

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei"

Corso di Laurea Triennale in Ottica e Optometria

TESI DI LAUREA

*Staining corneali: più cause, più significati e molteplici
interpretazioni.*

*Corneal staining: more causes, more meanings and many
interpretations.*

Relatore: Prof. Renzo Colombo

Laureanda: Cristina Boffo

Matricola: 1009715/OPT

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	<u>1</u>
<u>COLORAZIONI CORNEALI</u>	<u>3</u>
STAINING NEI PORTATORI DI LENTI A CONTATTO	7
STAINING NEI NON PORTATORI DI LENTI A CONTATTO	10
<u>FLUORESCENZA SODICA</u>	<u>13</u>
FATTORI CHE INFLUENZANO L'INTENSITÀ E LA COLORAZIONE DELLA FLUORESCENZA DELLA SUPERFICIE OCULARE	14
<u>ANATOMIA DELLA CORNEA</u>	<u>17</u>
LE GIUNZIONI STRETTE	19
MICROVILLI E GLICOCALICI APICALI	20
ACQUAPORINE E GIUNZIONI COMUNICANTI	20
<u>PERMEABILITÀ CORNEALE</u>	<u>23</u>
<u>TURNOVER EPITELIALE E DIVISIONE CELLULARE</u>	<u>25</u>
<u>METABOLISMO EPITELIALE</u>	<u>29</u>
<u>COLORAZIONI CELLULARI IN RELAZIONE AL LORO STATO FISIOLOGICO</u>	<u>31</u>
<u>METODI E STRUMENTI</u>	<u>35</u>
<u>ANALISI STAINING RILEVATI</u>	<u>37</u>
<u>DISCUSSIONE</u>	<u>47</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>57</u>

INTRODUZIONE

Questo studio è un review della letteratura presente sugli staining corneali. Lo scopo di questo studio è evidenziare tutti i meccanismi legati alla rilevazione di questi e l'analisi del colorante usato per evidenziarli: la fluoresceina sodica. Inoltre, si vuole approfondire i meccanismi alla base dell'interazione tra il colorante e la cornea umana e la natura di queste colorazioni nei non portatori di lenti a contatto per meglio poter identificare i soggetti idonei all'uso di lenti a contatto e diminuire la percentuale di drop out annui (14%-37% annui).

Con questo studio si vuole anche marcare l'importanza dell'uso della fluoresceina sodica a una concentrazione del 2% nella pratica Optometrica-Contattologica di ogni giorno, al di fuori delle strutture ospedaliere.

COLORAZIONI CORNEALI

Il termine colorazione o staining corneale viene utilizzato per descrivere la comparsa di aree fluorescenti nell'epitelio, successivamente all'instillazione di fluoresceina e dopo essere stata illuminata con luce blu cobalto o raggi ultravioletti. Le colorazioni corneali sono probabilmente le più familiari di tutte le potenziali complicazioni delle lenti a contatto. Hanno un'incidenza del 60% nei portatori di lenti a contatto e del 35% nei non portatori. Spesso sono clinicamente non significative.

Gli staining corneali non sono una condizione in se stessa, ma un termine usato per descrivere dei cambiamenti patofisiologici delle cellule o per evidenziare dei danni ai tessuti dell'occhio; questo avviene mediante l'aiuto di coloranti topici come il rosa bengala, il verde di lissamina e la fluoresceina sodica. Questi coloranti vengono definiti coloranti vitali poiché sembra evidenzino cellule ancora in vita, ma non è del tutto appropriato, poiché alcuni di questi sembra colorino anche cellule morte come il rosa bengala, successivamente sostituito dal verde di lissamina per la sensazione di bruciore che provocava nei soggetti analizzati.

Il termine staining non indica particolari meccanismi scatenanti, ma è attribuito a una grande varietà di eziologie. Quella meccanica dovuta a un trauma, a un corpo estraneo o alla conformazione della lente (bordo, rigidità, spessore o danneggiamento). Da esposizione dovuta a una distribuzione del film lacrimale non omogenea che porta a una conseguente secchezza. Metabolica come l'ipossia e l'ipercapnia (acidosi dei tessuti e desquamazione delle cellule epiteliali). Tossica come l'ipersensibilità ai sistemi di manutenzione o ai farmaci (1-10% dei portatori). Allergica data da un'ipersensibilizzazione immediata o ritardata infettiva. E infine, da disturbi sistemici e stati di salute precari come influenza e laringite.

Le fluorescenze corneali possono manifestarsi in numerose forme cliniche le quali possono essere classificate in termini di intensità, come ad esempio puntate, diffuse o coalescenti. In termini di forma: arcuate, lineari o a macchia. In termini di posizione: nell'area centrale, inferiore, superiore, nasale o temporale della

cornea. Infine, in termini di profondità: epitelio superficiale, epitelio profondo, stroma localizzato e stroma diffuso.

Le classificazioni più conosciute sono di Cochet-Bonnet del 1959 secondo punti e linee; successivamente Schulman nel 1974 propose una classificazione in sette categorie: arcuata, puntata, superficiale, profonda, lineare, limbare, superficiale congiuntivale. Nel 1969 Larke propose una classificazione basata sulla profondità, il tipo e l'area della colorazione, per ottenere un quadro generale della sofferenza e riuscire a riconoscere l'eventuale patologia o causa scatenante, per decidere come agire per risolverla.

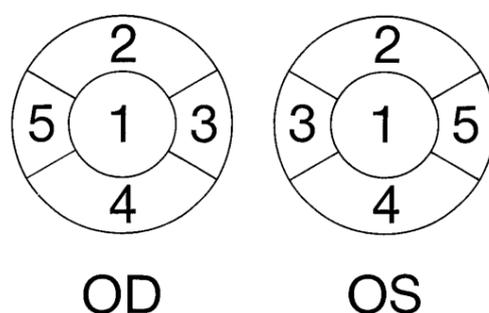


Figura 1. Rappresentazione schematica della cornea, divisa nelle cinque aree utilizzate per definire la posizione delle colorazioni corneali.

Non sempre è facile ottenere il quadro generale di una colorazione, molto spesso è alquanto difficile inquadrarne le cause e capire come risolverle, poiché molto spesso segni e sintomi non coincidono.

Tabella 1. La seguente tabella mostra come definendo la posizione, la profondità e la forma delle colorazioni corneali, si possa apprendere il tipo di sofferenza in atto e cosa queste colorazioni vogliono rappresentare.

Classification of various types of corneal surface fluorescence as a function of key descriptors.

Classification	Intensity	Shape	Location	Supporting information
Superior epithelial arcuate lesion (SEAL) 3&9	Coalescent	Arcuate	Superior (usually paralimbal)	More commonly seen in silicone hydrogel wearers Rigid lens wearer
	Punctate or diffuse	Patch	Nasal and/or temporal (usually paralimbal)	
Smile	Diffuse or coalescent	Arcuate or band	Inferior	Soft lens wearers
Foreign body	Coalescent	Linear	Any corneal area	
Solution-induced corneal staining	Punctate or diffuse	Annular or circular	All corneal areas, sometimes with central sparing	
Dimple veil	Coalescent	Circular (usually multiple and usually 100-300 µm in diameter)	Any corneal area, usually central or mid peripheral	Associated with bubbles under a rigid lens
Mucin balls	Coalescent	Circular (usually multiple and usually about 50 µm in diameter)	Any corneal area	More commonly seen in silicone hydrogel wearers

L'analisi della punteggiatura corneale è uno strumento molto utile per la valutazione clinica dell'integrità dell'epitelio corneale. Attualmente, per valutare l'estensione e la severità della punteggiatura corneale vengono utilizzate differenti scale di gradazione. Sfortunatamente le scale utilizzate differiscono sia in termini di classificazione, che di precisione e valutano l'estensione delle punteggiature in maniera qualitativa. Questo può causare interpretazioni diverse tra differenti operatori.

Risulta quindi che negli ultimi 20 anni le scale maggiormente utilizzate siano essenzialmente quattro:

la scala "Efron"

la scala "Annunziato"

la scala "CCLRU"

la scala "Vistakon"

Tutte queste scale di gradazione vanno intese come dei veri e propri sistemi per la valutazione delle complicanze indotte da lenti a contatto, infatti non contengono solo metodi di valutazione e gradazione per lo staining, ma anche per molte altre complicanze, come ad esempio l'arrossamento congiuntivale e la congiuntivite papillare. Un aspetto comune alle quattro scale citate è che tutte sono basate su set di immagini di riferimento. La valutazione della gravità delle punteggiature è effettuata mediante il confronto dell'immagine acquisita della cornea del paziente (tramite lampada a fessura) con le immagini di riferimento della scala. Nel caso della scala Efron e Annunziato le immagini di riferimento sono delle immagini illustrative realizzate ad hoc artisticamente, mentre nei sistemi CCLRU e Vistakon il set di riferimento è rappresentato da fotografie. Tra le quattro scale la CCLRU realizzata presso il Cornea and Contact Lens Research Unit, è sicuramente quella più utilizzata in ambito contattologico ed è stata scelta come punto di partenza e come riferimento per le successive valutazioni.

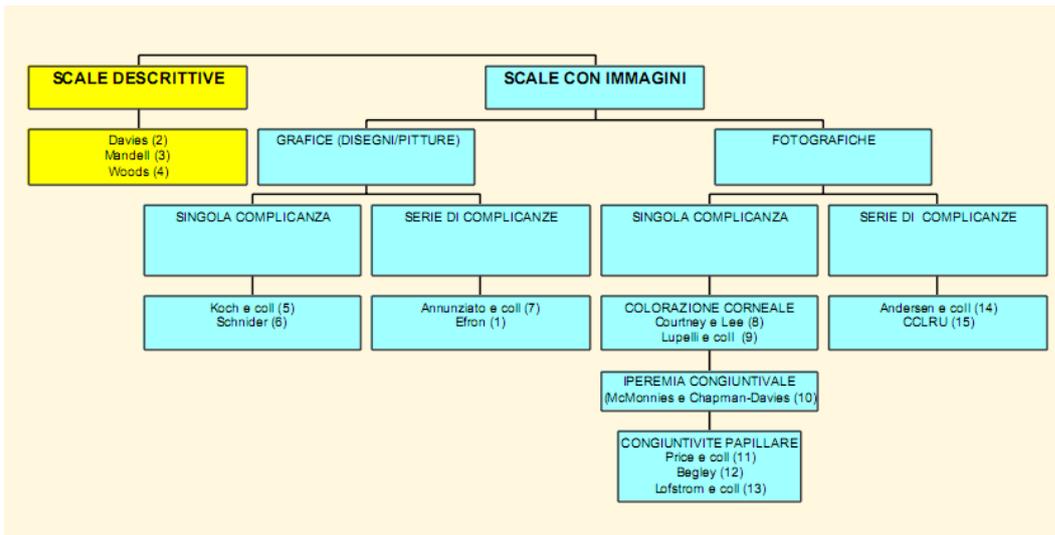


Figura 2. Schema delle scale di valutazione esistenti divise in due macrocategorie: set di immagini realizzate ad hoc e immagini fotografiche.

Spesso queste punteggiature sono asintomatiche e il portatore di lenti a contatto non lamenta nessun fastidio, così che molti operatori non indagano in maniera approfondita un'eventuale presenza di queste. I sintomi variano da colorazione a colorazione e dipendono principalmente dall'eziologia e dal grado di severità in cui si presentano.

Spesso i sintomi possono ridurre la tollerabilità delle lenti a contatto, il periodo di porto, provocare secchezza oculare, creando un'instabilità del film lacrimale e una modificazione nella secrezione. Fino a che, tutto questo, porta il soggetto a interrompere l'uso delle lenti e si ha il Drop out.

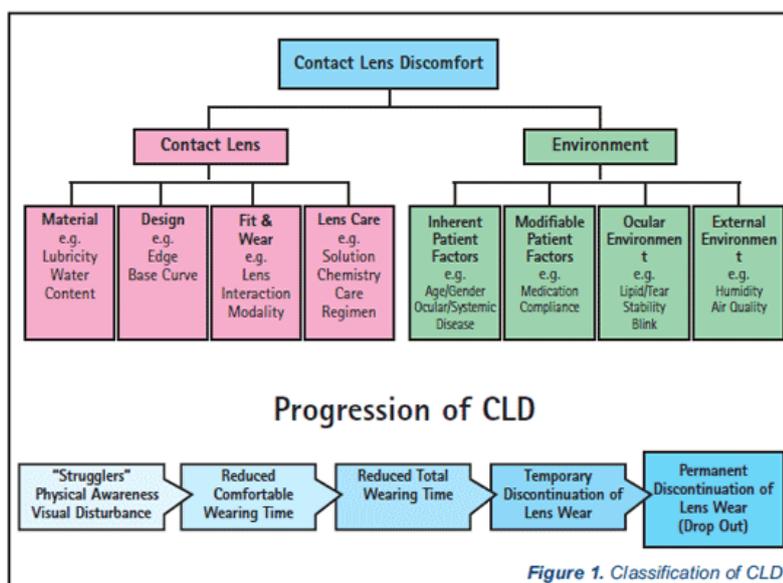


Figure 1. Classification of CLD

Figura 3. Nella figura sono evidenziate le principali cause di discomfort nell'uso di lenti a contatto. Nella parte inferiore della figura è stata riportata una linea

temporale che sottolinea i passaggi più importanti che avvengono e portano al Drop out

Il Drop out è l'interruzione definitiva dell'uso delle lenti a contatto, cioè il portatore dopo aver ridotto i periodi di porto a causa di discomfort o secchezza arriva a non tollerarle più e ne interrompe l'uso. Ogni anno abbiamo tra il 15,9% e il 34% di portatori di lenti a contatto che ne abbandonano l'uso definitivamente. Come mostrano gli studi più recenti, il range non è variato negli anni.

STAINING NEI PORTATORI DI LENTI A CONTATTO

Nei portatori di lenti a contatto negli anni sono stati diagnosticati una grande varietà di staining riconducibili all'uso di queste. Sono stati evidenziati staining legati ad abrasioni provocate da ipossia, come nell'uso di lenti a contatto in PMMA, dove il portatore presenta come sintomo principale, successivamente alle ore di sonno, con dolore acuto. Altri sintomi possono essere fotofobia, lacrimazione, acuità visiva ridotta, sensazione forte di corpo estraneo e intolleranza alla lente a contatto. Probabilmente, la causa di questa condizione è dovuta al fatto che la cornea, adattata al calo di ossigeno, portandole per un periodo più lungo sviluppa un edema supplementare. I nervi corneali perdono sensibilità e appena riprendono la loro normale funzione, il paziente si sveglia per la sensazione di dolore.

Macchiette corneali individuate nell'uso di lenti a contatto morbide, in particolare in quelle ad uso prolungato. Si notano immediatamente dopo l'apertura dell'occhio e scompaiono dopo circa due ore. Queste colorazioni sono più grandi della colorazione puntata e sono più diffuse.

Microcisti e microdepositi da lente a contatto morbida ad uso prolungato si manifestano come piccole depressioni, che si colorano in presenza di fluoresceina.

Abrasioni meccaniche dovute a errori di inserzione o rimozione della lente. Le abrasioni da rimozione si presentano come una abrasione causata da una lente a contatto rigida che preme sulla cornea. Queste abrasioni possono essere causate da compressione delle dita formando un'area distesa, che si colora con la fluoresceina

nella parte inferiore della cornea. In questo caso, la colorazione evidenzia una raschiatura sulla cornea. Conseguenze più serie possono essere date da abrasioni causate dall'unghia.

Colorazioni causate dal bordo della lente. Le più comuni sono quelle provocate dall'uso delle lenti a contatto rigide. Si osservano frequentemente nell'area a ore 3-9 della cornea e della congiuntiva e sono una delle cause della sindrome dessicativa della cornea periferica. Si può presentare come risultato di un'azione da graffio del bordo della lente, che si muove avanti e indietro al cambio di sguardo. Questo tipo di colorazione si presenta a poco tempo d'uso della lente e può avere carattere cronico.

Altra colorazione è data dalla rimozione accidentale dell'epitelio. Questa è una condizione traumatica rara con le lenti a contatto morbide moderne. Tipicamente, venivano coinvolte un insieme di particolari condizioni concomitanti: applicazione stretta, lente spessa, lente a uso giornaliero a basso contenuto di acqua portata anche durante il sonno. Il fenomeno è stato osservato anche con alcune lenti speciali, come le prime lenti al silicone, le lenti morbide con centro "rigido gas-permeabile" e altre morbide di vecchia concezione ad alto contenuto di acqua ad uso prolungato.

Abrasioni causate da lenti a contatto rotte, scheggiate o lacerate che possono provocare danni minimi o gravi, secondo la lacerazione, del tempo d'uso e del tipo di rottura della lente.

Staining dato da raggrinzimento corneale: fenomeno osservato con l'uso di lenti a contatto morbide e rigide. Condizione causata da forze meccaniche imposte sulla cornea dal peso della lente e delle palpebre. E' asintomatica e sparisce velocemente dopo aver tolto le lenti a contatto. Se causata da lenti a contatto rigide, la deformazione corneale potrebbe essere più seria, interessando strati corneali profondi e mostrando pieghe più pronunciate. L'acuità visiva potrebbe essere interessata e la guarigione è più lenta.

Colorazione a sorriso da lente a contatto morbida si presenta come un'abrasione ad arco localizzata nella parte inferiore della cornea. Può essere notata anche senza l'uso di fluoresceina. Generalmente è asintomatica o può portare a una lieve sensazione di occhio secco.

Colorazione superiore ad arco è comune nell'uso di lenti a contatto rigide. Causata

da fattori legati alla geometria della lente: raggio troppo corto, zona ottica troppo larga, movimento inadeguato, raccordo fra zona ottica e flangia non ben lavorato.

Colorazione a solco e ipertrofia limbare è una colorazione dovuta all'uso di lenti morbide ad uso prolungato. Probabilmente la lente stretta impedisce il normale ricambio cellulare. Questo tipo di colorazione è asintomatico

Lesione arcuata epiteliale superiore, si nota solo con la fluoresceina, è asintomatica e causata da ipossia, dal disegno del bordo della lente, da corpi estranei, cheratocongiuntivite limbare, congiuntivite tossica e molte altre cause.

Velatura irregolare (dimple veil) è causata da bollicine che premono sulla cornea. Sono indice di una applicazione non adeguata e una funzione metabolica anomala. Lo staining mostra un riempimento con il colorante delle lacune, indentazioni lasciate dalle bolle sulla cornea.

Abrasioni chimiche associate all'uso di lenti a contatto sono comuni e la causa va ricercata nei numerosi prodotti per la manutenzione disponibili sul mercato, la loro potenziale incompatibilità quando usati insieme, errori da parte del portatore. Nichols e al. hanno registrato un maggior presenza di staining in soggetti che non seguivano il corretto procedimento di manutenzione delle lenti. Inoltre, numerosi staining sembrano coincidere con l'uso di sostituti per la lacrimazione.

Altri fattori che possono contribuire sono l'uso di prodotti sbagliati, la contaminazione accidentale della superficie della lente da parte delle dita, quando applicate o rimosse, o l'uso di prodotti scaduti o contaminati. Di solito è difficile diagnosticare la causa esatta. Tra queste sono diffuse le abrasioni da perossido di idrogeno male neutralizzate con il catalizzatore e da detergente. Inoltre, vi sono colorazioni causate dall'uso di enzimi per la pulizia e di soluzioni preservate. Prodotti come il cloruro di benzalconio, clorexidina, EDTA, acido sorbico, Dymed, Poliqua e altri possono provocare reazioni di ipersensibilizzazione dell'epitelio corneale. L'ipersensibilità causata da queste sostanze può provocare congiuntiviti da leggere a gravi, congiuntiviti puntate superficiali, follicoli bulbari e limbari, infiltrati subepiteliali e stromali e neovascolarizzazioni. Lo staining in questi casi assume un aspetto micropuntato e diffuso su tutta la superficie corneale.

Abrasioni da corpo estraneo causate da strumenti utilizzati per il trucco, schegge di vetro o metallo, polveri causate da saldature o da polveri chimiche.

Inoltre si possono anche rilevare abrasioni dovute a un' esposizione prolungata ai raggi ultravioletti simile a quella provocata da fattori chimici.

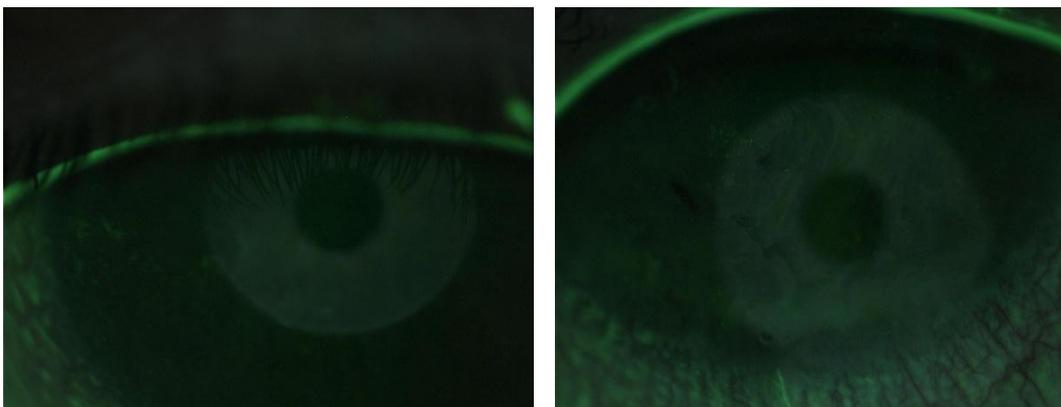


Figura 4. Nelle due foto sono stati evidenziati staining da secchezza oculare legata all'uso di lenti a contatto

STAINING NEI NON PORTATORI DI LENTI A CONTATTO

Nella pratica risulta molto importante l'esame pre-applicativo delle lenti a contatto per individuare i pazienti idonei all'uso di queste. Anche nei non portatori di lenti a contatto è possibile trovare una varietà di staining corneali che non sempre sono riconducibili a un quadro specifico. In questi casi è bene individuarli e riuscire a capirne la causa poiché questi possono contribuire al successo applicativo.

Nei non portatori di lenti a contatto alcuni studi hanno evidenziato la presenza di staining micropuntati diffusi, questi sembrano localizzarsi soprattutto nella cornea periferica dove c'è maggior attività mitotica e soprattutto nella zona infero-nasale, coincidente con la zona di deflusso del film lacrimale.

Gli staining in questi soggetti presentano variazioni diurne probabilmente legate a processi fisiologici inclusa la secrezione della lacrimazione. Inoltre, si hanno variazioni da giorno a giorno e più intense colorazioni la mattina dovute probabilmente a un cambiamento del metabolismo e di apporto di ossigeno durante la notte.

Nei soggetti che presentavano il medesimo staining a distanza di giorni, invece, è stata ipotizzata una causa esterna ambientale o meccanica.

Gli staining secondo Kikkawa e al. sembrano evidenziare il fisiologico ricambio

cellulare dell'epitelio dato dalla desquamazione di questo. Inoltre, grazie agli studi di Soni e al. del 1996 e di Norn del 1970, le colorazioni sembrano avere un legame con l'età. Infatti, hanno notato che la prevalenza di staining era più bassa negli adolescenti e più alta in soggetti più vecchi.

Altri studi hanno riportato una maggiore attività mitotica nella zona periferica della cornea in confronto al centro. Quando le cellule epiteliali sono in divisione, sulla superficie sono lasciati dei buchi tipo crateri sullo strato cellulare. Se questi buchi si colorano con la fluoresceina, è possibile che questi contribuiscano alla colorazione generale e che la loro localizzazione sia prevalentemente nella periferia.

Lo studio di Schwallie e al. ha avvalorato la teoria che le colorazioni possano essere legate all'attività mitotica dell'epitelio corneale. Tuttavia, considerando che l'attività mitotica avviene a livello della membrana basale può essere difficile concludere, che sia realmente questa a causare gli staining.

Norn, Josephson and Caffery hanno riportato che la localizzazione dello staining corneale è stato notato più frequentemente nella regione inferiore e nasale. Sebbene l'attività mitotica possa essere responsabile in quest'area, è credibile che altri fattori possano contribuire. Una possibile spiegazione è da un povero ammiccamento che causa una instabilità del film lacrimale, creando una secchezza localizzata. I lavori di Josephson and Caffery, tuttavia, hanno mostrato simili risultati anche in occhi analizzati dopo la notte; suggerendo che l'esposizione non sia la causa.

La predominanza dello staining in quest'area suggerisce una relazione con i detriti lacrimali e la via di deflusso di queste. Questo suggerisce che siano causati da corpi estranei, come polvere o detriti, che vengono rimossi dalla superficie oculare tramite il ricambio del film lacrimale. E' possibile che questi corpi estranei siano più presenti nell'area infero-nasale, perché seguono la via di deflusso delle lacrime.

La variabilità degli staining nei non portatori di lenti a contatto suggerisce più un'origine traumatica, più che avere un legame con la desquamazione fisiologica oculare. Risulta comunque difficile riuscire a discriminare tra staining causati, giorno dopo giorno, da un trauma e gli staining che possono essere causati dalla normale desquamazione.

Oltre agli staining micropuntati e a quelli causati da eziologie meccaniche sono stati trovati diversi tipi di pattern fluoresceinici come identazioni diffuse o a macchia o collegate con la disposizione del menisco lacrimale rispetto alla cornea. Inoltre, sono state evidenziate colorazioni a ore 3 e 9 tipiche nei portatori di lenti a contatto.

Secondo la ricerca di Bron e al. uno staining puntato di basso grado è un evento normale nelle cornee sane; questi non sono degli eventi sporadici, ma dipendono dal tempo e dalla concentrazione di fluoresceina instillata. Ripetendo i test con varie concentrazioni di fluoresceina, rispettivamente 0,125%, 1% e 2%, hanno riscontrato che il dato più attendibile si ottiene con una concentrazione al 2%.

FLUORESCEINA SODICA

L'uso di coloranti chimici per la valutazione della superficie oculare è una pratica clinica comune. Alcuni esempi di coloranti, usati negli ultimi 130 anni, includono il rosa bengala, il verde di lissamina e la fluoresceina sodica detta semplicemente fluoresceina.

La prima applicazione, durante un'osservazione oculare, fu riportata da Pfluger nel 1882 per evidenziare il disegno di un'abrasione epiteliale sulla cornea dei conigli. Successivamente, sempre negli anni 80', fu applicata anche da Straub. La Fluoresceina è stata sintetizzata dal chimico tedesco Johann Friedrich Adolf von Bayer nel 1871. E' uno xanthene, una classe di composti ampiamente usati come coloranti, a temperatura ambiente si presenta come un solido giallo-bruno inodore, inerte e innocuo per i tessuti. Ha formula chimica $C_{20}H_{10}O_5 [Na]_2$, la sua massa molare è di 376 e la sua solubilità in acqua a $15^{\circ}C$ è del 50%.

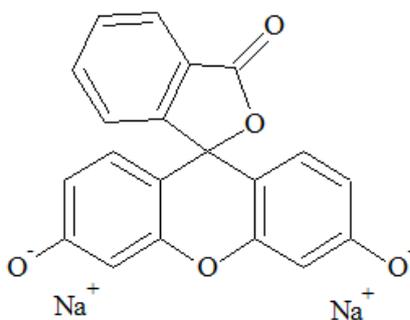


Figura 5. Formula chimica della Fluoresceina Sodica

La fluorescenza di questa molecola (di colore giallo-verde, molto caratteristica) è molto elevata. La sua eccitazione, tramite raggi ultravioletti a 254 nm o con filtro blu (465-490 nm) e filtro giallo di Wratten, avviene a 494 nm e la sua emissione a 521 nm.

La Fluoresceina sodica viene utilizzata in moltissimi campi, tra cui il più conosciuto è quello oftalmico. Viene utilizzata nella Fluorangiografia per

diagnosticare le patologie vascolari retiniche come controllare l'occlusione dei vasi retinici, diagnosticare le retinopatie diabetiche e forme di Maculopatia senile. Inoltre, è usata per valutare l'integrità della cornea, della congiuntiva, film lacrimale e l'allineamento nell'applicazione delle lenti a contatto rigide (fit applicativo). Mentre, nell'applicazione delle lenti a contatto morbide si predilige l'uso della Fluoresceina macromolecolare o Fluorexone, a causa della piccola dimensione molecolare della fluoresceina che viene assorbita negli spazi polimerici delle lenti e causa una colorazione irreversibile di queste. Purtroppo ha un potere di fluorescenza inferiore alla fluoresceina e questo impedisce la rilevazione di piccoli problemi corneali, che potrebbero essere rilevanti.

La fluoresceina è altamente tollerabile e una singola applicazione non causa bruciore o tossicità. Tuttavia, uno svantaggio nell'uso della fluoresceina è che legandosi allo strato acquoso del film lacrimale, questo può oscurare la misurazione delle colorazioni corneali.

Il principale pericolo della fluoresceina è la sua facile contaminazione da parte della "Pseudomonas aeruginosa", per questo nella pratica clinica si usa, preferibilmente, delle strisce i carta con la sostanza in forma secca. Queste prima di colorare la cornea vengono inumidite con una goccia di soluzione salina. Secondo alcuni studiosi, questa pratica porta a diluire la concentrazione di fluoresceina presente sulla striscia di carta e a rendere più difficile la diagnostica degli staining.

FATTORI CHE INFLUENZANO L'INTENSITÀ E LA COLORAZIONE DELLA FLUORESCENZA DELLA SUPERFICIE OCULARE

La fluorescenza di una molecola è un fenomeno dato dall'assorbimento di energia di un fotone, che causa l'emissione di un altro fotone a una lunghezza d'onda più alta.

L'intensità della sua fluorescenza aumenta con l'aumentare della sua concentrazione fino a un punto al di sopra del quale diminuisce progressivamente. Questa diminuzione della ad alte concentrazioni è definita "quenching /

smorzamento” ed è dovuta alla collisione delle molecole, che dissipano l'energia assorbita senza emissione di luce.

Per questo ad alte concentrazioni, la fluorescenza appare gialla, mentre a più basse concentrazioni si sposta verso lunghezze d'onda più corte, come il verde (510-520 nm).

Inoltre, l'intensità della fluorescenza della superficie oculare è dipendente dallo spessore dello strato di fluoresceina, che è strettamente collegato con lo strato lacrimale e in particolare con la componente acquosa alla quale si lega.

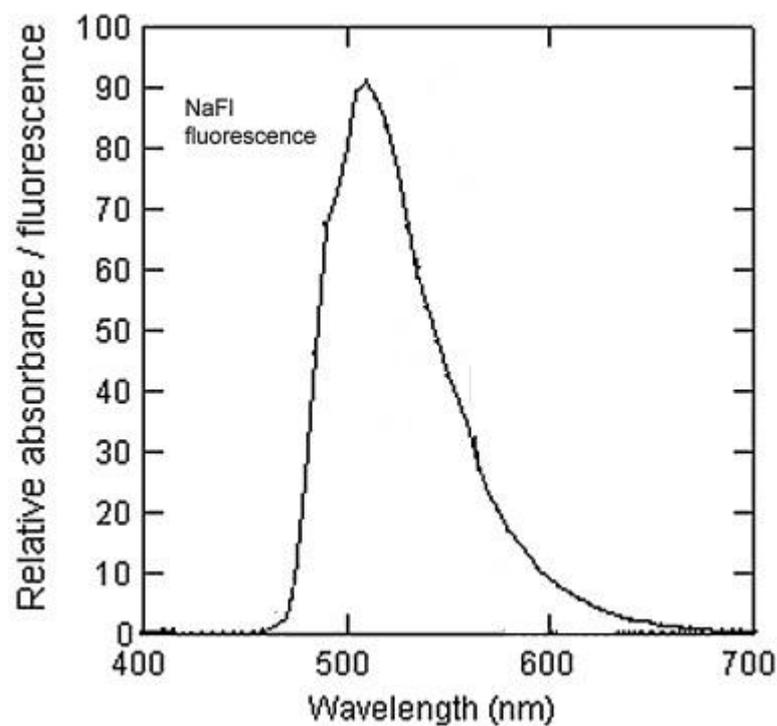


Figura 6. Curva di assorbimento ed emissione della fluorescenza della Fluoresceina sodica in funzione della lunghezza d'onda. Intorno ai 500 nm si ha il picco massimo di fluorescenza.

La fluoresceina è un colorante dipendente dal pH, l'intensità aumenta con l'aumentare di questo fino ad un pH8, dopo di che diminuisce. Al pH tipico della superficie corneale, che varia tra il 6,5 e l'8, il colore della fluorescenza rimane costante e appare una colorazione verde. Mentre, l'intensità varia a causa delle differenze locali di pH della superficie oculare.

Infine, anche la lunghezza d'onda della luce, che colpisce la superficie oculare

influisce sull'intensità della fluorescenza. Il picco si ottiene a una lunghezza d'onda pari a 495 nm.

È interessante porre attenzione agli studi di Peterson e al. che hanno dimostrato, che le comuni lampade a fessura, utilizzate durante la pratica, emettono un picco di lunghezza d'onda pari a 450 nm, suggerendo che molte di queste forniscono un'intensità di fluorescenza sub-ottimale per la diagnosi. Quindi anche alcune lampade a fessura, in possesso degli operatori, possono contribuire a non riuscire a percepire gli staining corneali nei soggetti analizzati a causa della più bassa lunghezza d'onda emessa.

Altro fattore che influenza la fluorescenza del colorante, oltre la concentrazione e la natura di questo, risulta essere la durata di esposizione sulla superficie oculare. Questa è determinata dalla quantità della lacrimazione, dal turnover del film lacrimale e dalla velocità della via di deflusso.

ANATOMIA DELLA CORNEA

La cornea costituisce la porzione anteriore della tunica esterna dell'occhio, che continua a livello del limbus sclerocorneale con la porzione posteriore della sclera. La cornea rappresenta la struttura con il maggior potere refrattivo del sistema visivo, avendo un potere diottrico pari all'incirca a 43 diottrie. La superficie anteriore è a contatto con il film lacrimale e presenta un diametro orizzontale (12 mm) maggiore di quello verticale (11 mm), assumendo una configurazione ellittica. Il raggio di curvatura orizzontale è di 7,8 mm, quello verticale di 7,7 mm. Lo strato posteriore è invece bagnato dall'umore acqueo. Lo spessore varia tra i 445 e i 600 μm e cresce dal centro alla periferia del 23% (Doughty e Zaman, 2000). L'indice di rifrazione è pari ad 1,37.

Dal punto di vista anatomico la cornea viene suddivisa in 5 strati che, partendo dall'esterno, sono rappresentati da: epitelio, membrana di Bowman, stroma, membrana di Descemet ed endotelio.

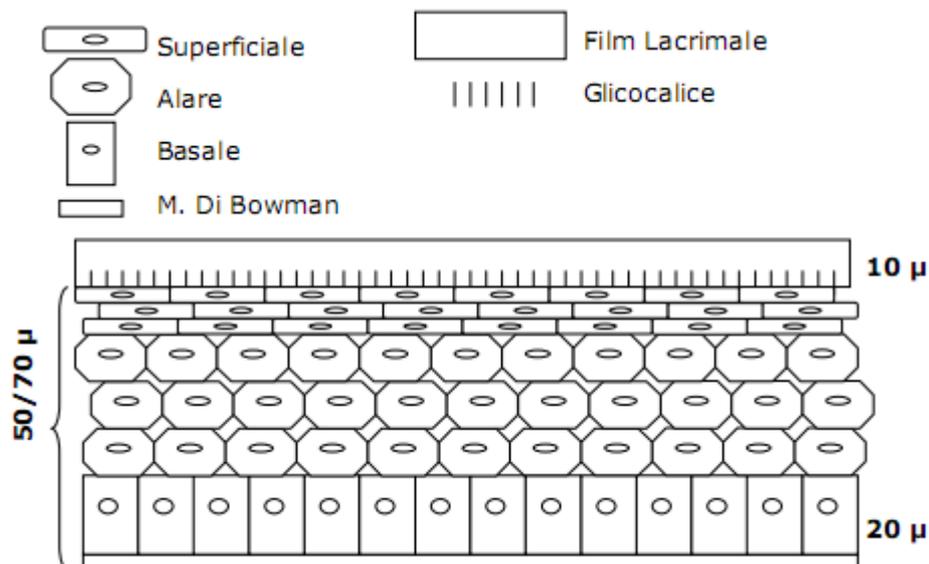


Figura 7. Organizzazione della struttura dell'epitelio corneale.

L'epitelio corneale, continuazione di quello congiuntivale, è di tipo pavimentoso composto, privo di cheratina e costituito da 6-7 strati di cellule suddivise in basali, poligonali e superficiali.

Le cellule basali, più profonde, hanno forma cilindrica e si dispongono in un'unica fila, strettamente connesse tra di loro da desmosomi e giunzioni strette. Sono cellule dotate di notevole attività mitotica, in quanto da esse si producono le cellule poligonali sovrastanti. Presentano una sottile membrana basale che a differenza della membrana di Bowman si riproduce nel caso in cui, traumi di varia natura, la distruggano.

Le cellule poligonali sono disposte in due o tre strati di elementi i quali man mano che migrano in superficie tendono ad appiattirsi. La coesione tra le singole cellule è maggiore rispetto a quelle profonde.

Le cellule superficiali sono rappresentate da elementi piatti, progressivamente migrati dagli strati più profondi. Il legame tra tali cellule è assicurato sia dai desmosomi che dalle tight-gap-junctions.

La membrana di Bowman, perifericamente, si continua con la membrana basale dell'epitelio congiuntivale ed è caratterizzata dalla presenza di piccole interruzioni, che permettono il passaggio dei filamenti nervosi sensitivi. Questi prenderanno poi contatto con le singole cellule epiteliali. Ha uno spessore di 12 micron ed è costituita da fibrille collagene immerse in una sostanza amorfa.

Lo stroma è la struttura più consistente dell'intero tessuto corneale, misurando circa 500 micron. Istologicamente si distinguono le lamelle, costituite da fibre collagene disposte parallelamente ed i cheratociti stromali, dei fibroblasti modificati con una notevole attività mitotica.

La membrana di Descemet (12 micron) ha una struttura fibrillare collagena priva di cellule e prende una configurazione multilamellare con una porzione bandata e una non bandata.

L'endotelio è costituito da un singolo strato di cellule poligonali, che nella faccia posteriore presenta le così dette zonule occludens.

LE GIUNZIONI STRETTE

Le giunzioni strette dell'epitelio corneale sono delle proteine transmembrana, cioè proteine che attraversano le membrane plasmatiche delle cellule presenti nel tessuto. La loro funzione è quella di sigillare le cellule in un foglietto epiteliale, che impedisce il passaggio di molecole fra esse. Tra le giunzioni strette vi sono le occludine, le claudine, le molecole adesive giunzionali (JAM) e le proteine di membrana periferiche. Inoltre, sono presenti proteine citoplasmatiche come la cingulina, che ha funzione strutturale e di segnale, simile alla miosina, che si lega ai filamenti di actina dei complessi di chiusura.

Le occludine e le claudine contengono quattro domini transmembrana con entrambe le code N- e C- terminali dirette attraverso il citoplasma. Queste si associano con proteine periferiche intracellulari di membrana, chiamate proteine ZO (zona occludens), che ancorano i filamenti al citoscheletro di actina, oltre che correre attraverso gli spazi intracellulari e chiuderli. Le occludine hanno la funzione di controllare la regolarità della struttura delle proteine con la fosforilazione. Non rivestono un ruolo significativo nella struttura ma, sono proteine regolatrici della permeabilità oltre che avere un' influenza nell'attività mitotica delle cellule basali. Probabilmente un loro danneggiamento, provoca il passaggio dei coloranti nell'epitelio corneale.

Le claudine costituiscono una famiglia di proteine con funzioni strutturali. I rapporti tra le claudine e il loro stato di fosforilazione determina la struttura molto stretta delle giunzioni. Inoltre, sono coinvolte nel rapido riassetto della superficie, durante la desquamazione delle cellule. Le claudine presenti nell'epitelio corneale sono i tipi 1,4 e 7. La claudina 7 e altri sottotipi risultano essere presenti anche nella congiuntiva. Questo potrebbe spiegare la differenza di permeabilità tra i due tessuti. La congiuntiva risulta essere più permeabile della cornea al passaggio di ioni e molecole.

Inoltre, le giunzioni strette costituiscono una barriera contro il passaggio di ioni e molecole idrofiliche, mentre le membrane plasmatiche apicali con i glicocalici associati sono prontamente permeabili alle molecole lipofile.

Le superfici baso-laterali delle cellule epiteliali sono altamente interdigitate e separate dalle cellule contigue da stretti spazi intercellulari e paracellulari, collegati da numerosi e sparsi desmosomi. Gli spazi paracellulari sono presenti tra tutte le cellule dell'epitelio e rappresentano una via per il movimento dei soluti dal film lacrimale alla lamina basale epiteliale.

MICROVILLI E GLICOCALICI APICALI

La maggior parte delle cellule superficiali presentano dei microvilli che si espandono nel film lacrimale, aiutandolo ad aderire alla cornea attraverso il legame con lo strato mucoso e aumentano l'area della superficie esposta ($1,04 \text{ [cm]}^2 \pm 0,12$).

inoltre, la superficie epiteliale presenta i glicocalici che sono legati alle membrane plasmatiche apicali delle cellule. Nella cornea umana i glicocalici contengono le mucine MUC1, MUC4 e MUC16, che hanno ecto ed endodomini (porzioni di proteine che restano esposte allo spazio extracellulare), galattina-3 e T-antigeni.

La presenza di MUC16 e galattina-3 sembra essere essenziale per l'esclusione dei coloranti dai fogli delle cellule mature dell'epitelio corneale umano. I glicocalici conferiscono proprietà aggiuntive alla superficie oculare, la più importante di queste è la sua bagnabilità intrinseca. Quando i glicocalici sono alterati patofisiologicamente, la bagnabilità della cornea diventa imperfetta e la stabilità del film lacrimale è compromessa.

ACQUAPORINE E GIUNZIONI COMUNICANTI

Attraverso lo spessore dell'epitelio, le cellule adiacenti sono interconnesse da canali coinvolti nel trasporto transepiteliale dell'acqua e dalle gap junctions o giunzioni comunicanti, che aiutano lo scambio di piccole molecole e ioni $< 1\text{kD}$ di misura e mediano la comunicazione tra le cellule (Candia e al. 2006).

Probabilmente, la maggior parte della diffusione dell'acqua attraverso l'epitelio avviene tramite i canali che trasportano l'acqua. Sperimentalmente alcuni studi

hanno mostrato che il flusso di acqua attraverso l'epitelio è ridotto in risposta a cambiamenti di tonicità nel film lacrimale o nello stroma, facendo diventare l'epitelio più reattivo e sensibile al passaggio di ioni e molecole. Questo meccanismo è coinvolto nella diffusione dei coloranti attraverso lo strato epiteliale, poiché si ha un maggiore trasporto d'acqua verso l'esterno, causando i tipici segni di secchezza. Questo meccanismo, inoltre, sembra avere un ruolo fondamentale nella deturgescenza della cornea. (Levin and Verkman, 2006).

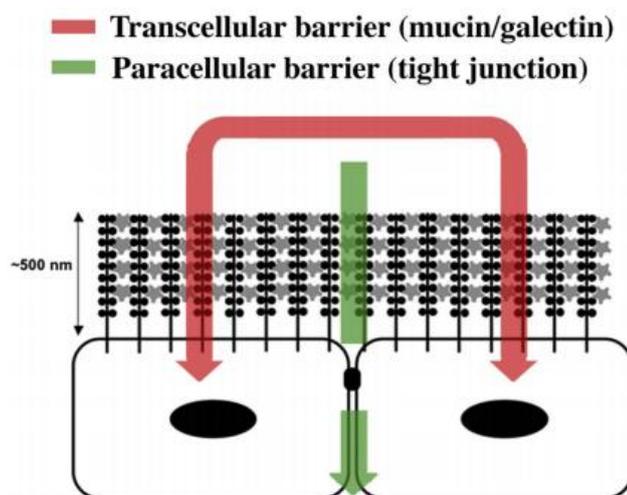


Figura 8. Rappresentazione delle barriere che mediano il passaggio di componenti attraverso la cornea, definendone la permeabilità.

Le giunzioni comunicanti hanno forma a bottone e sono giunzioni localizzate. Le membrane delle cellule sono molto vicine (distanza 2-3 nm) e rese comunicanti dalla presenza di numerose strutture proteiche, dette connessioni, formate da sei subunità proteiche (connessine), che delimitano un canale centrale che serve per la comunicazione tra il citoplasma di due cellule contigue.

Le connessine, cioè le proteine delle giunzioni comunicanti, si pensa abbiano un ruolo nel mantenimento della polarità dell'epitelio e nella migrazione delle cellule durante la guarigione dell'epitelio (Matic e al. 1997).

La conoscenza della connessione delle cellule dell'epitelio corneale risulta importante per comprendere il comportamento dei coloranti sulla superficie oculare. Studi sulla cornea umana e dei conigli hanno mostrato che gli strati cellulari più profondi della cornea sono ben accoppiati, mentre l'accoppiamento

delle cellule superficiali è assente. Questa differenza, probabilmente, è dovuta alla differente espressione delle proteine delle giunzioni comunicanti nei vari strati (William and Watsky, 2002, 2004). La differenziazione ultima degli strati superficiali sembra non presentare le gap junctions, mentre questo non avviene negli strati sottostanti. Tutto questo sembra essere direttamente collegato con il comportamento dei coloranti e la loro diffusione tra gli spazi intercellulari.

Infine, il funzionamento delle giunzioni dipende dalla presenza di ioni calcio. Se la concentrazione di calcio è bassa, le giunzioni comunicanti sono aperte; viceversa si chiudono. Lo stato di apertura e chiusura dei canali può essere determinato anche dal potenziale di membrana e dal pH citoplasmatico.

PERMEABILITA' CORNEALE

La superficie corneale non è una barriera totalmente impermeabile, ma permette il passaggio di piccole componenti idrofiliche. Queste passano preferibilmente attraverso le giunzioni strette, mentre le sostanze lipofiliche sono associate alle membrane lipiche dell'epitelio.

Grass and Robinson (1988) hanno determinato, che le componenti idrofiliche, solubili nell'acqua sono preferibilmente trasportate negli spazi intracellulari attraverso le giunzioni strette; mentre, il trasporto delle sostanze idrofobiche e delle componenti solubili nei lipidi è associata con le membrane lipidiche dell'epitelio.

Hamalainen e al. nel 1997 hanno riassunto in una tabella le scoperte riguardanti l'implicazione dell'entrata dei coloranti idrofilici di differenti pesi molecolari nell'epitelio corneale e quindi le loro proprietà legate agli staining.

Il passaggio di coloranti è influenzato dal peso molecolare, dalle dimensioni e profili delle molecole. La permeabilità della cornea varia in base alla massa molecolare e al raggio delle molecole, la più alta permeabilità viene raggiunta tra i 238 e i 414 Da al di fuori di questo range si ha una graduale decrescita.

Il trasporto della fluoresceina (MM 376 Da) attraverso un epitelio corneale intatto per diffusione dovrebbe verificarsi più facilmente, che per il verde di lissamina (MM 577 Da) e il rosa bengala (MM 1018 Da).

La fluoresceina non viene persa solo per la normale via di deflusso, cioè attraverso i canalicoli naso-lacrimali, ma anche per diffusione attraverso la congiuntiva. La fluoresceina viene persa molto velocemente proprio grazie al fatto che parte viene assorbita dalla cornea (Macdonald and Maurice, 1991).

TURNOVER EPITELIALE E DIVISIONE CELLULARE

Un meccanismo proposto per la colorazione corneale puntata è la presenza di fluoresceina negli spazi lasciati dalle cellule desquamate dell'epitelio. Prima è importante però considerare i processi di divisione che avvengono negli occhi normali e in quelli con patologie della superficie oculare.

Le cellule epiteliali vengono perse continuamente e sostituite con altre cellule tramite la mitosi.

La muta è influenzata dalla divisione della superficie tra le palpebre e il globo e l'ammiccamento riveste un ruolo importante nel normale processo di desquamazione. Il ricambio cellulare è accentuato dall'uso di lenti a contatto, dall'esposizione ai raggi ultravioletti (Wilson, 1994) e in particolari patologie come la sindrome di occhio secco o in presenza di ipossia.

La risorsa per le cellule epiteliali corneali sono le cellule staminiche presenti nello strato basale del limbus. Da qui una volta iniziata la maturazione si dirigono verso lo strato apicale e dal limbus con andamento centripeto si muovono verso il centro della cornea. La divisione delle cellule staminiche dà luogo ad una popolazione di cellule in rapida divisione dette TACs che sono responsabili del mantenimento della superficie epiteliale (Tseng, 1989).

Per la cornea, l'omeostasi è il risultato di un equilibrio tra le cellule in divisione al limbus e nell'epitelio basale e la divisione di cellule al termine della differenziazione alla superficie. Le cellule mature migrano centripetamente e anteriormente, avvicinandosi alla superficie tendono ad appiattirsi.

Gli studi di laboratorio, effettuati usando la Timidina Triziata (Hanna e O'Brien, 1960; Hanna et al., 1961), indicano che l'epitelio corneale umano è ricambiato ogni settimana, riflettendo il turnover delle cellule basali in divisione la quale progenie migra verso la superficie.

Altri riportano che c'è un più lento movimento centripeto delle cellule dal limbus verso l'epicentro e che circa due terzi di questo sia al di sotto del limbus superiore. Questa migrazione verso il centro dura circa un anno e determina l'organizzazione

radiale dell'epitelio corneale (Kaye, 1980).

Inoltre, è stato evidenziato un ricambio giornaliero nel numero cellulare durante la giornata, con un numero maggiore di cellule riscontrato la mattina e la sera; forse dovuto a cambi di ossigenazione della cornea e a variazioni fisiologiche del pH.

La divisione delle cellule in occhi normali include cellule nucleate e cellule fantasma, nelle quali non si riesce a discernere un nucleo. Le cellule fantasma sono considerate essere a uno stadio ultimo della differenziazione, forse avviate verso l'apoptosi. Il termine apoptosi indica la morte programmata della cellula. Questo processo serve al mantenimento del numero di cellule del sistema, avviene in modo moderato e regolato, richiede consumo di energia e generalmente porta un vantaggio durante il ciclo vitale di un organismo. Un' eccessiva attività apoptotica può causare disordini da perdita di cellule (si vedano ad esempio alcune malattie neurodegenerative, come la malattia di Parkinson), mentre un'apoptosi carente può implicare una crescita cellulare incontrollata, meccanismo alla base delle neoplasie.

Nel processo di desquamazione, le nuove cellule si trovano disaccoppiate da quelle vicine e si deve assumere che a un certo punto, una giunzione stretta sarà ristabilita tra queste e che queste rimpiazzeranno le cellule perse.

Wolosin e al. hanno mostrato che nell'epitelio corneale dei conigli la resistività delle giunzioni strette viene ripristinata in circa un'ora senza coinvolgere la sintesi di proteine, questo suggerisce che si rigenerano con elevata velocità ristabilendo l'equilibrio iniziale. Non sono disponibili informazioni sul tempo di ripristino dell'integrità funzionale della superficie oculare, ma la maturità di questa barriera attorno al tempo di desquamazione determinerà la diminuzione di permeabilità e l'esclusione dei coloranti.

Un glicocalice maturo contribuisce alla permeabilità caratteristica della superficie. Se venissero a mancare le mucine dei glicocalici sull'epitelio corneale, questo potrebbe favorire l'assorbimento dei coloranti nelle cellule in divisione. La presenza di un glicocalice completo sulla superficie apicale delle cellule migranti, insieme alla funzionalità delle giunzioni strette, è necessaria per escludere i coloranti dagli strati cellulari più profondi. Inoltre, in uno studio di Hazlett e Mathieu del 1989 condotto sui ratti, che la continuità della barriera dei glicocalici, presente nei giovani, viene persa in età avanzata o comunque subisce delle

modifiche, riducendo la sua funzionalità.

Durante la desquamazione dunque, oltre alla perdita delle cellule che entrano nello stadio terminale della differenziazione, si ha la perdita dei legami tra le cellule mediati dalle giunzioni strette e aderenti e consecutivamente anche dei glicocalici superficiali.

Riassumendo una volta sostituite le cellule desquamate, ripristinati i glicocalici presenti e la barriera fornita dalle giunzioni strette, viene a sua volta ristabilita una permeabilità selettiva nella cornea che permette di escludere da questa i coloranti

METABOLISMO EPITELIALE

Le cellule dell'epitelio corneale contengono una ricca fornitura di organelli tra cui nuclei, l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico e piccoli mitocondri sparsi. Nell'occhio aperto, la superficie oculare è esposta all'ossigeno atmosferico a una pressione di circa 150 mmHg e nell'occhio chiuso la fornitura di ossigeno giunge dalla vascolarizzazione della congiuntiva tarsale, l'esposizione di ossigeno cade a 61,5 mmHg.

Il metabolismo corneale, data l'avascolarizzazione della cornea, giunge dal film lacrimale, dal limbus, dove sono presenti sia vasi linfatici che sanguigni, e infine dagli strati sottostanti l'epitelio. Il metabolismo è principalmente aerobico e l'energia prodotta in forma di ATP è usata per guidare numerosi processi, incluse le pompe ioniche. C'è una pompa esterna del cloro e una pompa interna del sodio. Alcune evidenze per il trasporto attivo di fluoresceina sono state segnalate nelle cellule epiteliali corneali. (Bakkar e al., 2014).

COLORAZIONI CELLULARI IN RELAZIONE AL LORO STATO FISIOLOGICO

Alcuni studi hanno affrontato il meccanismo preciso alla base della interazione della fluoresceina con il tessuto corneale. Possibili eziologie includono: il movimento della fluoresceina negli spazi extra-cellulari dell'epitelio corneale come Feenstra e Kikkawa tra il 1972 e il 1992; accumulo di fluoresceina nelle lacune o depressioni sulla superficie epiteliale come Norn nel 1970; l'attaccamento alla superficie dell'epitelio corneale; l'assorbimento da parte delle cellule epiteliali come Wilson, che confermò questa ipotesi, proponendo che l'assorbimento della fluoresceina fosse secondario a un danneggiamento cellulare, come fu prima suggerito da Tabery. Tuttavia, la correlazione tra lo staining fluoresceinico e le cellule danneggiate non è dimostrato. Rimane sconosciuta la localizzazione subcellulare della fluoresceina e se l'entrata di questa nelle cellule si verifichi in tutte le forme di staining. Inoltre, rimane sconosciuta se l'entrata dipenda dalla temperatura e dal tempo.

Bakkar e al. Nella loro ricerca hanno usato cellule epiteliali e fibroblasti per investigare i meccanismi biologici fondamentali responsabili dell'iperfluorescenza nelle cellule, per aiutare ad approfondire la nostra conoscenza su questo fenomeno. Confermarono che non esiste una associazione tra le cellule iperfluorescenti e le cellule morte, quindi conclusero che la fluoresceina non è un semplice marcatore biologico per l'ultimo stadio delle cellule morte, ma almeno per altri due diversi tipi di cellule: quelle vive e quelle danneggiate. Inoltre, trovarono che l'assorbimento di fluoresceina nelle cellule vive dipende da quanto esse siano intatte, cioè dall'integrità della membrana plasmatica che protegge la cellula e regola gli scambi per mantenere in equilibrio l'omeostasi. Hanno osservato che l'assorbimento e il rilascio di fluoresceina è profondamente influenzato dalla temperatura, indicando che questi processi coinvolgono il trasporto attivo nelle cellule. A sostegno di questo Cercek nel 1978 dimostrò che la fluoresceina si polarizza con la temperatura e che le cellule incubate a diverse temperature mostrano una variazione nei livelli di fluoresceina e fluorescenza.

Questi dati hanno ulteriormente avvalorato la loro scoperta riguardo al fatto che la fluoresceina è distribuita per tutta la cellula, ed è concentrata nelle cellule vive, e non si accumula preferibilmente nelle cellule lise o morte.

Ritengono che l'iperfluorescenza, che si riscontra durante l'osservazione, rifletta un non equilibrio tra l'assorbimento attivo e il processo di rilascio della fluoresceina. Non escludono comunque la possibilità che eventi avversi, come l'apoptosi, mostrino un' iperfluorescenza delle cellule. Questi eventi avversi devono mantenere l'integrità delle membrane per mostrare la fluorescenza e creano uno squilibrio in entrata e in uscita della razione di colorante.

Bakkar conclude affermando che i dati ottenuti dimostrano che un' iperfluorescenza puntata riflette cellule attive con membrane intatte, piuttosto che cellule morte con membrane lise.

Bandamwar e al. nel 2013 hanno effettuato una valutazione dello stato fisiologico delle cellule dell'epitelio corneale e hanno dimostrato che, l'osservazione di colorazioni corneali con la fluoresceina, suggerisce la presenza di cellule sull'epitelio che stanno andando incontro ad apoptosi o che hanno subito un cambiamento del loro stato fisiologico ma non cellule morte. Le cellule sane assorbono fluoresceina in quantità minori di quelle in apoptosi, per questo non sono percepibili durante l'analisi clinica. Quindi considerano la fluoresceina come il miglior strumento per identificare le cellule in apoptosi.

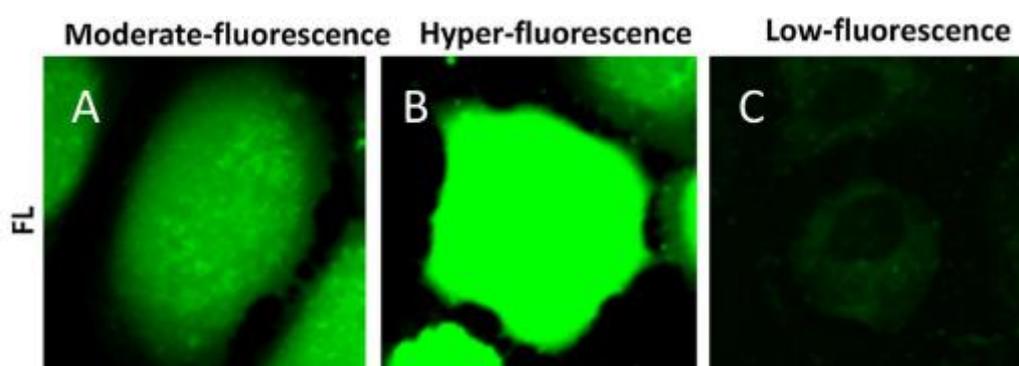


Figura 9. La foto mostra la fluorescenza delle cellule dopo l'instillazione di Fluoresceina sodica. A) mostra la fluorescenza nelle cellule sane B) cellule in apoptosi, C) morte. (Bandamwar e al. 2013)

Fino ad ora si è pensato che un epitelio sano e normale garantisce l'esclusione

della fluoresceina e che gli staining siano assenti dalle superfici corneali completamente sane, ma i dati presentati indicano che questo è probabilmente incorretto. Secondo Bandamwar, quando un operatore sta visionando lo stato della superficie corneale dopo aver instillato fluoresceina e non riscontra nessuna colorazione, in realtà non sta guardando un occhio privo di staining ma un occhio con una colorazione omogenea data dalla presenza di cellule sane che emanano una intensità di fluorescenza moderata. Nonostante il fatto che le cellule sane siano più luminose dello sfondo, la mancanza di un riferimento per fornire contrasto conduce alla percezione di un buio uniforme. Inoltre, afferma che l'osservazione della fluorescenza delle cellule sane può essere affetta dai limiti della lampada a fessura per l'osservazione di livelli più bassi di fluorescenza, come detto precedentemente. Quando una cellula diventa visibile, è perché in primo luogo mostra una iperfluorescenza e in secondo luogo è più luminosa di quelle vicine. Sembra ragionevole suggerire che i medici possono interpretare queste regioni vivacemente fluorescenti, come un indice che qualche stimolo sufficientemente stressante o danneggiante ha portato le componenti delle cellule sulla strada per l'apoptosi.

Quindi, ciò che noi chiamiamo staining fluoresceinico in realtà rappresenta una iperfluorescenza rispetto ad uno sfondo moderatamente fluorescente e può essere utilizzato per indicare l'inizio di apoptosi nelle cellule colpite.

La presenza di bassi livelli, micropuntati staining in popolazioni che non indossano lenti a contatto, che sono sani e normali, può essere anche compreso in questi termini come evidenza dell'apoptosi delle cellule epiteliali come parti di un ricambio cellulare regolare.

Le cellule morte, invece, se sono visibili, lo sono perché appaiono più scure rispetto alle cellule circostanti, che mostrano una moderata fluorescenza.

L'apoptosi oltre che al normale ricambio cellulare può essere indotta da condizioni di stress sia meccaniche che dovute ad un metabolismo errato della cellula. Questo mantiene le membrane delle cellule intatte e fa sì che queste in presenza di fluoresceina sodica diventino iperfluorescenti. Le cellule in presenza di stress sembrano mostrare infatti, un aumento dello staining corneale rispetto alle cellule di controllo utilizzate negli studi.

L'esposizione delle cellule ad ambienti ipotonici, ipertonici e a conservanti

oftalmici ha portato come risultato una colorazione diffusa mentre l'esposizione delle cellule a stress meccanici e alcalini mostra dei punti fluorescenti attorno ai bordi della ferita.

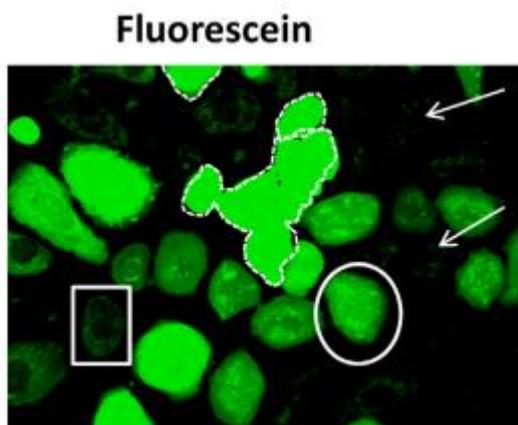


Figura 10. Confronto e analisi in vitro della colorazione delle cellule nei vari stadi fisiologici con Fluoresceina sodica. (Bandamwar e al. 2013)

METODI E STRUMENTI

Come detto precedentemente, anche nei non portatori di lenti a contatto è possibile riscontrare staining corneali, indici di una sofferenza delle cellule dell'epitelio corneale di eziologia incerta. Per verificare questo, sono stati analizzati 22 occhi di soggetti non portatori di lenti a contatto (11 persone di cui 6 donne e 5 uomini) di età compresa tra i 15 e i 70 anni. Ai soggetti è stata condotta un'anamnesi approfondita per indagare eventuali problemi sulla loro salute generale, che implichi l'uso di farmaci regolarmente. Sulla salute oculare e su eventuali interventi chirurgici, oltre che sulla presenza di sintomi di secchezza: bruciore, sensazione di corpo estraneo, lacrimazione eccessiva, pesantezza oculare, sensibilità alla luce, prurito, rossore oculare e secrezioni eccessive di muco e grasso. Ai soggetti è stata chiesta, inoltre, l'occupazione e la media giornaliera d'uso del computer. Gli ambienti più frequentati: ambienti dove sono presenti polveri, raggi UV, sostanza chimiche, riscaldamento, aria condizionata; lo sport praticato e la frequenza. Infine, se fossero fumatori o meno.

Successivamente, i soggetti sono stati sottoposti ai test sulla lacrimazione, qualitativi e quantitativi, per riscontrare se presentassero delle insufficienze nella secrezione dei vari strati componenti e delle irregolarità nella produzione e distribuzione del film lacrimale. I test effettuati sono: la dinamica lacrimale, il prisma lacrimale, la valutazione della componente lipidica tramite il lacrimoscopio EasyTear Wiev, il Break Up Time (BUT) tramite l'uso di fluoresceina sodica all'1% e infine, il verde di lissamina per evidenziare la presenza di cellule morte.

A tutti i soggetti, dopo l'instillazione di fluoresceina, è stata osservata la cornea per indagare la presenza di eventuali staining corneali.

A cinque soggetti di undici non sono state rilevate colorazioni evidenti, i soggetti presentavano una cornea uniformemente colorata di verde scuro. Mentre, ai restanti soggetti sono stati rilevati e fotografati staining di varia natura e specie. Le colorazioni trovate sono state analizzate per indagarne l' eziologia, ma soprattutto per vedere se confermano le teorie e osservazioni precedentemente

discusse degli studi analizzati. In particolare, si vuole verificare la natura della fluorescenza e da cosa possa essere influenzata.

Lo studio condotto nasce anche, per far capire l'importanza di una attenta analisi durante la fase pre-applicativa delle lenti a contatto, utile per identificare i portatori idonei. Lo studio degli staining corneali è finalizzato a capire se determinati tipi possano indicare una sofferenza o se ci possa essere una componente fisiologica, quindi che lo staining non mi indichi una sofferenza ma solo un normale ricambio cellulare dell'epitelio.

Il lacrimoscopio Easytear®view è uno strumento oftalmico d'indagine specifico, sviluppato e ottimizzato per facilitare l'osservazione del segmento anteriore dell'occhio umano in modo non invasivo. La peculiarità del lacrimoscopio è avere la più ampia riflessione corneale e di generare fasci di luce estremamente omogenei minimizzando la formazione di zone d'ombra.

Include i principali test per valutare e diagnosticare le problematiche dell'occhio secco e permette di consigliare in modo mirato l'utilizzo di una specifica lacrima artificiale o di un integratore.

Per merito di un innovativo sistema ottico di dispersione della luce garantisce una resa cromatica costante e calibrata per minimizzare qualsiasi alterazione ed essiccazione del film lacrimale durante l'esame. Utilizza tre sorgenti specifiche di luce led modulabile tarata per non abbagliare l'occhio del paziente.

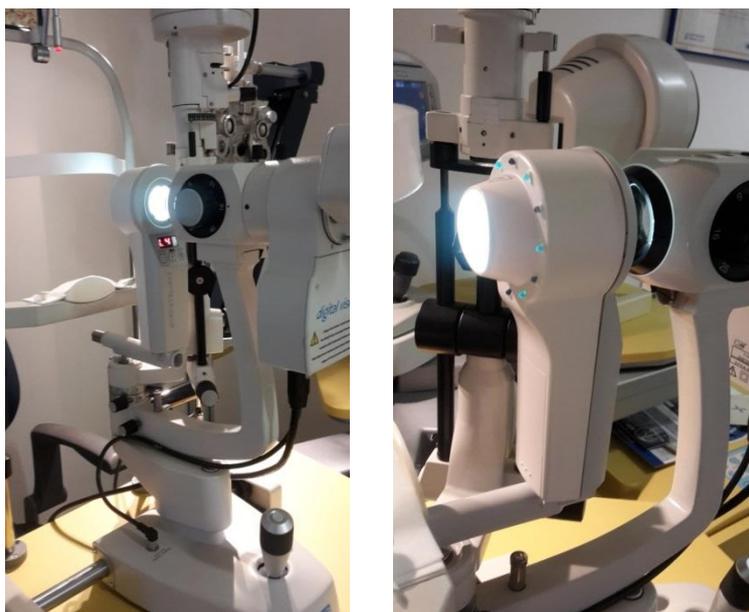


Figura 11. EasyTear View su lampada a fessura

ANALISI STAINING RILEVATI

La possibilità di analizzare soggetti di varie età, dai più giovani ai più anziani, ha permesso di evidenziare se ci possa essere una correlazione legata all'età. Come detto precedentemente, nello studio di Schwallie e al. (1997) , i soggetti giovani sembrano presentare minori colorazioni di soggetti anziani.

Tra i soggetti analizzati, i soggetti giovani hanno mostrato pochi o non percepibili colorazioni, con basse intensità di fluoresceina. Mentre i soggetti dai 40 anni in su hanno mostrato staining diffusi in più zone della cornea di varia eziologia, difficilmente riconducibile a una normale degenerazione cellulare ma più facilmente, legata a micro traumi legati a corpi estranei, secchezza oculare legata a disfunzioni dell'attività secretiva della lacrimazione.

Cinque soggetti di età compresa tra i 14 e i 23 anni non hanno mostrato colorazioni di particolare rilevanza o riconducibili a cambi fisiologici cellulari. Non è stato possibile notare la presenza di colorazioni legate a cellule in apoptosi o micro punteggiature presenti nell'area infero-nasale.

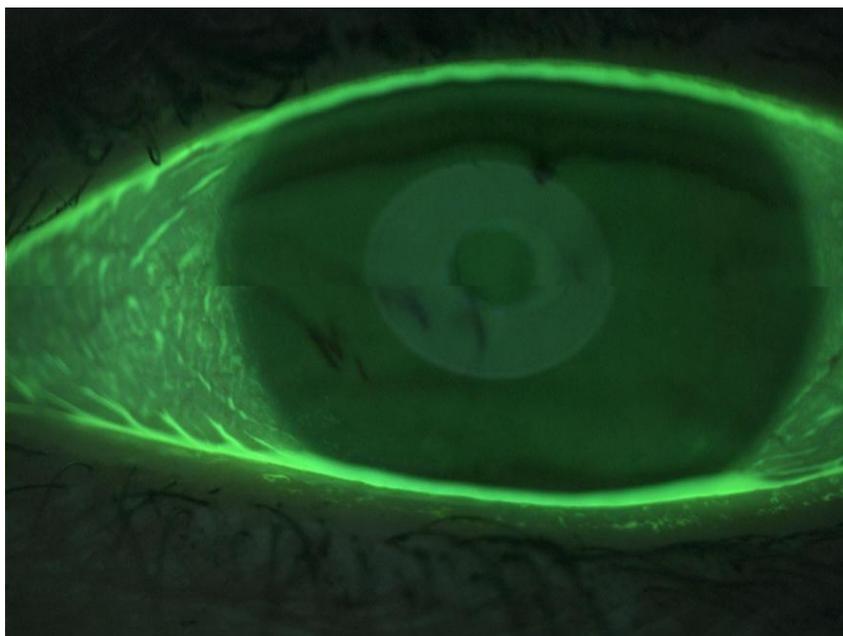


Figura 12. La foto mostra una leggera colorazione micropuntata nella zona inferonasale, riconducibile a quella degli studi di Schwallie e al.

Questo tipo di punteggiatura è stata diagnosticata in più soggetti. Questa colorazione era concorde con gli studi di Schwallie e di Norn, Josephson and Caffery e non sempre riscontrabile in entrambi gli occhi dei soggetti. Come suggerito dai loro studi, questo tipo di colorazione nella zona infero-nasale potrebbe essere legata alla via di deflusso lacrimale o alla rimozione di eventuali corpuscoli tramite questa, che hanno lasciato un'impronta. Inoltre, si può supporre sia legata all'attività mitotica cellulare più attiva nella periferia della cornea.

Queste colorazioni sono state difficili da evidenziare, poiché risultavano di bassa intensità rispetto al background. Si può ipotizzare, che gli strumenti in nostro possesso non abbiano qualità tecniche sufficienti ad evidenziare questi staining. Considerando i fattori che influenzano l'intensità della colorazione della fluoresceina, probabilmente, la sua concentrazione all'1 % e la lampada a fessura, che produce una lunghezza d'onda pari a 450 nm, inferiore a quella che permette al colorante di raggiungere la sua massima emissione ed intensità, hanno reso difficile l'identificazione di queste.

Si è notato, che in soggetti dove non si presentano o non è possibile rilevare gli staining la colorazione generale dell'occhio con la fluoresceina è molto scura. La fluoresceina si lega alla componente acquosa del film lacrimale e viene portata verso il puntino lacrimale, dopo un po' di tempo dall'instillazione è possibile analizzare la cornea senza confondere le colorazioni presenti con accumuli di colorante nella lacrimazione. Passato questo tempo, nei soggetti non era possibile percepire una fluorescenza di intensità rilevante. Sono state avanzate molteplici ipotesi riguardo questo: in primo luogo che il tempo di esposizione del colorante nell'occhio non fosse sufficiente a imprimersi sull'epitelio corneale ma fosse defluito insieme alla lacrimazione; in secondo luogo, che la cornea realmente presentasse una cornea integra, con una fitta rete di giunzioni strette che interpolassero le cellule e un'abbondante presenza di cellule caliciformi complete sulle cellule che, rendessero impermeabile la cornea al colorante.

Rispetto allo studio condotto da Bakkar nel 2014 e da Bandamwar del 2013 nel quale dimostrano che le cellule epiteliali corneali, assorbono una parte del colorante mediante trasporto attivo, attivato dalla temperatura; possiamo dire che quello che vediamo e interpretiamo come una mancanza di colorazione delle cellule da parte della fluoresceina in realtà, rappresenti un assorbimento del

colorante da parte di queste in quantità minime, poiché le cellule non sono danneggiate o in apoptosi, e che formino un background uniforme, che non avendo una misura di contrasto ci appare scuro e uniforme. Inoltre, essendo le cellule in uno stato di equilibrio, la quantità di fluoresceina che entra è equivalente a quella che esce, mantenendo l'omeostasi della cellula. Purtroppo gli studi a supporto di questa teoria sono stati effettuati in vitro e su cornee di animali quindi, non si può affermare con sicurezza che la stessa cosa avvenga sulle cornee umane e l'analisi sui pazienti fatta non può confermarlo.

Gli staining rilevati in questi soggetti sono legati principalmente a eziologie meccaniche.

Ad esempio, una ragazza di 20 anni, studente, che non ha evidenziato peculiarità significative con l'anamnesi, è stata sottoposta ai test per verificare se idonea all'uso di lenti a contatto.

Durante l'esame, il soggetto mostrava un ammiccamento incompleto con una buona frequenza di circa 12-15 volte al minuto. L'evaporazione del film lacrimale, senza alterare la sua condizione di normalità, cioè senza chiedere al soggetto di controllare l'ammiccamento, non avveniva tra un ammiccamento e l'altro. La lacrimazione presenta una abbondante componente lipidica e non sono presenti anomalie nelle palpebre superiore ed inferiore.

Dopo aver instillato la fluoresceina, appena la colorazione del film lacrimale si era ridotta, si è potuto osservare, sia nell'occhio destro che in quello sinistro, due graffi dai bordi definiti, nell'area superiore della cornea.

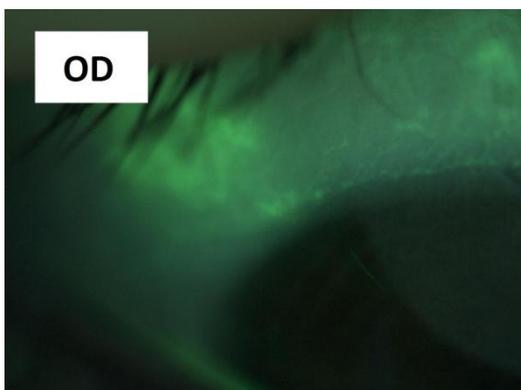


Figura 11. A) Staining area superiore della cornea dell'occhio destro. Si presenta a bordi netti, lineare tipo un graffio da corpo estraneo.

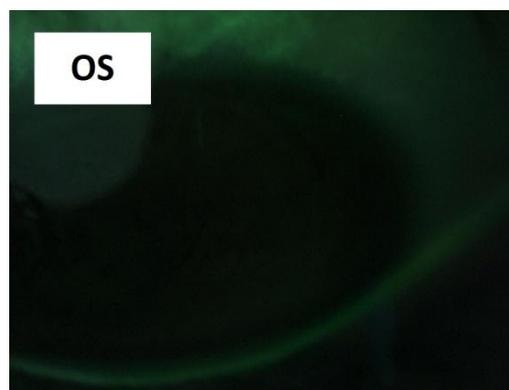


Figura 13. B) Staining area superiore occhio sinistro. si presenta a bordi netti, lineare tipo un graffio da corpo estraneo.

Lo staining presentato appare lineare in termini di forma, dai contorni definiti, in termini di profondità incide solo l'epitelio superficiale, infine in termini di intensità si può definire localizzato. Per approfondire la causa, era stato chiesto al soggetto se avesse avvertito una sensazione di corpo estraneo nell'arco della giornata, ma niente. Erano state osservate le ciglia per valutare se alcune fossero dirette verso il bulbo oculare ma, apparivano regolari. La colorazione dunque era asintomatica, il soggetto non percepiva nessun fastidio o bruciore o prurito.

Si è ipotizzata, allora, la presenza di granuli di polvere o corpuscoli, che potessero aver graffiato la zona con il contributo della pressione esercitata della palpebra.

Si è esclusa la possibilità, che il graffio potesse essere stato causato da prodotti per il trucco, come il pennino del mascara, poiché la colorazione non appariva diffusa ad altre aree della cornea né mostrava un disegno irregolare, né appariva come uno sfregamento.

Quello che lascia perplessi è la quasi corrispondenza della colorazione nei due occhi, entrambi si presentavano nella zona superiore più temporalmente.

Il soggetto è stato rivisto a distanza di una settimana per escludere una frizione meccanica continua sulla zona interessata e come ci si aspettava non è stata più registrata nessuna colorazione. I due graffi in questione si erano risolti e le cellule danneggiate dell'epitelio erano state sostituite grazie al ricambio settimanale delle cellule dell'epitelio (Hanna e O'Brien, 1960; Hanna et al., 1961).

Altri staining, sono stati riconducibili all'uso di farmaci o causati da componenti chimiche.

Il soggetto, 14 anni femmina, affetta da emicranie, assume regolarmente anticonvulsivanti (antiepilettici) e antidolorifici per tenere controllati gli attacchi e il dolore. A livello oculare, ha avuto qualche congiuntivite negli anni.

Gli antinfiammatori possono causare in rari casi erosioni corneali e cheratiti come la colchicina nel trattamento della gotta; ed emorragie sottocongiuntivali come i FANS.

Il soggetto presentava una colorazione micropuntata diffusa e in termini di profondità sita nell'epitelio superficiale, soprattutto nelle aree inferiori della cornea e lungo tutta la periferia.

Questo staining, molto simile a quelli rilevati da Schwallie nel suo studio sui non portatori di lenti a contatto, in questo caso, più che avere una natura fisiologica legata all'attività mitotica presente alla periferia della cornea, sembra un'apoptosi cellulare causata da farmaci.

Questa colorazione potrebbe rappresentare un cambio dell'attività metabolica delle cellule, avviate dunque all'apoptosi o morte programmata, questo danneggiamento causa una perdita dei glicocalici superficiali, rendendo più permeabile ai coloranti la superficie epiteliale della cornea.

Data la grande somiglianza con gli staining riscontrati negli studi di Schwallie con una incidenza del 50 %, è possibile supporre che questo staining sia della stessa natura e quindi attribuibile al turnover epiteliale corneale.

La problematica saliente, nei non portatori di lenti a contatto quindi risulta essere la difficoltà nel trovare le cause specifiche che provocano questi pattern fluoresceinici. È possibile effettuare delle supposizioni sulla base dei test effettuati e sulle informazioni ricavate direttamente dal soggetto, ma rimane comunque difficile individuare un'unica causa, quando le colorazioni sono difficilmente attribuibili a uno dei quadri già conosciuti sino ad ora.

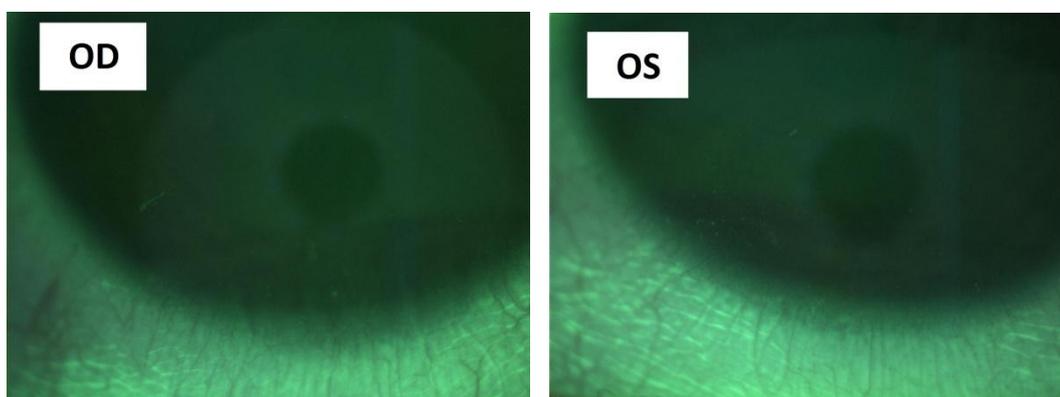


Figura 14. A) Staining corneale nell'area inferiore dell'occhio destro, sull'epitelio superficiale. si presenta sia a punti che lineare. B) Colorazione corneale nell'occhio sinistro, simile al destro, nella zona infero-nasale.

Le anamnesi condotte sui soggetti hanno permesso di evidenziare eventuali fattori ambientali, che potessero influenzare o causare gli staining. Nello studio di Schwallie è stato affermato che le variazioni delle colorazioni nell'arco della giornata e quelli che persistono per più di due giorni, in ugual misura, sono dati da

fattori esterni e legati all'ambiente circostante. Josephson and Caffery nel loro lavoro hanno concluso, che le colorazioni site nell'area infero-nasale risultavano simili anche dopo la notte, cioè la mattina con la minima influenza ambientale, stabilendo che questo non fosse la causa. Mentre, gli altri pattern fluoresceinici trovano una componente ambientale che definisce il quadro della colorazione.

Come ad esempio un soggetto di 40 anni, che ha lavorato per molti anni esposta ai raggi ultravioletti senza protezioni.

Non ha avuto traumi salienti oculari né soffre di patologie o assume farmaci. Utilizza il computer massimo due ore al giorno, frequenta ambienti con aria condizionata, riscaldamento e polveri.

Lamenta abbagliamento durante la guida notturna, molto probabilmente dato dal fatto, che non porta una correzione oftalmica per correggere il difetto visivo.

Durante l'esame in lampada a fessura, è stata rilevata una pinguecola nel canto interno dell'occhio destro (no vascolarizzazione, presente nella congiuntiva bulbare vicino al limbus, al limite della cornea). Non sono state evidenziate alterazioni della secrezione lacrimale.

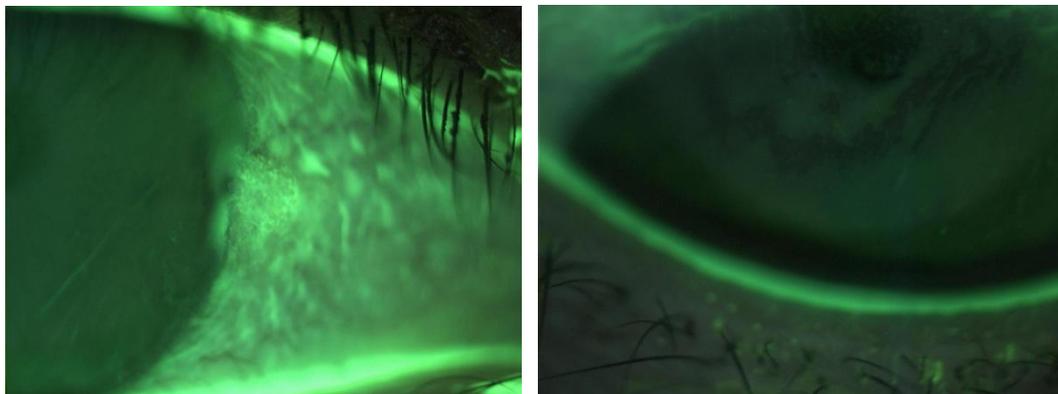


Figura 15. A) La foto mostra una pinguecola sulla congiuntiva dell'occhio destro, nel canto interno. inoltre, sono visibili dei graffi corneali e una leggera punteggiatura. B) La foto evidenzia la presenza di colorazioni corneali anche nella zona superiore

La pinguecola si colora sia con la fluoresceina sodica che con il verde di lissamina mostrando sia cellule danneggiate che morte.

Sulla cornea, nella zona nasale, sono presenti delle zone circoscritte fluorescenti, lineari a bordi netti. Non è presente diffusione del colorante negli strati sottostanti,

quindi, si presume siano poche e profonde limitate alla superficie. Inoltre, sono presenti delle micropunteggiature e delle piccole abrasioni superficiali simili a delle impronte nella zona infero-nasale.

Nella zona superiore, sono stati evidenziati altri pattern lineari a bordi netti e altri più estesi tipo piccola chiazza.

Data la lunga esposizione alle radiazioni ultraviolette accumulate negli anni dal soggetto, si può pensare, che parte delle colorazioni siano dovute a queste.

Mentre, gli staining nella zona superiore, sembrano avere eziologia meccanica. Dopo aver eseguito il verde di lissamina, che non ha evidenziato la presenza di cellule morte, follicoli o papille o zone che possano creare una pressione costante sulla cornea, creando la sofferenza delle cellule dell'epitelio, si è esclusa una azione meccanica a carico delle palpebre superiore ed inferiore.

I graffi sembrano causati da uno sfregamento da corpi estranei o detriti di piccole dimensioni o dalle setole del mascara, che hanno creato delle microabrasioni asintomatiche sull'occhio del soggetto.

Il graffio presente nella zona nasale della cornea appare simile alle abrasioni create da residui intrappolati sotto le lenti a contatto rigide. Ovviamente anche questo ha natura meccanica.

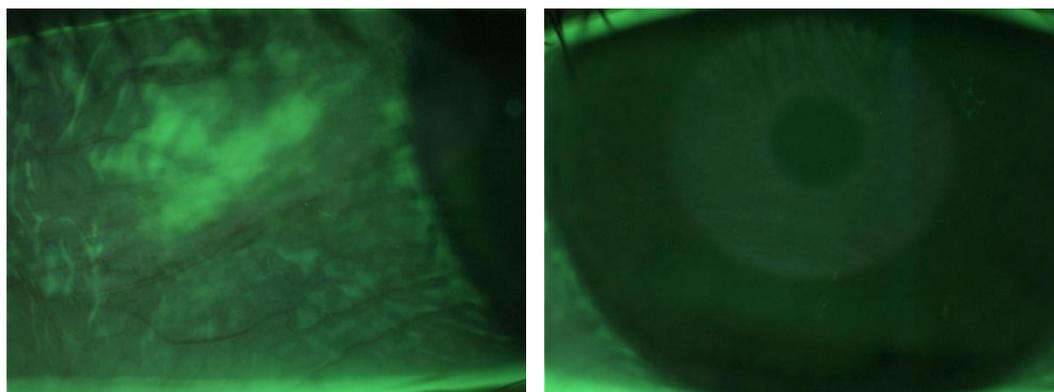


Figura 16. A) Colorazione corneale nella congiuntiva, nel canto interno dell'occhio sinistro. B) Staining corneali presenti in varie zone della cornea di probabile natura meccanica.

Nell'occhio sinistro, invece, nella zona nasale della congiuntiva è stata evidenziata una sofferenza in termini di intensità diffusa, a macchia in termini di forma e

superficiale.

Nella zona inferiore della cornea sono state evidenziate colorazioni di piccole dimensioni a forma circolare, nella zona infero-nasale una micro-punteggiatura e nella zona superiore uno staining a forma arcuata, che si distende in forma irregolare quasi da bordo a bordo, a bordi netti, superficiale.

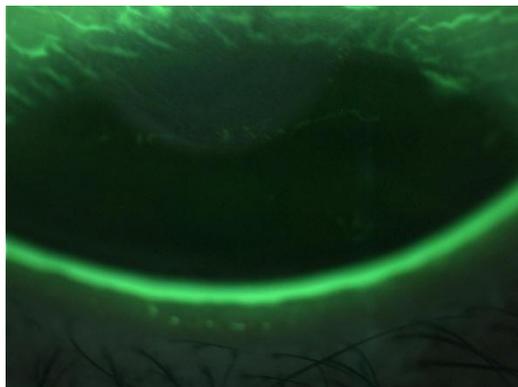


Figura 17. Colorazione corneale arcuato superiore, esteso, di natura dubbia.

Come per l'occhio destro, si presume che ci possa essere una causa legata all'esposizione ai raggi ultravioletti che abbia creato un danneggiamento delle cellule epiteliali. Il turnover cellulare risulta essere influenzato da eventi come l'esposizione agli UV, aumentando la velocità della degenerazione e la muta.

Inoltre, per lo staining arcuato superiore (vedi foto sovrastante) si è esclusa una azione palpebrale. E' stato effettuato il test con il verde di lissamina, per evidenziare un' eventuale sofferenza ma la rugosità, la colorazione e il bordo non hanno presentato niente di rilevante.

Si è ipotizzato, anche in questo caso, che la colorazione fosse provocata dalle setole degli strumenti utilizzati per il trucco.

Rielaborando i vari studi presenti in letteratura sull'uso della fluoresceina nella pratica clinica, si può, senza ombra di dubbio, affermare che questa, colora solo cellule danneggiate o sofferenti, avviate alla morte programmata o l'assenza di queste in termini di lacuna lasciata dalla cellula che si riempie con il colorante legato alla componente acquosa.

Può il tessuto esposto a lungo tempo ai raggi solari, subire un danneggiamento

tale da indurre le cellule alla morte programmata e ridurre le cellule caliciformi sulla superficie, rendendo meno efficaci anche le giunzioni strette, portando la cornea, precocemente, ad un ricambio cellulare, mostrando queste zone fluorescenti anche a distanza di anni dall'esposizione? Quindi, si può instaurare un processo irreversibile che, continua a indurre le cellule all'apoptosi o a distanza di tempo le cellule possono ristabilire la loro normale funzionalità? Quindi è possibile che ciò che vediamo quando andiamo a instillare fluoresceina sia causato dai raggi ultravioletti o trovi la sua origine in altre cause?

Risulta nuovamente evidente la difficoltà e la varietà di cause che si può attribuire a ogni colorazione e come, di conseguenza, possa risultare difficile discriminare a priori soggetti idonei al porto di lenti a contatto.

Altro caso particolare, che può rientrare nei casi di pattern fluoresceinici causati da un impatto ambientale, è uomo di 56 anni, ora pensionato, che ha lavorato come saldatore nel campo della lavorazione della vetroresina. Il soggetto, dunque, è stato esposto a luci incandescenti, ad alte temperature e polveri e residui dei materiali lavorati.

A livello di salute generale, soffre di ipertensione a causa della quale assume farmaci regolarmente e anche per il cuore. L'uso di questi farmaci ha tra le varie controindicazioni: la comparsa di congiuntiviti e una lacrimazione bassa, dovuta all'idroclorotiazide, che causa anomalie idroelettrolitiche, riduzione del volume extracellulare e una perdita di acqua (disidratazione), che può avere effetti a livello della lacrimazione, creando secchezza o cambi nel metabolismo cellulare oltre che ad altri organi come ai reni e all'apparato gastrointestinale.

A livello oculare, non ha avuto congiuntiviti o traumi. È fumatore e usa poco il computer, perchè dopo un'ora inizia a lacrimare. Non lamenta sintomi legati alla secchezza oculare, ma già dall'anamnesi si può ipotizzare che vi possano essere dato anche l'uso del farmaco in questione.

Durante l'esame in lampada a fessura si è riscontrato uno strato lipidico molto sottile e una rapida evaporazione mediante il test del Break Up Time.

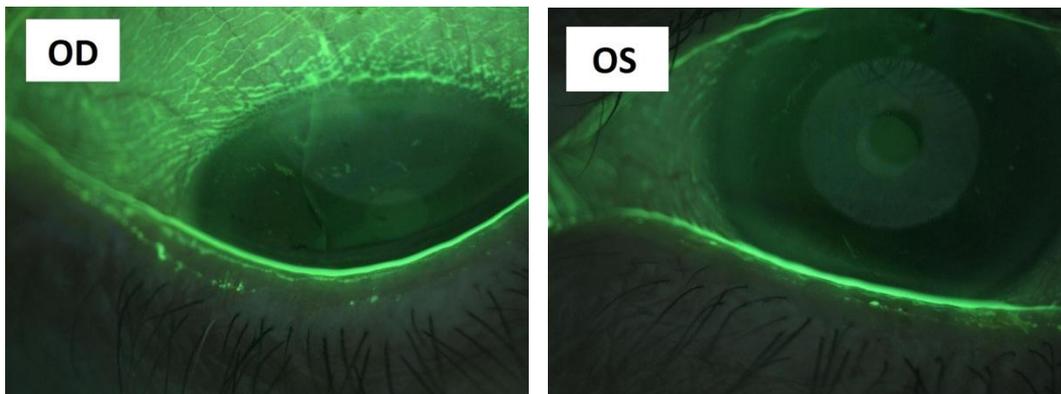


Figura 18. A) Sofferenza corneale evidenziata nella zona superiore dell'occhio destro, indice di secchezza oculare. B) Colorazioni diffuse anche nell'occhio sinistro di varia eziologia.

Nell'occhio destro è evidente una colorazione da secchezza oculare, confermata anche dalla carenza di secrezione della componente lipidica, forse legata anche a una degenerazione o chiusura delle Ghiandole di Meibomio.

Nell'occhio sinistro, invece, si è rilevata una particolare colorazione nella zona nasale-superiore della cornea, ramificata, con andamento lineare un po' arcuato, vicino ad altre colorazioni di simile aspetto. Queste assomigliano a degli infiltrati o a delle piccole abrasioni superficiali, che non superano lo strato apicale dell'epitelio corneale. Assomigliano anche allo staining del raggrinzimento corneale; in questo caso si è esclusa una sofferenza data da secchezza poiché la forma non rispecchia questo pattern. Il resto dei soggetti non hanno presentato colorazioni, nonostante in alcuni soggetti i test abbiano mostrato alterazioni nella distribuzione dovuti ad ammiccamenti incompleti o anomalie.

DISCUSSIONE

Questa rivisitazione sulla letteratura, che concerne lo studio degli staining corneali, supportato dal piccolo esperimento condotto sui nostri pazienti, ci ha permesso di chiarire alcuni punti chiave.

Il primo, tra questi, è che l'interazione che avviene tra la fluoresceina e l'epitelio corneale sembra non avere una sola spiegazione ma essere il risultato di un insieme di eventi.

Molti ricercatori affermano che la fluoresceina colora la mancanza di cellule: una volta che l'epitelio corneale perde una cellula lascia una lacuna, che si riempie di fluoresceina, evidenziando così l'anomalia presente sull'epitelio corneale.

Altri, invece, ritengono che il colorante evidenzia cellule danneggiate ossia, quelle cellule che hanno subito un cambiamento della loro omeostasi, del loro metabolismo o della loro permeabilità; inoltre, evidenzia anche nelle zone dove le giunzioni strette si sono indebolite a causa di rotture nei legami o da deformazioni della struttura.

In questi casi, la diffusione del colorante aumenta grazie alla mancanza dei glicocalici sulla superficie, aumentando così la permeabilità dello strato epiteliale, rendendo più facile il passaggio dei coloranti.

Infine, Bakkar e Bron (2014) supportano l'idea che le cellule epiteliali assorbano la fluoresceina e che queste si colorino quando si crea uno squilibrio tra la fluoresceina assorbita e quella rilasciata dalle cellule. Questo avviene tramite un trasporto attivo, che si avvia attraverso i cambiamenti di temperatura che polarizzano la fluoresceina permettendone il passaggio.

Dunque, secondo questa teoria, la fluoresceina non entrerebbe solo nelle cellule danneggiate ma anche nelle cellule sane e in tutte quelle cellule che presentano una membrana plasmatica integra. Nel momento in cui la membrana non è più integra, la cellula va incontro alla lisi e muore e non si colora più con la fluoresceina ma con altri coloranti come il Rosa Bengala o il Verde di Lissamina.

Le cellule morte creano così, nel quadro generale, dei buchi o delle assenze di colore poiché, ai nostri occhi restano delle zone scure.

Come è stato sottolineato in precedenza, le cellule vive della cornea si colorerebbero tutte, creando un background uniformemente colorato, che agli operatori appare scuro, che senza iperfluorescenze come metro di paragone sembra in realtà non colorarsi.

Le iperfluorescenze rappresentano le cellule in apoptosi, queste si colorano con un' intensità maggiore rispetto alle restanti, creando poi quelli che noi andiamo a definire come pattern fluoresceinici.

La domanda che ci si pone ora, è se questo processo sia realmente possibile, poiché i tempi di esposizione del colorante sulla superficie oculare sono ridotti a causa della protezione instaurata con la lacrimazione. Questa barriera, fornita soprattutto dai glicocalici, mediano l'esclusione del colorante dalla cornea.

Dal momento in cui la fluoresceina viene instillata nell'occhio, essa si distribuisce grazie all'ammiccamento a tutto il segmento esterno. La fluoresceina, legandosi alla parte acquosa, colora sia il film lacrimale che le zone sofferenti. Dunque, nel caso in cui l'epitelio sia integro, risulta difficile accettare l'idea che il colorante riesca a superare questa barriera e raggiungere le cellule, dove viene poi assorbito. Inoltre, importanti risultano anche i tempi di esposizione della superficie al colorante e il tempo necessario perché questo venga assorbito. Riescono le cellule ad assorbire il colorante prima che questo venga espulso dall'occhio attraverso la via di deflusso del film lacrimale e per diffusione attraverso la congiuntiva? Bakkar ha assunto che il trasporto attivo viene messo in azione dalla temperatura; la nostra cornea, che si trova a una temperatura di 36°-37°C più o meno costante, riesce ad attivare questi canali?

Gli esperimenti condotti su questa teoria sono stati svolti in laboratorio in vitro e in vivo o su altri organi, che potessero simulare i tessuti oculari umani, o su cornee di animali, ma è possibile assumere o aspettarsi che questi comportamenti siano simili o uguali anche sulla cornea umana?

Quindi, al momento, non potendo rispondere a queste domande e dovendo attendere studi futuri, si ritiene parzialmente attendibile questa teoria e si supporta di più l'idea che questi staining nascano dalla coincidenza di tutte queste teoria e non che una possa escludere l'altra.

Le cellule danneggiate, dunque, assorbono parte della fluoresceina, grazie alla variazione di metabolismo e di stasi cellulare, ma rimane ancora difficile accettare l'idea che questo possa avvenire anche nelle cellule sane dove non sono presenti cambiamenti; o almeno, questi meccanismi restano ancora oscuri e incomprensibili.

Assumendo questa teoria, in ogni caso, potrebbe forse cambiare il nostro modo di valutare e comprendere le colorazioni che si presentano durante un'analisi.

Non sempre quello che si vede è quello che si crede: non necessariamente questi staining rappresentano un indice di sofferenza ma possono essere, più semplicemente, turnover epiteliali e cambiamenti fisiologici legati all'età o all'ambiente in cui si vive.

L'interazione tra cornea e fluoresceina è ancora un processo non del tutto chiaro, ma si può presumere che avvenga in più forme, che possono variare in funzione della causa che le scatena e non si può dire che solo una di queste sia valida o si presenti isolatamente, ma che l'insieme di queste potrebbe definire e descrivere approfonditamente questi fenomeni.

Altro punto cardine da sottolineare è lo stato fisiologico delle cellule, che viene evidenziato con le micropunteggiature nella zona periferica della cornea e in particolar modo in quella infero-nasale.

Schwallye ha affermato che queste possono descrivere l'attività mitotica presente nella periferia, poiché qui sono presenti le cellule staminali del limbus.

L'attività mitotica è presente alla base dello strato epiteliale, dove sono presenti le cellule basali, quindi a una distanza di 30-50 μm dalla superficie, ma mano che le cellule si differenziano affiorano in superficie. Quando queste giungono in superficie, perdono la loro capacità di differenziarsi quindi, nella porzione corneale, le cellule che si colorano sono, teoricamente, cellule già mature e quindi risulta difficile affermare che, questo tipo di colorazione, possa evidenziare l'attività mitotica cellulare.

Intuitivamente, è più facile assumere l'idea che in presenza di un cambiamento fisiologico o nel caso della mancanza di cellule, si abbia questa colorazione micropuntata nella periferia.

Questa può essere, inoltre, facilmente ricollegata anche al deflusso della

lacrimazione, presente nel canto interno dell'occhio, precisamente nella rima palpebrale dove sono presenti i puntini lacrimali. Dunque, è possibile che, detriti o corpuscoli o piccoli granelli di polvere entrati a contatto con l'occhio, seguendo la via di deflusso abbiano lasciato delle impronte o piccole incisioni sulla cornea, causando il pattern fluoresceinico nell'area infero-nasale.

Questo tipo di colorazione, poiché di piccolissime dimensioni è parzialmente difficile da evidenziare, soprattutto con la fluoresceina all' 1%.

Negli studi di Bron e al., è consigliata la fluoresceina al 2%, perché la maggiore concentrazione più difficile da diluire, dà luogo a una colorazione più precisa, in quanto il colorante si imprime meglio nei tessuti e mostra le punteggiature più piccole più facilmente. Aumentano le percentuali di soggetti con staining e la quantità di punteggiatura, normalmente di difficile rilevazione. Resta dunque all'operatore discriminare, poi, quali staining sono indice di sofferenza e quali no.

I grafici sottostanti, mostrano come cambiano i risultati di diagnosi passando da una concentrazione allo 0,125% a quella all' 1%, su un campione di 411 cornee normali (non portatori di lenti a contatto o affetti da patologie che interessano il segmento anteriore dell'occhio).

Percent of corneas stained.

Age – years	0.125% fluorescein	1% fluorescein*
<40	4	70
40–49	13	67
50–59	20	82
60–69	19	83
≥70	22	40
All subjects	17%	73%

Tabella 2. La tabella mostra la percentuale di cornee con staining corneale rilevate, in funzione della concentrazione di Fluoresceina sodica (A. J. Bron, 2014)

Percent of normal corneas with stated number of stained microdots.

Dots per cornea	0.125% fluorescein	1% fluorescein*
Zero	83	27
1-4	9	16
5-9	4	2
10-24	3	4
25-99	1/2	0
100-999	1	16
> 1000	0	35

Tabella 3. La tabella mostra come con l'aumento della concentrazione di Fluoresceina sodica, aumenti la percentuale di soggetti con staining e aumentino anche le punteggiature rilevate, ossia siano più visibili all'operatore.

Nel primo grafico, è facile notare come le percentuali di soggetti con colorazioni si quadruplicano e nel secondo come il numero di punti evidenziati aumenti in presenza di staining coalescenti o rimanga più o meno costante nel caso di numeri bassi di punti colorati. Significativo, è che per cornee con zero punteggiatura con concentrazione allo 0,125% si ha un valore dell'83% mentre, con la fluoresceina all'1% diminuiscono fino al 27%. Questo dimostra come, una maggiore concentrazione permetta di evidenziare meglio i pattern fluoresceinici.

Non sono stati però presentati i grafici, con i quali, si possa statisticamente dimostrare che una concentrazione al 2% possa migliorare la diagnosi durante la pratica, ma si può supporre guardando la variazione dei dati in tabella che sia effettivamente così, senza che il colorante alteri la fisiologia cellulare.

La valutazione degli staining nella fase pre-applicativa delle lenti a contatto è molto importante. Infatti, un risultato accidentale, dello studio di Bron, ha evidenziato che i soggetti che presentavano staining, di varia natura, prima dell'uso delle lenti a contatto, successivamente, aumentavano il numero di punteggiatura corneale, suggerendo che la tendenza delle cornee normali a colorarsi è un valore predittivo sulla tolleranza di queste.

Più difficile è comprendere in quali casi sia possibile applicare lenti a contatto e se ci sono casi in cui si possa applicarle comunque e monitorare poi, successivamente, gli staining, variando i parametri di queste: materiale, raggio di curvatura, diametro, trasmissibilità di ossigeno (Dk/t), bagnabilità e molti altri.

Capire l'importanza di queste colorazioni e poterle classificare secondo scale quantitative e qualitative, basate su dati statistici e non con figure di

comparazione, aiuterebbe gli operatori a comprenderle e discriminare tra buoni portatori di lenti a contatto e non, per prevenire in ogni modo possibile il Drop out.

Gli staining rilevati su cornee normali sono difficili da collocare tra i pattern già conosciuti, di conseguenza, è difficile comprenderne la natura e definire se possono rispecchiare, come già detto, turnover epiteliali, cambiamenti fisiologici o sofferenze non compatibili con l'uso delle lenti a contatto.

Utile, dunque, sembra essere il monitoraggio dei cambiamenti della superficie oculare dopo l'applicazione e procedere settimanalmente, poiché ogni 4,2 giorni avviene anche il ricambio cellulare (Schwallie e al., 1997), in modo da escludere punteggiature fuorvianti e concentrarsi su quelle che definiscono effettivamente una condizione patologica o di effettiva sofferenza.

Riassumendo, l'uso della fluoresceina nella fase pre-applicativa, se non viene utilizzata per la valutazione dello spessore dello strato acquoso del film lacrimale o dell'evaporazione dello stesso, risulta essere essenziale per evidenziare condizioni, che molto spesso vengono trascurate.

Si vuole ribadire che è di fondamentale importanza, poter lavorare con la fluoresceina ad una concentrazione del 2% e testare effettivamente la sua funzionalità.

In Italia, questa, rientra tra i farmaci di fascia H, ossia farmaci ad uso esclusivamente ospedaliero e non vendibili in farmacia, dunque questo farmaco è ad uso esclusivo degli oculisti o dei contattologi, che lavorano nelle strutture ospedaliere (da: supplemento ordinario alla "gazzetta ufficiale " n.306 del 31-12-1993 provvedimento 30 dicembre 1993: riclassificazione dei medicinali ai sensi dell'art. 8, comma 10, della legge 24 dicembre 1993, n. 537 allegato 1: linee guida seguite dalla CUF per la riclassificazione dei medicinali ai sensi della legge recante interventi correttivi di finanza pubblica collegata alla legge finanziaria 1994).

Questo farmaco presenta tra le indicazioni d'uso la localizzazione di lesioni corneali e di corpi estranei; l'uso nella tonometria di Goldman e per il controllo dell'applicazione e la tollerabilità delle lenti a contatto rigide.

Dunque, in base all'uso che se ne può fare, dovrebbe poter essere accessibile anche al di fuori degli ospedali, per gli Ottici e Optometristi, che lavorano in

strutture proprie.

Poiché la valutazione degli appoggi delle lenti a contatto, come pure anche la valutazione della lacrimazione sono competenza degli optometristi-contattologi e in quanto lo strato di lacrime non viene considerato un tessuto organico, l'uso di questo tipo di fluoresceina dovrebbe essere resa disponibile a tutti gli operatori sanitari che lavorano per favorire la salute oculare, siano essi interni o esterni all'ospedale.

CONCLUSIONI

Gli staining corneali sono un segno molto importante durante la pratica, non solo in una fase post applicativa delle lenti a contatto o per la valutazione dell'integrità del segmento anteriore quando si sospettano anomalie legate a patologie o infiltrati, ma anche per la valutazione pre-applicativa.

Una attenta analisi aiuta ad aumentare i successi applicativi e ridurre i Drop out delle lenti a contatto morbide.

Il lavoro di ogni contattologo non si deve limitare a questo, ma ogni caso deve essere seguito nel tempo e monitorato, creando un follow-up applicativo, apportando le giuste variazioni, per non apportare cambiamenti alla normale fisiologia delle cellule dell'epitelio superficiale e al film lacrimale che protegge le strutture oculari anteriori.

La valutazione delle colorazioni corneali nei soggetti non portatori di lenti a contatto deve essere approfondita con studi successivi, per riuscire a individuare uno schema per ogni colorazione, utile alla diagnosi, per rendere più semplice ogni quadro riscontrato nella pratica.

Si auspica l'approfondimento, con ulteriori studi, dell'assorbimento della fluoresceina da parte delle cellule sane, per riuscire a identificare la vera natura dell'interazione della fluoresceina con queste. I prossimi studi dovranno essere mirati a conoscere i meccanismi alla base dell'assorbimento nella cornea umana, non in vitro ma in vivo per non alterare i risultati.

BIBLIOGRAFIA

1. A. J. Bron, P. A. (2014). Clinical staining of the ocular surface: Mechanisms and interpretations. *Progress in Retinal and Eye Research*, 36-61.
2. Anto Rossetti, P. G. (2003). *Manuale di optometria e contattologia*. Padova: Zanichelli.
3. Barbara E. Caffery, J. e. (1991). Corneal staining after sequential instillations of fluorescein over 30 days. *Optometry and Vision Science*, 467-469.
4. Bucci, M. G. (2010). La Cornea. In B. M. G., *Oftalmologia* (p. 700). Italia: SEU.
5. Carole Maldonado-Codina, M. L. (2013). Observation of solution-induced corneal staining with fluorescein, rose bengal and lissamine green. *Contact Lens & Anterior Eye*, 267-270.
6. Carolyn G. Begley, J. T. (1196). Characteristics of corneal staining in Hydrogel contact lens wearers. *Optometry and Vision Science*, 193-200.
7. Christina M. Van Itallie, J. M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular. *Elsevier Science Inc.*, 157-165.
8. Doerte Luensmann, A. M. (2012). Corneal staining and cell shedding during the development of solution-induced corneal staining. *Optometry and Vision Science*, 868-874.
9. Doughty, M. J. (2014). Fluorescence characteristics of sodium fluorescein-rose bengal ophtalmic solution mixtures. *Contact Lens & Anterior Eye*, 358-362.
10. Ellina A. Mun, P. W. (2014). On the barrier properties of the cornea: a microscopy study of the penetration of Fluorescently labeled nanoparticles, polymers and sodium Fluorescein. *Molecular Pharmaceutics*, 3556-3564.
11. Fabio Menegoni, G. T. (2010, 11 23). *Fluoralpha Alpha intes*. Tratto il

giorno 03 15, 2015 da Medicina Facile:
http://http://www.medicofacile.it/fluoralfa_alfa-intes_29170014

12. Guidotti, M. (2014, 01 31). *Classificazione dei farmaci*. Tratto il giorno 03 15, 2015 da Facoltà di Farmacia e Medicina:
<http://http://www.galenotech.org/noteAIFA.htm>
13. Joseph D. Schwallie, O. M. (1997). Corneal Staining Patterns in Normal Non-Contact Lens Wearers. *Optometry and Vision Science*, 92-98.
14. Joshua E. Josephson, B. E. (1992). Corneal staining characteristics after sequential instillations of fluorescein. *Optometry and Vision Science*, 570-573.
15. Kalika L. Bandamwar, E. B. (2013). Fluorescein staining and physiological state of corneal epithelial cells. *Contact Lens & Anterior Eye*, 213-223.
16. Kalika L. Bandamwar, Q. G. (2012). Mechanisms of superficial micropunctate corneal staining with sodium fluorescein: The contribution of poling. *Contact Lens & Anterior Eye*, 81-84.
17. Kelly K. Nichols, O. M. (2002). Corneal staining in hydrogel lens wearers. *Optometry and Vision Science*, 20-30.
18. May M. Bakkar, L. H.-C. (2014). The cellular basis for biocide-induced fluorescein hyperfluorescence in Mammalian cell culture. *Plos One*, 1-7.
19. Park, Y. S. (2014). Reliability of 4 corneal grading systems for corneal staining. *Elsevier Science Inc.*, 1097-1102.
20. Philip B. Morgan, C. M.-C. (2009). Corneal staining: Do we really understand what we are seeing? *Contact Lens & Anterior Eye*, 48-54.
21. Susanne M. Krug, J. D. (2014). Tight junction, selective permeability and related diseases. *Elsevier Science inc.*, 166-176.
22. Tony Chahine, O. a. (1996). Peripheral corneal furrow staining: A sign to discontinue hydrogel contact lens use? *Elsevier Science Inc.*, 892-896.