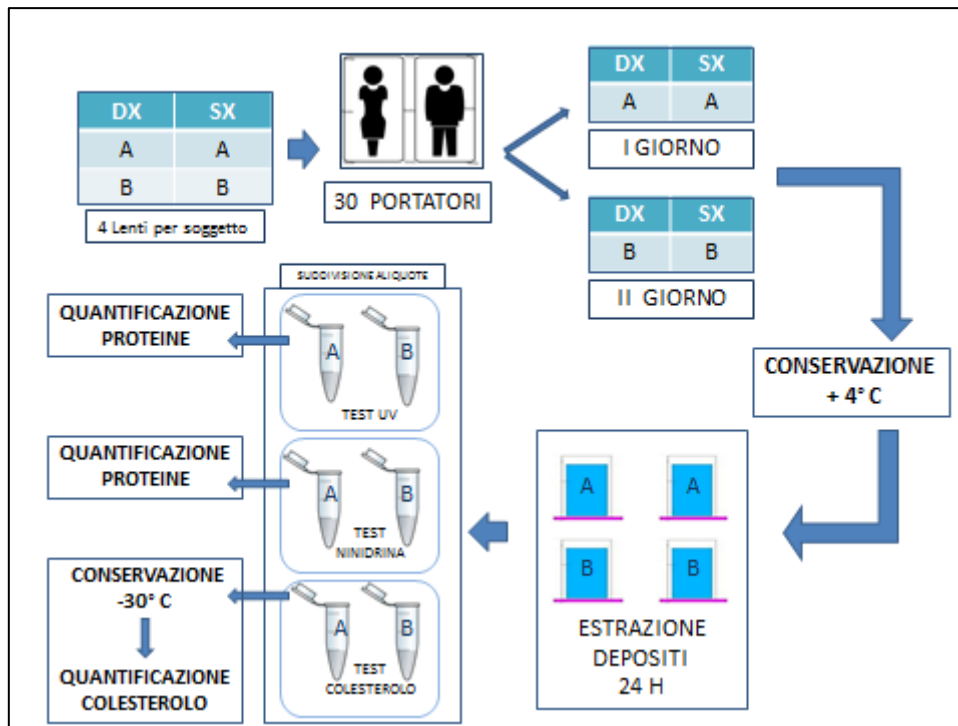


Figura 3-1 Sintesi delle fasi principali dell'esperimento

3.4 Protocollo Clinico: Reclutamento dei Soggetti e tipologia delle Lenti a contatto

Lo studio è stato effettuato su lenti a contatto utilizzate da un gruppo di 30 soggetti (età 33 ± 10 anni) miopi di ambo i sessi (11 maschi e 19 femmine) già portatori di lenti a contatto da almeno 12 mesi senza complicazioni e selezionati secondo i seguenti criteri: nessun uso di farmaci durante lo studio, nessuna nota allergia oculare o patologia del segmento anteriore, nessun sintomo o segno clinicamente evidente di secchezza oculare, buona compatibilità dei parametri corneali (cheratometria e diametro corneale) con le lenti utilizzate, verifica di performance visive di almeno 8/10 di acuità visiva

monoculare e 10/10 binoculare, buon comfort soggettivo con entrambe le lenti e nessuno stato di gravidanza.

Ogni soggetto ha utilizzato una coppia di lenti a contatto di tipo “A” per una giornata ovvero circa 10 ore consecutive e il giorno successivo una lente di tipo “B” con le medesime modalità.

Inserimento e rimozione delle lenti sono stati eseguiti da un operatore professionista ottico esperto in contattologia con guanti sterili monouso al fine di evitare contaminazioni dei campioni in particolare con il grasso cutaneo.

Il portatore non ha mai toccato le lenti né le ha rimosse durante la giornata di test, pena l'esclusione dei campioni dallo studio.

Terminate le ore di utilizzo le lenti sono state recuperate al fine di consentire la conservazione e le successive analisi di laboratorio. Ogni coppia di lenti é stata raccolta a secco in un contenitore portalenti costituito da materiale plastico (nome commerciale Microblock), che riportava un numero progressivo per la catalogazione e posta in conservazione a +4°C.

3.5 Saggi per la quantificazione proteica

3.5.1 Assorbanza UV 280nm

Una quantificazione delle proteine in una soluzione è possibile attraverso la spettrofotometria. L'assorbimento di radiazioni nel vicino UV da parte delle proteine dipende principalmente dagli aminoacidi triptofano, tirosina e in maniera minore da fenilalanina e cistina²⁷⁻²⁸.

Triptofano, tirosina e fenilalanina sono aminoacidi aromatici, in quanto la loro catena laterale contiene un anello aromatico simile al benzene che conferisce a tali aminoacidi la proprietà di assorbire la radiazione elettromagnetica nella banda dell'ultravioletto, mentre per la cistina l'assorbimento è dovuto al ponte disolfuro.

Come si può osservare in Fig.3-2 la catena laterale della tirosina presenta un gruppo fenolico (anello aromatico-OH) che è responsabile, insieme agli anelli aromatici di fenilalanina e triptofani, dell'assorbimento nell'ultravioletto e della fluorescenza delle proteine che contengono questi aminoacidi.

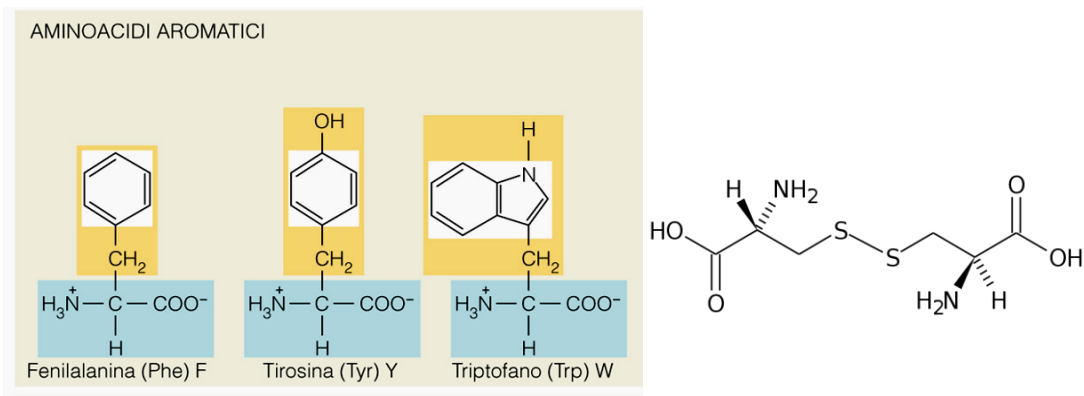


Figura 3-2 Formule di struttura di tirosina, triptofano, fenilalanina e a destra della cistina dove - il legame -S-S- è noto come ponte disolfuro.

3.5.1.1 Protocollo del Saggio UV 280nm

Per la lettura dell'assorbimento delle soluzioni è stato utilizzato lo spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 della Perkin Elmer, che veniva acceso un'ora prima dell'esperimento. Le cuvette in quarzo da 0,5 ml per effettuare le misurazioni sono state pulite con etanolo assoluto e asciugate con azoto. Lo strumento, azzerato con la soluzione di estrazione dei depositi posta in entrambe le cuvette, viene impostato per rilevare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 280 nm. La soluzione da analizzare, tramite pipetta pasteur, è stata trasferita nella cuvetta per procedere con la lettura a 280nm e in seguito, dopo la lettura, la cuvetta con il campione analizzato è stata nuovamente pulita con etanolo e asciugata con azoto.

3.5.1.2 Standard per il Saggio UV 280nm

Per poter ricavare il valore in concentrazione delle proteine in soluzione analizzate nei campioni è stata costruita una retta di taratura con Bovin Serum Albumin (BSA).

Sono stati pesati 10,35 mg di BSA e in seguito dissolti in 10 mL di soluzione per l'estrazione ottenendo una soluzione madre a concentrazione di 1,035 mg/mL. In seguito la soluzione madre ottenuta è stata diluita in soluzioni di 2 mL ciascuna come indicato in tabella 3-2.

Tabella 3-2 Soluzioni per la costruzione di una retta di taratura

Soluzione	Concentrazione (mg/mL)	Concentrazione (µg/mL)	Volume madre (ml)	Volume sol estr (ml)
1 madre	1,035	1035,00		
2	0,690	690,00	1,333	0,667
3	0,518	517,50	1,000	1,000
4	0,345	345,00	0,667	1,333
4,5	0,242	241,50	0,467	1,533
5	0,173	172,50	0,333	1,667
5,5	0,104	103,50	0,200	1,800
6	0,069	69,00	0,133	1,867
7	0,052	51,75	0,100	1,900
8	0,035	34,50	0,067	1,933
9	0,017	17,25	0,033	1,967

Per ognuna delle soluzioni preparate è stata registrata l'assorbanza a 280 nm e con i risultati ottenuti è stata costruita una retta di regressione (Tabella 3-3 e Fig.2-4).

Tabella 3-4 Valori di assorbanza per la costruzione della retta di calibrazione

Soluzione	Concentrazione (µg/mL)	Assorbanza
1	1,035	0,600
2	0,690	0,407
3	0,518	0,304
4	0,345	0,201
4,5	0,242	0,157
5	0,173	0,102
5,5	0,104	0,074
6	0,069	0,043
7	0,052	0,034
8	0,035	0,024
9	0,017	0,012

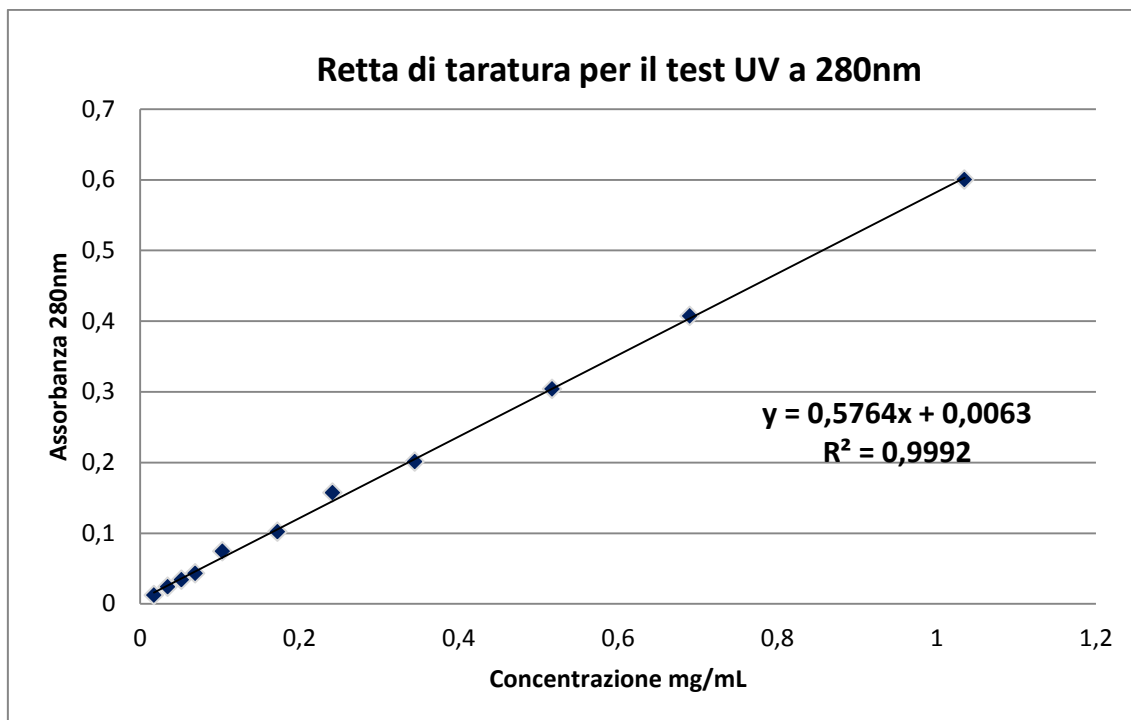


Figura 3-3 Retta di taratura per il test alla ninidrina

3.5.2 Saggio alla Ninidrina

Una reazione degli α -amminoacidi con la ninidrina (Trichetoidrindene idrato) può essere utilizzata per determinare la loro presenza di amminoacidi anche in piccole quantità.

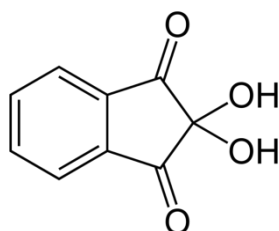


Figura 3-4 Formula di struttura della Ninidrina $C_9H_6O_4$

La ninidrina reagisce con gli α -amminoacidi comportando la formazione di un colore blu-viola caratteristico (che ha il massimo assorbimento intorno ai 575nm) che è conosciuto come il viola di Ruhemann, tale reazione ha diversi prodotti intermedi e il prodotto finale che è indicato in figura 3-5.

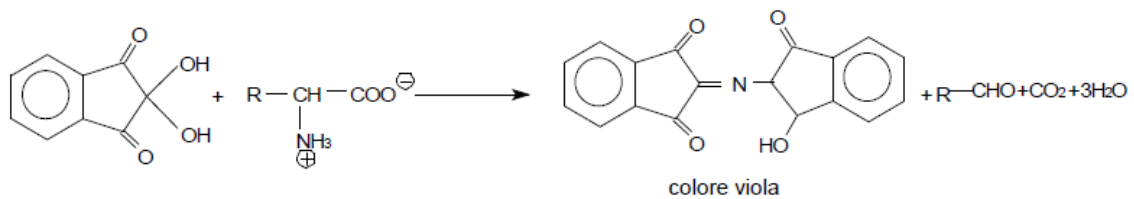


Figura 3-5 Prodotto finale della reazione della ninidrinaTratto da C. B. Bottom, S. S. Hanna & D. J. Siehr, *Mechanism of the Ninhydrin reaction. Biochemical Education. January Vol. 6 No. 1, 1960.*

Il saggio che è stato utilizzato, introdotto da Starcher²² nel 2001 e risulta essere più sensibile dei più noti metodi di Lowry o Bradford e riesce a migliorare notevolmente i limiti di rilevazione delle proteine rispetto agli altri metodi²³.

3.5.2.1 Protocollo del Saggio alla ninidrina

Ogni campione secco, è stato idrolizzato aggiungendo 250µl di HCl 6N e posto a 100°C per 24h, segue ulteriore essiccamento e risospensione in 1ml di Milli-Q, quindi sono stati aggiunti 100 µl di reagente alla ninidrina e si è mescolato tramite Vortex. Dopo essere stati posti a 100°C per 20', raffreddati in acqua fino a temperatura ambiente e centrifugati per 60" i campioni sono pronti per la lettura a 575 nm. Prima sono stati misurati i bianchi (campioni provenienti da lenti non utilizzate) e in seguito i campioni.

3.5.1.2 Standard per il Saggio alla Ninidrina

Un'aliquota di 300 µl da ciascuna delle soluzioni diluite destinate per le misure di assorbanza per la retta di taratura UV è stata riservata alla quantificazione della BSA con il metodo alla ninidrina, pertanto il protocollo per la ninidrina è stato seguito anche per queste soluzioni e inoltre è stata aggiunta una soluzione a concentrazione nulla di BSA.

Infine per ognuna delle soluzioni preparate è stata letta l'assorbanza a 575 nm e con i risultati ottenuti è stata costruita una retta di regressione (Tabella 3-5 e Fig.3-6).

Tabella 3-5 Soluzioni di cui é stata letta l'assorbanza per costruire la retta di taratura.

Concentrazione (mg/mL)	Assorbanza
0,1725	0,427
0,1035	0,207
0,05175	0,148
0,0345	0,130
0,01725	0,012
0	0,000

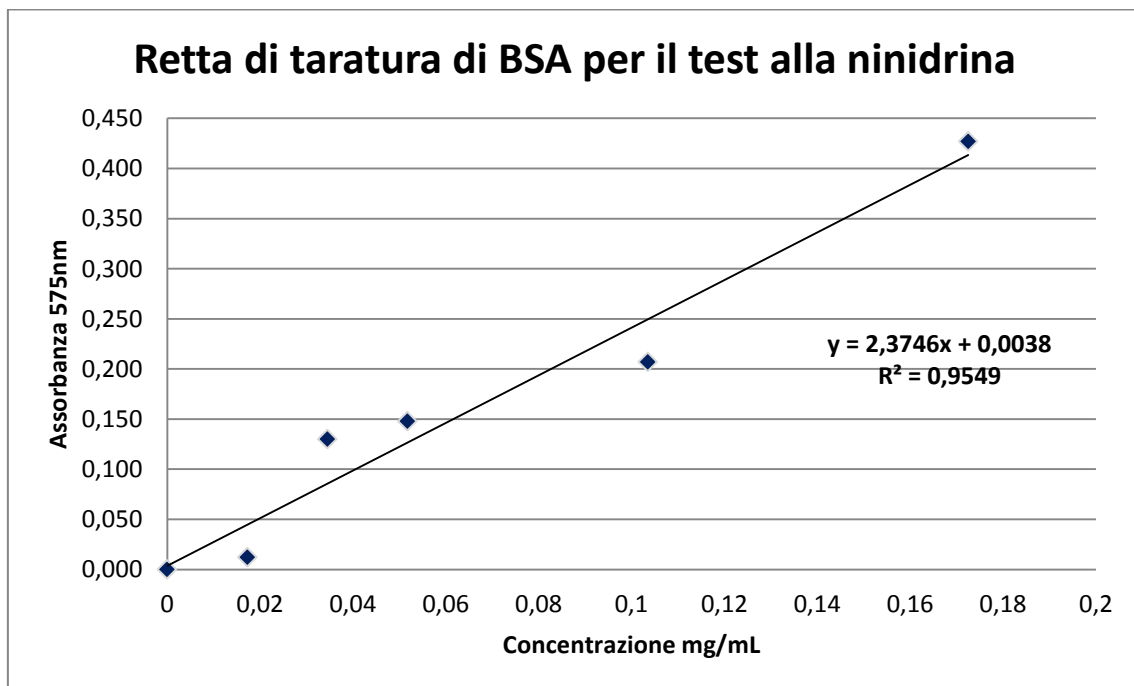


Figura 3-6 Retta di taratura di BSA per il test alla ninidrina

3.6 Saggio per la quantificazione del colesterolo

Lo strato lipidico del film lacrimale può essere diviso a sua volta in due strati uno strato più interno ed uno più esterno, quello interno è polare mentre quello esterno è apolare²⁴. Si ritiene che quest'ultimo sia costituito da colesterolo ed esteri del colesterolo e da altri lipidi come acidi grassi ed esteri di acidi grassi^{25,26}. Quando questo strato è alterato nella sua struttura o composizione, lo strato lipidico non svolge più la sua azione di protezione e lubrificazione della cornea, per cui lo stesso film tende ad evaporare più facilmente e l'occhio può diventare secco. Il problema della disidratazione della cornea è abbastanza grave per vari ordini di motivi: l'acuità e le performance visive calano specie nei soggetti con medio alti difetti di vista, la cornea è più soggetta a infezioni e il soggetto lamenta sintomi come il prurito, bruciore o nei casi più importanti anche dolore.

Per determinare la quantità di colesterolo è stato utilizzato il EnzyChrom™ AF Cholesterol Assay Kit (E2CH-100) della BioAssay, CA USA. Il principio di funzionamento è il seguente: gli esteri del colesterolo sono idrolizzati dall'enzima colesterolo esterasi, quindi il colesterolo prodotto viene ossidato dall'enzima colesterolo ossidasi producendo H₂O₂ che, reagendo con una sonda cromofora, produce una colorazione proporzionale al contenuto di colesterolo quantificabile mediante spettrofotometria con picco di assorbimento massimo a 570 nm.

3.6.1 Protocollo del Saggio per la quantificazione del colesterolo

Tutti i reagenti del EnzyChrom™ AF Cholesterol Assay Kit sono stati portati a temperatura ambiente prima dell'inizio della preparazione dell'esperimento.

I campioni da analizzare già seccati sono stati risospesi in 100µL di *Assay Buffer* e mescolati tramite Vortex di questi 50µL sono stati trasferiti ognuno in un differente pozzetto della piastra per la lettura dell'assorbanza (Tabella 3-6).

Tabella 3-6 Schema di riempimento della piastra a 96 pozzeti, la prima colonna é stata dedicata alle concentrazioni standard per costruire la retta di taratura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	60	1A	5A	36A	52A	70A	86A	102A	118°	134A	vuoto	vuoto
B	40	1B	5B	38B	54B	72B	88B	104B	120B	136B	vuoto	vuoto
C	30	2A	24A	40A	56A	74A	90A	106A	122°	vuoto	vuoto	vuoto
D	20	2B	26B	42B	58B	76B	92B	108B	124B	vuoto	vuoto	vuoto
E	15	3A	28A	44A	62A	78A	94A	110A	126°	vuoto	vuoto	vuoto
F	10	3B	30B	46B	64B	80B	96B	112B	128B	vuoto	vuoto	vuoto
G	5	4A	32A	48A	67A	82A	98A	114A	130°	vuoto	vuoto	vuoto
H	0	4B	34B	50B	68B	84B	100B	116B	132B	vuoto	vuoto	vuoto

Per ogni pozzetto sono stati aggiunti 50µL di una soluzione definita *working reagent* così composto: 55µL di *Assay Buffer*, 1µL di *Enzyme Mix* e 1µL di *Dye Reagent*. La piastra è stata coperta con pellicola adesiva e mescolata adeguatamente, quindi incubata per 30'. Infine la piastra è stata letta a 540 nm.

3.6.2 Standard per la quantificazione del colesterolo

E' stata prepara una soluzione madre con una concentrazione di colesterolo pari 10mg/dL in seguito diluita con *Assay Buffer* come indicato in Tabella (3-7).

Tabella 3-7 Soluzioni di colesterolo e Assay Buffer per costruire la retta di taratura.

Soluzione	STD + Assay Buffer	concentrazione	µg in 100 µL
1	60µL + 40µL	6 mg/dL	6 µg
2	40µL + 60µL	4 mg/dL	4 µg
3	30µL + 70µL	3 mg/dL	3 µg
4	20µL + 80µL	2 mg/dL	2 µg
5	15µL + 85µL	1,5 mg/dL	1,5 µg
6	10µL + 90µL	1 mg/dL	1 µg
7	5µL + 95µL	0,5 mg/dL	0,5 µg
8	0µL + 100µL	0 mg/dL	0 µg

Infine è stata letta l'assorbanza della piastra a 540nm e con i risultati ottenuti è stata costruita una retta di regressione (Tabella 3-8 e Fig.2-5).

Tabella 3-8 Assorbanze delle soluzioni per la costruzione della retta standard

Soluzione	Concentrazione	assorbanza
1	6 mg/dL	0,483
2	4 mg/dL	0,3205
3	3 mg/dL	0,239
5	1,5 mg/dL	0,163
6	1 mg/dL	0,086
7	0,5 mg/dL	0,0525
8	0 mg/dL	0

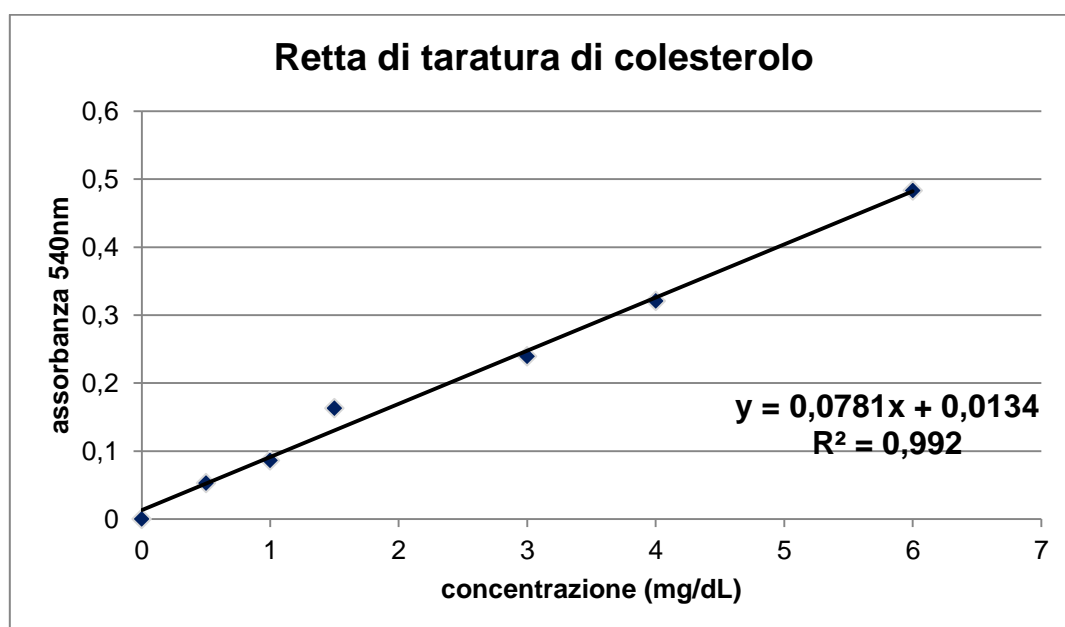


Figura 3-7 Retta di taratura del colesterolo

4. RISULTATI

4.1 Prove preliminari per la messa a punto del protocollo sperimentale

Prima di procedere con l'esperimento definitivo sono state fatte opportune prove per validare il protocollo sperimentale che si intendeva utilizzare.

Sono stati raccolti dei campioni di lenti di tipo A e di tipo B utilizzati dai portatori e messi a confronto con lenti riferimento nuove non portate, ovvero dei bianchi. Durante le prove preliminari i bianchi sono stati semplicemente prelevati dalla confezione originale e asciugati con azoto. Infatti tutte le lenti a contatto morbide sono immerse in una soluzione di conservazione affinché le lenti stesse possano mantenere inalterate le proprietà e l'applicazione sull'occhio risulti agevole.

I primi risultati non sono stati incoraggianti infatti su di un campione di 10 soggetti e 4 lenti riferimento si sono registrate le assorbanze medie riportate in tabella 4.1.

Tabella 4-1 Valori di assorbanza prove preliminari UV e ninidrina.

Lenti	Assorbanza	Assorbanza
	UV 280nm	Ninidrina 575nm ^c
tipo A portate	0,093±0,013	0,298±0,11
tipo B portate	0,109±0,034	0,492±0,035
tipo A non portate	0,079±0,002	0,456±0,001
tipo B non portate	0,029±0,001	0,430±0,001

Si evince facilmente dalla lettura dei risultati preliminari con il test alla ninidrina che è molto difficile distinguere se una lente è stata portata oppure no, infatti le lenti di tipo A non utilizzate presentavano assorbanze superiori a quelle utilizzate.

La ragione di un tale risultato imprevisto è stata ricercata inizialmente:

^c Per eseguire questo test preliminare sono stati seccati 500µL di soluzione per l'estrazione per ogni campione o riferimento, mentre nel protocollo definitivo quel valore scenderà a 300µL)

- In contaminazioni derivanti da materiali non sterilizzati
- Nella presenza di cromofori nelle soluzioni di conservazione delle lenti nuove.

Per verificare la prima ipotesi si sono sterilizzati tutti i puntali che dovevano essere utilizzati e tutti i detergenti per la pulizia sono stati sostituiti.

Tali accorgimenti, peraltro opportuni, non hanno cambiato radicalmente i risultati confermando il persistere del problema.

Per verificare la seconda ipotesi si sono analizzate le soluzioni conservanti.

Le lenti nuove sia il tipo “A” che il tipo “B” sono conservate in un blister con soluzione di tampone salino. L’unica differenza é che la soluzione di conservazione della lente tipo A contiene anche l’1% del copolimero 845^d, ovvero un agente umettante che ha l’obbiettivo di migliorare il comfort iniziale alla prima applicazione della lente sull’occhio.

Misurata l’assorbanza delle due soluzioni si è ottenuto:

- Assorbanza 280 nm soluzione conservazione Tipo A = 0,123
- Assorbanza 280 nm soluzione conservazione Tipo B = 0,017

Se il valore del tipo B può essere accettabile perché molto basso il valore del tipo A non lo è sicuramente.

L’ipotesi che è stata formulata è che le lenti nuove non utilizzate contengano questa soluzione che assorbe a 280 nm, mentre le lenti portate subiscono sicuramente una deposizione proteica e lipidica da parte del film lacrimale ma l’originale soluzione di conservazione scompare quasi completamente.

A dimostrazione di tale assunto è stato condotto un nuovo esperimento con l’obbiettivo di verificare che cosa cambia nei valori di assorbanza se le lenti nuove subiscono oppure no un lavaggio con acqua Milli-Q e se vi è una differenza nel portare una lente che ha subito il lavaggio oppure no. I risultati sono riassunti in tabella 4-2.

^d 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 2-(dimethylamino)ethyl ester, polimero con 1-ethenyl-2 pyrrolidinone(fonte)

Tabella 4-2 Esperimento di verifica sull'influenza del lavaggio delle lenti tipo A

Lenti	Assorbanza	Assorbanza
	UV 280nm	Ninidrina 575nm ^e
tipo A portate non lavate	0,053±0,005	0,298±0,11
tipo A portate lavate	0,060±0,026	0,322±0,029
tipo A nuove non lavate	0,083±0,001	0,456±0,001
tipo A nuove lavata	0,020±0,001	0,201±0,039

In sostanza è stato verificato che per la lente tipo A che è stata utilizzata non varia l'assorbanza in relazione ai lavaggi con acqua Milli-Q, pertanto nel protocollo sperimentale finale è stato deciso di effettuare i lavaggi per le sole lenti riferimento di entrambi i tipi.

4.2 Analisi dei depositi

4.2.1 Quantificazione dei depositi proteici

L'analisi dei campioni di lenti dei 30 soggetti è stata suddivisa in 6 batterie di 5 soggetti ciascuna e per ogni batteria di analisi sono state preparate delle lenti riferimento non utilizzate.

4.2.1.1 Quantificazione mediante rilevazione dell'assorbimento a 280nm

Da ogni valore di assorbanza delle lenti a contatto utilizzate è stato sottratto il valore di assorbanza prodotto dalla lente riferimento dello stesso tipo. In seguito, applicando i risultati della retta di taratura, è stata ricavata la concentrazione in mg/mL. In accordo con la maggior parte dei lavori in letteratura le concentrazioni sono state rapportate a quantità per lente ed espresse in µg/lente.

Nelle di lenti di tipo "A" si è trovato mediamente un quantitativo proteico di 83±44 µg/lente mentre le lenti di tipo "B" 149±39 µg/lente.

^e Per eseguire questo test preliminare sono stati seccati 500µL di soluzione per l'estrazione per ogni campione o riferimento, mentre nel protocollo definitivo quel valore scenderà a 300µL)

Entrambe le distribuzioni di valori ottenuti dai due tipi di lenti hanno rispettato le condizioni di normalità secondo diversi indici statistici e pertanto si è potuto applicare il test T di Student a due code per dati accoppiati per verificare se vi fosse una significatività nelle differenze tra i risultati ottenuti. Il valore di p trovato è stato 0,0001 che indica una che la differenza trovata è molto significativa.

Nelle figure 4-1 e 4-2 sono riassunti i risultati trovati.

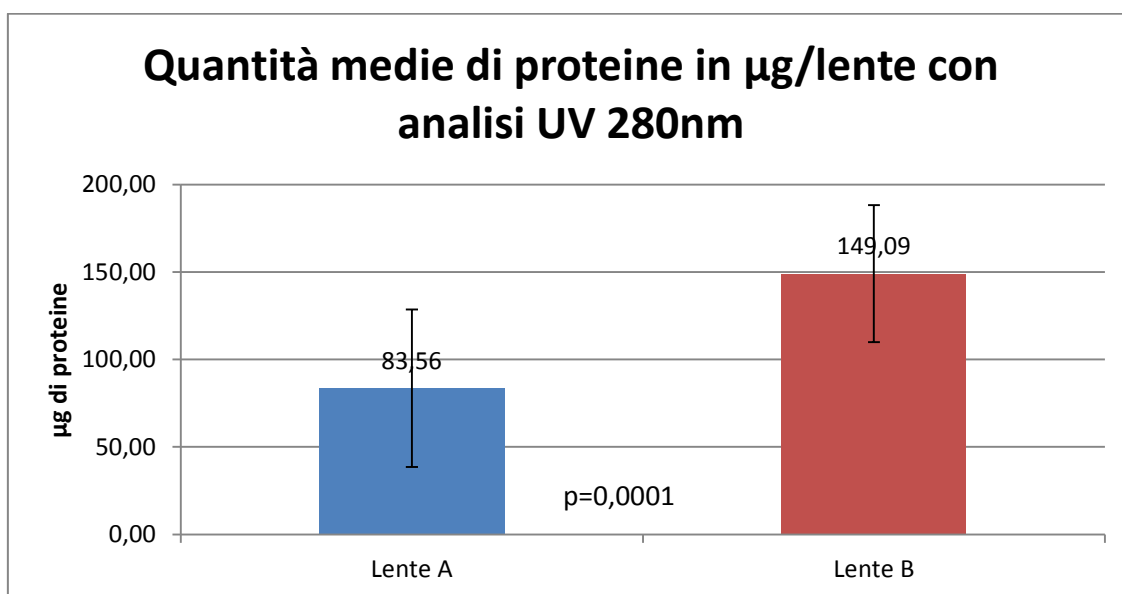


Figura 4-1 Quantitativi medi di proteine per lente. Le barre di errore indicano la deviazione standard dei dati (p=0,0001)

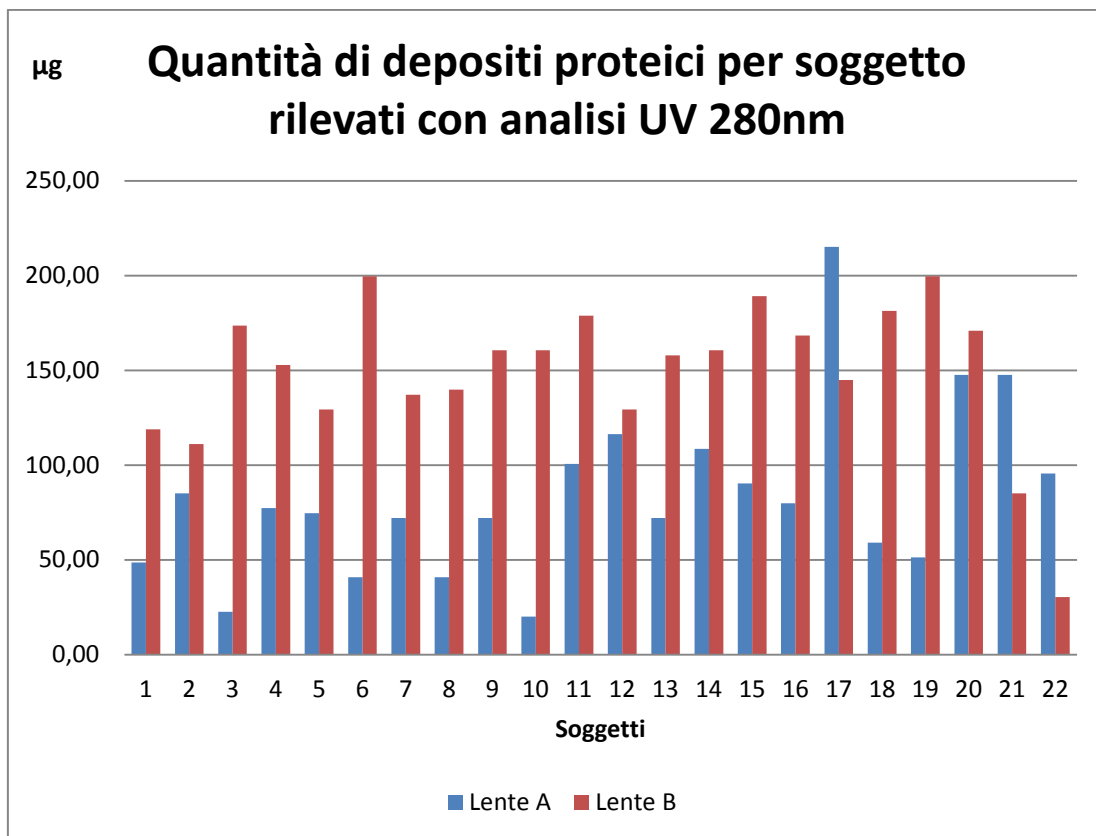


Figura 4-2 Quantità di depositi suddivisi per soggetto

4.2.1.2 Saggio alla Ninidrina

Da ogni valore di assorbanza delle lenti a contatto utilizzate è stato sottratto il valore di assorbanza prodotto dalla lente riferimento dello stesso tipo. In seguito, applicando i risultati della retta di taratura, è stata ricavata la concentrazione in mg/mL. In accordo con la maggior parte dei lavori in letteratura le concentrazioni sono state rapportate a quantità per lente ed espresse in µg/lente.

Nelle di lenti di tipo “A” si è trovato mediamente un quantitativo proteico di 64 ± 45 µg/lente mentre le lenti di tipo “B” 73 ± 60 µg/lente.

Le distribuzioni di valori ottenuti dai due tipi di lenti non hanno rispettato le condizioni di normalità e per verificare se vi fosse una significatività nelle differenze tra i risultati ottenuti si è adottato il Wilcoxon signed-rank test. Il valore di p trovato è stato 0,5 pertanto non statisticamente significativo.

Nelle figure 4-3 e 4-4 sono riportati i dati sperimentali.

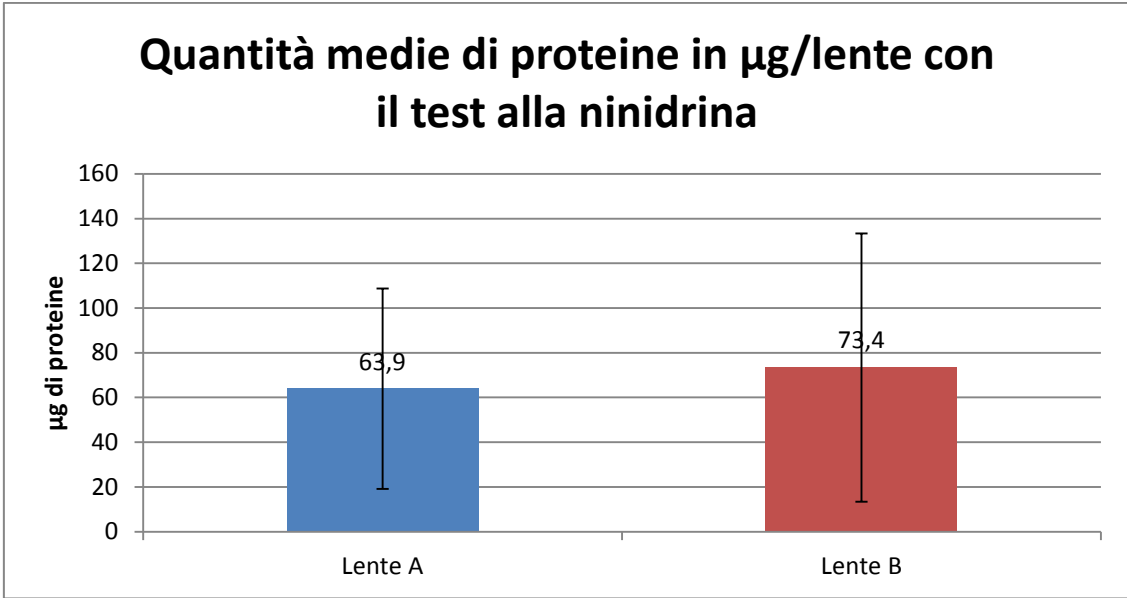


Figura 4-3 Quantitativi medi di proteine per lente con il test alla ninidrina. Le barre di errore indicano la deviazione standard dei dati ($p=0,5$)

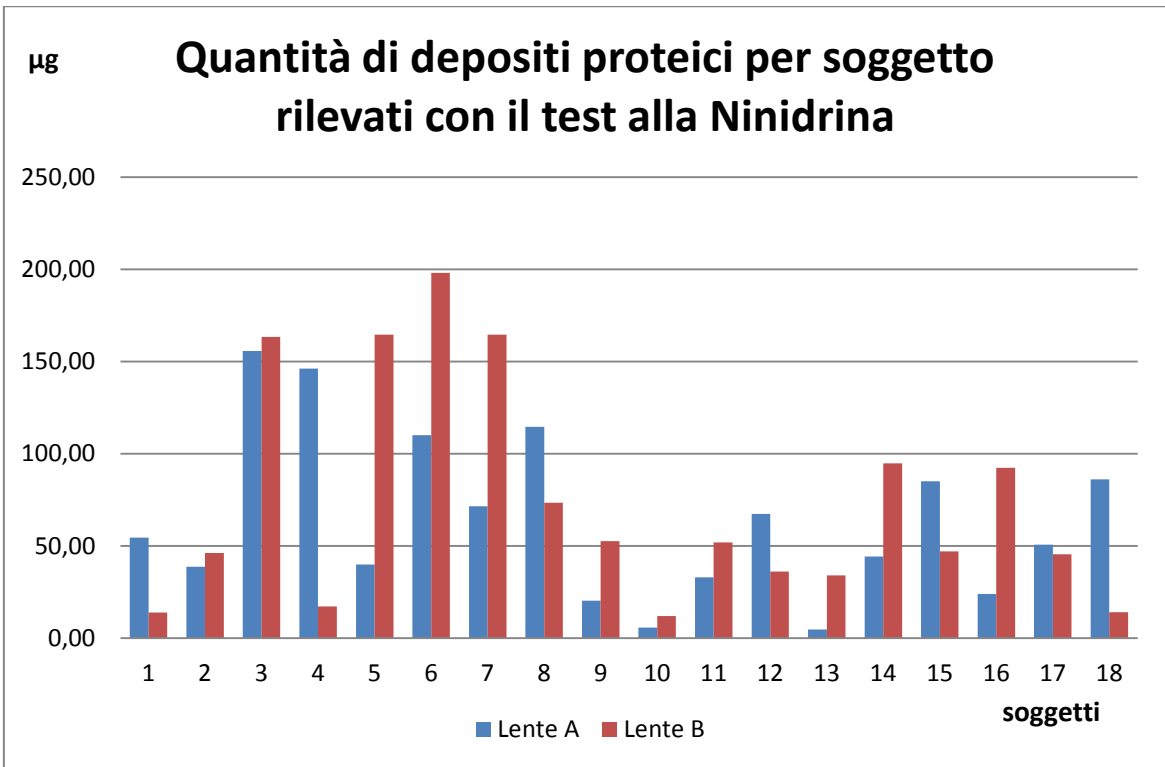


Figura 4-4 Quantità di depositi suddivisi per soggetto

4.2.2 Quantificazione del colesterolo

Le aliquote dei campioni raccolti destinati alla quantificazione del colesterolo sono state seccate e conservate a -20°C . Quando sono stati raccolti tutti i campioni dei 30 soggetti è stata possibile la lettura su piastra delle assorbanze come indicato in precedenza.

Nelle di lenti di tipo "A" si è trovato mediamente un quantitativo di colesterolo di 69 ± 66 ng/lente mentre le lenti di tipo "B" 64 ± 52 ng/lente.

Le distribuzioni di valori ottenuti dai due tipi di lenti non hanno rispettato le condizioni di normalità e per verificare se vi fosse una significatività nelle differenze tra i risultati ottenuti si è adottato il Wilcoxon signed-rank test. Il valore di p trovato è stato 0,8 pertanto non statisticamente significativo.

Nelle figure 4-5 e 4-6 sono riportati i dati sperimentali.

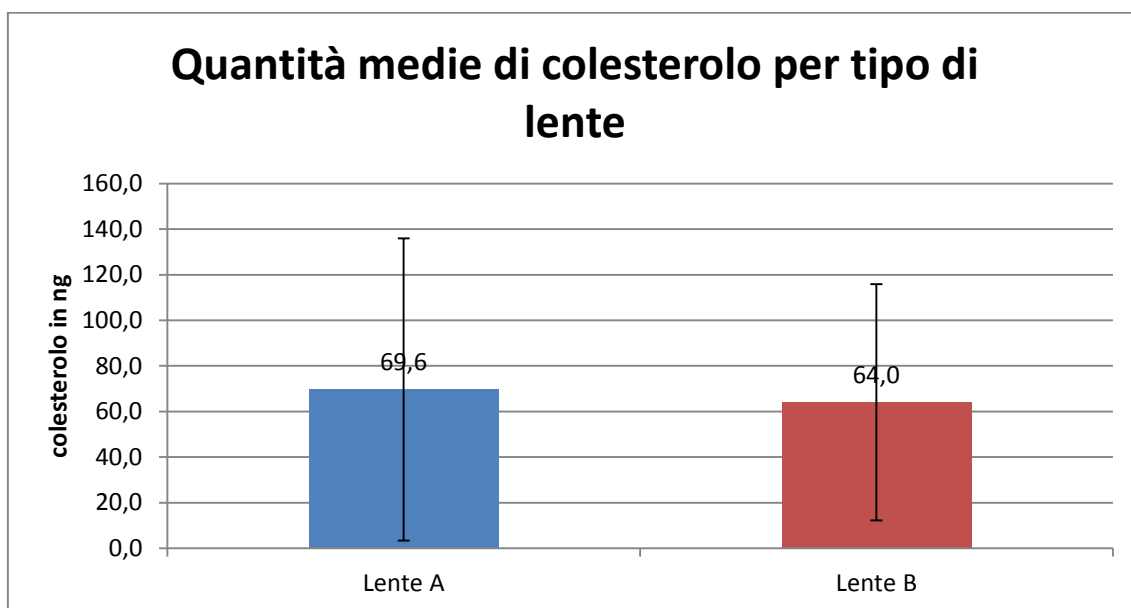


Figura 4-5 Quantitativi medi di colesterolo per tipo di lente

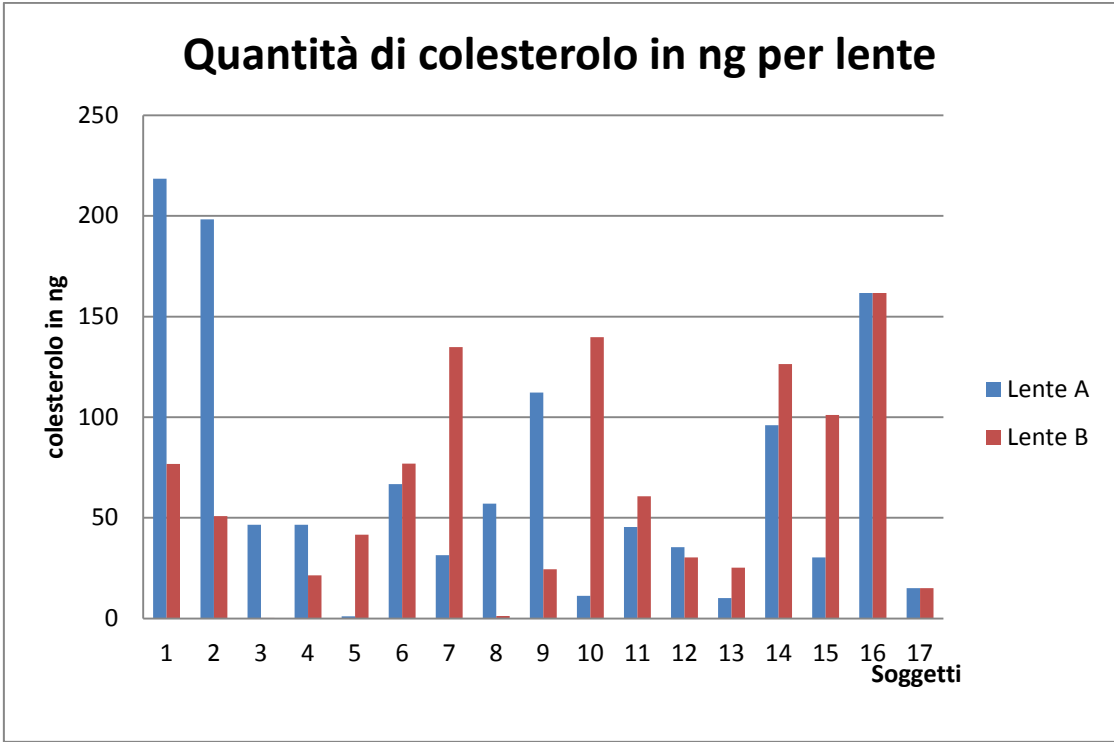


Figura 4-6 Quantità di colesterolo per soggetto e tipo di lente

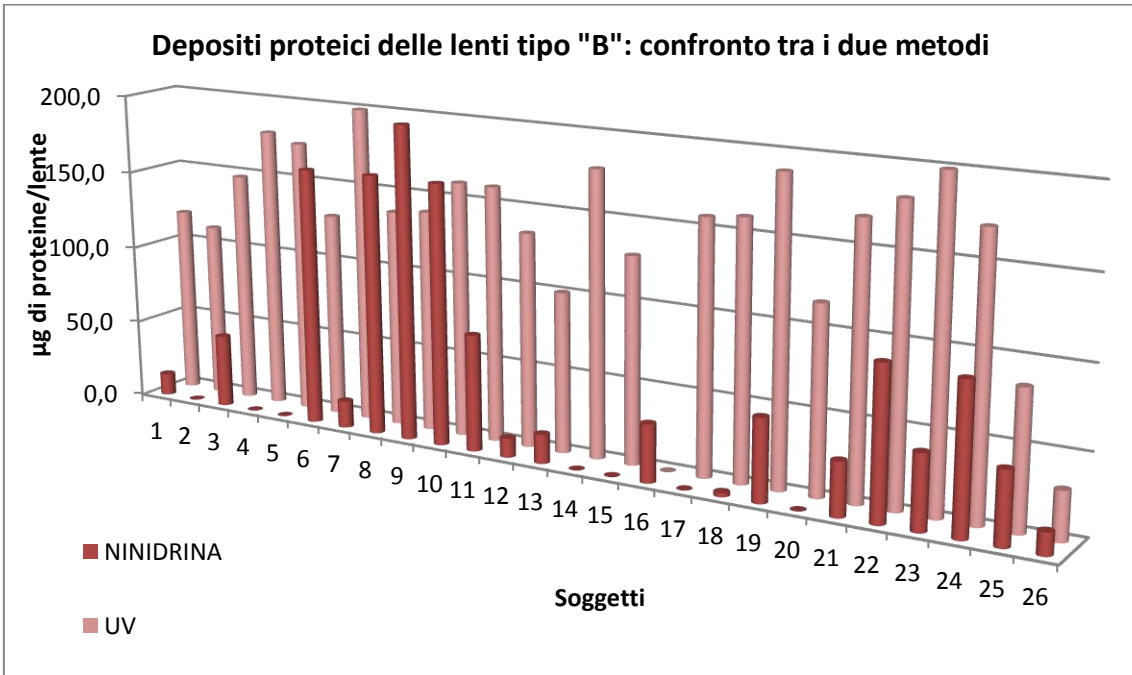


Figura 4-7 Confronto dei depositi proteici ottenuti con i due metodi per le lenti di tipo "B"

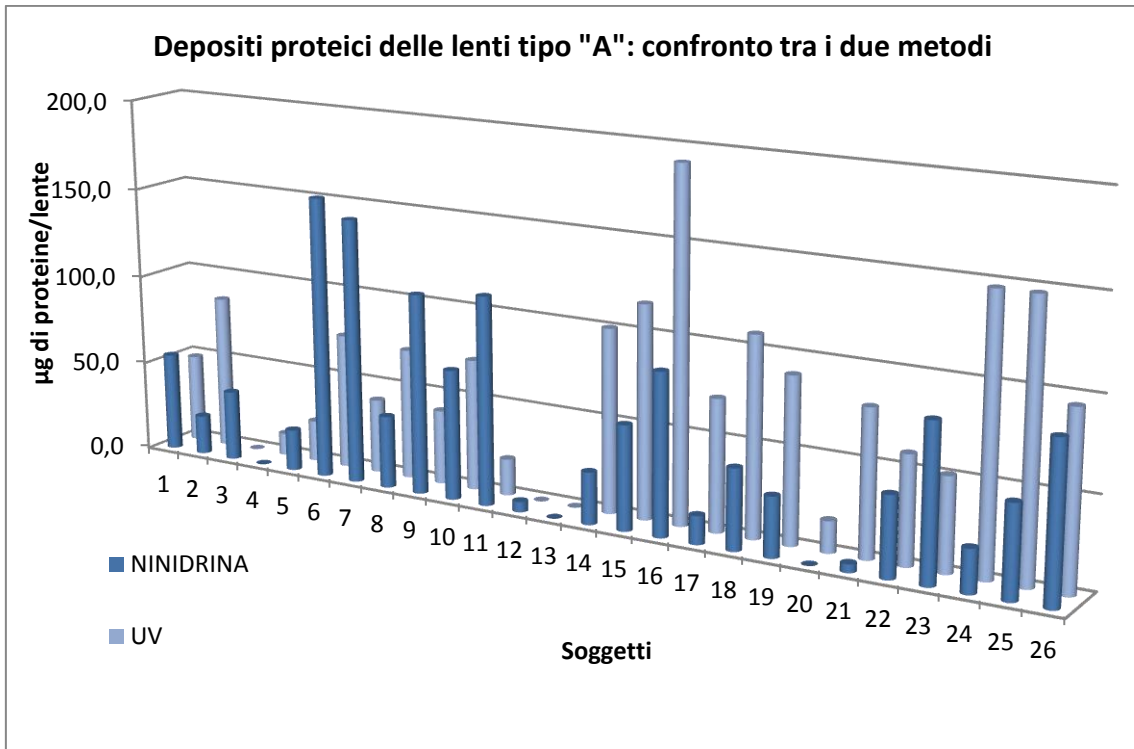


Figura 4-8 Confronto dei depositi proteici ottenuti con i due metodi per le lenti di tipo "A"

5. DISCUSSIONE

Il complesso di deposizione proteica non è ancora completamente compreso ma si ritiene che sia dovuto all'interazione di un insieme di fattori come alcune caratteristiche chimico-fisiche del materiale con la variabilità individuale del film lacrimale di ogni soggetto.

Le proprietà del polimero che assumono importanza a tal proposito sono: contenuto d'acqua, ionicità e idrofobicità.

Comparando idratazione e depositi si può affermare che l'intensità della deposizione proteica è direttamente proporzionale al contenuto d'acqua del polimero, sia per i materiali idrogel sia per i più recenti silicone idrogel⁴³. Un maggiore contenuto d'acqua significa un aumento della larghezza dei pori della matrice del polimero e la minor densità risultante facilita l'assorbimento delle proteine⁴⁴.

La carica superficiale di un idrogel favorisce l'assorbimento delle proteine perché gli aminoacidi polari idrofili di una proteina sono attratti da superfici di carica opposta se entrati in contatto. Tuttavia l'aspetto della ionicità è più interessante per i materiali idrogel a base di pHEMA e non a base di silicone, in quanto quest'ultimi sono sostanzialmente neutri.

Non tutte le proteine hanno la stessa affinità per una superficie e quindi l'esito del processo di deposizione è condizionato dal tipo di proteine presenti e dalla loro concentrazione. Nel film lacrimale, ad esempio, il lisozima con un peso molecolare contenuto (14,4KDa) e una polarità positiva viene assorbita più facilmente nei polimeri con contenuti d'acqua medio alti e con carica ionica negativa⁵¹. Al contrario dai lavori di Luensmann⁴⁴ si è visto che l'assorbimento dell'albumina (64,4KDa) è favorito da materiali con carica ionica positiva, superfici idrofobiche e contenuti d'acqua medio-bassi dei polimeri⁴⁴. Inoltre sulle superfici delle lenti il numero dei siti di legame è finito pertanto le proteine in soluzione devono competere fino al raggiungimento di uno stato pseudo-stazionario la cui composizione dipende non solo dalle interazioni proteina-superficie ma anche dalle interazioni proteina-proteina. Le proteine che arrivano più rapidamente alla superficie sono quelle presenti in maggior concentrazione e/o con maggior peso molecolare e anche se la loro affinità non dovesse essere particolarmente

elevata, la loro deposizione è facilitata da una superficie ricca di siti vacanti. Con l'utilizzo delle lenti a contatto il tempo di contatto lente-film lacrimale è prolungato, pertanto è anche possibile uno scambio competitivo tra le proteine adsorbite più rapidamente e quelle che presentano una maggiore affinità di superficie.

Quando le proteine vengono in contatto con superfici solide, in particolare quelle idrofobiche, tendono a riorganizzare la loro struttura per favorire l'assorbimento al fine di raggiungere un nuovo equilibrio energetico⁴⁵. Nei materiali silicone idrogel, idrofobici rispetto agli idrogel convenzionali senza silicone, le proteine che vi si depositano presentano un alto grado di denaturazione⁴⁶. Le proteine denaturate sono ritenute responsabili dell'insorgenza della congiuntivite papillare⁵², una complicazione ad eziologia immunitaria e meccanica²⁰, che può compromettere l'utilizzo futuro delle lenti a contatto.

Nel presente lavoro il materiale Comfilcon ha assorbito un quantitativo di proteine significativamente maggiore rispetto al Lotrafilcon nelle circa 10 ore di utilizzo delle lenti. Le ragioni di tale differenza di assorbimento proteico vanno ricercate nelle caratteristiche proprie di ciascun materiale.

L'attenzione deve essere rivolta al contenuto d'acqua e alle caratteristiche di idrofobicità e idrofilicità dei due materiali poiché sono gli elementi che li differenziano maggiormente.

Il Comfilcon ha un contenuto d'acqua pari al 48% mentre il rivale di solo il 33% e come si è accennato poco sopra l'assorbimento del lisozima cresce al crescere del contenuto acquoso del polimero.

Idrofobicità e idrofilicità differiscono nei due materiali perché mentre il Comfilcon è un silicone modificato con l'inserimento di composti che lo rendono idrofilico sia in superficie che all'interno, il Lotrafilcon è idrofilico solo in superficie. Quest'ultima, infatti risulta modificata in modo irreversibile grazie ad una miscela di trimetilsilano, ossigeno e metano che rende idrofilica²¹ solo la superficie e non l'interno. Il materiale Lotrafilcon ha dimostrato un minore assorbimento proteico rispetto ad altri materiali senza trattamenti anche in altri lavori⁴⁷⁻⁴⁸. È stato ipotizzato che il rivestimento si comporti come una barriera all'ingresso delle proteine che riescono ad entrarvi in quantità minore rispetto ad altri materiali e potrebbe essere proprio questo trattamento

ad ostacolare la penetrazione delle proteine all'interno del materiale, che pertanto sarà limitata ai soli legami in superficie⁴⁹.

E' interessante notare che, nei lavori pubblicati, viene affermato che il materiale Lotrafilcon assorbe mediamente da 10 a 20 µg di proteine per lente mentre nel presente lavoro è stato riscontrato un quantitativo medio di 83 µg. Le ragioni di una tale discrepanza meritano di essere indagate.

Tutti gli studi in vivo pubblicati prevedono che il portatore utilizzi le lenti per più giorni e compia le operazioni di manutenzione ordinaria con la soluzione di conservazione disinfettante. L'utilizzo giornaliero di tali soluzioni, lasciando in immersione per tutta la notte le lenti comporta una riduzione del quantitativo proteico di quasi il 50% e inoltre le operazioni meccaniche di pulizia dell'utente (come lo strofinamento della lente con la soluzione) possono ridurre ulteriormente le proteine legate in superficie⁵⁰.

Alla luce di tali considerazioni è possibile comprendere come le differenze sopracitate siano da imputare principalmente al modo di conduzione dell'esperimento e ai sistemi di utilizzo e raccolta delle lenti analizzate.

Sul materiale Comfilcon, presente nel mercato dalla fine del 2006, non è presente alcun lavoro che ne indagli il contenuto di deposizione proteica. La particolarità di tale materiale è di non avere né trattamento di superficie né agenti umettanti al suo interno e risultare comunque ottimamente bagnabile. In questo studio tale materiale ha presentato una affinità alle proteine maggiore rispetto alle lenti concorrente. Infatti il contenuto proteico medio è di circa 149 µg, ben più alto rispetto alla lente "A". Il materiale Comfilcon trattiene l'acqua al suo interno in modo naturale e questo risultato è stato ottenuto sfruttando la formazione dei legami idrogeno con l'ossigeno delle molecole d'acqua³⁸. Poiché le proteine lacrimali presentano una certa carica forse è proprio un'interazione di tipo polare che giustifica una maggior adesione e trattenimento proteico nelle lenti di tipo "B".

Un aspetto che rimane da chiarire e approfondire è il rapporto tra adsorbimento e assorbimento delle proteine nei due materiali. Al fine di poter meglio indagare e comprendere le differenze di deposizione. Inoltre sarebbe interessante comprendere se nei due materiali le proteine depositate presentano differenti livelli di denaturazione.

Infatti essendo il silicone idrogel della lente “B” idrofilico sia in superficie che al suo interno potrebbe, per analogia al comportamento degli idrogel senza silicone, denaturare meno le proteine. Ma tale ipotesi richiede ulteriori studi prima di essere validata.

I risultati di deposizione proteica ottenuti con il metodo alla ninidrina ci forniscono informazioni parziali sulla differenza tra i due tipi di lente. Infatti anche se lo studio statistico delle differenze dei quantitativi proteici tra le lenti “A” e le lenti “B” non ha assunto una significatività, tuttavia i due metodi dimostrano una certa correlazione soprattutto per la lente “B”. In sostanza anche il test alla ninidrina evidenzia un maggior assorbimento proteico da parte della lente di tipo “B”(figura 4-7 pag.46) .

Va inoltre sottolineato che le deviazioni standard individuate sono più alte di quelle ottenute con il metodo UV. Pertanto i valori di proteine nei vari soggetti oscillano sensibilmente di più e tale oscillazione comporta anche un abbassamento della concentrazione media delle lenti “B”. Infatti per il materiale Lotrafilcon il contenuto proteico trovato con l’UV è di 83 µg lente contro i 64 µg trovati con la ninidrina.

Il metodo alla ninidrina che è stato utilizzato si è rilevato molto sensibile, forse fin troppo. Rispettando la corretta procedura (v.capitolo 3 pag.33) sono necessarie non meno 32h prima di avere un risultato e inoltre il campione deve essere manipolato ripetutamente. Pertanto è inevitabile che alla fine di tutti questi passaggi la precisione ne risenta.

La formazione di depositi lipidici sui materiali delle lenti a contatto è dovuta alle proprietà idrofobiche dei lipidi stessi che tendono ad aderire facilmente alle aree idrofobiche delle lenti con affinità diverse a seconda della specifica chimica di ogni singolo materiale. Infatti le lenti al silicone, che conferisce carattere idrofobico al materiale, presentano affinità maggiori ai lipidi rispetto alle lenti idrogel⁵³.

I valori di colesterolo trovati nel presente lavoro sono inferiori rispetto ad altri pubblicati in letteratura. Zhao⁵⁰ per il materiale Lotrafilcon ha indicato in 0,25µg il quantitativo di colesterolo nelle lenti, mentre nel presente lavoro ne sono stati riscontrati solo 0,07 µg. La ragione di una tale differenza può essere individuata nella modalità di estrazione dei depositi. Infatti, il presente lavoro ha optato per una soluzione di

estrazione dei depositi (0.2% di TFA in Acqua/Acetonitrile 50/50) che massimizzasse l'efficacia nei confronti delle proteine e i risultati di quantificazione hanno confermato la bontà di tale scelta. Per ottenere un'estrazione lipidica e di conseguenza di colesterolo più sostanziosa probabilmente si sarebbe dovuto optare per una soluzione cloroformio:metanolo (2:1 v/v). Mentre nel presente lavoro la componente organica era il 50%. Inoltre il metodo utilizzato per la quantificazione è di tipo colorimetrico ed è in grado di rilevare concentrazioni di colesterolo comprese tra 1 e 100mg/dL. La soglia inferiore 1 mg/dL corrisponde ad 1µg di colesterolo nei 100 µL di ogni pozzetto della piastra di lettura. Pertanto la quantità minima di colesterolo che il metodo è in grado di rilevare è di 1µg per pozzetto. Dato che in letteratura i valori di colesterolo trovati nelle lenti a contatto sono compresi tra i decimi di microgrammi e qualche decina, il metodo ideale per quantificare il colesterolo nei materiali per lenti dovrebbe essere più sensibile e avere un limite di rilevabilità compreso indicativamente tra 0,1 e 10 mg/dL.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio è stato condotto con l'obiettivo di indagare la deposizione proteica e lipidica in due diversi materiali per lenti a contatto attraverso tecniche spettroscopiche. I materiali analizzati sono Comfilcon A e Lotrafilcon B.

Le analisi condotte hanno dimostrato che entrambi i materiali presentano una discreta affinità ai depositi di tipo proteico. Il materiale Comfilcon A trattiene, dopo una giornata di utilizzo da parte del portatore, un quantitativo proteico quasi doppio rispetto al Lotrafilcon B. Tale risultato è da attribuire principalmente alle differenti modalità impiegate nei due materiali per aumentare l'idrofilicità e al loro diverso contenuto idrico.

Il metodo UV a 280 nm si è verificato valido ed affidabile per la determinazione dei depositi proteici nelle lenti a contatto e le deviazioni standard ottenute sono inferiori a quelle generalmente presenti in letteratura.

Il metodo alla Ninidrina si è rilevato essere meno affidabile del precedente probabilmente per una maggiore complessità del protocollo di analisi.

I risultati ottenuti con l'applicazione di entrambi i metodi presentano una discreta variabilità attribuibile alla variabilità individuale, ossia del singolo portatore di lenti, anche se sono stati seguiti criteri rigidi per la selezione dei candidati. L'effetto legato alla variabilità individuale trova riscontro negli studi già presenti in letteratura.

L'estrazione di depositi condotta con una soluzione acida al 50% di acetonitrile in acqua si è rilevata altamente selettiva per i composti proteici non mettendo in evidenza la presenza di lipidi. Questo aspetto conferma che per la quantificazione del colesterolo sarebbe opportuno ricorrere anche a solventi con maggiore affinità per i lipidi. Pertanto la quantificazione del colesterolo attraverso il metodo del presente studio non si può ritenere esaustiva e andrà ripetuta con solventi di estrazione più efficaci.

7. APPENDICE

PROTOCOLLO ANALISI DEI DEPOSITI

Dopo la raccolta di tutti i campioni provenienti da 30 soggetti, si hanno a disposizione 4 lenti per ogni soggetto: 1 destra e 1 sinistra del tipo A e 1 destra e 1 sinistra del tipo B (tutti i campioni vengono conservati a +4°C). Per poter effettuare le analisi i 120 campioni vengono suddivisi in 6 batterie da 20 ciascuna e ogni batteria contiene i campioni provenienti da 5 soggetti. Il protocollo che segue è stato seguito e ripetuto per ogni batteria di 5 soggetti.	Pianificazione
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	
Preparazione dei contenitori	
Per contenere le lenti a contatto si utilizza un contenitore di plastica cilindrico pulito con etanolo.	Prima dell'esperimento
Campioni	
Ogni campione di lente a contatto è conservato a secco e dal porta-lenti originale viene riversato con una pipetta pasteur nel contenitore. Quindi aggiungo 1.5mL di soluzione per l'estrazione (Soluzione acquosa di 0.2% di TFA/Acetonitrile 50/50). Si verifica che non vi siano bolle, si copre con ParaFilm e con alluminio per oscurare. Il contenitore viene etichettato con codice identificativo.	Giorno 1
Riferimenti	
Ogni lente riferimento (bianco ovvero lente non utilizzata) subisce la seguente procedura di lavaggio: Apro il contenitore di una lente riferimento non utilizzata e raccolgo la soluzione di conservazione con pipetta pasteur. Rovescio la lente su un Becker (pulito con etanolo) contenente 30ml di acqua Milli-Q. Attendo 5 minuti. Svuoto il Becker trattenendo la lente con pasteur. Riverso la lente su di un altro Becker (sempre con 30ml) e ripeto due volte le operazioni dal punto 3 al 5, ovvero effettuo tre lavaggi con tre diversi Becker. Svuoto anche l'ultimo Becker o e riverso la lente con pasteur su un altro Becker con 75ml di acqua Milli-Q ed un piccolo magnete (anch'esso precedentemente pulito con etanolo) e lascio in lenta agitazione magnetica per 8h. Rimuovo il magnete e svuoto il Becker. Asciugo la lente con azoto. Riverso con una pasteur nel contenitore che ospiterà l'estrazione la lente riferimento. Per ogni batteria si sono preparati i rispettivi riferimenti del tipo A (2 lenti) e del tipo B (2 lenti). Si aggiunge come sopra 1.5mL di soluzione per l'estrazione (Soluzione acquosa di 0.2% di TFA/Acetonitrile 50/50). Si verifica che non vi siano bolle, si copre con ParaFilm e con alluminio per oscurare. Il contenitore viene etichettato con codice identificativo.	Prima dell'esperimento
Tempo di estrazione	
24h	

PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE PER L'ESTRAZIONE	
(Soluzione acquosa di 0.2% di TFA/Acetonitrile 50/50) 15mL di H ₂ O Milli-Q in recipiente vetro Con pipettatore 30µl di acido trifluoroacetico (TFA) Acetonitrile (C ₂ H ₃ N) 15mL Per un totale di 30mL Da conservare in una bottiglia di vetro oscurata.	Prima dell'esperimento
SUDDIVISIONE in aliquote di un campione	Giorno 2
Dopo le 24h di estrazione, ogni coppia di campioni (occhio destro e occhio sinistro) di un dato tipo di lente (A o B) relativi allo stesso soggetto subiscono la seguente suddivisione in aliquote: Dal contenitore di estrazione che contiene 1500µL relativi all'occhio destro: 300 µl in un contenitore eppendorf con etichetta per il test alla ninidrina. Esempio di etichetta: "34An" dove 34 è il numero del campione "A" si riferisce al tipo di lente ed "n" perché destinata al test alla ninidrina 600 µl in un contenitore eppendorf con etichetta per il test UV a 280nm. Esempio di etichetta "34AU" dove "U" perché destinata al test UV a 280nm. 500 µl in un contenitore eppendorf con etichetta per la quantificazione del colesterolo. Esempio di etichetta "34AdC" dove "d" indica la provenienza dall'occhio destro e "C" perché è destinata al test del colesterolo. Dal contenitore di estrazione che contiene 1500µl relativi all'occhio sinistro: 1400 µl in un contenitore eppendorf per la quantificazione del colesterolo. Con etichetta "35AtC" dove t sta per colesterolo totale di un soggetto.	
TEST UV 280nm	
Lettura 280	
Si utilizzano le cuvette in quarzo da 500µl (lavate con etanolo e asciugate con N ₂) e si imposta la lunghezza d'onda a 280nm. Azzeramento dello strumento tramite inserimento della soluzione di estrazione in entrambe le cuvette . Trasferisco il contenuto dal contenitore eppendorf alla cuvetta con pipetta pasteur. Dopo la lettura trasferisco la soluzione dalla cuvetta al contenitore originale numerato. La cuvetta viene nuovamente lavata con etanolo e asciugata con azoto.	Giorno 2
Registrazione dei valori di assorbanza	
Registro i risultati di assorbanza in una tabella considerando il riferimento numerato del campione.	Giorno 2
PORTARE A SECCHENZA	
Secco in Speed Vac a temperatura ambiente i seguenti contenitori Eppendorf: Tutti i contenitore Eppendorf per il test alla ninidrina Tutti i contenitori Eppendorf relativi al colesterolo totale (contenente 1400 µL provenienti)	Giorno 2 e 3
Test alla NINIDRINA	
Idrolisi acida	
Aggiungere 250µl di HCl 6N per ogni campione da analizzare (più un bianco solo HCl) e porre a 100°C per 24h.	Giorno 4
Portare a secchezza	
Secco in Speed Vac a temperatura di 43°C i contenitori dopo l'idrolisi	Giorno 5
Preparazione tampone acetato di sodio 4N	
Per 100ml: Dissolvere 54.4g di acetato di sodio in 10mL di acido acetico.	Prima

	dell'esperimento
Preparazione ninidrina stock-solution	
200mg di ninidrina da dissolvere in 7.5mL di etilenglicole (mescolare tramite Vortex fino a scioglimento) e aggiungere 2.5mL di tampone acetato di sodio. Ph circa 5,5. (Soluzione stabile 6 mesi a temperatura ambiente)	Prima dell'esperimento
Preparazione della sospensione cloruro stannoso e etilenglicole	
Aggiungere 50mg di SnCl ₂ a 500 µL di etilenglicole. (Risospendere prima di prelevare)	Prima dell'esperimento
Letture allo spettrofotometro	Giorno 6
Imposto la lunghezza d'onda su 575nm ed effettuo l'azzeramento con H ₂ O Milli-Q.	
Preparazione del working reagent alla ninidrina	
Aggiungere 40 µL di sospensione cloruro stannoso e etilenglicole ad 1,6 mL di ninidrina stock-solution e mescolare tramite Vortex.	Al momento d'uso (Giorno 6)
Reazione con la ninidrina	
Aggiungo ad ogni campione 1000 µL di H ₂ O Milli-Q e 100 µL di working reagent ad ogni campione quindi mescolare tramite Vortex. Porre a 100°C per 20 minuti, raffreddo in H ₂ O. Lettura del bianco (solo reagenti) e lettura dei campioni	Giorno 6
COMPLETAMENTO DELLA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA QUANTIFICAZIONE DEL COLESTEROLO	
Trasferisco il contenuto dei contenitori eppendorf contenenti i 500 µL provenienti dall'occhio destro di ogni soggetto nel corrispondente contenitore "tC" (il cui contenuto è già stato essiccato in precedenza). Effettuo due lavaggi. Secco in Speed Vac a temperatura ambiente. Conservo a -30°C nell'attesa della raccolta di tutti i campioni.	

8. ABBREVIAZIONI

UV: ultravioletto

BSA: Bovine serum albumin (albumina di siero bovino)

FM0411M: (2-ethyl[2-[(2-methylprop-2-enoyl)oxy]ethyl]carbamate)

HOB: ((2RS)-2-hydroxybutyl 2-methylprop-2-enoate)

IBM: (Isobornyl methacrylate)

M3U: (α -[[3-(2-[[2-(methacryloyloxy)ethyl] carbamoyloxy]ethoxy)propyl]dimethylsilyl]- ω -[3(2[[2(methacryloyloxy)ethyl]carbamoyloxy]ethoxy)propyl]poly([oxy[(methyl) [3-[ω methylpoly(oxyethylene)oxy]propyl]silylene]/[oxy[(methyl)(3,3,3-trifluoropropyl)]silylene]/oxy(dimethylsilylene)))]

NVP: (N-vinyl pyrrolidone)

TAIC: (1,3,5-triisoprop-2-enyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione)

VMA: (N-Vinyl-N-methylacetamide)

TFA: Acido trifluoroacetico

9. BIBLIOGRAFIA

1. Brennan NA, Coles ML, Comstock TL, Levy B: A 1-year prospective clinical trial of balafilcon a (PureVision) silicone-hydrogel contact lenses used on a 30-day continuous wear schedule. *Ophthalmology* 2002; 109: 1172-7.
2. Morgan PB, Efron N: Comparative clinical performance of two silicone hydrogel contact lenses for continuous wear. *Clin Exp Optom* 2002; 85: 183-92.
3. Papas E, Vajdic C, Austen R, Holden B: High oxygen-transmissibility soft contact lenses do not induce limbal hyperaemia. *Curr Eye Res* 1997; 16: 942-948.
4. Dumbleton KA, Chalmers RL, Richter DB, Fonn D: Changes in myopic refractive error with nine months' extended wear of hydrogel lenses with high and low oxygen permeability. *Optom Vis Sci* 1999; 76: 845-9.
5. Keay L, Sweeney DF, Jalbert I, Skotnitsky C, Holden BA: Microcyst response to high Dk/t silicone hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci* 2000; 77: 582-5.
6. Covey M, Sweeney DF, Terry R, Sankaridurg PR, Holden BA: Hypoxic effects on the anterior eye of high-Dk soft contact lens wearers are negligible. *Optom Vis Sci* 2001; 78: 95-9.
7. Du Toit R, Simpson TL, Fonn D, Chalmers RL: Recovery from hyperemia after overnight wear of low and high transmissibility hydrogel lenses. *Curr Eye Res* 2001; 22: 68-73.
8. Pritchard N, Fonn D, Weed K: Ocular and subjective responses to frequent replacement of daily wear soft contact lenses. *CLAO J* 1996; 22: 53-59.
9. Gellatly K, Brennan N, Efron N: Visual decrement with deposit accumulation on HEMA contact lenses. *Am J Optom Physiol Opt* 1988; 65: 937-941.
10. Mondino B, Salamon S, Zaidman G: Allergic and toxic reactions in soft contact lens wearers. *Surv Ophthalmol* 1982; 26: 337-344.
11. www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/K033919.pdf (Marzo 2011)
12. www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/K052560.pdf (Marzo 2011)
13. Jones L, Senchyna M, Louie D, Schickler J: A comparative evaluation of lysozyme and lipid deposition on Etafilcon, Balafilcon and Lotrafilcon contact lens materials. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: s593 #3186.
14. Senchyna M, Jones L, Louie D, Forbes I, May C: Optimization of methodologies to characterize lysozyme deposition found on balafilcon and etafilcon contact lens

- materials. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; ARVO abstract # 3082.
15. McNally J, McKenney CD: A clinical look at a silicone hydrogel extended wear lens. Contact Lens Spectrum 2002; 17: 38 - 41.
 16. Court JL, Redman RP, Wang JH, Leppard SW, Obyrne VJ, Small SA, Lewis AL, Jones SA, Stratford PW: A novel phosphorylcholine-coated contact lens for extended wear use. Biomaterials 2001; 22: 3261-72.
 17. Bruinsma GM, van der Mei HC, Busscher HJ: Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. Biomaterials 2001; 22: 3217-24.
 18. Jones L, Long J, Chen P: The impact of contact lens care regimens on the in vitro wettability of conventional and silicone-hydrogel contact lens materials. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; ARVO abstract # 3097.
 19. Jones L, Mann A, Evans K: An in Vivo Comparison of the Kinetics of Protein and Lipid Deposition on Group II and Group IV Frequent-Replacement Contact Lenses. Optom Vis Sci 2000; 77: 503-510.
 20. Santos L, Rodrigues D, Lira M: The influence of surface treatment on hydrophobicity, protein adsorption and microbial colonisation of silicone hydrogel contact lenses. Contact Lens Anterior Eye 2007; 30: 183-188
 21. Nicolson PC, Vogt J: Soft contact lens polymers: an evolution. Biomaterials 2001; 22: 3273-83.
 22. Starcher, B: A Ninhydrin-based Assay to Quantitate the Total Protein Content of Tissue Samples. Anal.Biochem 2001; 182 : 319-326.
 23. Bioanalytical Chemistry, by Susan R. Mikkelsen and Eduardo Corto'n ISBN 0-471-54447-7, 2004 John Wiley & Sons, Inc.
 24. Andrews JS. Human tear film lipids, I: composition of the principal non-polar component. *Exp Eye Res.* 1970;10:223-227
 25. Brauninger GE, Shah DO, Kaufman HE. Direct physical demonstration of oily layer on tear film surface. *Am J Ophthalmol.* 1972;73: 132-134
 26. Morgan P. et al., International Contact Lens Prescribing in 2011. Contact Lens Spectrum 1/1/2012
 27. <http://www.microspectra.com/component/content/article/35-technical-support/185-protein-absorbance> (Febbario 2012)
 28. The Protein Protocols Handbook, J.M.Walker Humana Press Inc., Totowa, NJ

29. Prydal JI, Artal P, Woon H, Campbell FW. Study of the human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.*, 1992;33:2006-2011.
30. Rossetti A., Gheller P. *Manuale di optometria e contattologia* Ed.Zanichelli 2007
31. Fred S. Chen, David M. Maurice, The pH in the precorneal tear film and under a contact lens measured with a fluorescent probe, *Experimental Eye Research*, Volume 50, Issue 3, March 1990, Pages 251-259.
32. Janssen PT, Van Bjsterveld OP. Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983;24:623-630.
33. Sala F., Madesani A., Madesani F.. La lente a contatto e la sua interazione con il film lacrimale. *Dossier Contattologia di Professional Optometry* Aprile 2011
34. Morgan P., Dobson C.. Proteine del film lacrimale, lenti a contatto morbide e soluzioni. *Dossier Contattologia di Professional Optometry* Aprile 2010
35. Blümcke S., Morgenroth Jr K. The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea. *Journal of Ultrastructure Research*, Issue 18. 1967, 502-518
36. Dunaway D., Berger I. Worldwide Distribution Of Visual Refractive Errors And What To Expect At a particular Location. Presentation to the International Society for Geographic and Epidemiologic Ophthalmology. InFOCUS Center for Primary Eye Care Development.
37. Copolimero 845 Scheda di Sicurezza (1907/2006) tratto da http://online1.ispcorp.com/MSDS/COPOLYMER%20845_IT_72257I.pdf febbraio '12
38. Sebastian M. Wie hart sind weiche kontaktlinsen?. *DOZ* 10/2007
38. Whittaker G. Biofinity Silicone Hydrogels. *Contact lens Monthly. Optician* 04.04.2008.
39. Maissa C, Franklin V, Guillon M, Tighe B. Influence of contact lens material surface characteristics and replacement frequency on protein and lipid deposition. *Optom Vis Sci* 1998;75:697-705.
40. Boone A, Heynen M, Joyce E, Varikooty J, Jones L. Ex vivo protein deposition on bi-weekly silicone hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci* 2009;86:1241-9.
41. Christine E. Soltys-Robitaille, Daniel M. Ammon Jr., Paul L. Valint Jr., George L. Grobe III, The relationship between contact lens surface charge and in-vitro protein deposition levels, *Biomaterials*, Volume 22, Issue 24, 15 December 2001, Pages 3257-3260.

42. Michaud L., Giasson C. Comparing the extent of protein build-up on several disposable lenses by two spectrophotometric methods. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association* 1 January 1998 (volume 21 issue 4 Pages 104-108).
43. Maissa C, Franklin V, Guillon M, Tighe B: Influence of contact lens material surface characteristics and replacement frequency on protein and lipid deposition. *Optom Vis Sci* 1998; 75;9: 697-705.
44. Luensmann D., Jones L. Albumin adsorption to contact lens materials: a review. *Contact Lens and Anterior Eye* 2008; 31: 179-187.
45. Norde W.. Energy and entropy of protein adsorption. *J Dispersion Sci Technol* 1992; 13: 363-77.
46. González M., Almeida J., and Parafita M.. Analysis of Surface Mechanical Properties of Unworn and Worn Silicone. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*; 2010: 554-559.
47. Subbaraman L., Glasier M., Senchyna M.. Kinetics of in vitro lysozyme deposition on silicone hydrogel, PMMA, and FDA groups, I, II, and IV contact lens materials. *Curr Eye Res* 2006; 31: 787-96.
48. Chow L., Subbaraman L.. Kinetics of in vitro lactoferrin deposition on silicone hydrogel and FDA group II and group IV hydrogel contact lens materials. *J Biomater Sci Polim* 2009; 20; 71-82.
49. Luensmann D., Zhang F., Subbaraman L.. Localization of lysozyme sorption to conventional and silicone hydrogel contact lenses using confocal microscopy. *Curr Eye Res* 2009 Aug; 34(8): 693.
50. Zhao Z., Carnt N., et al.. Care regime and lens material influence on silicone hydrogel contact lens deposition. *Optom Vis Sci* 2009; 86: 251-259.
51. Luensmann D., Zhang F., Subbaraman L.. Localization of lysozyme sorption to conventional and silicone hydrogel contact lenses using confocal microscopy. *Curr Eye Res* 2009 Aug; 34(8): 683-97.
52. Bucci M.G. *Oftalmologia*, Società Editrice Universo 1993.
53. Lorentz H., Jones L.. Lipid deposition on Hydrogel contact lenses: how history can help us today. *Optom Vis Sci* 2007; 84: 286-295.

Ringraziamenti

Desidero anzitutto ringraziare la Proff.ssa Dettin per i preziosi insegnamenti e per la disponibilità dimostrata durante tutta la durata di questo studio.

Inoltre, ringrazio sentitamente la Dott.ssa Roberta Danesin per l'infinita pazienza nell'insegnarmi le procedure di laboratorio e in generale per l'aiuto che mi ha sempre fornito.

Intendo poi ringraziare il Dott. Filippo Naso per il suo contributo con le analisi sul colesterolo e il Dott. Leonardo Bee, mio caro amico, che è sempre stato disponibile per chiarimenti e consigli.

Grazie Eleonora, amore mio, per la vita che stiamo realizzando insieme, per tutto l'amore che ci lega e per i momenti quotidiani di gioia con il piccolo Ale.

Grazie anche a mamma e papà per il vostro sostegno e la vostra presenza e anche alla Margi che è sempre nei miei pensieri.

A Susanna che mi tratta come un figlio: grazie per l'aiuto che ci dai sempre.

A Michele che ha sempre creduto in me, a Enry per l'affetto che ci lega, a Davide per la bella amicizia maturata in questi anni e al caro Fede, che mi sa sempre consigliare.

Ringrazio tutti gli amici che mi son stati vicini in questi lunghi anni di lavoro e studio e infine ringrazio zio Enore e zia Sandra per l'affetto che mi hanno sempre dimostrato.