

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei"
Corso di Laurea Triennale in Ottica e Optometria

TESI DI LAUREA

Fluoresceina:
un mezzo, molteplici scopi.

Relatore: Prof. Renzo Colombo

Laureanda: Beatrice Scarsi
Matricola: 11234547

Anno Accademico 2017/2018

*Mira alla luna, anche se la mancherai
atterrerai tra le stelle.*

Anonimo

INDICE

INTRODUZIONE	1
ABBREVIAZIONI	3
I. COLORAZIONI CORNEALI	5
1.1 FUNZIONE DEI COLORANTI VITALI.....	5
1.2 CLASSIFICAZIONE.....	6
1.3 ROSA BENGALA, VERDE DI LISSAMINA, RIBOFLAVINA.....	14
1.4 DISPONIBILITÀ SUL MERCATO ITALIANO.....	16
II. FLUORESCEINA	19
2.1 CHIMICA DELLA FLUORESCEINA.....	19
2.2 FUNZIONI.....	21
2.3 COME FUNZIONA.....	21
2.4 DOVE SI PUÒ TROVARE.....	22
2.5 CAMPI DI UTILIZZO.....	23
2.6 STAINING CORNEALE.....	24
2.6.1. STAINING CORNEALE NEI NON PORTATORI DI LENTI A CONTATTO.....	26
2.6.2. STAINING CORNEALE NEI PORTATORI DI LENTI A CONTATTO.....	27
III. ANATOMIA CORNEALE	31
3.1 GIUNZIONI STRETTE.....	35
3.2 MICROVILLI E GLICOCALICI APICALI.....	37
3.3 ACQUAPORINE E GIUNZIONI COMUNICANTI.....	39
IV. PERMEABILITÀ	41
4.1 I MECCANISMI DI PENETRAZIONE ATTRAVERSO LA CORNEA.....	42
4.1.1. ENDOTELIO.....	43

4.1.2.	EPITELIO.....	45
4.1.3.	STROMA.....	46
4.2	MOVIMENTO DELLA FLUORESCEINA ATTRAVERSO LO STROMA.....	46
V.	METABOLISMO CORNEALE.....	51
5.1	EPITELIO.....	54
5.2	STROMA.....	57
VI.	TURNOVER EPITELIALE E DIVISIONE CELLULARE.....	59
VII.	COLORAZIONI CELLULARI IN BASE AL LORO STATO FISIOLOGICO.....	63
VIII.	IL FILM LACRIMALE.....	69
8.1	IL RICAMBIO LACRIMALE.....	70
8.2	CARATTERISTICHE FISICHE.....	71
8.3	CARATTERI BIOCHIMICI.....	72
8.3.1	STRATO LIPIDICO.....	73
8.3.2	STRATO ACQUOSO.....	74
8.3.3	STRATO MUCOSO.....	76
IX.	TEST CON UTILIZZO DELLA FLUORESCEINA.....	79
9.1	VALUTAZIONE DEL FILM LACRIMALE CON UTILIZZO DELLA FLUORESCEINA.....	82
9.2	VALUTAZIONE DELLE LENTI RGP CON FLUORESCEINA.....	85
X.	CONCLUSIONI.....	87
	RINGRAZIAMENTI.....	99

INTRODUZIONE

Questo studio è un review della letteratura presente sui coloranti vitali, in particolar modo sulla fluoresceina, sulle interazioni cornea-colorante e sull'analisi della fluoresceina. Lo scopo è quello di andare a colmare delle lacune personali, su un argomento che è stato trattato durante gli anni di studi, e trovare delle risposte ad alcune domande sorte, per esempio cosa colora effettivamente la fluoresceina? Esistono colorazioni migliori? È possibile che la miscela di due coloranti ne fornisca un terzo migliore? E tante altre, a cui si cercherà di dare risposta. Per cui vi è anche un interesse e una curiosità personale nelle varie sfaccettature del colorante. 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.

ABBREVIAZIONI

1. al.: all, tutti.
2. ATP: adenosina trifosfato;
3. AQPs: acquaporine;
4. BUT: Break Up Time;
5. CCLRU: Corneal and Contact Lens Research Unit;
6. col.: collaboratori;
7. ecc.: eccetera;
8. i.e: id est;
9. Igs: immunoglobuline
10. JAM: Junctional Adhesion Molecules;
11. LaC: Lenti a Contatto;
12. logP: logaritmo del coefficiente di partizione;
13. MUC: mucine;
14. MUC1: mucina 1
15. MUC4: mucina 4
16. MUC16: mucina 16
17. NIBUT: Not Invasive Break Up Time;
18. PMMA: polimetilmetacrilato;
19. TJ: tight junctions;
20. ZO: zonula occludens;
21. ZO1: zonula occludens protein 1;
22. ZO2: zonula occludens protein 2;
23. ZO3: zonula occludens protein 3.

Capitolo I

COLORAZIONI CORNEALI

Il termine colorazione o *staining* corneale viene utilizzato per descrivere la comparsa di aree fluorescenti nell'epitelio, successivamente all'instillazione del colorante.

Le tecniche di colorazione sono un indispensabile supporto per la visualizzazione delle cellule e tessuti; le colorazioni vitali hanno come finalità quella di svelare particolari che altrimenti non sarebbero visibili, o di indicare lo stato metabolico della cellula, o ancora di distinguere tra cellule vive e morte. L'utilizzo di coloranti vitali nelle analisi della superficie oculare alla lampada a fessura rende maggiormente visibile i danni che vengono riportati a livello degli epitelii, ed è un mezzo diagnostico non invasivo, obiettivo, economico e valutabile in maniera quantitativa se si applicano scale di graduazione o software di analisi di immagine¹.

I coloranti di più frequente utilizzo nella pratica clinica quotidiana sono la fluoresceina sodica, il rosa bengala, il verde di lissamina, e più di recente, è stata introdotta la riboflavina. Ogni colorazione, avendo una struttura chimica unica, ha diverse caratteristiche che permettono l'uso preferenziale in diverse patologie oculari (Kim, 2000). Un esempio può essere la colorazione vitale con fluoresceina sodica e verde di lissamina, che viene usata normalmente nella diagnosi delle anomalie corneali e congiuntivali. I test che prevedono l'utilizzo dei coloranti devono essere eseguiti secondo procedure standard, per garantire la ripetibilità e l'adeguata registrazione dei risultati così da poterli confrontare con i valori normativi di riferimento (Cattaneo et Plebani, 2014).

1.1 FUNZIONI DEI COLORANTI VITALI

I coloranti oftalmici sono attualmente utilizzati nelle procedure diagnostiche oculistiche, nella localizzazione di aree danneggiate da trauma o da malattie della cornea e in altre

¹<http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali>

tecniche. Ulteriori utilizzi dei coloranti in oculistica comprendono l'analisi dei difetti epiteliali, lo studio del sistema naso-lacrimale, la determinazione del tempo di dissoluzione lacrimale, l'angiografia, la localizzazione di corpi estranei non epitelizzati e dei punti di pressione delle lenti a contatto (Nallapati et al., 2003). Vengono utilizzati anche dal professionista che applica e controlla le lenti a contatto (LaC) sia in fase pre-applicativa, sia durante le sedute di controllo e anche in fase post-applicativa (Cattaneo et Plebani, 2014).

1.2 CLASSIFICAZIONE

Al fine di registrare nel miglior modo possibile le reazioni indotte dall'uso di LaC, sono state elaborate, da ricercatori e clinici, delle scale di gradazione per le complicanze oculari. L'esame biomicroscopico dell'occhio rappresenta una fase di vitale rilevanza nella pratica contattologica, in particolare nelle sedute di controllo. I cambiamenti che possono essere osservati sui vari tessuti dell'occhio esterno sono generalmente registrati con termini descrittivi e/o qualitativi. Tali termini possono molte volte adattarsi ad un ampio ventaglio di condizioni cliniche, quindi, possono essere interpretati in maniera discorde da operatori differenti e inoltre, possono essere definiti diversamente anche dallo stesso operatore in tempi dissimili. Termini come regolare o irregolare, accettabile o non accettabile, liscio o rugoso, abbondante o scarso, diffuso o localizzato, grande o piccolo, il più delle volte non permettono di descrivere la situazione in maniera inequivocabile (Lupelli, 2002). Una reazione oculare, come ad esempio una colorazione con fluoresceina dell'epitelio corneale, che può essere giudicata grave se viene osservata in una giornata in cui non sono state viste altre reazioni simili, può essere invece considerata di moderata entità se viene osservata dopo aver visto uno o due casi più gravi (Lupelli, 2002). Di uguale importanza ai fini dell'esame da effettuare è la registrazione dei risultati. Secondo le indicazioni del College of Optometrist (UK), se un'azione non è registrata, è ritenuta come se non fosse mai avvenuta. Difatti, una registrazione scritta, adeguata ed inequivocabile, della storia clinica del portatore di LaC può certamente essere un ausilio determinante in un eventuale contestazione legale. Non è sufficiente quindi indicare nella scheda se la cornea è trasparente o meno, il

professionista deve cercare di registrare e di quantificare ciò che ha visto. La tabella I elenca le strutture e le lesioni che si possono misurare e quelle che necessitano di una graduazione (Veys et al., 2009).

Tabella I. Strutture e lesioni che richiedono misurazione o graduazione (Veys, 2009).

MISURAZIONE OGGETTIVA	GRADUAZIONE SOGGETTIVA
Microcisti (numero)	Punteggiatura
Vascularizzazione (dimensione e posizione)	Follicoli
Pieghe (numero)	Papille
Strie (numero)	Iperemia
Pinguecola/Pterigio (dimensione)	Depositi
Opacità (dimensione e posizione)	Film lacrimale

Con lo scopo di quantificare gli elementi caratteristici della condizione oculare osservata e quindi, di poter registrare l'esame biomicroscopico nel miglior modo interpretabile e meglio comparabile nel tempo e nello spazio, può essere utile fare riferimento a delle scale di gradazione. La scala di gradazione utilizzata nella pratica clinica può essere definita come: "uno strumento che permette di quantificare la gravità della condizione facendo riferimento a una serie di immagini o descrizioni standardizzate" (Efron, 1999).

Le scale di gradazione sono caratterizzate, in sintesi, da:

- attendibilità (stesso risultato per la stessa osservazione);
- assenza di ambiguità semantica;
- sistematicità della registrazione.

Inoltre, un set di dati ipotetici è stato utilizzato per mostrare i problemi associati all'uso di scale di valutazione troppo grossolane. Gli autori hanno presentato un modello matematico che aiuta a stimare i benefici dell'uso di una scala più fine. I dati sono stati presentati da due studi separati, uno sulla misurazione dell'acuità visiva e l'altro sulla graduazione dell'opacità nucleare, per mostrare i vantaggi dell'uso di scale più accurate e per migliorare la sensibilità della misurazione clinica. Elevati livelli di concordanza tra osservazioni indipendenti indicavano che la scala di valutazione era troppo grossolana e

che queste scale riducevano inutilmente la capacità del clinico di rilevare i cambiamenti nel parametro da valutare. Per una sensibilità clinica fine, la dimensione degli incrementi della scala non deve superare un terzo della deviazione standard della discrepanza, in modo che la concordanza dei confronti accoppiati non superi il 37% (Bailey et al., 1991).

Le proposte di *grading scales* utilizzabili in campo contattologico sono numerose. Queste possono essere divise tra descrittive e immagini cliniche, e possono essere ulteriormente suddivise fra quelle grafiche (disegni o pitture) e fotografiche (fig. 1). Se siano più utili le scale di gradazione composte da disegni o da foto è stato largamente disquisito e nonostante possano essere individuati vantaggi e svantaggi sia per le une che per le altre (fig. 2), risulta evidente che entrambe rappresentano un utile mezzo per standardizzare e rendere meglio comprensibile la registrazione clinica delle reazioni dell'occhio esterno (Chong et al., 2000; Twelker et Bailey, 2000). Le scale fotografiche hanno il vantaggio di raffigurare condizioni reali, tuttavia creare una serie di fotografie che mostrino una costante manifestazione, con incrementi di gravità uniformi e crescenti, risulta difficile. Le *grading scales* interpretate artisticamente forniscono un semplice, conveniente e accurato mezzo con cui i professionisti possono registrare e comunicare la gravità delle complicazioni da LaC e hanno dei vantaggi quando vengono comparate alle scale fotografiche. Con le *grading scales* dipinte, la gravità della condizione raffigurata può essere sistematicamente avanzata e l'angolo di campo, l'ingrandimento e le caratteristiche associate, come il colore dell'iride, possono essere standardizzate. In un lavoro di Efron e col. del 2001, in cui è stata considerata la validità clinica di quattro scale di gradazione usate per registrare le complicanze indotte da LaC tramite immagini standard, è stato dimostrato che tali scale sono tutte valide per la normale attività della pratica contattologica. È evidente che maggiore è l'esperienza dell'operatore con l'uso delle scale, maggiore risulta la loro validità clinica (Lupelli, 2002).

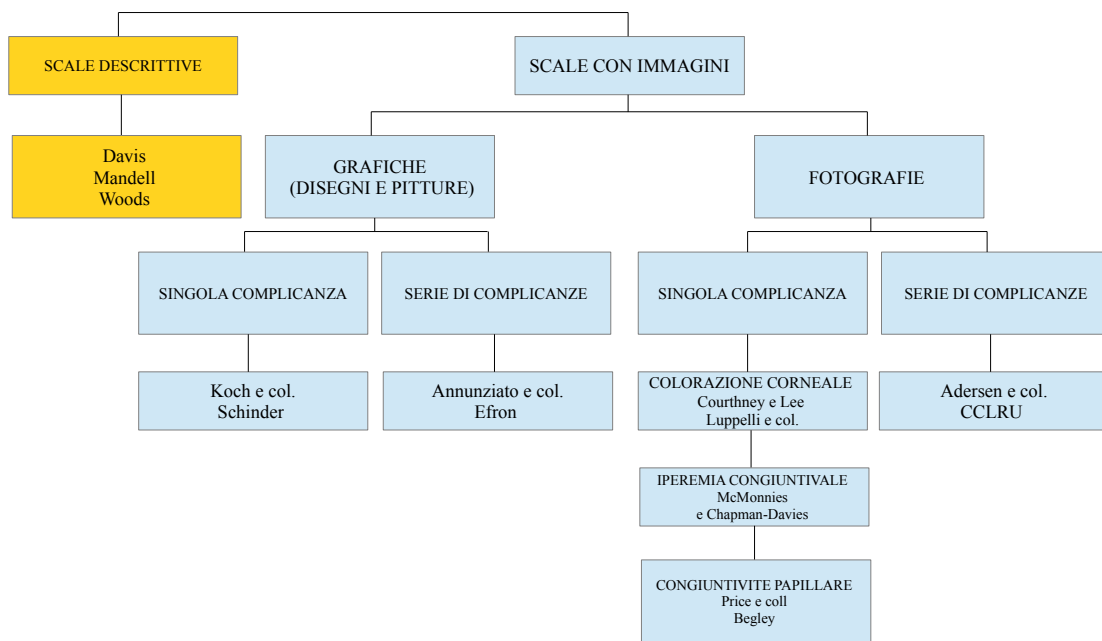


Figura 1. Schema delle scale di valutazione esistenti divise in due macrocategorie: set di immagini realizzate ad hoc e immagini fotografiche (Lupelli, 2002).



Figura 2. Confronto tra scale di gradazione fotografiche (tipo CCLRU) e quelle grafiche (tipo Efron) (Lupelli, 2002).

Quindi negli ultimi 20 anni le scale maggiormente utilizzate sono 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 l'analisi delle complicanze indotte da LaC, 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 della punteggiatura è effettuata mediante il confronto dell'immagine acquisita della cornea del paziente (tramite lampada a fessura) con le immagini di riferimento della scala. Quelle a cui sicuramente deve essere prestata maggiore attenzione, poiché hanno la caratteristica di essere onnicomprensive, cioè considerano un numero consistente di reazioni oculari sono le *CCLRU Grading Scales* e le *Efron Grading Scales*. Le prime sono un esempio di scale con immagini dipinte, mentre le seconde sono un modello di scale con immagini fotografiche. Nelle *CCLRU Grading Scales* vengono mostrati i quattro livelli di gravità della complicanze, senza mostrare l'immagine della condizione normale. Nelle *Efron Grading Scales* vengono mostrati i quattro livelli di gravità della complicanze e l'immagine della condizione normale (Grado 0). Un modo di registrare i gradi di gravità dei livelli è quello presentato nella tabella IIa. Per le tavole più diffuse la terminologia è però lievemente diversa (tab. IIb). In definitiva è importante sapere prima a quali termini è necessario fare riferimento (Lupelli, 2002).

Le scale di gradazione rappresentate con immagini, in cui viene considerata una serie di complicanze indotte dall'uso di LaC, sono generalmente disponibili in forma di poster da porre sulla parete nell'area dello studio contattologico dove si trova la lampada a fessura, o in forma di foglio plastificato di dimensioni A4, o simile, in modo da permetterne un pratico uso mentre si esegue l'esame biomicroscopico, o in forma di libro (Lupelli, 2002).

Tabella II. Livelli di gravità. In contattologia vengono usate diverse formulazioni (a-b). (Lupelli, 2002).

a)

Grado	Gravità	Significatività clinica
0	normale	
1	lieve	Non è clinicamente significativo
2	moderato	Può essere necessario intervenire
3	severo	Di solito è richiesto un intervento
4	molto severo	Richiede un intervento in tempi brevi

b)

Grado	Gravità	Significatività clinica
0	normale	
1	molto lieve	Non è clinicamente significativo
2	lieve	Può essere necessario intervenire
3	moderato	Di solito è richiesto un intervento
4	severo	Richiede un intervento in tempi brevi

Le fluorescenze corneali possono manifestarsi in numerose forme cliniche, le quali possono essere classificate (tab. III):

- in termini di intensità: 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.
- in termini di profondità: epitelio superficiale, epitelio profondo, stroma localizzato e stroma diffuso.

Tabella III. La seguente tabella mostra la possibilità di apprendere il tipo di sofferenza in atto e cosa le colorazioni risultanti vogliono rappresentare, definendo la posizione, la profondità e la forma delle colorazioni corneali. (Lupelli, 2002).

Classificazione dei vari tipi di fluorescenza della superficie corneale come una funzione di parole chiave

CLASSIFICAZIONE	INTENSITÀ	FORMA	LOCALIZZAZIONE	INFORMAZIONI DI SUPPORTO
Superior epithelial arcuate lesion (SEAL)			Superiore (solitamente paralimbare)	Più comunemente vista nei portatori di silicon idrogel
3&9	Puntata o diffusa	Patch	Nasale e/o temporale (solitamente paralimbare)	Portatori di lenti rigide
smile	Diffusa o coalescente	Arcuata o a bande	Inferiore	
Corpi estranei	Coalescente	Lineare	Qualsiasi area corneale	
Soluzione che induce staining corneale	Puntata o diffusa	Arcuata o circolare	Tutte le aree corneali, qualche volta con moderatezza centrale	Portatori di lenti morbide
Dimple veil	Coalescente	Circolare (solitamente multiple e solitamente di 100-300 µm nel diametro)	Tutte le aree corneali, solitamente centrali o media periferia	Portatori di lenti morbide
Mucin balls	Coalescente	Circolare (solitamente multiple e solitamente di 50 µm nel diametro)	Qualsiasi area corneale	Più comunemente vista nei portatori di silicon idrogel

Le classificazioni più conosciute sono: quella di Cochet-Bonnet del 1959 secondo l'utilizzo di punti e linee; successivamente Schulman nel 1974 propose una classificazione suddivisa in sette categorie: arcuata, puntata, superficiale, profonda, lineare, limbare, superficiale congiuntivale. Nel 1969 Larke propose una suddivisione 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 e, secondariamente, per decidere come tentare di risolverla. Per la cornea vengono valutati 5 settori attribuendo alla relativa colorazione un punteggio da 1 a 3. Il valore finale viene dato dalla somma dei 5 singoli punteggi con un intervallo tra 0 e 15 (fig. 3) Per la congiuntiva vengono valutati 6 settori della congiuntiva bulbare, 3 nasali e 3 temporali, attribuendo alla relativa colorazione un punteggio da 1 a 3. Il valore finale viene dato

dalla somma dei 6 singoli punteggi con un intervallo tra 0 e 18 (fig. 4).²

Score each of 5 areas of the cornea and total score:

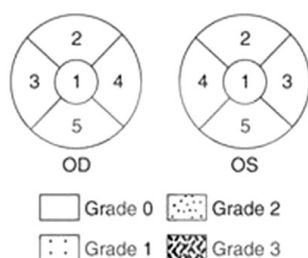


Figura 3. Divisione cornea³.

Score each of 6 areas of the conjunctiva and total score:

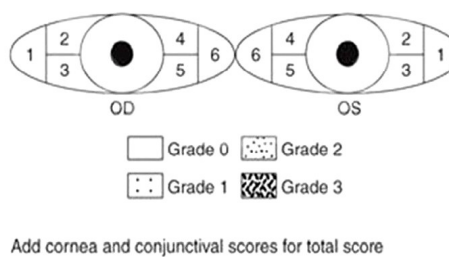


Figura 4. Divisione congiuntiva⁴.

Molto spesso le punteggiature sono asintomatiche e il portatore di LaC non lamenta nessun tipo di fastidio, cosicché molti operatori non indagano in maniera approfondita un'eventuale presenza di queste. I sintomi variano da colorazione a colorazione, dipendono principalmente dall'eziologia e dal grado di severità in cui si presentano, e spesso possono ridurre la tollerabilità delle LaC, 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*. Il *drop out* è l'interruzione definitiva dell'uso delle LaC, 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 si ha tra il 15,9% e il 34% di portatori di LaC che ne abbandonano l'uso definitivamente. Come mostrano gli studi più recenti, il range non è variato negli anni (Rumpakis, 2010; Richdale et al., 2007; Pritchard et al., 1999; Berberian, 1983). Per cui si ritiene che la diffusione delle tavole con le scale di gradazione per immagini possa permettere una registrazione più oggettiva della condizione osservata e nello stesso tempo ciò possa rappresentare un mezzo che ottimizza l'interpretazione e che quindi facilita i processi di decisione nell'ambito contattologico (Lupelli, 2002), prevenendo se possibile il *drop out*.

2 <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali>

3 <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali>

4 <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali>

1.3 ROSA BENGALA, VERDE DI LISSAMINA, RIBOFLAVINA

Il rosa bengala non è altro che fluoresceina con aggiunta di un alogeno iodato, che gli conferisce il caratteristico colore rosato. La scelta del nome pare derivi dal fatto che questo colorante conferisce una colorazione dei tessuti umani molto simile al colore del punto posizionato al centro della fronte delle donne della regione indiana del Bengala, per indicare il loro stato di donne sposate (Troiano, 2017). Il rosa bengala non è in grado di superare la barriera epiteliale corneale e quindi colora le cellule epiteliali di superficie, solo se non protette dalla mucina o dal glicocalice, e le cellule morte o degenerate. Le proprietà di colorazione del rosa bengala, per cui, sono diverse da quelle della fluoresceina: il rosa bengala colora le cellule epiteliali sane della cornea e della congiuntiva se non sono coperte dalla mucina e che, per questo, tendono a cheratinizzarsi. Deve essere però ricordato che il rosa bengala è in grado di alterare la morfologia delle cellule epiteliali, di ridurre la vitalità e di indurre apoptosi. Questi effetti sono aumentati dall'esposizione alla luce e, per questo, colora le aree danneggiate della superficie oculare più rapidamente sulla congiuntiva bulbare che sulla cornea (Troiano, 2017). Tuttavia, poiché la sua instillazione provoca una sensazione di bruciore, il suo utilizzo induce lacrimazione riflessa. Il grado di colorazione del rosa bengala è dose-dipendente, per cui si raccomanda l'instillazione di una goccia intera di colorante, preceduta dall'instillazione di anestetico per ridurre il fastidio, e ponendo attenzione ad asciugare l'eccesso poiché il colorante in più potrebbe fuoriuscire e colorare temporaneamente la cute peripalpebrale⁵. Inoltre, se l'impiego di questo colorante viene considerato necessario sul piano clinico, può essere opportuno far precedere una colorazione con riboflavina o fluoresceina, e se le condizioni degli epiteli lo consentono, dopo un abbondante lavaggio, si può somministrare una goccia di anestetico e procedere alla somministrazione del rosa bengala. Il suo uso è controindicato in caso di disepitelizzazione congiuntivale o corneale, poiché può colorare indelebilmente il sottostante tessuto connettivo. Prima di esporre il paziente alla luce della lampada a fessura è opportuno lavare abbondantemente l'eccesso di colorante dalla superficie oculare. Anche per il rosa bengala esistono diversi sistemi di

⁵ <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali>

gradazione della colorazione della superficie oculare. Una particolarità di questo colorante è il fatto che è in grado di inibire la replicazione virale in vivo (Troiano, 2017).

Il verde di lissamina è un colorante organico acido, prodotto sinteticamente, è indolore e ha un miglior contrasto con i vasi e le emorragie. Il verde di lissamina colora in modo selettivo le cellule sofferenti e disidratate, garantendo l'osservazione dell'epitelio congiuntivale ed evidenziandone le zone epiteliali abrase o desquamate (Cattaneo et Plebani, 2014). Il suo utilizzo è meglio tollerato rispetto al rosa bengala nonostante le affinità tintoriali, rendendolo oggi di fatto il suo sostituto nella pratica clinica quotidiana. Il colorante è disponibile in commercio in Italia in forma di cartine sterili impregnate; i centri che lo utilizzano in forma liquida si avvalgono di preparazioni galeniche⁶ delle farmacie aziendali. L'impiego di filtri per l'osservazione di coloranti alla lampada a fessura è raccomandato, con la finalità di aumentare la visibilità della colorazione; per il verde di lissamina, che viene osservato usando la luce bianca, si raccomanda l'utilizzo di un filtro rosso (567 e 634 nm) per aumentare il contrasto con la sclera⁷. A differenza del rosa bengala, il verde di lissamina non inibisce la replicazione virale in vivo e la vitalità delle cellule epiteliali.

La riboflavina è la sostanza più naturale impiegata in oculistica. Può essere impiegata perfettamente nella misurazione del tono oculare con lo strumento ad applanazione di Goldmann, con caratteristiche di fluorescenza, alla luce di Wood, del tutto paragonabili a quelle ottenute dalle tradizionali colorazioni con preparati a base di fluoresceina. Ha numerosi vantaggi rispetto alla fluoresceina: ha un tempo di permanenza sulla superficie oculare dieci volte più lungo della fluoresceina e questo permette d'individuare difetti del sistema di giunzione delle cellule epiteliali anche lievi, di analizzare più accuratamente il processo di ricambio lacrimale e la presenza della black-line; colora tutta la lacrima (non solo lo strato acquoso come la fluoresceina), fornisce informazioni qualitative più affidabili attraverso lo studio del BUT ed è anche in grado di rilevare le aree di sofferenza epiteliale sia della cornea sia della congiuntiva, evitando così di

6 Sono medicinali preparati dal farmacista nel laboratorio di una farmacia, o di una parafarmacia

7 <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali>

ricorrere alla fastidiosa doppia colorazione con fluoresceina e lissamina. Può essere impiegata per la valutazione della superficie oculare anche in presenza di lente a contatto morbida poiché colora la lente solo transitoriamente a differenza della fluoresceina che, per questo tipo di impiego, deve essere di tipo macromolecolare. La si trova in confezioni monodose, senza conservanti, richiudibili che la rendono perfettamente utilizzabile senza sprechi (Troiano, 2017).

1.4 DISPONIBILITÀ SUL MERCATO ITALIANO

È opportuno precisare che l'impiego di colorante in strisce per la colorazione della superficie oculare è poco confortevole e potenzialmente dannoso per il paziente, e può essere fuorviante per il medico. In particolare quando il colorante che impregna la striscia viene disciolto direttamente nella lacrima mediante l'applicazione della striscia nel sacco congiuntivale inferiore. Paradossalmente, infatti, il fenomeno della fluorescenza è molto scarso quando il colorante è poco diluito, mentre è ottimale quando la concentrazione nei liquidi è bassa. Questa manovra produce inevitabilmente disepitelizzazione congiuntivale e perdita di un certo numero di cellule mucipare. In alcuni casi può causare anche disepitelizzazione corneale. Per queste ragioni è consigliabile impiegare coloranti in collirio, preferendo confezionamenti monodose. La tabella IV riporta i prodotti attualmente acquistabili in Italia con le loro principali caratteristiche. Si potrà notare che per molti prodotti non è disponibile il prezzo. In effetti, è originale il fatto che per la maggioranza di questi prodotti non esista un prezzo stabilito, ma il prezzo deve essere richiesto e può variare significativamente in base alle quantità acquistate (Troiano, 2017).

Tabella IV. Tabella con diversi coloranti e varie relative informazioni. (Troiano, P., 2017).

Produttore	Nome	Tipologia	Formato	Ingredienti	Confezionamento	Ritilizzabile	Prezzo
Servimed Industrial	DROPtest	Riboflavina	Gocce	100 ml di soluzione contengono 0,25 ml di Riboflavina sodio fosfato	10 fiale monodose da 0,5 ml, confezionate in 2 blister sterili contenenti 5 fialele cadauno	SI, entro 24 ore dall'apertura della fiala	18 €
Alfa Intes	Fluoralfa	Fluoresceina	Gocce	100 ml contengono: fluoresceina sodica 2 g. ECCIPENTI: Flacone da 10 ml: fenilmercurio nitrate; sodio cloruro; acqua depurata sterile.	Flacone in vetro da 10 ml con contagocce.	SI	7,32 €
Alfa Intes	Fluoralfa	Fluoresceina	Gocce	Monodose da 0,5 ml: sodio cloruro; acqua depurata sterile.	Flaconcini monodose da 0,5 ml in polietilene singolarmente blisterati, contenuti in n. di 100 in scatola di cartone	NO	24 €
Soft	Fluorofta	Fluoresceina	Gocce	Fluoresceina sale sodico; trealosio; acqua depurata.	30 monodose da 0,2 ml	NO	25 €
Biotech	Verde di Lissamina	Verde di Lissamina	Strisce	1,5 mg. di Verde di Lissamina	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Biotech	Bio Fluoro	Fluoresceina	Strisce	Fluoresceina 1 mg	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	22 €
Biotech	Bio High Fluoro	Fluoresceina	Strisce	Fluoresceina macromolecolare 0,5 mg	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Opto	Optofluor	Fluoresceina	Gocce	Fluoresceina con Trealosio	Monodose 15 fiale da 0,20 ml	nd	nd
Bioglo	Strips	Fluoresceina	Strisce	Ogni striscia contiene Fluoresceina 1 mg	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	23 €
Gecis	Lissaver Plus	Verde di Lissamina	Strisce	Strisce sterili impregnate di 1,5 mg di lissamina verde (colorante E142).	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Gecis	Fluoresceina Sodica	Fluoresceina	Strisce	Strisce con 1 mg di fluoresceina	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Omni	Omni Fluro	Fluoresceina	Strisce	1 mg Di fluoresceina Sodica U.S.P. per striscia	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Alesi Hospital	Hospifluo	Fluoresceina	Strisce	1 mg Di fluoresceina Sodica U.S.P. per striscia	100 strisce sterili	NO	28 €
Easyopht	Easytest	Fluoresceina	Strisce	1 mg Di fluoresceina Sodica per striscia	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Ophthalmic experts		Fluoresceina	Strisce	fluorescina sodica 1 mg. su carta	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	26 €
Contacare	Fluo Strips	Fluoresceina	Strisce	fluorescina sodica 1 mg. su carta	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	35 €
Contacare	Hi Glo	Fluoresceina	Strisce	fluoresceina macromolecolare	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd
Contacare	Lissamine Green	Verde di Lissamina	Strisce	strisce impregnate con 5mg di verde di lissamina	100 Strisce sterili confezionate singolarmente	NO	nd

Capitolo II

FLUORESCEINA

L'uso della fluoresceina è stata introdotta nell'esaminazione dell'integrità corneale da Pflüger nel 1882, durante un'osservazione oculare per evidenziare il disegno di un'abrasione epiteliale sulla cornea dei conigli; solo sei anni dopo, la prima lente a contatto venne applicata ad un umano, come riportato da Fick (Efron, 2012). A seguire, sempre negli anni '80, la fluoresceina fu applicata anche da Straub. Però, è solo nei successivi 35 anni che la fluoresceina è stata utilizzata dai clinici nella routine giornaliera (Efron, 2012).

2.1 CHIMICA DELLA FLUORESCEINA

La fluoresceina sodica è stata sintetizzata dal chimico tedesco Johann Friedrich Adolf von Bayer nel 1871. È un indicatore, un colorante acido di derivazione xantinica, che a temperatura ambiente si presenta come un solido giallo-bruno inodore, inerte e innocuo per i tessuti. La sua formula chimica è $C_{20}H_{10}O_5 [Na]_2$ (fig. 5), la sua massa molare corrisponde a 376,28 g/mol e la sua solubilità in acqua a 15°C è del 50%¹.

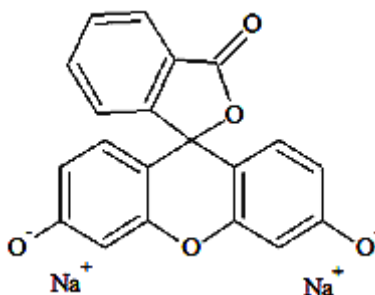


Figura 5. Struttura chimica della fluoresceina².

1 <https://www.zetalab.it/schede/x172389.pdf> consultato il 12/10/2018

2 <http://physicsopenlab.org/2015/12/15/cose-la-fluorescenza/> consultato il 16/10/2018

La fluorescenza di questa molecola (di colore giallo-verde, molto caratteristica) è molto elevata. A temperatura ambiente si presenta come un solido rosso-bruno inodore, che emette un'intensa fluorescenza nella gamma 520-530 nm (giallo-verde) quando, dopo essersi disciolta nello strato acquoso del film lacrimale, viene eccitata da raggi ultravioletti e dalla gamma della luce blu (465- 490 nm) assieme al filtro giallo di Wratten (fig.6) (Cattaneo et Plebani, 2004). La fluoresceina è il colorante più comunemente usato in oftalmologia clinica ed è stata ampiamente utilizzata per la colorazione della superficie oculare già prima dell'introduzione della lampada a fessura (Troiano et al., 2017).

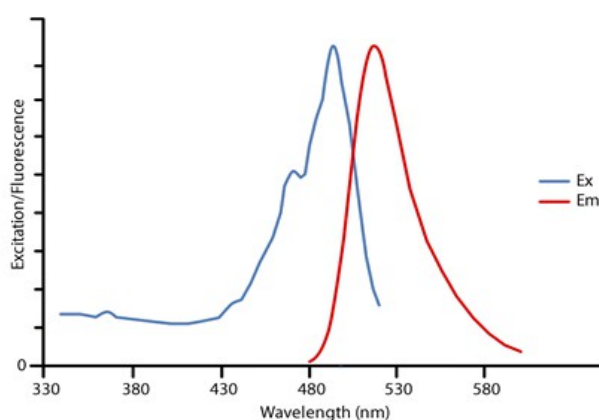


Figura 6. Grafico assorbimento e emissione fluoresceina³

Questo colorante permette di valutare lo spessore della lacrima che si trova nell'interfaccia epitelio corneale-lac; inoltre consente di individuare la presenza, l'estensione e la profondità di un danno epiteliale. La fluoresceina infatti colora i tessuti disepitelizzati: le aree di lesione mostrano una captazione della fluoresceina e appaiono di colore giallo-verde brillante (Cattaneo et Plebani, 2004).

Interessante è quello che viene riportato da uno studio su 16 soggetti, con lo scopo di revisionare le caratteristiche della colorazione clinica della fluoresceina, del rosa bengala e del verde di lissamina in dose e concentrazione controllata, e di determinare se lo *staining* ottimale della cornea e della congiuntiva bulbare siano possibili utilizzando coloranti miscelati, ha dimostrato che una miscela di 2% fluoresceina e 1% verde di lissamina offre un'eccellente *staining* simultaneo di cornea e congiuntiva

3 <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/conjugate-selection/fitc>

bulbare e potrebbe rimpiazzare l'uso dei coloranti individualmente per lo *staining* e per +la pratica di LaC (Korb et al., 2008). L'intensità della fluorescenza della fluoresceina in una soluzione acquosa aumenta all'aumentare della concentrazione, fino a un massimo circa che va dallo 0,001% allo 0,004% e quindi diminuisce (Peterson et al., 2016).

2.2 FUNZIONI

La fluoresceina sodica viene utilizzata ampiamente per valutare l'integrità della superficie oculare. È particolarmente ben adatta a questo scopo grazie alle proprietà di fluorescenza e alla sua alta visibilità con bassa concentrazione. L'osservazione clinica della superficie oculare con la fluorescenza è affetta da un numero di fattori che includono la concentrazione di fluoresceina, lo spessore della strato di fluoresceina, la lunghezza d'onda della sorgente di luce eccitante e tanti altri. (Morgan et Maldonado, 2009). Inoltre, il profilo della fluoresceina permette di controllare i cambiamenti dinamici nel film lacrimale e potrebbe essere usata per valutare qualitativamente le dinamiche del film lacrimale. La fluoresceina è altamente tollerabile e una singola applicazione non causa bruciore o tossicità. Tuttavia, uno svantaggio nell'uso di questo colorante è che legandosi allo strato acquoso del film lacrimale, può oscurare la misurazione delle colorazioni corneali.

2.3 COME FUNZIONA

La continua espressione dei complessi giunzionali lungo il perimetro dell'apice cellulare forma uno strato sigillante, che impedisce alle proteine estranee di raggiungere lo spazio intercellulare (Troiano et al., 2017). Perciò la cornea integra è lipofila e, in quanto tale, non assimila la fluoresceina, ma nel momento in cui la barriera epiteliale viene interrotta, la zona di discontinuità viene colorata e il colorante aderisce allo stroma esposto (che è idrofilico). Le cellule, perciò, captano la fluoresceina ogni volta che ne viene compromessa l'integrità, come ad esempio in presenza di un glicocalice difettoso o di rottura delle interconnessioni cellulari. Il colorante si diffonde per esempio negli

spazi intercellulari, come nei difetti dei *tight junctions* (*zonulae occludens*) delle cellule basali dell'epitelio o nei *dropout* delle cellule (risultando in uno *staining* puntato). Una volta entrato quindi, può diffondersi liberamente all'interno delle cellule circostanti passando attraverso le superfici giunzionali (Romanchuck, 1982). Ciò significa che, se è presente un difetto epiteliale corneale a tutto spessore, il colorante penetra nello stroma idrofilo esposto, dove può essere osservato come “assorbito” (Mitchell et Oliver, 2018). Se, invece, la barriera epiteliale non è interrotta ma sono danneggiati i sistemi giunzionali, dopo qualche minuto, la fluoresceina riesce a superare l'epitelio dando luogo a microaree puntiformi di colorazione sub epiteliale. Questo fenomeno è più frequentemente visibile a livello della congiuntiva piuttosto che della cornea, poiché la congiuntiva è un tessuto immunocompetente che risponde potentemente alle sollecitazioni esterne (idrocarburi aromatici provenienti dalla inquinazione ambientale, polveri, allergeni) (Troiano al., 2017). La membrana di Descemet non assimila la fluoresceina, quindi il riscontro di un'area chiara alla base di un difetto profondo nella cornea indica con tutta probabilità un descemetocèle⁴.

2.4 DOVE SI PUO' TROVARE

La fluoresceina si può presentare come strisce impregnate singole o come una soluzione trasparente arancione-rossa, venduta in confezioni da dieci unità di collirio sterile monodose, ciascuna unità contiene approssimativamente 0,5 ml di prodotto. E' anche presente in vendita in strisce singole (Nallapati et al., 2003). Se si utilizzano le strisce bisogna, prima di metterle delicatamente a contatto con la superficie congiuntivale, inumidirle con un po' di soluzione salina sterile. In alternativa, si può far cadere un goccia di colorante sulla superficie oculare, allo stesso modo delle ampolle monodose. Le preparazioni multidose dovrebbero essere evitate in quanto potrebbero essere facilmente contaminate da batteri potenzialmente patogeni (Turner, 2008). Rimuovere l'eccesso di colorante con soluzione salina sterile è importante per evitare i falsi positivi

4 Formazione a vescicola dell'endotelio dello strato più interno della cornea (membrana di Descemet). Si forma in caso di ulcera corneale a causa della pressione dell'umor acqueo, che agisce sulla membrana di Descemet orientandola verso l'esterno. La membrana può cedere con perforazione dell'ulcera e fuoriuscita dell'umor acqueo. (Treccani, *Dizionario della lingua italiana*, 2017)

che potrebbero confondere la ricerca della soluzione (le irregolarità della cornea consentono la presenza di colorante).

Il principale pericolo della fluoresceina è la sua facile contaminazione da parte dello *Pseudomonas aeruginosa*, per questo nella pratica clinica si usano, preferibilmente, delle strisce di carta con la sostanza in forma secca che vengono inumidite con una goccia di soluzione salina prima dell'utilizzo. 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*.

Le gocce di fluoresceina al 2% sono universalmente utilizzate in oftalmologia e in optometria. Però è da riportare il caso di una donna di 51 anni, che sviluppò una reazione anafilattica dopo che le fu instillata nell'occhio fluoresceina sodica al 2%, in seguito a un intervento di cataratta. Questo caso rivela il potenziale di questo colorante di causare una pericolosa reazione sistemica e sottolinea l'importanza di considerare questa possibile conseguenza nella somministrazione topica della fluoresceina al 2% a un paziente con anamnesi di anafilassi e altri allergeni (Shahid et Salmon, 2010). Un altro caso riguarda una donna di 67 anni con ipotensione e diabete di tipo II, a cui venne fatta una fluoroangiografia a causa della perdita di vista. Subito dopo la somministrazione intravenosa di 3 ml di fluoresceina al 20% la signora ha iniziato a soffrire di vertigini, diaforesi, pallore generalizzato, nausea, rilassamento dello sfintere, ipotensione, e un intenso malessere che richiedeva trattamento con antistaminici e corticosteroidi. In questo caso la signora nei precedenti esami con fluoresceina aveva lamentato solo una leggera nausea. Il problema principale in questi casi è soprattutto quello di distinguere le reazioni allergiche alla fluoresceina da altri tipi di reazioni, in quanto potrebbero essere utilizzati differenti approcci per la premedicazione e per la gestione delle reazioni (Lopez-Saez et al., 1998).

2.5 CAMPI DI UTILIZZO

La fluoresceina viene utilizzata in molteplici campi tra cui troviamo:

- la fluorangiografia per diagnosticare le patologie vascolari retiniche come controllare l'occlusione dei vasi retinici, diagnosticare le retinopatie diabetiche e

forme di maculopatia senile;

- la valutazione dell'integrità corneale, della congiuntiva, del film lacrimale;
- la valutazione dell'allineamento nell'applicazione delle LaC rigide (fit applicativo).

Molto importante è la presenza della fluoresceina nella misurazione della pressione intraoculare con il tonometro di Goldman. Questo è stato dimostrato dallo studio di Moses nel 1960, il quale nelle conclusioni, precisa che una concentrazione insufficiente della fluoresceina porta ad una sottostima della pressione intraoculare nella tonometria ad applanazione. Per cui, per evitare una sottostima, dopo l'anestesia topica, il foglio di fluoresceina deve essere inumidito con la salina e applicato nella congiuntiva, cosicché una certa quantità di fluoresceina, in condizione di fluorescenza, sarà presente nel film lacrimale durante la tomografia.

Nell'applicazione delle LaC morbide si preferisce usare la fluoresceina macromolecolare o fluorexone, poiché a causa della piccola dimensione molecolare della fluoresceina sodica, quest'ultima viene assorbita negli spazi polimerici delle lenti e causa una colorazione irreversibile di queste. La fluoresceina macromolecolare, invece, come dice il nome stesso, ha una dimensione molecolare maggiore che ne permette l'utilizzo senza particolari conseguenze al polimero della lente. Purtroppo ha un potere di fluorescenza inferiore alla fluoresceina e questo impedisce la rilevazione di piccoli problemi corneali, che potrebbero invece essere rilevanti.

2.6 STAINING CORNEALE

Lo *staining* corneale è probabilmente il più familiare di tutte le potenziali complicanze da LaC da quando l'importanza clinica è ben stabilita ed è facilmente osservabile (Efron, 2012). Difatti l'incidenza è abbastanza comune nei portatori di LaC (60%), ma molto spesso clinicamente insignificante. Si può presentare anche nei non portatori di LaC, con una percentuale del 35%. Anche se la precisa natura dello *staining* fluoresceinico è incerto (Caffery et Josephson, 1991; Thomas et al., 1997; Wilson et al., 1995), è comunemente accettato che lo *staining* con fluoresceina rappresenti un epitelio corneale compromesso. Le cause comuni di *staining* nella pratica clinica includono il

porto di LaC, cheratopatie e complicazioni di malattie sistemiche. Comunque, la colorazione può verificarsi anche senza alcuna causa ovvia (Korb et Exford Korb, 1970; Norn, 1970). Strettamente parlando, lo *staining* corneale non è un condizione in sé, piuttosto è un termine generale che si riferisce a un'apparenza di rottura del tessuto e ad altri cambiamenti patofisiologici nell'occhio anteriore come viene rilevato dall'aiuto di uno o più numeri di coloranti topici, come la fluoresceina, il rosa bengala e il verde di lissamina (Efron, 2012). Nei primi studi venivano usati dei metodi per definire lo *staining* che non erano accessibili ad altri professionisti, poiché la definizione era basata sull'opinione che veniva fatta durante l'osservazione al momento, per cui non poteva essere rivista in momenti differenti da diversi professionisti. Per esempio, se Korb e E. Korb avessero incluso gli altri 63 soggetti che mostravano *staining*, i quali non furono considerati significativi, la percentuale sarebbe salita dal 37% al 58%, questa è la spiegazione delle problematiche che si evidenziano con l'utilizzo della fluoresceina (Korb et Exford Korb, 1970), in quanto molto spesso le conclusioni che vengono fatte sono particolarmente soggettive. L'inclusione di soggetti con uno *staining* significativo, piuttosto che soggetti con una qualsiasi colorazione, può spiegare perché gli studi precedenti riportano una più bassa percentuale di *staining* (4-37%) rispetto a Schwallie et al. (1997), i quali usarono le *grading scale* (78%).

Il termine *staining*, perciò, non indica dei particolari meccanismi scatenanti, ma è attribuito a una grande varietà di eziologie, quali:

- meccanica: dovuta a un trauma, un corpo estraneo, una lente danneggiata, alla rigidità del materiale o della lente spessa;
- 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 di lenti idrogel);
- allergica: data da un'ipersensibilizzazione immediata o ritardata infettiva;
- disturbi sistemici e stati di salute precari come influenza e laringite.

2.6.1 STAINING CORNEALE NEI NON PORTATORI DI LAC

Prima di considerare l'entità della colorazione corneale nei portatori di LaC, dovrebbe essere presa in considerazione l'estensione della colorazione nella popolazione normale. Schwallie et al. nel 1972 hanno valutato la colorazione corneale con fluoresceina in 16 soggetti normali non portatori di LaC in un periodo di 2 settimane. La durata media di un episodio di colorazione superiore a un gruppo medio (grado 0,5) è stato trovato essere $1,2 \pm 0,4$ giorni. Per ambedue gli occhi, la posizione predominante della colorazione era la regione inferiore (50%), seguita poi da quella nasale (20%). Complessivamente, è stato ricavato un grado di colorazione medio pari a 0,5-0,6 (Schwallie et al., 1997). In uno studio simile, Dundas e al. hanno trovato un certo grado di colorazione corneale sul 79% delle cornee di 102 soggetti normali che hanno esaminato (Fujitani et al., 2016).

Nella pratica risulta molto importante l'esame pre-applicativo delle LaC per poter individuare i pazienti idonei al porto di queste. Anche nel caso dei non portatori di LaC è possibile individuare una varietà di *staining* corneali che non sempre sono riconducibili a un quadro specifico. In questi casi, è bene identificarli e riuscire a capirne la causa, poiché questi possono contribuire al successo applicativo. Nei non portatori di LaC alcuni studi hanno evidenziato la presenza di *staining* micropuntati diffusi, i quali sembrano localizzarsi preferenzialmente nella cornea periferica, dove si trova una maggiore attività mitotica, e in particolare, si posizionano nella zona infero-nasale, corrispondente alla zona di deflusso del film lacrimale. Gli *staining* in questi soggetti mostrano variazioni diurne, probabilmente legate a processi fisiologici, inclusa la secrezione della lacrimazione. Inoltre, si hanno variazioni giornaliere, e più intense colorazioni la mattina dovute probabilmente a un cambiamento del metabolismo e di apporto di ossigeno durante la notte. Nei soggetti che presentano il medesimo *staining* a distanza di giorni, invece, è stata ipotizzata una causa esterna ambientale o meccanica. Le colorazioni secondo Kikkawa sembrano evidenziare il fisiologico ricambio cellulare dell'epitelio dato dalla desquamazione di questo (Kikkawa, 1972).

Grazie agli studi di Norn del 1970 e di Soni e al. del 1996, si evince che c'è una probabile relazione tra le colorazioni e l'età del soggetto. Quello che hanno notato è

infatti un prevalenza di *staining* più alta nei soggetti anziani e più bassa in quelli adolescenti. Quando le cellule epiteliali si dividono, sulla strato cellulare vengono lasciate delle lacune molto simili a dei crateri. Se la fluoresceina, raggiunge questi buchi, molto probabilmente li colora ed è possibile che questi contribuiscano alla colorazione generale, posizionata prevalentemente nella zona periferica. Lo studio di Schwallie e al. del 1972 ha avvalorato la teoria che le colorazioni possano essere legate all'attività mitotica dell'epitelio corneale. Tuttavia, deve essere considerato che l'attività mitotica si sviluppa a livello della membrana basale e risulta quindi difficile arrivare alla conclusione che sia questa la reale causa degli *staining*. Norn, Josephson e Caffery hanno riportato che la localizzazione della colorazione corneale è stata notata più frequentemente nella regione inferiore e in quella nasale. Sebbene l'attività mitotica possa essere responsabile dello *staining* in quest'area, è credibile che altri fattori possano contribuire. Una spiegazione plausibile è quella data da un ammiccamento ridotto che causa un'instabilità del film lacrimale, creando una secchezza localizzata. Tuttavia, è stato mostrato dai lavori di Josephson e Caffery, che risultati molto simili sono stati registrati al mattino poco dopo il risveglio; ipotizzando che l'esposizione all'atmosfera non sia la causa effettiva. La predominanza dello *staining* in quest'area suggerisce la presenza di una relazione con i detriti lacimali e con la via di deflusso di questi. Questi detriti potrebbero essere causati da corpi estranei, come polvere e detriti, che vengono rimossi dalla superficie oculare attraverso il ricambio del film lacrimale, e che siano più presenti nell'area infero-nasale, perché seguono la via di deflusso delle lacrime. La presenza di colorazioni variabili nei non portatori di LaC suggerisce un'origine che si avvicina di più a quella traumatica, piuttosto che a un legame con la desquamazione fisiologica oculare. Risulta comunque difficile riuscire a individuare tra i vari *staining*, che si creano giorno dopo giorno, quali sono quelli dovuti a un trauma e quali quelli che potrebbero essere causati da una normale desquamazione.

2.6.2 STAINING CORNEALE NEI PORTATORI DI LAC

La prevalenza dello *staining* corneale, di qualsiasi grado di gravità in una popolazione di portatori di LaC, si pensa essere al 60%, ma spesso la colorazione è di basso livello e

in generale clinicamente insignificante (Efron, 2012). Brautaset e al. hanno riportato un'incidenza del 19,5% di colorazione corneale tra i 338 portatori di lenti in idrogel adattati, senza soggetti che mostrino macchie superiori al grado 2 usando la scala CCLRU. Begley e al. hanno riscontrato che il grado di colorazione media complessiva per entrambi gli occhi di 98 indossatori asintomatici di LaC morbide era 0,5. Vi è una significativa correlazione tra la colorazione corneale tra i due occhi. Un terzo dei soggetti che hanno partecipato allo studio presentavano una colorazione corneale notevole. Jalbert e al. hanno misurato i livelli di colorazione corneale in un periodo di due anni di porto giornaliero riuscito e di porto continuo di LaC idrogel monouso. I loro risultati erano molto simili a quelli riportati da Begley e al.; i livelli complessivi di colorazione corneale erano bassi, con valori medi inferiori o uguali al grado di 0,5 in tutti i gruppi. Non era presente una sostanziale differenza in estensione, profondità o distribuzione geografica della colorazione corneale tra il porto giornaliero e l'utilizzo prolungato di LaC. La colorazione è stata riportata in modo più frequente nelle aree superiore e inferiori della cornea rispetto a quella centrale, nasale o regioni temporali. Nei portatori di LaC negli anni sono stati diagnosticati una grande varietà di *staining* riconducibili all'uso di queste. Sono stati evidenziati varie colorazioni collegate ad abrasioni causate da ipossia, come ad esempio nell'utilizzo di LaC in PMMA, dove il sintomo principale presentato dal portatore, successivamente alle ore di sonno, era il dolore acuto. Altri sintomi riscontrati 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, si adattata al calo di ossigeno, ma portando la lente per un periodo più lungo inizia a sviluppare un edema supplementare. I nervi corneali perdono sensibilità e appena riprendono la loro normale funzione, il paziente si sveglia per la sensazione di dolore (Efron, 2012). Le più comuni colorazioni causate dal bordo della lente sono quelle provocate dall'uso delle LaC rigide. Solitamente si osservano nell'area a ore 3-9 della cornea e della congiuntiva, e sono una delle cause della sindrome dessicativa della cornea periferica. Possono essere causate dal bordo della lente che graffia la superficie oculare seguendo il movimento di avanti e indietro causato dal cambio di sguardo (Efron, 2012). La 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. La lesione arcuata epiteliale superiore (SEAL), si nota solo con la fluoresceina, è asintomatica quando la lente è applicata, mentre si può avvertire una sensazione di corpo estraneo quando la lente viene rimossa. È causata da ipossia, dal disegno del bordo della lente, da corpi estranei, dalla cheratocongiuntivite limbare, dalla congiuntivite tossica, dalla disidratazione e da tante altre cause (Anderson et al., 2006). Le *dimple veil* sono delle piccole indentazioni a livello epiteliale che si riempiono della componente acquosa del film lacrimale; sono molto simili in apparenza alla superficie di una pallina da golf. La loro eziologia è collegata a delle indentazioni dell'epitelio dovute a delle piccole bolle di aria intrappolate al di sotto della lente o sono dovute a una cattiva relazione tra la superficie posteriore della lente e la superficie corneale. Solitamente scompaiono con la rimozione della lente (Anderson et al., 2006). Gli *staining* possono, inoltre, essere dovuti: ad abrasioni meccaniche, alla rimozione accidentale dell'epitelio, ad abrasioni causate da LaC rotte, scheggiate o lacerate, al raggrinzimento corneale causato dalle forze meccaniche imposte sulla cornea dal peso della lente e delle palpebre, ad abrasioni chimiche create dai numerosi prodotti per la manutenzione, all'uso di enzimi per la pulizia e di soluzione preservate, ad abrasioni da corpo esterne (trucco, schegge di vetro ecc.), ad abrasioni dovute a un'esposizione prolungata ai raggi ultravioletti simile a quella provocata da fattori chimici.

Capitolo III

ANATOMIA CORNEALE

La cornea è una membrana trasparente che costituisce la porzione anteriore della tunica fibrosa esterna del bulbo oculare, del quale rappresenta solo la sesta parte, in quanto la porzione rimanente è formata dalla sclera. Le due strutture contigue sono intimamente connesse tra loro per una vera fusione di tessuti in un'area definita limbus. La superficie corneale anteriore, convessa, è in rapporto con il film lacrimale e con le palpebre. Ha un contorno lievemente ellittico con un diametro orizzontale medio di 11,7 mm (11-12,8 mm), un millimetro maggiore di quello verticale, che è in media 10,7mm (10-11,5 mm). Tale differenza è causata dall'astigmatismo fisiologico. La superficie posteriore, concava e circolare, è in rapporto con la camera anteriore e presenta lo stesso diametro (circa 11,7 mm) e lo stesso raggio (6,8 mm) in tutti i meridiani (Scudieri, 1998).

La cornea ha uno spessore che varia tra i 445 e i 600 μm e cresce dal centro alla periferia del 23% (Doughty et Zaman, 2000), un indice di rifrazione di 1,37 ed un potere rifrattivo intorno alle 45 diottrie, risultando la struttura con maggior potere rifrattivo del sistema visivo.

Dal punto di vista anatomico, la cornea risulta essere istologicamente suddivisa in 5 strati, che dall'esterno all'interno sono: epitelio, membrana di Bowman, stroma, membrana di Descemet, endotelio (fig.7).

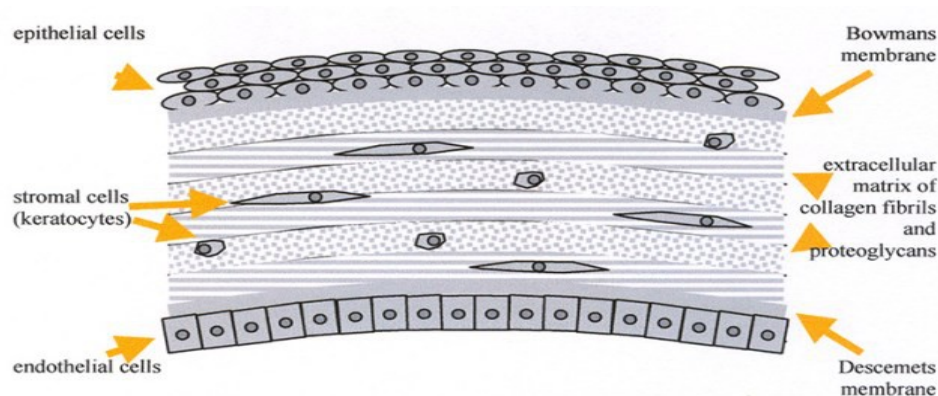


Figura 7. Strati della cornea¹.

L'epitelio corneale insieme a quello congiuntivale, struttura a cui è strettamente correlato sia in condizioni fisiologiche che patologiche, formano l'epitelio della superficie oculare (Scudieri, 1998). Il suo spessore varia da 45 μ m nella zona centrale ad 80 μ m in quella periferica e rappresenta circa il 10% di quello totale delle membrane. È un epitelio di tipo pavimentoso, pluristratificato, squamoso e non cheratinizzato, composto da cellule elastiche, dotate di notevole plasticità e che facilmente scivolano le une sulle altre. L'epitelio comprende un singolo strato di cellule basali, due o tre strati di cellule alari e due strati di cellule squamose di superficie. Questi strati rappresentano differenti stadi di maturazione di una stessa unità cellulare. Le cellule epiteliali hanno un'emivita di alcuni giorni e rigenerano costantemente lo strato esterno grazie a un regolare processo di moltiplicazione delle cellule nello strato basale, di stratificazione, di migrazione in superficie e di degenerazione con distacco nel film lacrimale (Rame, 2018). 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. La loro attività mitotica, che è cospicua, assicura la sostituzione degli strati superficiali che progressivamente e periodicamente desquamano (Scudieri, 1998). Queste cellule 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 basali vanno incontro a modificazioni morfologiche e biochimiche, che ne determinano la trasformazione in elementi di forma poligonale con estroflessioni e ramificazioni, i quali assicurano l'adesione tra loro e con gli elementi basali sottostanti. Le cellule poligonali

¹ <https://www.paolorama.it/anatomia-cornea/>

sono disposte in due o tre strati di elementi, i quali man mano che migrano in superficie tendono ad appiattirsi. Spostandosi verso la superficie gli elementi poligonali si trasformano in cellule squamose che, organizzate in 2-3 file sovrapposte, parallele alla superficie corneale, costituiscono questo strato (Scudieri, 1998). Le cellule superficiali sono rappresentate da elementi piatti, il cui legame è assicurato sia dai desmosomi che dalle *tight-gap-junctions*.

Esiste una struttura alquanto complessa chiamata giunzione epitelio-stromale che giova essenzialmente a garantire la salda adesione dell'epitelio alla membrana di Bowman, condizione indispensabile questa per mantenere l'integrità strutturale e funzionale della cornea (Scudieri, 1998). Tale formazione è costituita da filamenti che originano dal citoplasma delle cellule basali, attraversano la loro membrana basale e ancorano tali elementi, e quindi tutto l'epitelio, alla sottostante Bowman².

La membrana di Bowman è una membrana acellulare, uniforme con uno spessore di circa 8-16 micron, posta tra epitelio e stroma, che si interrompe bruscamente a livello del limbus (Scudieri, 1998). La Bowman è costituita da un sottile intreccio di fibrille di collagene, principalmente di tipo V. distribuite in maniera dispersa in un substrato granuloso amorfo. Sono presenti anche rare cellule di Schwann che appartengono alle fibre nervose sensitive, le quali perforano la membrana per dirigersi alle cellule epiteliali. Perifericamente, la sua superficie anteriore si continua con la membrana basale dell'epitelio congiuntivale ed è caratterizzata dalla presenza di piccole interruzioni, che permettono il passaggio di rami nervosi perforanti, i quali prenderanno poi contatto con le singole cellule epiteliali; mentre la superficie posteriore continua senza limiti netti nello stroma corneale.

Lo stroma con i suoi 500 micron, rappresenta il 90% circa dello spessore corneale. È costituito da lamelle collagene e da cheratociti; possono essere presenti anche cellule di Schwann, polimorfonucleati, linfociti e macrofagi. Istologicamente si distinguono delle lamelle, formate da fibrille di collagene di uguale diametro, disposte parallelamente tra loro e anche alla superficie corneale, che si intersecano fra di loro a angolo retto, in

2 Gli studi abbastanza recenti sullo sviluppo della giunzione epitelio-stromale fanno ritenere che le fibrille di ancoraggio, come la membrana basale, originino dalle cellule epiteliali (Tisdale et col., 1988)

modo tale da assicurare la trasparenza corneale. Quest'ultime sono immerse in una sostanza fondamentale costituita biochimicamente da proteoglicani, glicoproteine, alcune proteine solubili, minerali ed acqua³. Tra le lamelle collagene sono situati i cheratociti stromali, che sono delle cellule appiattite (fibroblasti modificati), disposti parallelamente alla superficie corneale e uniti tra loro da ponti citoplasmatici, con la funzione di assicurare la costante sintesi delle fibrille di collagene e della matrice extracellulare.

La membrana di Descemet è una membrana basale trasparente, situata tra lo stroma e l'endotelio, che in periferia si continua con le fibre del trabecolato. Ha uno spessore di circa 8-10 micron nell'adulto (Scudieri, 1998). Presenta una struttura fibrillare collagena, priva di cellule e prende una configurazione multilamellare con una porzione bandata e una non bandata. È prodotta per elaborazione e secrezione dalle cellule endoteliali sottostanti, di cui costituisce la membrana basale. Dotata di elevata elasticità, anche se non presenta fibre elastiche, è molto resistente ai traumi; inoltre, una volta lesa, può rigenerarsi (Scuderi, 1998). Sia la sua superficie anteriore che quella posteriore sono scarsamente aderenti rispettivamente allo stroma e all'endotelio.

L'endotelio è lo strato più interno della cornea. È costituito da un unico strato omogeneo di cellule poliedriche appiattite, le quali diventano cuboidi a livello della linea di Schwalbe (Scudieri, 1998). In prossimità sia della superficie anteriore che di quella posteriore, sono sovente reperibili vescicole pinocitosiche, indice di una funzione secretoria o di trasporto (Svedbergh et Bill, 1972). I margini cellulari si giustappongono e presentano interdigitazioni reciproche. Le giunzioni intercellulari sono del tipo *gap junctions* e *maculae occludentes (focal tight junctions)* che derivano dalla fusione delle membrane cellulari delle cellule tra loro adiacenti, e desmosomi (Oyster, 1999). Non sono presenti, invece, come ipotizzato sulla base dei primi studi ultrastrutturali, le *zonulae occludentes*. La membrana plasmatica delle cellule appare grinzosa e in essa le glicoproteine e i polisaccaridi presentano una disposizione diversa a seconda che si prenda in esame la porzione apicale o quella basale della cellula (François et Fehér,

3 Proteoglicani e glicoproteine hanno una struttura molto simile: sono macromolecole costituite da una catena centrale di proteine a cui aderiscono catene di oligosaccaridi (composte da ecosamine e monosaccaridi nel caso delle glicoproteine) e catene di glicosamminoglicani (composte da exosamine ed acido ialureico nel caso dei proteoglicani) (Scudieri, 1998).

1972). In quest'ultima zona la concentrazione di polisaccaridi è più elevata. Tale diversità può essere riferita alle differenti proprietà funzionali delle due aree cellulari (Scudieri, 1998).

3.1 GIUNZIONI STRETTE

Le giunzioni strette dell'epitelio corneale sono costituite da creste continue di proteine idrofobiche giunzionali transmembrana, cioè proteine che attraversano le membrane plasmatiche delle cellule presenti nel tessuto e che si interconnettono nello spazio intercellulare a formare uno strato impermeabile. Come si osserva in figura 8, tra le proteine giunzionali che formano questi complessi vi sono almeno 40 tipi differenti di proteine integrali di membrana (Schneeberger et Lynch, 2004; Tsukita et al. 2008), tra cui le occludine, le claudine e le molecole adesive giunzionali (JAM), che si giustappongo reciprocamente nello spazio intercellulare. Inoltre, sono presenti proteine periferiche di membrana (*zonula occludens*), molecole regolatrici come la chiansi e proteine citoplasmatiche come la cingulina, con funzione strutturale e di segnale, simile alla miosina.

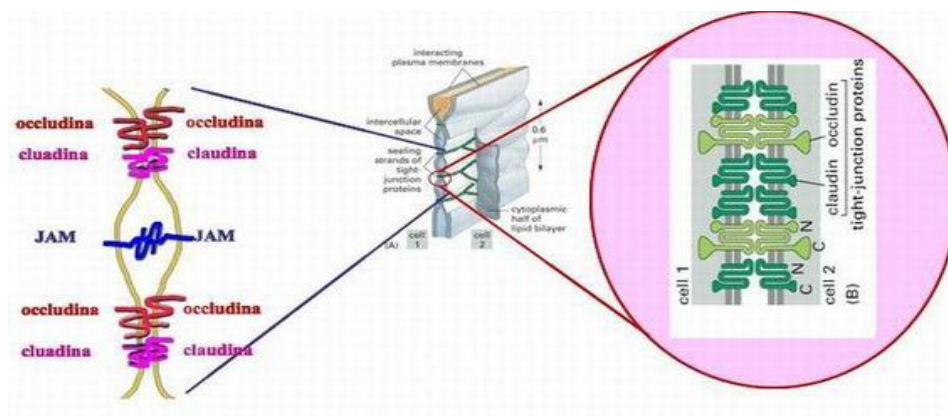


Figura 8. Le proteine giunzionali transmembrana delle Tight junctions sono le claudine, le occludine e le JAM che si giustappongo reciprocamente nello spazio intercellulare (Schneeberger et Lynch, 2004).

Il legame tra le proteine transmembrana (occludine e claudine) e i microfilamenti actinici dello strato corticale, che rinforzano l'adesione tra le cellule adiacenti nel lato citoplasmatico, è mediato da proteine periferiche, tra cui le ZO1, ZO2 e ZO3 (*Zonula Occludens protein 1, 2 e 3*) (Fanning et al. 1998). La loro funzione è quella di fondere gli emistrati esterni delle due membrane plasmatiche, che costituiscono la giunzione, lungo una linea di coniugazione netta. La fusione, in corrispondenza delle linee di coniugazione, elimina lo spazio extracellulare e contribuisce a rendere impermeabile la giunzione al passaggio dei liquidi extracellulari, di ioni e molecole in soluzione, in quanto, questi sono sottoposti a selezione molecolare, dovuta alla mediazione di proteine transmembrana calcio-dipendenti. Le giunzioni *tight* impediscono anche la diffusione laterale delle proteine, operandone il loro confinamento (funzionale) nella porzione apicale o in quella laterobasale delle membrane.

Le occludine sono proteine con 4 domini transmembrana e 2 *loop* extracellulari. Il dominio C-terminale, localizzato nel citoplasma, si lega direttamente a ZO1 che, a sua volta, lega la parte apicale dell'actina. Questa porzione di occludina è ricca di siti di fosforilazione (tiroxina, serina e treonina) che possono essere modificati dalle chinasi e dalle fosfatasi. L'occludina non fosforilata è distribuita nella membrana basolaterale e nelle vescicole citoplasmatiche, mentre l'occludina fosforilata è localizzata nelle TJ e determina una ridotta permeabilità paracellulare (Mitic et al., 2000; Schneeberger et Lynch, 2004). 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 idrofile, mentre le membrane plasmatiche apicali, con i glicocalici associati, sono prontamente permeabili alle molecole lipofile (Alphonus et Rodseth, 2014). 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, proteine ZO, che ancorano i filamenti al citoscheletro di actina, oltre che correre attraverso gli spazi intracellulari e chiuderli. Probabilmente un loro danneggiamento, provoca il passaggio dei coloranti nell'epitelio corneale.

3.2 MICROVILLI E GLICOCALICI APICALI.

Le cellule epiteliali nei differenti organi esibiscono modificazioni delle cellule di membrana nella parte apicale o sottostante. Nel caso dell'epitelio congiuntivale abbiamo la presenza dei microvilli (Fanning et al., 1998). I microvilli sono delle estroflessioni della membrana plasmatica nel polo apicale di cellule appartenenti al tessuto epiteliale di rivestimento. Sottili filamenti, visibili al microscopio elettronico, si proiettano dalla superficie delle estroflessioni. Essi sono probabilmente costituiti da mucopolisaccaridi o da mucina e sono essenziali al mantenimento della stabilità del film lacrimale (Scudieri, 1998). La loro struttura è sostenuta dal citoscheletro, costituito da una trentina di microfilamenti di actina paralleli. La zona apicale del fascio di microfilamenti è stabilizzata da un cappuccio proteico amorfo ed è collegata in modo laterale alla membrana attraverso la calmodulina e la miosina I. Alla base del microvillo, invece, i microfilamenti sono ancorati ad una zona corticale, ricca in actina e spectrina. La funzione dei microvilli, legandosi al muco presente, è quella di rendere idrofila la superficie stessa della cornea, altrimenti idrofoba, di aiutare il film lacrimale attraverso il legame con lo strato mucoso ad aderire alla cornea aumentando l'area della superficie esposta ($1,04 \text{ cm}^2 \pm 0,12$) e di esaltare la diffusione ed i processi di trasporto attivo.

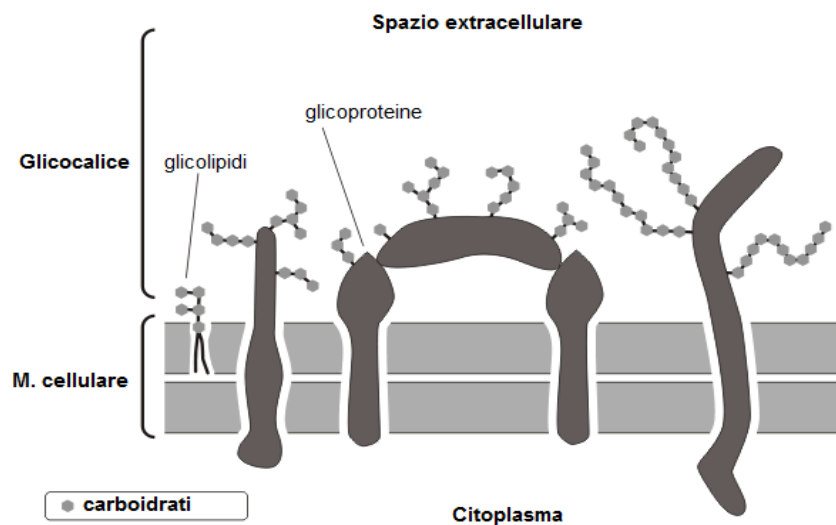


Figura 9. Il glicocalice è formato da tutta questa componente di carboidrati che sporgono dalla membrana cellulare. ⁴

Le cellule apicali, in particolare, possiedono sulla membrana esterna (a contatto con il film lacrimale) numerosi microvilli e micropliche (Oyster, 1999) dove aderisce il glicocalice (fig.9), costituito principalmente da mucine di membrana MUC1, MUC4, MUC16 (Kaufman et al., 2011), che hanno ecto ed endodomini (porzioni di proteine che restano esposte allo spazio extracellulare), galattina-3 e T-antigeni. Le mucine hanno come funzione principale quella di aumentare l'umettabilità e la persistenza del film lacrimale sulla superficie corneale legandosi con lo strato mucoso (Tiffany, 2008). Le mucine componenti il glicocalice sono prodotte dalle cellule caliciformi della congiuntiva e, in parte minore, dalle cellule dell'epitelio (Kaufman et al., 2011). Si presume che il glicocalice sia altamente organizzato, molto probabilmente attraverso interazioni delle mucine superficiali con lectine come proteina, ad esempio la galectina-3. Altri componenti del glicocalice includono proteoglicani con i loro associati glicosaminoglicani (Herranz, 2012). 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 poiché il glicocalice è intimamente collegato alla funzione omeostatica dell'endotelio (Alphonus et Rodseth, 2014), e la stabilità del film lacrimale è

⁴ <http://testdimedicina.altervista.org/blog/glicocalice/>

compromessa.

3.3 AQUAPORINE E GIUNZIONI COMUNICANTI

Attraverso lo spessore dell'epitelio, le cellule adiacenti sono interconnesse da canali coinvolti nel trasporto transepiteliale dell'acqua e dai *gap junctions* o giunzioni comunicanti, che aiutano lo scambio di piccole molecole e ioni, e mediano la comunicazione tra le cellule (Pfister, 1973). Probabilmente, la maggior parte della diffusione dell'acqua attraverso l'epitelio avviene tramite i canali che trasportano l'acqua. Sperimentalmente, alcuni studi hanno dimostrato 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 (Verkman et Levin, 2006).

Le acquaporine sono una famiglia di proteine transmembrana il cui nome riflette il loro ruolo di “canali” molecolari dell'acqua, presenti in ogni forma di vita (Andreoli et Egid, 2011), la cui funzione principale è di trasportare l'acqua attraverso la membrana cellulare in risposta al gradiente osmotico (Verkman, 2008). Il concetto generale è che le acquaporine facilitano rapidi assorbimenti/secrezioni transepiteliali di fluidi quasi-isomolari, come anche rapidi movimenti di acqua sostenuti da gradienti osmotici. Un'altra proprietà associata alle AQP è la bidirezionalità, in quanto si ottengono valori identici per la permeabilità dell'acqua sia in esperimenti di *swelling* che di *shrinkage* (Andreoli et Egid, 2011).

Capitolo IV

PERMEABILITA' CORNEALE

La superficie corneale non è una barriera totalmente impermeabile, ma permette il passaggio di piccole componenti idrofile. Nel 1988, Grass e Robinson 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 alle membrane lipidiche dell'epitelio.

Hamalainen e al. nel 1997 hanno riassunto in una tabella le scoperte riguardanti l'implicazione dell'entrata dei coloranti idrofili di differenti pesi molecolari nell'epitelio corneale e quindi, le loro proprietà legate agli *stainings*. Il passaggio di coloranti è influenzato dal peso molecolare, dalle dimensioni e dai 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) o per il rosa bengala (MM 1018 Da). La fluoresceina non viene persa solo per la normale via di deflusso, cioè attraverso i canalicoli nasolacrimali, ma anche per diffusione attraverso la congiuntiva e per di più in maniera molto velocemente, proprio grazie al fatto che viene in parte assorbita dalla cornea (Macdonald et Maurice, 1991).

La fluoresceina di sodio è una molecola polare a pH fisiologico ed è ragionevolmente solubile nell'acqua (Wilson et al., 1995). Nell'esperimento condotto da Inoue e col. nel 2014, la soluzione di fluoresceina al 10% (0,2 μ L) è stata somministrata mediante iniezione intrastromale nelle cornee di coniglio usando una siringa. Il colorante iniettato apparve con una fluorescenza a forma di anello come si può vedere nella figura 10, dove non si osservava alcuna fluorescenza al centro dell'area iniettata, il fluido stromale diluiva il colorante e consentiva alla fluorescenza di rimanere. Questo, molto probabilmente, è dovuto alla notevole caratteristica di spegnimento della fluoresceina in

base alla sua concentrazione (Nichols et al., 2012; Chen et Knutson, 1988); un'alta concentrazione di fluoresceina avrebbe una maggiore riduzione nell'intensità della fluorescenza rispetto a una bassa concentrazione, dovuta all'auto-spegnimento del colorante ad alta concentrazione (Inoue et al. 2014).

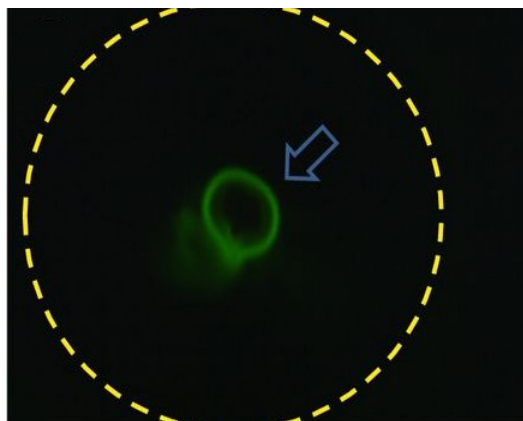


Figura 10. Colorante iniettato che assume una forma ad anello. (Inoue, T., et al., 2014)

4.1 MECCANISMI DI PENETRAZIONE ATTRAVERSO LA CORNEA

I modelli di trasporto classici possono parzialmente spiegare la permeazione delle cornea, ma richiedono delle ipotesi riguardanti la struttura corneale, i componenti e le vie di trasporto e una serie di proprietà fisiche, come LogP e raggio molecolare (Edward et Prausnitz, 1998; 2001). La permeazione della membrana cellulare ha una componente non specifica per quanto riguarda la struttura chimica del soluto, ampiamente catturata dal suo LogP. Tuttavia, vi è anche una componente specifica della struttura per la permeabilità della cornea, riflessa dalla limitazione del semplice utilizzo di LogP, nei modelli di permeabilità della cornea (Li et al., 2014).

Seguendo l'approccio generale adottato da alcuni studi fatti da Grassman e al. nel 1988, da Maurice nel 1953 e da Huang e col. nel 1983, la permeabilità allo stato stazionario della cornea può essere determinata considerando le permeabilità individuali dei tre tessuti primari che compongono la cornea: endotelio, stroma ed epitelio (Fatt et Weissman, 1992). La membrana di Bowman e la membrana di Descemet, invece, sono

così sottili e permeabili, che non contribuiscono in modo significativo alla complessiva permeabilità corneale (Edwards et Prausnitz, 2001).

4.1.1. ENDOTELIO

Lo strato più interno della cornea, l'endotelio, ospita un'attiva pompa di acqua che regola lo spessore corneale attraverso l'idratazione (Fishbarg et Lim, 1974; Huff et Green, 1983). È un tessuto molto poroso con una rete intercellulare aperta, permettendo così alle larghe molecole (superiori a 70.000 Da) di attraversare la membrana facilmente (Mishima et Trenberth, 1986; Hull et al., 1977), perciò la permeabilità endoteliale dipende esclusivamente dal peso molecolare del componente, e non dalla sua carica o dalla sua natura idrofilica.

Ci sono due percorsi principali per il movimento attraverso l'endotelio corneale: la via transcellulare e quella paracellulare (cioè tra le cellule). La frazione di un dato soluto che attraversa ogni percorso è determinata principalmente dal suo coefficiente di distribuzione membrana-acqua (F). Più grande è F (per molecole idrofobiche), maggiore è l'ammontare relativo di soluto che si diffonde attraverso le cellule. Poiché i due percorsi sono in parallelo, la permeabilità complessiva dello strato cellulare (k_{layer}) è la somma delle permeabilità di ogni percorso (eq.1):

$$k_{layer} = k_t + k_p \quad (eq. 1)$$

dove k_t e k_p sono le permeabilità transcellulari e paracellulari, rispettivamente (Edwards et Prausnitz, 2001).

A) Via transcellulare

Il movimento transcellulare (ad esempio all'interno o attraverso le membrane cellulari) coinvolge la diffusione/partizione di cellule/tessuti, i canali di diffusione e i trasportatori mediati da vettori ed è il percorso di scelta per molecole idrofobiche. È un processo dissipativo dipendente dalla differenza presente nella concentrazione del soluto e nella proprietà di permeabilità superficiale dell'area della membrana coinvolta; soprattutto per le molecole idrofobiche è importante la partizione dei componenti, la quale presenta

un'elevata energia di attivazione dovuta alla diffusione relativamente alta attraverso la membrana cellulare.

Ci sono due possibili percorsi coinvolti nella via transcellulare attraverso l'epitelio. Il primo percorso consiste nel partizionamento dallo stroma ricco di acqua alle membrane plasmatiche (ricche di lipidi) delle cellule endoteliali, seguito dalla diffusione nelle membrane cellulari attraverso l'endotelio e dal partizionamento al di fuori dalle membrane e/o all'interno dell'umor acqueo, che bagna la superficie interna della cornea. Questo percorso, indicato come via laterale del percorso transcellulare, non include il trasporto all'interno del citosol delle cellule endoteliali (Edwards et Prausnitz, 2001).

Mentre il secondo percorso, chiamato trasversale, inizia con il partizionamento interno attraverso la diffusione trasversale, per poi proseguire con il partizionamento al di fuori della membrana cellulare anteriore, la diffusione attraverso il citosol, il partizionamento interno, la diffusione da una parte all'altra e la partizione al di fuori della membrana cellulare posteriore (Edwards et Prausnitz, 2001).

B) Via paracellulare

In contrasto con la via transcellulare, la via paracellulare rappresenta il diffusivo e convettivo trasporto che accade attraverso gli spazi intracellulari e i *tight junctions* (Malhotra et Majumdar, 2001); è un percorso riempito d'acqua, ostacolato da *gap junctions* e strette giunzioni, favorito da molecole e ioni idrofili (Edwards et Prausnitz, 2001), con la presenza di canali di diffusione per l'acqua, importanti per il trasporto corneale di componenti idrofilici e caratterizzati da una bassa energia di attivazione¹. Il trasporto convettivo è dominato da un equilibrio di gradienti idrostatici e osmotici, dalla concentrazione di soluti e dal coefficiente idraulico di riflessione della barriera restrittiva (Liaw et Robinson, 1993).

La disposizione cellulare dell'epitelio della cornea preclude il trasporto paracellulare della maggior parte dei farmaci oftalmici e limita il movimento laterale nell'epitelio anteriore². La dimensione dei pori intracellulari presenti nella superficie corneale dell'epitelio è stata stimata essere all'incirca 60Å, per cui è consentito il passaggio a

1 Grass, G.M., Robinson, J.R., *Mechanims of corneal drug penetration I*, J Pharm Sci, 1988, 77 (1):3.

2 Grass, G.M., Robinson, J.R., *Mechanism of corneal drug penetration II*, J Pharm Sci, 1988, 77 (1): 15.

piccoli ioni e molecole idrofiliche per raggiungere la camera anteriore (Klyce et Crosson, 1985) e comunque, per la maggior parte dei farmaci, il trasporto paracellulare è precluso in ogni caso da complessi *tight* intergiunzionali.

4.1.2 EPITELIO

Fisiologicamente, l'epitelio è relativamente impermeabile a componenti polari o idrofilici con un relativo peso molecolare maggiore di 60-100 Da. Il glucosio (MM 180 Da), per esempio, non riesce a passare attraverso l'epitelio a causa del suo peso (Bachman et Wilson, 1984). L'epitelio lascia passare i componenti lipofilici attraverso la solubilizzazione nelle membrane cellulari lipidiche (Benson, 1974), mentre provvede una maggiore resistenza al movimento degli ioni³ o dell'acqua⁴. Simile all'endotelio, l'epitelio ha due vie parallele, una transcellulare e una paracellulare.

A) Via transcellulare

La permeabilità della via transcellulare nell'epitelio è molto simile a quella dell'endotelio. Anche in questo caso sono presenti due tipi di diffusione: laterale e trasversale. Nella diffusione laterale si è ipotizzato che le cellule epiteliali siano imballate molto strettamente, cosicchè non ci sia quasi nessuna discontinuità quando un soluto si diffonde da una cellula all'altra, cioè il partizionamento membrana-membrana non è un passo limitante della velocità. Uno dei valori differenti dall'endotelio è la lunghezza media del percorso di diffusione, dove si considera che le cellule abbiano la forma di cilindri. Quando una molecola si partiziona in una membrana cellulare, da qualche parte sulla sua superficie superiore, deve prima diffondersi attraverso il bordo della superficie e poi giù lungo il lato della cellula (Edwards et Prausnitz, 2001).

Mentre, per determinare la permeabilità della via trasversale attraverso l'epitelio, sono state prese singolarmente la permeabilità di una singola membrana cellulare e quella del citosol in una singola cellula, come nell' endotelio.

3 Klyce, S.D., *Electrical profiles in the corneal epithelium*, I *Physiol*, ottobre 1972, 226(2):407-29.

4 Green, K., *Anatomic study of water movement through rabbit corneal epithelium*, *Am I ophthalmol*, 1969, 67:110.

4.1.3 STROMA

Lo stroma corneale è attraversato da acqua solubile, componenti polari e in quantità inferiore da componenti non-polari. Persino le sostanze con elevato peso molecolare diffondono con tranquillità (Maurice et Watson, 1965; Green et al., 1983) . Esso esercita una barriera diffusionale ai farmaci altamente lipofilici dovuta alla sua natura idrofilica. Non ci sono complessi *tight junctions* nello stroma e il trasporto paracellulare attraverso questo tessuto è possibile (Malhotra et Majumdar, 2001).

In precedenza è stato sviluppato un modello per la permeabilità dello stroma a piccoli soluti e macromolecole (Edwards et Prausnitz, 1998). L'analisi è stata eseguita su tre scale di lunghezza; per ciascuna, si è assunto un determinato accordo di fibre di geometria e orientamento definiti, intorno e attraverso cui si diffondono i soluti. Calcoli corrispondenti erano basati su un approccio di matrice di fibre. Alla macroscale, lamelle di collagene stromali sono disposte in fogli paralleli. Alla mesoscale, le lamelle contengono fibrille di collagene che formano matrici esagonali di cilindri paralleli. Alla microscale, la sostanza di base che circonda le fibrille e le lamelle era modellata come una collezione di fibre orientate in modo casuale, rappresentando i proteoglicani. Va notato che, per questo studio, l'idratazione stromale era stata considerata come 78%, che è il valore fisiologico per la cornea intatta (Edwards et Prausnitz, 1998; Fatt et al., 1992).

4.2 MOVIMENTO DELLA FLUORESCEINA NELLO STROMA

L'epitelio corneale è una barriera efficace al passaggio della fluoresceina nel stroma e impedisce il suo rapido ingresso nel umore acqueo. Jones e Maurice hanno usato ionoforesi⁵ per introdurre fluoresceina nello stroma corneale, dal quale poteva diffondersi nell'umore acqueo.

C'è una ragione per credere che il movimento della maggior parte delle sostanze nello stroma obbedisca alle semplici leggi governanti la diffusione in modo uniforme. Il comportamento della fluoresceina, la quale entra nella cornea, può essere prontamente

5 Ionoforesi è una tecnica di somministrazione farmaceutica attraverso l'epidermide (somministrazione per via transcutanea), utilizzando una corrente continua (corrente galvanica), prodotta da un apposito generatore. Sostanzialmente si potrebbe definire un'iniezione "senza ago".

calcolata su questa base. Il più semplice caso da considerare è quando alcuni dei coloranti sono momentaneamente liberi sulla superficie dello stroma e si diffondono attraverso quest'ultimo; questo dovrebbe corrispondere approssimativamente a quello che succede quando una goccia di concentrato di soluzione è instillato nel sacco congiuntivale e poco dopo lavato via. La figura 11 mostra come la concentrazione varia attraverso lo stroma, mentre la fluoresceina si diffonde in esso. La forma della curva è quella del “errore semplice ” o curva di Gauss, ed è tale che la concentrazione è data da (eq.2) (Maurice, 1960):

$$\frac{M}{\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (\text{eq. 2})$$

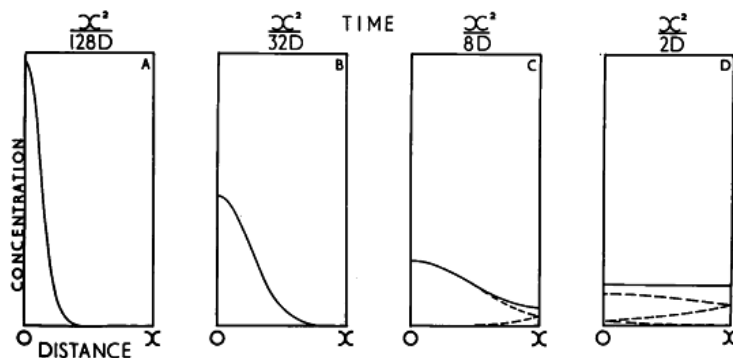


Figura 11. Diffusione della fluoresceina attraverso lo stroma. I bordi di ogni pannello rappresenta le due facce della cornea e le curve rappresentano la distribuzione della fluoresceina in quattro momenti differenti dopo la sua entrata nello stroma nella facciata di sinistra. Le linee tratteggiate rappresentano una semplice onda di diffusione; la linea continua, la concentrazione effettiva che si incrementa (Maurice, 1960).

dove t è il tempo dopo che la massa M di fluoresceina è stata liberata su ogni unità di area della cornea, e x è la distanza nello stroma. D, invece, è la costante di diffusione della fluoresceina nello stroma, una quantità che esprime la velocità di diffusione ed è espressa in unità di cm²/sec. In ogni pannello successivo nella figura il colorante si è diffuso due volte più lontano, corrispondente a un tempo di diffusione pari a quattro volte. Quando l'onda di diffusione raggiunge una barriera, come l'epitelio o l'endotelio, si perde relativamente poco colorante nel periodo in esame, e questo viene rappresentato nei grafici dalla linea spezzata, come si può vedere nei pannelli c e d. L'effettiva

concentrazione è data dalle onde incidenti sommate a quelle riflesse e vengono rappresentate dalla linea continua.

Il tempo per la crescita della concentrazione nella superficie endoteliale può essere derivato anche da una formula, ed è mostrato in figura 12, curva a. La fluoresceina viene gradualmente persa attraverso l'endotelio e ne viene incrementata la concentrazione nell'umore acqueo. La quantità totale, che passa attraverso, può essere ottenuta dall'integrazione della curva a, con la sua crescita, indicata dalla curva b. Naturalmente, il colorante sarà perso nella camera anteriore dal drenaggio, e la concentrazione nell'umore acqueo scenderà al di sotto di quello mostrato dalla curva b col passare del tempo. In esperimenti simili, la fluoresceina può essere portata a contatto continuo con la superficie della cornea, per esempio una soluzione del colorante iniettata nella camera anteriore, così il colorante sarà liberato ad un ritmo costante ed è mostrato dalla curva a, figura 13. Per confronto, la curva b in questa figura mostra la variazione di concentrazione, che dovrebbe essere trovata, se la stessa quantità totale di fluoresceina, Q_t , fosse stata liberata all'inizio, invece che gradualmente per tutto il periodo, t . L'iniziale crescita della concentrazione in ogni punto dello stroma, quando la soluzione di fluoresceina è costantemente a contatto con la superficie della cornea, è identica nella forma alla curva b, figura 12.

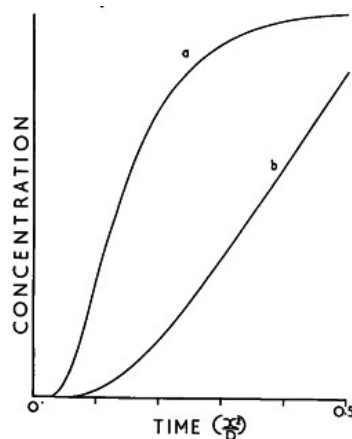


Figura 12. (Curva a) Aumento della concentrazione nell'endotelio della cornea, dopo che la fluoresceina è stata applicata nella facciata dell'endotelio. (Curva b) Aumento della concentrazione nell'umor acqueo. Ordinata è la concentrazione nelle due unità arbitrarie, differente per le due curve (Maurice, 1960).

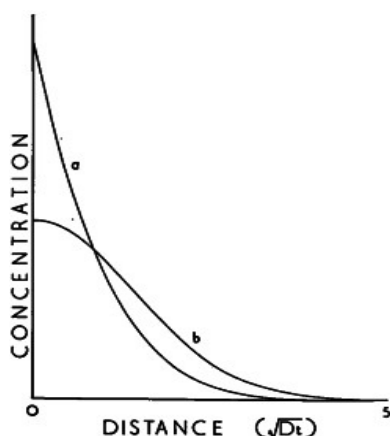


Figura 13. I profili della concentrazione della fluoresceina nella cornea dopo (Curva a) il passaggio continuo attraverso la facciata, durante il tempo t ; (Curva b) la stessa totale quantità in entrata nella facciata all'inizio del tempo t (Maurice, 1960).

In due recenti occasioni (Beswick et al. 1958; De Simone, 1958), è stato fatto uso di stime di velocità con cui la fluoresceina passa attraverso lo stroma corneale. Alla base di questi metodi c'è il presupposto che, la facciata frontale del colorante che avanza potrebbe essere chiaramente determinata, e che l'arrivo alla superficie opposta della cornea possa essere stimato con precisione. Quello che però Maurice sostiene nel suo studio è che queste concezioni siano sbagliate e che possano portare a conclusioni errate. È evidente per cui che risulta impossibile determinare il tempo di arrivo, in qualsiasi punto o distanza, della facciata avanzante del colorante che si sta diffondendo, in quanto subentrano diversi fattori tra cui: la sensibilità con la quale la fluoresceina può essere rilevata, la quantità totale di colorante che entra nella cornea, le proprietà di diffusione dello stroma. E ognuno di questi fattori, a sua volta, dipende da altri fattori ancora come ad esempio, la sensibilità che può essere limitata sia dall'opalescenza dello stroma stesso, sia dall'intensità e dal colore della luce della lampada a fessura, sia dalla soglia visiva del osservatore, e ne sono state menzionate solo alcune (Maurice, 1960).

Capitolo V

METABOLISMO CORNEALE

L'epitelio corneale, lo strato più esterno del bulbo oculare, è la via principale per l'ingresso di materiali estranei nell'occhio. In condizioni fisiologiche, le cellule superficiali dell'epitelio formano una barriera di permeabilità funzionale selettiva. La funzione di questa barriera non solo assicura l'arruolamento dei nutrienti necessari per un regolare metabolismo, ma previene anche l'invasione di corpi estranei o di microrganismi. Recentemente, un gran numero di studi clinici e sperimentali ha dimostrato che la base patologica di molte malattie oculari corrisponde a un'anomalia nella normale funzione della barriera epiteliale corneale (Liu et al., 2016). Inoltre, alcuni studi hanno scoperto che la barriera dell'epitelio corneale è costituita da una varietà di proteine coinvolte nella proliferazione cellulare, nella differenziazione, nell'apoptosi e in una serie di processi fisiologici e patologici (Liu et al., 2016). Le cellule dell'epitelio corneale contengono una ricca fornitura di organelli tra cui vengono ritrovati i nuclei, l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico e piccoli mitocondri sparsi.

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 (quella esterna del cloro e quella interna del sodio). È ovvio che l'attività di pompa presuppone un dispendio energetico, peraltro dimostrato dalla presenza di enzimi ATP-dipendenti sulla membrana cellulare (Bucci, 2010). L'epitelio corneale e le cellule endoteliali sono metabolicamente attive. Le attività cellulari richiedono l'adenosina trifosfato (ATP) come fonte di energia, con il catabolismo del glucosio attraverso la glicolisi e il ciclo dell'acido citrico che genera ATP sotto condizioni anaerobiche. La cornea è rifornita di glucosio dalla diffusione dall'umor acqueo. In contrasto, l'ossigeno è fornito alla cornea primariamente dalla diffusione dal fluido lacrimale, il quale assorbe l'ossigeno dall'aria (Krachmer et al., 2010).

La cornea è una struttura eterogenea dal punto di vista biochimico e ciò è dovuto alla differente natura anatomica dei suoi vari strati. Essa in condizioni normali contiene: 78% di acqua, 16% di proteine, 4% di glicosaminoglicani e 2% di lipidi, acidi nucleici e sali (Scudieri, 1998). Tali componenti costituiscono sia le cellule che la matrice extracellulare e sono anche disperse nel liquido interstiziale. I dati sulla presenza di acqua e di elettroliti sono approssimativi, in quanto sono dedotti da esperimenti quasi sempre effettuati su animali da laboratorio, a causa della necessità di disporre di materiale fresco per poter effettuare un'esatta valutazione. Comunque si è dedotto che l'acqua ha un tasso molto elevato. La concentrazione dello ione sodio è alta nello stroma, mentre quella del potassio è più cospicua nell'epitelio. Nella cornea, inoltre, sono presenti gli ioni cloro, bicarbonato, calcio, magnesio, ferro, rame, zinco, manganese. Anche per il cloro è stata riscontrata una differente concentrazione tra l'epitelio e lo stroma. I valori dei vari elettroliti presenti nella cornea sono stati riportati nella tabella V (Scudieri, 1998).

Nella tabella VI è stata invece presa in considerazione comparativamente la concentrazione degli ioni sodio, potassio e cloro sia nella cornea in toto che nello stroma, nell'epitelio, nell'umor acqueo, nel plasma e nel liquido lacrimale del coniglio. Il contenuto dei tre elettroliti nel liquido lacrimale, nell'umor acqueo e nel plasma è risultato pressoché equivalente (Scudieri, 1998).

Tabella V. Gli elettroliti della cornea (da Maurice et Ridley, 1970, modificata)

Sodio			Bicarbonato		
tutta la cornea	147 mEq/l 155 mEq/l	bue,maiale coniglio	tutta la cornea	25-35 mEq/l	non specificato
epitelio	57 mEq/l	coniglio	Calcio		
stroma	165 mEq/l	coniglio	tutta la cornea	2 mEq/l	vitello
Potassio			Magnesio		
tutta la cornea	35 mEq/l 31,5 mEq/l	maiale coniglio	tutta la cornea	2 mEq/l 1,5 mEq/l	maiale vitello, bue
epitelio	109 mEq/l	coniglio	Ferro		
stroma	21 mEq/l	coniglio	tutta la cornea	2,6 g/gm	bue
Cloro			Rame		
tutta la cornea	76 mEq/l 94 mEq/l	vitello coniglio	tutta la cornea	10/70 g/gm	uomo
epitelio	23 mEq/l	coniglio	Zinco		
stroma	104 mEq/l	coniglio	tutta la cornea	9 g/gm	uomo
Manganese					
tutta la cornea	0,11 g/gm	bue			

Tabella VI. Composizione elettrolitica della cornea, dell'umor acqueo, del plasma e delle lacrime nel coniglio (da Wan Meter et col., 1992)

	Na ⁺ (mEq/l H ₂ O ₂)	K ⁺ (mEq/l H ₂ O ₂)	Cl ⁻ (mEq/l H ₂ O ₂)
Cornea	156	28	97
Stroma	172	21	108
Epitelio	75	142	30
Umore acqueo	143,5	5,2	108
Plasma	151	5,2	109
Liquido lacrimale	149	12	131

Oltre al contenuto di acqua, tra i principali costituenti del parenchima sono da prendere in considerazione il collagene e i proteoglicani. Questi costituiscono rispettivamente il 12-15% e l'1-3% del peso totale del tessuto secco (Scudieri, 1998).

Nella cornea sono state studiate da tempo altre proteine strutturali di tipo non collagene e anche glicoproteine, proteine solubili e lipidi. Studi eseguiti, negli anni '60, sulla componente lipidica della cornea hanno riportato la presenza di trigliceridi, di esteri del colesterolo e di colesterolo, che costituiscono all'incirca tre quarti del contenuto lipidico

totale delle membrana; la rimanente parte è costituita dalla sfingomieline e da altri quattro fosfolipidi (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositolo) (Scudieri, 1998). Dopo quanto analizzato si può dedurre che vi sia una corrispondenza tra la complessa struttura anatomica corneale e un altrettanto eterogenea organizzazione biochimica altamente specializzata nei singoli strati.

L'epitelio è responsabile del metabolismo glucidico e della produzione di composti ad alto contenuto energetico necessari ai processi metabolici. Per quanto riguarda la sintesi del collagene, delle glicoproteine e dei proteoglicani questo avviene a livello dei cheratociti stromali, ed è grazie alla loro organizzazione strutturale che si deve la trasparenza del parenchima, anche se il suo stato di idratazione è principalmente regolato dai processi metabolici che avvengono nell'endotelio.

5.1 EPITELIO

Il primo metabolismo che sarà analizzato è quello glucidico. Il glucosio costituisce l'elemento principale per la produzione di energia nell'epitelio. Esso proviene principalmente dall'umor acqueo e per un 10% dai vari limbari e dalle lacrime. L'epitelio si dispone, inoltre, di ingenti riserve di glicogeno che è rapidamente metabolizzato in glucosio, in condizioni di ridotta ossigenazione corneale o in risposta a traumi con perdita di sostanza.

La principale via catabolica è la glicolisi anaerobica che utilizza circa 85% del glucosio disponibile nell'epitelio. Questo processo avviene essenzialmente nel citoplasma cellulare. Il prodotto finale della glicolisi è costituito dall'acido piruvico, che a sua volta può essere ridotto in altre sostanze.

La glicolisi anaerobica produce due molecole di adenosina trifosfato (ATP) per ogni molecola di glucosio metabolizzato, mentre il ciclo di Krebs ne produce 36, rappresentando così la principale fonte di composti ad alta energia dell'epitelio corneale (Andreoli et Egidi, 2011). Una fornitura di glucosio e ossigeno è perciò essenziale per mantenere il normale funzionamento metabolico della cornea (Aguayo et al., 1988; Wessman et al., 1981). Un'altra importante via del metabolismo glucidico è la via dei pentoso fosfati, anche definita *shunt* dei pentosi. È stato dimostrato che il 35% del

glucosio presente a livello dell'epitelio è metabolizzato della via dei pentosi e che in determinate condizioni, tale via può utilizzare fino al 60% del glucosio disponibile. L'importanza della via dei pentosi fosfati consiste non solo nella produzione di ATP, ma soprattutto nel rilascio della forma ridotta di nicotinamide-adenina dinucleotide fosfato. Questa molecola rappresenta la principale fonte di equivalenti ridotti necessari al mantenimento di sostanze, quali il glutatione e l'acido ascorbico nella loro forma ridotta (Scudieri, 1998). Il mantenimento dell'equilibrio ossido-riduttivo dell'epitelio è necessario per prevenire un eventuale danno ossidativo causato dall'accumulo di radicali liberi e di H_2O_2 .

Ad eccezione della glicolisi anaerobica, tutte le vie cataboliche del glucosio richiedono la presenza di ossigeno. La fonte primaria di ossigeno per il metabolismo corneale è l'atmosfera. Ad occhio aperto la pressione atmosferica, esercitata sulla cornea, produce lo scioglimento di ossigeno nel film lacrimale e il conseguente passaggio oltre l'epitelio (Bottegal, 2009). La diretta esposizione del liquido lacrimale all'atmosfera è essenziale per l'ossigenazione della cornea (Krachmer et al., 2010). Mentre ad occhi chiusi esso proviene dai vasi della congiuntiva palpebrale. È stato misurato che in presenza di una pressione atmosferica dell'aria di circa 760 mm di Hg (pressione media normale al livello del mare) la tensione che si scarica sulla cornea è di circa 155 mm di Hg. In tali condizioni il flusso dell' O_2 è nell'ambito da 3,2 a 7,2 $\mu l/cm^2$ per ora, con una media di circa 4,8 μl . Si è dimostrato che una cornea normale, per mantenere il proprio metabolismo in ambiente aerobico, necessita almeno di una tensione di 39 mm di Hg; alcuni autori hanno sostenuto che per avere un adeguato margine di sicurezza la tensione minima non debba scendere sotto i 76 mm di Hg (Bottegal, 2009). Ad occhio chiuso (durante il sonno) la questione si complica. L'apporto atmosferico scompare e si riduce la quantità di ossigeno che raggiunge la cornea. Il metabolismo corneale così, cambia da aerobico a anaerobico (con conseguenze nell'accumulo di lattato) durante il sonno¹⁻². Entra in gioco la fonte ausiliare rappresentata da una parte dall'umor acqueo, attraverso la barriera dell'endotelio, dall'altra dalla fitta rete di capillari presenti sulla

1 Sack RA, Tan KO, Tan A. Diurnal tear cycle: evidence for a nocturnal inflammatory constitutive tear fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 626-640.

2 Sack RA, Beaton A, Sathe S, et al. Towards a closed eye model of the pre-ocular tear layer. *Prog Retin Eye Res*, 2000;19: 649-668.

superficie del tarso palpebrale che ad occhio chiuso va a ricoprire la cornea. La tensione dell'ossigeno, in questo frangente, è molto inferiore a quella dell'occhio aperto: 55 mm di Hg (Bottegal, 2009). È stato dimostrato che tale bassa pressione parziale è sufficiente ed adeguata alle richieste di ossigeno da parte dell'epitelio, che sono circa 2-4 $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$. Il fenomeno della deturgescenza avviene in condizioni critiche e non in maniera esaustiva. Il risultato è che, dopo una normale notte di sonno, al risveglio, è possibile misurare la presenza di un modesto edema corneale (fisiologico) che si risolve in tempi brevi, rimanendo ad occhi aperti (Bottegal, 2009). Si ha invece ipossia quando la tensione di tale gas scende al di sotto di 20-30 mmHg. Questo valore viene indicato come soglia critica dell'ossigeno. In tali condizioni il flusso di ossigeno scende sotto i 2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$ e il metabolismo, pur riducendosi, consente ancora la formazione di una sufficiente quantità di ATP e il mantenimento di uno normale spessore corneale (Scudieri, 1998). Un'alterazione dei normali processi metabolici epiteliali, così come il porto di LaC, può portare all'ipossia corneale e a un conseguente edema stromale o epiteliale (Holden et al., 1985; Thoft et Friend, 1975). L'edema può essere distinto in edema intracellulare, generalizzato o localizzato. La causa quindi è da ricercare nella maggior parte dei casi nell'ipossia prodottasi (Bucci, 2010). Nel caso di un edema massivo che impedisca l'osservazione alla lampada a fessura, l'instillazione di una goccia di glicerina, dopo anestesia topica, permetterà un esame accurato del segmento anteriore (Bucci, 2010).

L'altro metabolismo dell'epitelio è quello proteico. L'epitelio ha un rinnovo completo ogni 6-7 giorni. La sintesi delle proteine e la richiesta di amminoacidi sono molto attive. Si ritiene che questi ultimi arrivino dall'umor acqueo, poiché la loro concentrazione nel film lacrimale è bassa e oltretutto l'epitelio corneale è impermeabile a tali molecole. I meccanismi di sintesi proteica a partire dagli amminoacidi sono analoghi a quelli degli altri distretti del corpo. In esso sono state individuate tutte le più importanti proteine citoscheletriche (cheratina, microfilamenti di actina...).

5.2 STROMA

Il collagene corneale viene sintetizzato durante lo sviluppo embrionale e nelle prime fasi della vita postnatale. La produzione di collagene comincia a livello del reticolo endoplasmatico rugoso con la sintesi di protocollagene che, successivamente, viene secreto attraverso l'apparato di Golgi all'esterno della cellula. La prima tappa della sintesi del collagene inizia con la produzione di una subunità primaria che dopo essere stata sintetizzata viene idrossilata, andando a formare la catena pro- α . Questa catena assume poi una conformazione elicoidale che si lega a sua volta ad altre tre catene, dando luogo a una molecola di procollagene. Si ritiene che i processi di idrossilazione siano importanti per la stabilità delle eliche, mentre quelli di glicosilazione influenzano sia i processi di secrezione che quelli di fibrollogenesi. Il protocollagene viene secreto dalle cellule ma il suo successivo sviluppo si avvera a livello extracellulare dove sono rimosse enzimaticamente le estremità peptidiche di registrazione. Si forma così il tropocollagene da cui derivano le fibrille di collagene (Scudieri, 1998). Alcune evidenze per il trasporto attivo di fluoresceina sono state segnalate nelle cellule epiteliali corneali. (Bakkar e al., 2014).

Capitolo VI

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 però, è importante considerare i processi di divisione della superficie oculare che avvengono negli occhi normali e in quelli con patologie.

Le cellule epiteliali corneali vengono perse continuamente, per poi essere costantemente sostituite, tramite la mitosi, con altre cellule durante l'arco della vita, esattamente come avviene per la pelle: le cellule superficiali si sfaldano nel film lacrimale e nuove cellule vengono generate per rimpiazzare quelle perse. Oltre a ripopolare l'epitelio corneale, queste cellule fungono da barriera giunzionale, evitando che la congiuntiva invada la cornea (Rama, 2010). Questo processo è influenzato dalla divisione della superficie tra le palpebre, la quale altera anche la migrazione epiteliale e il turnover aumentando l'esfoliazione dovuta alla forza di taglio (Lemp et Mathers, 1989). Rilevante nella desquamazione è il fenomeno dell'ammiccamento.

L'uso di LaC, l'esposizione ai raggi ultravioletti e particolari patologie, come la sindrome dell'occhio secco o la presenza di ipossia, accentuano il ricambio cellulare (Ren et Wilson, 1996). Le cellule staminali presenti nello strato basale del limbus sono la risorsa per le cellule epiteliali corneali. L'esistenza di cellule staminali limbali supporta la teoria, proposta da Thofr, dell'omeostasi corneale che viene garantita dalle cellule staminali presenti nello strato basale dell'epitelio del limbus, ovvero la zona di transizione tra cornea e congiuntiva bulbare (Rama, 2010), nota come ipotesi XYZ, in cui X rappresenta la proliferazione e la stratificazione delle cellule basali limbali, Y la migrazione centripeta delle cellule basali e Z la desquamazione delle cellule superficiali. Per mantenere la massa della cornea costante, la somma di X e Y deve essere uguale a Z e gli esperimenti di tracciamento cellulare forniscono una forte evidenza a sostegno di

questa teoria (Yoon et al., 2014).

Gli studi che riportano le differenze tra cellule corneali centrali e limbali furono pubblicati già negli anni '40. Questi primi studi hanno mostrato un aumento della frequenza delle mitosi nello strato basale della cornea periferica utilizzando la conta delle figure mitotiche con la timidina¹ irradiata (Buschke et al., 1943; Hanna et O'Brien, 1960). La migrazione centripeta di cellule che esprimono il pigmento di melanina è stata osservata nel coniglio e nelle cornee umane, suggerendo che il limbus fosse la fonte di nuove cellule (Mann, 1944; Davanger et Evensen, 1971). Da allora, vari studi hanno stabilito il limbus come sede di cellule staminali epiteliali corneali basandosi su un insieme di proprietà uniche osservate all'interno di questa popolazione cellulare.

La divisione asimmetrica di queste cellule staminali produce una cellula figlia staminale che rimane all'interno del limbus e una cellula amplificante transitoria (TAC) che migra anteriormente, verso lo strato apicale, e in modo centripeto, ovvero verso il centro della cornea. Queste cellule sono responsabili del mantenimento della superficie epiteliale (Tseng, 1989). I TAC subiscono più cicli di replicazione e perdono progressivamente la loro caratteristica di "staminali" quando migrano anteriormente e progrediscono verso le cellule alveolari sopra-post-mitotiche e quindi verso le cellule differenziate squamose superficiali, con la tendenza ad appiattirsi. Il segnale chemiotattico per la migrazione centripeta può essere fornito sotto forma di citochine e/o di differenza tra la composizione della matrice extracellulare, tra il limbus e la cornea (Lu et al, 2001). Le cellule superficiali vengono perse dalla superficie mediante normale esfoliazione o lesione traumatica. Pertanto la migrazione anteriore dalle cellule dell'epitelio basale "X" e la migrazione centripeta dal limbus "Y" equivale alla desquamazione dalla superficie "Z", in maniera tale da mantenere l'omeostasi. Alcuni studi dicono che l'intero epitelio corneale umano si rinnova in 9-12 mesi (Wagoner, 1997). Mentre altri studi di laboratorio, effettuati usando la timidina, 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 (Hanna et O'Brien, 1960). Altri ancora riportano che c'è un più lento movimento centripeto delle cellule dal limbus verso

¹ La timidina è un nucleoside formato da uno zucchero pentoso e dalla timina, una base azotata pirimidinica.

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, 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 avviene in modo moderato e regolato e serve per mantenere il numero di cellule nel sistema, inoltre richiede un certo consumo di energia portando generalmente 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 verranno rimpiazzate quelle cellule perse. Wang e al., nel 1993, hanno dimostrato 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 i *tight junctions* 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.

La permeabilità caratteristica della superficie è mantenuta tale dalla presenza di un glicocalice maturo. Se venissero a mancare le mucine dei glicocalici sull'epitelio corneale, questo potrebbe favorire l'assorbimento dei coloranti nelle cellule in divisione. È essenziale dunque la presenza di un glicocalice completo sulla superficie apicale delle cellule migranti e la funzionalità delle giunzioni strette per permettere l'esclusione dei coloranti dagli strati cellulari più profondi. Inoltre, dallo studio eseguito sui ratti da Hazlett e Mathieu nel 1989, si evince che la continuità della barriera dei glicocalici

viene persa con l'avanzare dell'età o comunque subisce delle modifiche che ne riducono la funzionalità. Perciò durante la desquamazione si ha la perdita dei legami tra le cellule mediati dalle giunzioni strette e aderenti e consecutivamente anche dei glicocalici superficiali, oltre che alla perdita delle cellule entranti nello stadio terminale della differenziazione. Riassumendo una volta sostituite le cellule desquamate, ripristinati i glicocalici presenti e rifornita la barriera dalle giunzioni strette, viene a sua volta ristabilita una permeabilità selettiva nella cornea che permette di escludere da questa i coloranti.

Capitolo VII

COLORAZIONI CELLULARI IN BASE

AL LORO STATO FISIOLÓGICO

Nonostante la sua utilità clinica ben accettata, l'interpretazione esatta di colorazione corneale (si usa il termine "colorazione" per riferirsi alla colorazione superficiale con fluoresceina micropuntata se non diversamente specificato) non è ben compreso ed è stato tema di svariati dibattiti nel corso degli anni (Romanchuk, 1982; Mokhtarzadeh et al., 2011). Alcuni studi hanno analizzato il meccanismo preciso che sta alla base dell'interazione della fluoresceina con il tessuto corneale. Sono state trovate possibili eziologie, che includono: il movimento della fluoresceina negli spazi extracellulari dell'epitelio corneale come studiato da Feenstra e Kikkawa tra il 1972 e il 1992; l'attaccamento alla superficie dell'epitelio corneale; l'accumulo di fluoresceina nelle lacune presenti sulla superficie epiteliale o tra gli spazi intercellulari (Norn, 1970); l'assorbimento da parte delle cellule epiteliali, la cui ipotesi fu confermata da Wilson (Wilson et al., 1994), dimostrando che lo *staining* con fluoresceina è dovuto alla colorazione delle singole cellule, e non è stata trovata alcuna prova a supporto della tesi che la fluoresceina risieda in aree di abbandono delle cellule o che la colorazione fosse dovuta al riempimento di spazi intercellulari, proponendo quindi, che l'assorbimento della fluoresceina fosse secondario a un danneggiamento cellulare, come fu prima suggerito da Tabery (Tabery, 1992; Tabery, 2003). Recentemente tuttavia, queste teorie basate sul "*pooling*" sono state sfidate dall'osservazione che, un ripetuto risciacquo salino non fa alterare sostanzialmente l'aspetto delle cornee che si presentano con una colorazione superficiale micropuntata (Bandamwar et al, 2012). È anche improbabile che questo specifico quadro clinico potrebbe essere prodotto dalla rapida diffusione stromale di fluoresceina attraverso giunzioni cellulari-cellule disturbate (Feenstra et al., 1992), come pure è stato suggerito. Tuttavia, non è stata dimostrata la correlazione tra lo

staining fluoresceinico e le cellule danneggiate. Rimane per cui sconosciuta la localizzazione subcellulare della fluoresceina e se l'entrata di questa nelle cellule si verifichi in tutte le forme di colorazione. Inoltre, rimane sconosciuta se l'entrata dipenda dalla temperatura e dal tempo (Wilson et al., 1994).

Negli studi di Kikkiwa del 1972 si è arrivati alla conclusione che alcuni fenomeni di *staining* sono relazionati al normale processo di desquamazione dell'epitelio corneale, e che questo tipo di *staining* deve essere distinto dalla colorazione che risulta da anomalie corneali (Kikkiwa, 1972). Quando la fluoresceina è stata instillata nell'occhio di un normale coniglio, in quasi tutti i casi sono state osservate alcune colorazioni sulla superficie corneale. Lo *staining* mostra un ampio range di variazione, da leggero a intenso. Una cornea senza colorazione è stata trovata solo in rare occasioni. Colorazione intensa e leggera si verificava a tempi alternati sulla stessa cornea. L'intervallo tra i due *staining* consecutivi intensi era variabile (1-11 giorni). Appare quindi, che questo tipo di colorazione della cornea sia un fenomeno fisiologico. Il tempo richiesto per il rinnovo totale della popolazione di cellule epiteliali è stato stimato essere di 4 giorni nel ratto (Hanna et O'Brien, 1960), o secondo altri ricercatori è di 7 giorni, il che indica che il 14% delle cellule vengono formate dalla mitosi ogni giorno (Bertalanffy et Lau, 1962). Da queste considerazioni, si può designare il seguente concetto: lo *staining* di una cornea normale e sana può verificarsi con l'espressione del processo di desquamazione (Kikkiwa, 1972).

Bakkar e al. nella loro ricerca hanno usato cellule epiteliali e fibroblasti per indagare i meccanismi biologici fondamentali responsabili dell'iperfluorescenza nelle cellule, in quanto la biologia cellulare alla base di questa colorazione non è nota. Confermarono che non esiste una associazione assoluta 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 bensì per altri due differenti tipi di cellule: quelle danneggiate e quelle vive. Inoltre, scoprirono che l'assorbimento di fluoresceina nelle cellule vive è relazionato da quanto esse siano intatte, cioè dall'integrità della membrana plasmatica che protegge la cellula e regola gli scambi per mantenere 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 ha studiato i cambiamenti negli spettri di fluorescenza, di polarizzazione e di eccitazione delle cellule. Gli spettri di polarizzazione delle emissioni e di eccitazione nelle cellule viventi mostrano una caratteristica di dipendenza dalla lunghezza d'onda per lo stato del ciclo cellulare. I cambiamenti nella temperatura e nella quantità di acqua intracellulare risultano in variazioni quantitative, indipendenti dalla lunghezza d'onda negli spettri di polarizzazione. Alla fine si 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 il fatto che la fluoresceina sia distribuita su tutta la cellula, è concentrata nelle cellule vive e che non si accumula preferibilmente nelle cellule lise o morte. Viene ritenuto 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 viene esclusa comunque la possibilità che eventi avversi, come l'apoptosi, mostrino un'iperfluorescenza delle cellule. 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 (Bakkar et al. 2014). Bandamwar e col. nel 2013 hanno effettuato una valutazione dello stato fisiologico delle cellule dell'epitelio corneale e hanno dimostrato che l'osservazione clinica di colorazioni corneali con la fluoresceina suggerisce la presenza di cellule epiteliali che stanno subendo apoptosi o che hanno subito un cambiamento del loro stato fisiologico, ma che non indicano cellule morte (fig.14-15). Le cellule sane assorbono fluoresceina in quantità inferiori a quelle delle cellule apoptotiche, e pertanto, non sono percepibili durante l'osservazione clinica. Quindi si può considerare la fluoresceina come una sonda per identificare le cellule in apoptosi (Bandamwar et al., 2014).

Fino ad ora si è pensato che un epitelio sano e normale garantisce l'esclusione della fluoresceina e che gli *stainings* siano assenti dalle superfici corneali completamente sane, ma i dati riportati dopo svariati studi dimostrano che questo pensiero non sia corretto.

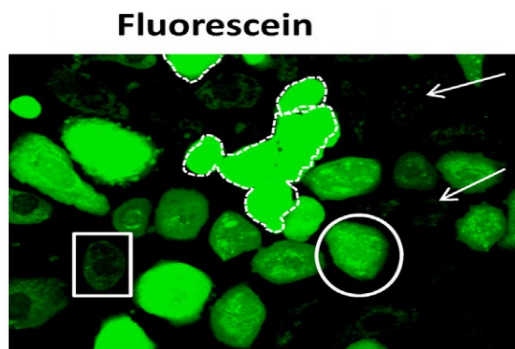


Figura 14. Raffigurazione dei vari stadi fisiologici delle cellule in vitro con la fluoresceina (Bandamwar et al. 2013).

Secondo Bandamwar, quando un operatore sta visionando lo stato della superficie corneale dopo aver instillato fluoresceina e non riscontra alcun tipo di colorazione, in realtà non sta guardando un occhio privo di *staining*, bensì un occhio con una colorazione omogenea dovuta alla 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 (Bandamwar, 2014). 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 ipotizzare che si possono interpretare queste regioni vivacemente fluorescenti, come un indice che le cellule in questione siano sulla strada dell'apoptosi dovuta a qualche stimolo sufficientemente stressante o danneggiante. Quindi, ciò che noi chiamiamo *staining* fluoresceinico, in realtà rappresenta una iperfluorescenza rispetto allo sfondo, che risulta essere moderatamente fluorescente, e può essere utilizzato per indicare l'inizio di apoptosi nelle cellule colpite. Questo può spiegare la presenza di bassi livelli di *staining* micropuntati nelle popolazioni che non indossano LaC, in quanto la colorazione evidenzia la presenza di apoptosi delle cellule epiteliali come parti di un regolare turnover cellulare (Ohashi et al., 2003). Quando le cellule alla fine muoiono, perdono tutta la fluorescenza. Quindi, se le cellule morte sono visibili dopo l'instillazione della fluoresceina, lo sarà perché appaiono più scure (cioè meno fluorescenti) rispetto

all'ambiente circostante con le cellule normali. Questa potrebbe essere una spiegazione per il fenomeno di "colorazione negativa", cioè aree relativamente scure, che a volte possono essere viste nel modello di fluoresceina (O'Hare et al., 2002). L'apoptosi può essere indotta da condizioni di stress sia meccaniche che metaboliche, oltre che al normale ricambio cellulare. Questo mantiene le membrane delle cellule intatte e le permette di diventare iperfluorescenti in presenza di fluoresceina. 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.

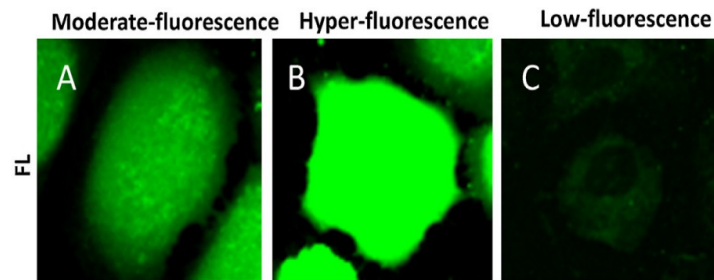


Figura 15. Immagine microscopica confocale della fluoresceina. Le cellule vive mostrano una fluorescenza moderata; le cellule morte mostrano una bassa fluorescenza e le cellule apoptotiche mostrano un' iperfluorescenza. (Bandamwar e al. 2013)

Capitolo VIII

IL FILM LACRIMALE

La superficie corneale è coperta dal fluido lacrimale, il quale protegge la cornea dalla disidratazione e aiuta a mantenere liscia la superficie epiteliale (Krachmer et al., 2011). In passato, la maggior parte degli studi sono stati indirizzati al film lacrimale, mentre scarsa importanza è stata data alla morfologia e alla fisiopatologia degli strati superficiali dell'epitelio. Indagini recenti dimostrano, invece, quanto rilevante sia il ruolo di questi ultimi nella formazione e nella stabilità del film lacrimale. A conferma di ciò, è ormai acquisito che la membrana cellulare apicale dell'epitelio corneale e congiuntivale con le sue microproiezioni (microvilli e micropliche) gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi di mantenimento della stabilità di tale film. Le cellule dell'epitelio congiuntivale partecipano, inoltre, alla formazione di alcuni costituenti delle lacrime quali il muco, le proteine, i metaboliti, ecc. (Scudieri, 1998).

Con la denominazione di film lacrimale si indica il sottile strato di liquido che ricopre sia l'epitelio della cornea che della congiuntiva bulbare e palpebrale. Come già evidenziato dagli studi di Wolff nel 1946 esso risulta una struttura tristratificata (Wolff, 1946; 1954). Il più superficiale strato, quello lipidico, è prodotto dalla secrezione delle ghiandole di Meibomio, Zeiss e Moll, e poggia su una fase intermedia acquosa, secreta dalla ghiandola lacrimale principale, e da quelle accessorie di Ciaccio-Wolfring e di Krause, mentre quello più interno o profondo, lo strato mucoso, deriva dalle cellule caliciformi, dalle cripte di Henle e dalle ghiandole di Manz. Questa descrizione classica del film lacrimale suddiviso in tre strati è stata negli ultimi anni messa in discussione e modificata in seguito ad alcune considerazioni fatte da Nicholas e al., e altre deducibili dal lavoro di Pyral, che ritengono che il film lacrimale sia significativamente più spesso e contenga maggior quantità di mucine di quanto si fosse ritenuto in precedenza (Veys et al., 2008).

8.1 IL RICAMBIO DEL FILM LACRIMALE

Il film lacrimale si forma e viene mantenuto costante grazie all'azione dell'ammiccamento, mentre i movimenti palpebrali assicurano la distribuzione del film lacrimale sulla superficie congiuntivale e corneale. Quando avviene la chiusura palpebrale la componente lipidica superficiale viene compressa tra i margini posteriori del bordo libero delle palpebre, divenendo un sottile cordone, mentre quella sierosa viene sospinta verso le vie di deflusso. La mucina, contaminata dai lipidi prodotti dalla rottura del film lacrimale, viene spostata verso il fornice superiore e inferiore da dove viene secreta attraverso il dotto lacrimale, ed è poi sostituita da un nuovo strato creato dalle palpebre che, muovendosi, premono contro la superficie dell'occhio (Veys et al., 2008).

Quando l'occhio viene aperto, un nuovo strato acquoso si diffonde sulla superficie epiteliale che è stata resa idrofila. Lo strato lipidico, mentre era schiacciato in uno strato di alto spessore durante la chiusura palpebrale, si è formato e ora si espande producendo un nuovo monostrato sopra quello acquoso, per ridurre l'evaporazione delle lacrime. Il film lacrimale risulta, in condizioni normali con l'occhio aperto, limitato anteriormente da uno strato lipidico che inizia con una linea di grassi depositati sui margini palpebrali, chiamata linea di Marx. Questa linea, composta da materiali idrofobi, rappresenta un confine difficilmente valicabile da parte del liquido lacrimale e così esso non deborda sulla superficie cutanea palpebrale, se si trova in condizioni normali.

La produzione e il turnover di un film lacrimale efficiente è essenziale per la salute della superficie oculare. Le funzioni della lacrima sono diverse e di estrema importanza per garantire la salute delle strutture oculari: azione lubrificante, azione diottrica, azione metabolica (mediante assorbimento di ossigeno dall'aria e cessione di esso all'epitelio corneo-congiuntivale), azione lavante, potere tampone nei confronti di sostanze basiche ed acide (acidità atmosferica), azione batteriostatica e antivirale, azione nutritiva e protettiva nei confronti dell'epitelio corneale (Debbia, 2018).

8.2 CARATTERISTICHE FISICHE

Il liquido lacrimale, è secreto in quantità di 1-2 microlitri al minuto (ml/min) ed è presente nel sacco congiuntivale. Il volume di questo film lacrimale è di circa 6.5 μ l (Scherz et al., 1974). In una condizione in cui non si portano LaC, la struttura del film lacrimale può essere influenzata dalla somministrazione di un farmaco sistemico o locale, dalle condizioni generali di salute e da una serie di condizioni oculari quali la cheratocongiuntivite secca¹. La produzione delle lacrime, con modificazioni che si riscontrano sia a livello di volume di produzione lacrimale sia a livello di stabilità del film lacrimale, viene anche influenzata dall'età. Quando si tratta di valutare il normale film lacrimale, vi sono delle complicazioni causate dalle qualità del film stesso, dalla sua trasparenza, dal suo piccolo volume (7 μ l), dal suo sottile spessore (7 μ m), nonché dalla lacrimazione riflessa, spesso stimolata dal metodo di valutazione adottato. Un flusso lacrimale normale può essere aumentato di oltre 100 volte se viene stimolata la lacrimazione riflessa. Vi può anche essere una modifica della composizione delle lacrime. Qualunque metodo utilizzato per la raccolta delle lacrime implica un certo trauma meccanico all'occhio che, a sua volta, determina una lacrimazione riflessa e pone domande circa la normalità del campione (Veys et al., 2008). Il nuovo film lacrimale che si ottiene dopo l'ammiccamento, è una struttura relativamente instabile. Nonostante la presenza dello strato lipidico, si ha ancora un certo quantitativo di evaporazione che ne riduce lo spessore ed è durante questa fase che i lipidi cominciano a diffondersi verso lo strato inferiore mucinico. Lo strato mucinico, ora contaminato dai lipidi, comincia a perdere la sua idrofilia e il film lacrimale comincia a rompersi portando alla formazione di isole di rottura lacrimale. Questo è lo stimolo per l'ammiccamento e per la ripetizione del ciclo. Il tempo di rottura del film lacrimale normale dovrebbe essere più lungo del periodo che intercorre tra un ammiccamento e l'altro (Veys et al., 2008).

Metodi meccanici e chimici avevano determinato che lo spessore del film che bagna la

¹ La cheratocongiuntivite è una condizione patologica caratterizzata dalla simultanea infiammazione di cornea (cheratite) e congiuntiva (congiuntivite). La cheratocongiuntivite secca viene originata da un'alterazione dei processi secretori lacrimali ed è conosciuta anche con l'espressione sindrome dell'occhio secco, la cheratocongiuntivite secca prova dolore e bruciore oculare, spesso associati a iperemia oculare, fotofobia, visione offuscata e difficoltà.

cornea è di circa 4-7 μ m (Mishima et al., 1996). Il pH lacrimale è lievemente alcalino², ha un valore medio di 7.4-7.5 con variazioni di 5.2 e 8.6 nei diversi individui ed anche nello stesso soggetto nel corso della giornata³. Un pH di 7.25 è stato riscontrato dopo la chiusura palpebrale prolungata. Ciò è probabilmente dovuto alla produzione, da parte della cornea, di anidride carbonica che rimane disciolta nelle lacrime. Un pH alcalino è stato rilevato, invece, dopo una protratta apertura palpebrale (60 secondi o più). Si ritiene che quest'ultima evidenza sia dovuta ad un nuovo equilibrio che si instaura tra il bicarbonato del film lacrimale e l'anidride carbonica (Scuderi, 1998). La temperatura del fluido lacrimale varia in rapporto alla sede della misurazione. 30°C al centro della cornea e 35°C a livello limbare. Vi è un incremento termico di 0.5°C a palpebre chiuse. L'apertura palpebrale determina un raffreddamento di circa 1°C e ciò forse è dovuto all'evaporazione.

8.3 CARATTERI BIOCHIMI

Il film lacrimale consiste in tre strati: uno strato superficiale lipidico ($\approx 0.1 \mu\text{m}$), uno strato acquoso ($\approx 7 \mu\text{m}$), e uno strato mucinico (0.02–0.05 μm) (Holly et Lemp, 1977). A livello funzionale, i tre principali componenti del film lacrimale esplicano un'azione congiunta, tesa a mantenere la forma complessiva. Le loro funzioni ed origini sono riassunte nella tabella VII. Gli strati lipidico e mucinico influiscono maggiormente sulla qualità del film lacrimale, mentre lo strato acquoso apporta la quantità di lacrima necessaria. Sia la qualità che la quantità delle lacrime sono importanti per mantenere l'idratazione del segmento anteriore.

2 In chimica, relativo ad alcali, che ha le proprietà di un alcali, cioè basiche.

3 Tali notevoli variazioni sono, talora, probabilmente dovute alle diverse metodiche di determinazione utilizzate.

Tabella VII. Componenti del fluido lacrimale (Veys et al., 2008)

Strato lacrimale	Origine	Componenti	Funzioni fisiologiche
Strato lipidico	Ghiandole di meibomio, ghiandole accessorie lacrimali	Esteri del colesterolo, cere di esteri.	Lubrificazione, prevenzione all'evaporazione, stabilizzazione, fornitura di una superficie otticamente liscia.
Strato acquoso	Ghiandola lacrimale, ghiandole accessorie lacrimali	Acqua, elettroliti (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Mg^{2+}), proteine (albumina, lisozima, lattoferrina, transferrina, ceruloplasmi) immunoglobuline (IgA, IgG, IgE, IgM), citochine, fattori di crescita (EGF, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, bFGF, HGF, VEGF, sostanza P), altri (glucosio, vitamine)	Lubrificazione, antimicrobico, batteriostatico, supporto di ossigeno e nutrienti, chiarezza meccanica, regolazione delle cellule funzionali.
Strato mucinico	Cellule caliciformi congiuntivali, cellule epiteliali congiuntivali, cellule epiteliali corneali	Sulfomucina, cialomucina, MUC1, MUC4, MUC5AC, glicoproteina	Abbassamento della tensione superficiale, stabilizzazione dello strato acquoso

8.3.1 STRATO LIPIDICO

Lo strato lipidico è il più superficiale ed esterno del film lacrimale. Il suo spessore è di norma di 0.1 μm (1000 Å), ma può variare, in rapporto all'apertura della rima palpebrale, da 0.05 μm (500 Å) a 0.5 μm (5000 Å) (Scuderi, 1998). Lo spessore di questo strato può essere stimato per le sue proprietà ottiche. Il materiale secco della secrezione meibomiana ha un indice di rifrazione di circa 1,5 (Mishima et Maurice, 1961), e la superficie del film lacrimale normalmente non mostra un colore di interferenza. La ragione di ciò sembra essere dovuta al fatto che lo strato oleoso sia più sottile che la lunghezza d'onda della luce. Quando l'apertura palpebrale è ridotta a una fessura e il strato lipidico è compresso e inspessito, distinti colori di interferenza possono essere visti sulla superficie del film lacrimale. Quando invece l'occhio è totalmente aperto, lo strato lipidico è teso e il colore d'interferenza sparisce (Mishima, 1965). Questo strato viene prodotto dalla secrezione delle ghiandole di Meibomio e di Zeiss, che si trovano nello sbocco del bordo libero delle palpebre, grazie allo stimolo

principale dato dalla contrazione del muscolo orbicolare durante l'ammiccamento. Le sue fibre, infatti, circondano non solo i dotti escretori ma anche il corpo delle suddette ghiandole. Bisogna sottolineare che non tutta la componente lipidica viene rinnovata ad ogni ammiccamento, bensì viene compressa e ricostruita. Una piccola quantità di lipidi fuoriesce dal sacco congiuntivale attraverso le vie lacrimali di deflusso, mentre la porzione più cospicua si va ad accumulare a livello del fornice inferiore e del canto interno insieme al muco. I lipidi lacrimali sono essenzialmente costituiti da esteri della cera (35%) e del colesterolo (32%), da fosfolipidi (16%) e da una piccola quantità di acidi grassi (13%) e di trigliceridi (4%) (Scuderi, 1998). È importante sottolineare, però, che è stata rilevata una grandissima variabilità percentuale nei diversi individui e nelle differenti età.

La componente lipidica è costituita, nel suo insieme, da una doppia stratificazione molecolare. Durante l'ammiccamento, gli elementi polari quali fosfolipidi ed esteri del colesterolo si distribuiscono sopra lo strato acquoso con lo scopo di abbassare la tensione superficiale, mentre quelli polari si sovrappongono ai precedenti andando a formare uno strato superficiale. La stabilità del film dipende essenzialmente dall'interazione tra i lipidi polari e il sottostante strato acquoso.

Dal punto di vista funzionale lo strato lipidico rende stabile e migliore le qualità ottiche del film precorneale andandone a rallentare l'evaporazione lacrimale e assicura una superficie anteriore regolare. Inoltre, gioca un ruolo di rilievo nei meccanismi di difesa della superficie oculare impedendo l'adesione su di essa di minuscoli corpi estranei e di agenti aggressivi esterni.

8.3.2 STRATO ACQUOSO

Lo strato acquoso è quello intermedio del film lacrimale di cui costituisce la componente più cospicua. Ha infatti uno spessore medio di 7 μm (4-9 μm), uniforme in tutta la superficie oculare, ed un volume di un millimetro cubo (Scuderi, 1998). Viene secreto dalla ghiandola lacrimale principale e da quelle accessorie di Krause e di Wolfring-Ciacco. Una quantità preponderante di esso viene rinnovata periodicamente e lascia il sacco congiuntivale, attraverso le vie di deflusso lacrimali. Invece, la restante

parte, quella minore, evapora con l'esposizione all'atmosfera.

Esso è una soluzione acquosa che contiene sia sostanze inorganiche che organiche. Le sostanze inorganiche sono l'acqua (più del 98% del volume totale del film lacrimale) (Krachmer et al., 2011), l'ossigeno⁴ (disciolto nel film lacrimale), l'anidride carbonica (prodotta dal catabolismo del glucosio), il cloro, il bicarbonato, il fosfato inorganico, il sodio, il potassio, il calcio, il manganese, il magnesio, il ferro e il rame. Mentre le sostanze organiche sono le proteine⁵. L'analisi elettroforetica ha individuato due principali frazioni proteiche, la prealbumina⁶, che sembra avere un ruolo prevalentemente fisico sui meccanismi di stabilità del film, e il lisozima⁷, con il compito di procedere a un'azione batteriolitica e mucolitica nei confronti dei muco-peptidi della parete batterica. Ciascuna di esse costituisce circa il 30%-40% delle proteine totali. Tra le altre proteine presenti nelle lacrime umane ricordiamo: la beta-lisina che ha azione antibatterica, la lattoferrina che possiede azione batteriostatica, nonché la transferrina e la ceruloplasmina deputate rispettivamente al trasporto del ferro e del rame (Scuderi, 1998). Il film lacrimale, così, serve non solo come un lubrificante e una risorsa di nutrienti per l'epitelio corneale, ma anche come una sorgente di fattori di regolazione richiesti per il mantenimento epiteliale e la riparazione (Van Setten et al., 1989; Nishida et Tanaka, 1996). Per quanto riguarda le immunoglobuline, quelle maggiormente rappresentata nel liquido lacrimale sono le IgA secretorie (sIgA). Vengono prodotte dalle plasmacellule che si trovano tra le cellule secretorie della ghiandola lacrimale principale e di quelle accessorie⁸. Svolgono una funzione primaria di difesa atta a impedire la colonizzazione batterica nelle superfici mucose e a neutralizzare molti virus, senza aumentare la fagocitosi batterica né indurre la lisi. Come sostanze organiche troviamo il glucosio⁹, l'urea, il lattato, l'acido citrico, l'acido ascorbico, il fosforo organico e il piruvato (Scuderi, 1998).

4 pressione parziale dell'ossigeno è pari a 140 mmHg a palpebre aperte, e 55 mmHg a palpebre chiuse.

5 la cui concentrazione media riscontrata presenta notevoli variazioni e ciò è da imputare alle metodiche di prelievo. Come riferito da Murube e Castillo, i valori oscillano tra i 2 e i 20 grammi per litro.

6 albumina lacrimale superficiale

7 muramidasi

8 è stata, inoltre, ipotizzata la partecipazione, a tale processo, dell'epitelio congiuntivale (Allansmith et Coll, 1988)

9 come riferito da Calabria e Rolando (1984), il glucosio costituisce il 40% delle sostanze riducenti che si trovano nelle lacrime.

8.3.3 STRATO MUCOSO

Lo strato mucoso è il più interno del film lacrimale. Si sovrappone al glicocalice delle cellule epiteliali di superficie e ricopre sia la cornea che la congiuntiva. Holly e Lemp nel 1977 avevano valutato il suo spessore intorno a 0.02-0.05 μm (200-500 Å), ma studi più recenti condotti attraverso l'utilizzo del microscopio elettronico, hanno dimostrato che esso è notevolmente superiore a quanto misurato, ovvero circa 1 μm . Lo strato mucoso è essenzialmente composto dalla mucina prodotta dalle cellule caliciformi della congiuntiva, dalle ghiandole di Manza e dalle cripte mucose di Henle, poste sulla congiuntiva tarsale della palpebra superiore ed inferiore. Chimicamente è costituito da glicoproteine, grandi molecole allungate con oligosaccaridi connessi al loro cuore proteico, che contengono una quota di carboidrati variabile dal 50 all'80% (Scuderi, 1998). In tali molecole, attraverso ponti di solfuro, si formano dei legami crociati che determinano dei polimeri ad alto peso molecolare e la formazione di un gel attraverso delle interazioni che non sono ancora ben definite. I mucopolisaccaridi che compongono questo strato, ad ogni ammiccamento, si dispongono in maniera tale da avere il loro polo idrofobo rivolto verso l'interno aderente alla superficie cornea-congiuntiva, mentre il polo idrofilo rimane all'esterno.

Una funzione del muco è quella di ridurre la tensione superficiale, non solo della componente acquosa, ma anche di quella dell'interfaccia lacrime-epitelio, andando ad assicurare un angolo di contatto nullo e quindi una completa bagnabilità, attraverso una certa quantità di mucina che viene disciolta nella parte più profonda dello strato acquoso. Perciò sia la superficie corneale che quella congiuntivale, entrambe di per sé idrofobe, divengono idrofile permettendo alle lacrime di stendersi al di sopra in maniera uniforme. Altre funzioni del muco sono: la difesa dalle aggressioni dei batteri e dei virus, che devono possedere un particolare corredo enzimatico per sopravvivere e svilupparsi in tale ambiente; la protezione degli epitelii della superficie oculare dallo sfregamento palpebrale, andando a ridurre le forze di adesione tra le due strutture grazie alle sue proprietà visco elastiche; l'allontanamento meccanico dei germi, dei piccoli corpi estranei e delle cellule desquamate presenti sulla superficie oculare, ostacolandone anche l'adesione. Il muco ne riduce l'energia cinetica e imbriglia questi ultimi in sottili

filamenti e si sposta, con l'ammiccamento, verso l'angolo interno per essere quindi, espulso dal sacco congiuntivale entro 4 ore circa.

È, infine, opportuno ricordare che il muco contiene il substrato di ancoraggio delle IgA secretorie.

Capitolo IX

TEST CON USO DELLA FLUORESCEINA

9.1 VALUTAZIONE DEL FILM LACRIMALE CON UTILIZZO DELLA FLUORESCEINA

La valutazione del film lacrimale può essere eseguita utilizzando una ampia varietà di metodi. Coerente con molti aspetti della pratica contattologica, la lampada a fessura rappresenta l'elemento chiave dell'intera strumentazione. Un ingrandimento elevato ed ottiche eccellenti sono requisiti necessari per poter osservare le strutture e l'integrità del film lacrimale, utilizzando la riflessione speculare e il fenomeno dell'interferenza dei colori che vi sono associati. Per la valutazione del film lacrimale, vengono continuamente sviluppate diverse tecniche, specialmente nella ricerca clinica. La valutazione del film lacrimale può essere distinta in due aspetti: la valutazione del volume (o della qualità di lacrime) e la valutazione della loro stabilità o quantità.

Nei test per la quantità delle lacrime troviamo:

- test di Schirmer: consiste nel posizionare l'estremità ripiegata di 5 mm di una strisciolina di carta assorbente sopra il margine della palpebra inferiore. Il tratto bagnato della piegatura viene misurato in millimetri dopo cinque minuti. Un film lacrimale normale dovrebbe dare una porzione di carta inumidita superiore a 15 mm;
- test del filo rosso di fenolo: l'estremità piegata di un filo di 70 mm viene posta nel sacco congiuntivale inferiore, dal lato temporale, del soggetto. All'esaminato viene chiesto di chiudere gli occhi e il filo viene tolto dopo 15 secondi. Il tratto di filo caratterizzato dal cambiamento di colore, indicante la porzione di filo bagnata dalle lacrime, è misurata in millimetri. La porzione di filo inumidito deve normalmente variare fra 9 e 20 mm. Valori inferiori al minimo hanno dimostrato di correlarsi a sintomi soggettivi di secchezza oculare.

- altezza del prisma lacrimale inferiore: la misurazione del menisco lacrimale che si forma sui margini delle palpebre inferiore offre un'utile indicazione del volume di lacrime prodotto. Questa semplice tecnica utilizza il biomicroscopio con lampada a fessura. È consigliato evitare di utilizzare l'illuminazione in modo eccessivo o prolungato onde prevenire l'essiccazione artificiale del prisma di lacrime. Un'altra tecnica consiste nel confrontare l'altezza del prisma di lacrime con la larghezza della fessura illuminata, impostando la fessura orizzontalmente, allineandola al margine della palpebra inferiore, modificando la larghezza della fessura siano a quando pare corrispondere all'altezza del prisma di lacrime.
- Turnover della secrezione lacrimale: valutazione del tempo necessario affinché il film lacrimale venga totalmente ricambiato. La tecnica è molto semplice, viene instillata la fluoresceina e attraverso la lampada a fessura si osserva la completa scomparsa del colorante dovuta a un ricambio completo del menisco lacrimale. Normalmente il tempo necessario è di 10-15 min.

Nei test, invece, per la qualità delle lacrime è presente il BUT (*Break Up Time*), nel quale viene utilizzata la fluoresceina. È stato proposto da Norn nel 1969 per indicare la stabilità del film precorneale (Norn, 1969). L'esame si svolge instillando la fluoresceina e chiedendo al paziente di ammiccare più volte, per poi invitarlo a mantenere gli occhi aperti e di guardare dritto. Da quel momento, viene calcolato il tempo che intercorre tra l'ultimo ammiccamento e lo sviluppo del primo *dry spot* o zona secca, che corrisponde alla zona di rottura del film lacrimale con la comparsa di una o più macchie non più fluorescenti. Questo test dà delle indicazioni sull'integrità e sulla stabilità degli strati mucoide e lipidico (Rossetti et Gheller, 2003).

Un BUT tra 15-20 secondi è considerato un valore normale per la stabilizzazione del film lacrimale misurata con fluoresceina, nonostante in letteratura siano riportati ampi range. È bene ripetere 2-3 volte il test per avere un dato più attendibile, date le possibili influenze endogene e esogene. Va notato che si tratta di una tecnica invasiva. Toccando l'occhio con una strisciolina di carta si determina un certo grado di lacrimazione riflessa ed instillando 20-30 ml di soluzione di fluoresceina si viene ad alterare quello che è il volume normale di 70ml del film. Inoltre, l'aggiunta di fluoresceina al film lacrimale

altera le interazioni fisiche tra gli strati che compongono il film lacrimale, riducendo la tensione superficiale e, quindi, influenzando sul valore del BUT.

È possibile eseguire anche il NIBUT (*Break Up Time* non invasivo) per valutare il tempo di rottura del film lacrimale senza l'utilizzo della fluoresceina o di altri elementi esterni. Questo test corrisponde alla misurazione in secondi del tempo trascorso fra l'ultimo ammiccamento completo e la comparsa della prima discontinuità nel film lacrimale. La rottura del film lacrimale appare come una perdita di coerenza della superficie su cui si riflettono gli anelli, nel caso venisse usato il topografo per l'osservazione, o la griglia, nel caso dell'aberrometro o del tearscope. Il valore di questo test è estremamente significativo in quanto si basa sulla valutazione della situazione basale ideale dello strato lacrimale; il suo limite è rappresentato dall'elevata variabilità dei dati per lo stesso soggetto, in quanto si tratta di un test molto sensibile e che risente di diverse variabili, da quelle ambientali a quelle personali e locali. I valori di normalità secondo Efron (1998) vanno da 20 a 30 secondi, mentre Wong (2002) dichiara che in media dovrebbero essere 10s quelli che intercorrono tra la prima immagine di Purkinje e il verificarsi della distorsione o rottura dell'immagine proiettata. Tuttavia il range di normalità può fluttuare tra 4-45s (Rossetti et Gheller, 2003).

Un altro test per la qualità delle lacrime è il test della black line o linea nera. Si instilla la fluoresceina e, una volta aperto l'occhio, il movimento di diffusione dello strato lipidico verso il centro corneale tende a svuotare il menisco lacrimale al margine lacrimale inferiore. Vicino a questo menisco si nota un assottigliamento lineare del film lacrimale, che appare come una linea nera. In corrispondenza di questa linea, il menisco è composto esclusivamente dagli strati lipidico e mucoide, con l'assenza dell'acquoso. Quando il margine della black line appare irregolare, significa che il menisco è saturo e non è più in grado di mantenere uno spessore costante del film lacrimale.

Il test della felcizzazione è un test importante per determinare la qualità del film lacrimale. Il muco ha la capacità di cristallizzarsi sotto forma di felci quando viene fatto asciugare in vitro a temperatura ambiente per un tempo di 5-8 minuti. Tanto più fitta è l'arborizzazione tanto più è equilibrata la concentrazione del muco (fig.16).

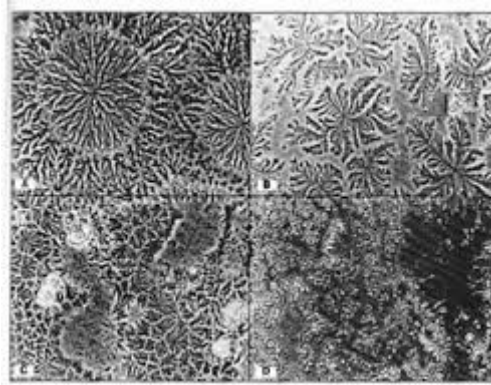


Figura 16. Immagini di felcizzazione del muco ottenute con microscopio ottico. (Rolando, 1984)

I primi due tipo di arborizzazione (quelli nella parte superiore della fig.16) indicano un buon equilibrio fra mucina ed elettroliti, mentre in quelli inferiori l'equilibrio è alterato anche se la percentuale di mucina è normale. Alterazioni dello strato mucinico si possono avere in: ipovitaminosi A, cheratocongiuntiviti, disordini mucocutanei, traumi chimici e uso di farmaci topici (Rossetti et Gheller, 2003).

9.2 VALUTAZIONE DELLE LENTI RGP CON FLUORESCEINA

L'applicazione delle lenti RGP richiede la valutazione di criteri statici e di criteri dinamici. Grazie alla presenza della fluoresceina la valutazione di questi aspetti risulta essere più semplice. In particolar modo la fluoresceina permette, associata ad altri fattori, di evidenziare la presenza di una lente che risulta essere troppo stretta o troppo piatta. L'applicazione di fluoresceina nel film lacrimale è essenziale per l' appropriata valutazione della relazione perfetta tra lente e cornea. Omettere questo step può risultare in qualcuno o più dei seguenti problemi:

- blocco periferico: non è possibile il ricambio lacrimale; comunque vengono eliminati i detriti e il supporto di ossigeno addizionale viene tolto;
- aree di contatto della lente con la cornea: una distorsione corneale può risultare con il tempo;

- regione di eccessiva clearance: più consapevolezza della palpebra da parte del portatore, secchezza o essiccazione corneale, e ci può essere anche il decentramento della lente;
- compressione della cornea: presenza di area della cornea con *staining* coalescente.

Quando parliamo di fitting di allineamento intendiamo un pattern fluoresceinico che mostra una colorazione uniforme della cornea con solo un leggero accumulo di lacrime tra la lente e la cornea.

Un'applicazione centrale più stretta con un'eccessiva fluorescenza o con un eccessivo accumulo di lacrime centrale viene definito clearance apicale. Il contatto apicale invece rappresenta la forma opposta di pattern o diretto contatto della lente contro la cornea centrale. Solitamente viene consigliato di seguire una applicazione di tipo allineata. L'unica eccezione potrebbe riguardare quei casi in cui un'applicazione allineata non potrebbe essere ottenuta (i.e. Cornee irregolari) o nei casi in cui non è desiderata (i.e. Ortocheratologia). Un eccessivo cuscinetto apicale dovrebbe essere evitato per non incorrere nel modellamento corneale, possibilmente risultante nella incurvatura corneale o distorsione.

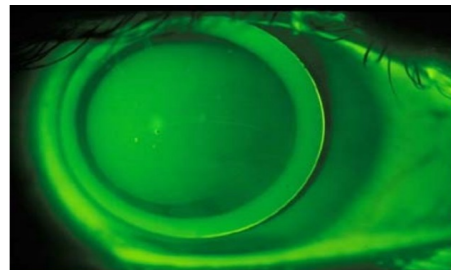
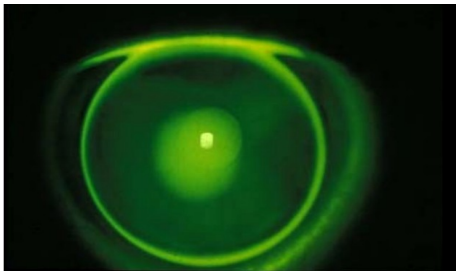


Figura 17. Una bassa clearance di applicazione ¹ **Figura 18. Un' elevata clearance di applicazione** ²

Con il portatore davanti alla lampada a fessura o utilizzando la lampada di Burton, si deve effettuare una valutazione dell'applicazione con instillazione della fluoresceina. Una minima quantità del colorante deve essere instillata nel sacco congiuntivale e al portatore viene chiesto di ammiccare. Il professionista dovrà quindi effettuare una

¹ Immagine presa da <https://www.slideshare.net/hmirzaeee/fitting-rgp-lenses-presentation>

² Immagine presa da <https://www.slideshare.net/hmirzaeee/fitting-rgp-lenses-presentation>

valutazione sistematica con la fluoresceina in tre zone distinte: centrale, medio-periferica, periferica. Una semplice scala di valutazione per l'applicazione è stata ideata da Guillon (tab. VIII).

Tabella VIII. Scala di valutazione della colorazione con fluoresceina per l'applicazione di lenti RGP (Veys et al., 2008)

	+2	+1	0	-1	-2
APPLICAZIONE GENERALE	Eccessivamente stretta	Lievemente stretta	Allineamento	Lievemente piatta	Eccessivamente piatta
APPLICAZIONE PERIFERICA					
Larghezza	Estremamente larga (0,4mm)	Lievemente larga (da 0,3 a 0,4 mm)	Ottimale (da 0,2 a 0,3mm)	Lievemente stretta (da 0,1 a 0,2mm)	Estremamente stretta (<0,1mm)
Altezza	Eccessiva	Più che ottimale	Ottimale	Ottimale	Insufficiente
APPLICAZIONE MEDIO-PERIFERICA	Contatto ben definito	Contatto ben definito	Nessun contatto		

Nel corso della valutazione, viene osservata la fluoresceina che si trova al di sotto della lente e la sua entità può variare da una quantità modesta ad una moderata o ad una eccessiva. Se è difficile da valutare, a causa di un apparente film uniforme di fluoresceina, si avrà una applicazione di allineamento. Generalmente è più facile rilevare un'applicazione stretta piuttosto che una piatta. La valutazione della fluoresceina nell'applicazione di LaC in relazione con la cornea dovrebbe essere fatta sempre, assieme alla valutazione dell'acuità visiva. L'abilità nel valutare accuratamente un pattern fluoresceinico viene solo dopo costanti e frequenti valutazioni. Non è poi così insolito avere una lente che si centra perfettamente ma che compromette la cornea nel tempo, poiché vi è l'assenza di una applicazione allineata.

Per quanto riguarda la valutazione di LaC morbide, come detto in precedenza, non è possibile instillare la fluoresceina, a causa delle larghe maglie dei polimeri delle lenti, che tenderebbero a colorarsi a causa dell'entrata della fluoresceina. Per questo viene utilizzata una fluoresceina macromolecolare che non entra nel polimero e non lo colora.

CONCLUSIONI

Per oltre un secolo la colorazione della superficie oculare è stata ottenuta con la fluoresceina. Le esigenze di maggiore comfort per il paziente e di più dettagliate valutazioni delle caratteristiche della superficie oculare per l'oftalmologo, portarono a preferire coloranti in collirio confezionati in monodose, senza conservanti e richiudibili. La fluoresceina in collirio rimane comunque un buon colorante della superficie oculare. La riboflavina è la principale innovazione in quest'area della semiotica oftalmica e rappresenta un miglioramento della colorazione con fluoresceina. L'osservazione della colorazione della superficie oculare ottenuta con la riboflavina (usando contemporaneamente la luce di Wood nel sistema illuminante e il filtro giallo nel sistema osservante) non solo appare migliore, amplificata e potenziata, ma anche più raffinata nel circoscrivere i confini delle lesioni presenti, rispetto alla colorazione ottenuta con la fluoresceina. Come per tutte le innovazioni anche in questo caso è necessaria una minima familiarizzazione con il nuovo metodo di colorazione.

Alla domanda cosa effettivamente colora la fluoresceina, confrontando i vari studi, si evince che essa colora tutte le cellule "vive", ovvero quelle sane in maniera moderata e quelle in apoptosi (dovuto a stress o a cause fisiologiche) che ancora non hanno raggiunto la vera e propria morte, e sono proprio queste che vengono evidenziate in modo particolare dalla fluoresceina con un'iperfluorescenza. Nonostante l'uso diffuso della fluoresceina per la valutazione della superficie oculare, viene molto spesso contesa la comprensione e l'interpretazione della fluorescenza della superficie oculare, in quanto basata sui meccanismi di questo fenomeno, perciò un'ulteriore ricerca per capire meglio le interazioni di base tra le cellule della superficie oculare e la fluoresceina, dovrebbe essere una priorità nel campo dell'optometria e dell'oftalmologia. I prossimi studi dovranno, quindi, concentrarsi sulla conoscenza dei meccanismi che stanno alla base dell'assorbimento nella cornea umana.

Notevole è l'importanza che la fluoresceina risulta avere nella fase pre-applicativa delle LaC, in quella applicativa e in quella post. Non solo, è anche utile per valutare l'integrità della superficie corneale e per rilevarne anomalie quando si sospettano patologie oculari. Il lavoro contattologico, però, non si deve limitare solo a questo ma deve esserci

anche un follow-up applicativo, che permette di seguire e monitorare il soggetto apportando le giuste modifiche, che non includano il cambiamento della normale fisiologia dell'epitelio corneale e del film lacrimale.

Un aspetto che non bisogna dimenticare è il sovradosaggio. Si sa, “il troppo stropia”, e questo è un detto che può essere applicato a qualsiasi cosa. Il problema, nel caso della fluoresceina, è che risulta essere un tema poco trattato negli studi che sono stati fatti finora. Per questo si spera che l'argomento possa essere approfondito in un breve futuro. Cosa fondamentale che è stata percepita dai vari studi letti, è che la lettura del disegno fluoresceinico e la consapevolezza di quello che viene visto con la lampada a fessura, avviene solo dopo un certo carico di esperienza. Per cui non basta solo comparare quanto osservato con le immagini presenti nelle *grading scales*, ma bisogna avere una certa conoscenza della materia e un consistente background per poter classificare un determinato disegno o applicazione. E anche in quel caso si deve essere sempre un minimo critici, in quanto molto spesso determinate figure possono trarre in inganno.

Attraverso la fluoresceina è possibile andare a ridurre l'incidenza del *drop out*, in quanto permette al professionista di evidenziare le cause che possono portare il soggetto a tale decisione.

Un altro fattore da non sottovalutare, che è stato riscontrato in alcuni studi, è l'importanza dell'anamnesi in soggetti con allergie. Bisogna prestare molta attenzione a quel passaggio, perché come visto, la fluoresceina non è totalmente innocua nei soggetti che ne sono allergici.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Aguayo, J.B., McLennan, I.J., Graham, C.Jr., et al., *Dynamic monitoring of corneal carbohydrate metabolism using high resolution deuterium NMR spectroscopy*, Exp Eye Res, 1988, 47:337-343
- (2) Alphonusus, C.S., Rodseth, R.N., *The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier*, Anaesthesia, 2014, 69(7):777-784.
- (3) Anderson, J.S., Davies, I.P., Kruse, A., Lofstrom, T., Ringman, L., *Manuale per l'assistenza all'applicazione di Lenti a Contatto*, The vision care institute® by JohnsonandJohnson 2ª edizione, Butterwoth-Heinemsnn, 2006, 34.
- (4) Anderson, J.S., Davies, I.P., Kruse, A., Lofstrom, T., Ringman, L., *Manuale per l'assistenza all'applicazione di Lenti a Contatto*, The vision care institute® by JohnsonandJohnson 2ª edizione, Butterwoth-Heinemsnn, 2006, 42.
- (5) Anderson, J.S., Davies, I.P., Kruse, A., Lofstrom, T., Ringman, L., *Manuale per l'assistenza all'applicazione di Lenti a Contatto*, The vision care institute® by JohnsonandJohnson 2ª edizione, Butterwoth-Heinemsnn, 2006, 46.
- (6) Andreoli, A., Egid, I., *Argomenti di fisiologia e nutrizione umana*, Società editrice Esculapio, Bologna, 2011, 240-241.
- (7) Andreoli, A., Egid, I., *Argomenti di Fisiologia e Nutrizione Umana*, Società Editrice Esculapio, Bologna, 2011, 252.
- (8) Bachman W.G., Wilson G., *Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface*, Invest Ophthalmol VisSci, 1984, 26.
- (9) Bakkar, M.M., Hardaker, L., March, P., Morgan, P.B., Maldonado-Codina, C., Dobson, C.B., *The Cellular Basis for Biocide-Induced Fluorescein Hyperfluorescence in Mammalian Cell Culture*, PLoS ON , 2014, 9(1).
- (10) Bailey, I.L., Bullimore, M.A., Raasch, T.W., Taylor, H.R., *Clinical grading and the effects of scaling*, 1991, 32(2):422-32.
- (11) Bandamwar, K.L., Garrett, Q., Papas, E.B., *Mechanisms of superficial*

- micropunctate corneal staining with sodium fluorescein: the contribution of pooling*, Cont Lens Anterior Eye, 2012, 35:81-84.
- (12) Bandamwar, K.L., Garrett, Q., Papas, E.B., *Fluorescein staining and physiological state of corneal epithelial cells*, PlumXMetric, 2014, 37(3): 213-223.
- (13) Begley, C.G., Barr, J.T., Edrington, T.B., Long, W.D., McKenney C.D., Chalmers, R.L., *Characteristics of corneal staining in hydrogel contact lens wearers*, Optom Vis Sci., 1996 ;73(3):193-200.
- (14) Benson H., *Permeability of the Cornea to Topically Applied Drugs*, Arch Ophthalmol, 1974, 91:313.
- (15) Berberian, D., *The contact lens 'drop-out' – a dissatisfied person?*, Ophthalmic Optician, 1983, 17:551.
- (16) Bertalanffy, F.D., Lau, C., *Cell renewal*, In&n. Rev. Cytol, 1962, 13:357.
- (17) Beswick, A.J., Langler, R., McCulloch, C., *Factors influencing the movement of fluorescein in the cornea*, Am J. Ophth, 1958, 46:3-8 (pt.II).
- (18) Bottegal, E., *Contattologia*, Vargellini, Bologna, 2009.
- (19) Brautaset, R.L., Nilsson, M., Leach, N., Miller, W.L., Gire, A., Quintero, S., Bergmanson, J.P., *Corneal and conjunctival epithelial staining in hydrogel contact lens wearers*, Eye Contact Lens, 2008, 34(6):312-316.
- (20) Bucci, M. G., *La Cornea in Oftalmologia*, SEU, Italia, 2010.
- (21) Buschke, W., Friedenwald, J.S., Fleischmann, W., *Studies on the mitotic activity of the corneal epithelium; methods; the effects of colchicine, ether, cocaine and ephedrin*, Bull Johns Hopkins Hosp, 1943, 73:143–167.
- (22) Caffery, B.E., Josephson, J.E. , *Corneal staining after sequential instillations of fuorescein over 30 days*, Optom. Vision Sci, 1991, 68:467-469.
- (23) Cattaneo, E., Plebani, S., *Polimeri delle lenti a contatto e coloranti utilizzati in contattologia*, SOPTI professional optometry, 2014, 48.
- (24) Chong, T., Simpson, T., Fonn, D., *The repeatability of discrete and continuous anterior segment grading scales*, Optom. Vis. Sci., 2000, 77: 244-

251.

- (25) Cercek, L., Cercek, B., Ockey, C.H., *Fluorescein excitation and emission polarization spectra in living cells: changes during the cell cycle*, *Biophys J.*, 1978, 23(3):395-405.
- (26) Chen, R.F., Knutson, J.R., *Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers*, *Anal. Biochem.*, 1988, 172: 61–77.
- (27) Cochet P., Bonnet, R., *Epithelial reactions to contact lens*, *Bull. Soc. Ophthalmol.*, 1959, 1:20-27.
- (28) Davanger, M., Evensen, A., *Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium*, *Nature*, 1971, 229:560–561.
- (29) Debbia, E.A., *Microbiologia Clinica*, Esculapio, Bologna 2018, 239.
- (30) Doughty, M.J., Zaman, M.L., *Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach*, *Surv. Ophthalmol*, 2000, 44(5):367-408.
- (31) Dundas, M., Walker, A., Woods, R.L., *Clinical grading of corneal staining of non-contact lens wearers*, *Ophthal. Physiol. Opt.*, 2001, 21(1):30-35.
- (32) Edward, A., Prausnitz, M. R., *Fiber matrix model of sclera and corneal stroma for drug delivery to the eye*, *AIChE J.*, 1998, 44:214-225.
- (33) Edward, A., Prausnitz, M. R., *Predicted permeability of the cornea to topical drugs.*, *Pharm. Res.*, 2001, 18:1497–1508.
- (34) Efron, N., Morgan, P.B., Katsara, S.S., *Validation of grading scales for contact lens complications*, *Ophthal. Physiol. Opt.*, 2001, 21:17-29.
- (35) Efron, N., *Contact Lens Complications*, *Optician*, Butterworth-Heinman Oxford, 1999, 161-167.
- (36) Efron. N., *Contact Lens Complications:Expert Consult - Online and Print*, Elsevier Health Sciences, 2012, 16.
- (37) Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M., *The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein*

- occludin and the actin cytoskeleton*, J. Biol. Chem., 1998, 273(45):29745-53.
- (38) Fatt, I., Weissman, B.A., *Physiology of the Eye. An Introduction to the Vegetative Functions*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Boston, 1992.
- (39) Feenstra, R.P.G., Scheffe, C.G., Tseng, M.D., *Comparison of Fluorescein and Rose Bengal Staining*, Ophthalmology, 1992, 99:605-617.
- (40) Fishbarg, J., Lim, J.J., *Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium*, I Physiol., 1974, 241:647.
- (41) François, J. & Feher, J., *Collagenolysis and regeneration in corneal burnings*, Ophthalmologica, 1972.
- (42) Fujitani, K., Lee, N.G.K.I., Barry, B., Asbell, P., *Corneal permeability changes in dry eye disease: an observational study*, BMC Ophthalmology, 2016, 16:53.
- (43) Grass, G.M., Robinson, J.R., *Mechanisms of corneal drug penetration II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement*, J. Pharm. Sci., 1988, 77(1):15-23.
- (44) Grass, G.M., Cooper, E.R., Robinson, J.R., *Mechanisms of corneal drug penetration. III. Modeling of molecular transport*, J Pharm Sci, 1988, 77:24–26.
- (45) Green, K., Laughter, L., Hull, D.S., *Radial keratotomy and corneal permeability in Owl Monkey*, Curr. Eye Res., 1983, 2: 797.
- (46) Hanna, C., O'Brien, J.E., *Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea*, Arch. Ophthalmol, 1960, 64: 536–539.
- (47) Hazlett L.D., Mathieu P., *Glycoconjugates on corneal epithelial surface: Effect of neuraminidase treatment*, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1989, 39:19–35.
- (48) Herranz, R.M., Corrales, R.M., *Ocular Surface: Anatomy and Physiology, Disorders and Therapeutic Care*, CRC Press., 2012, 28.
- (49) Holden, B.A., Sweeney, D.F., Vannas, A., et al., *Effects of long term extended contact lens wear on the human cornea*, Invest Ophthalmol Vis. Sci., 1985, 26:1489-1501.

- (50) Holly, F.J., Lemp, M.A., *Tear physiology and dry eye*, Survey of Ophthalmology, 1977, 22(2): 69-87.
- (51) Huang, H.S., Schoenwald, R.D., Lach, J.L., *Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions*, J. Pharm. Sci., 1983, 72:1272–1279.
- (52) Huff, J.W., Green, K., *Characteristics of bicarbonate, sodium, and chloride fluxes in the rabbit corneal endothelium*, Exp. Eye Res., 1983, 36:607.
- (53) Hull, D.S., Green, K., Boyd, M., Wynn, H.R., *Corneal endothelium bicarbonate transport and the effect of carbonic anhydrase inhibitors on endothelial permeability and fluxes and corneal thickness*, Invest Ophthalmol Vis. Sci., 1977, 16:883.
- (54) Inoue, T., Kobayashi, T., Nakao, S., Hare, Y., Suzuki, T., Hayashi, Y., Zheng, X., Shirashi, A., Ohashi, Y., *Horizontal Intracorneal Swirling Water Migration Indicative of Corneal Endothelial Function*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014, 55, 8006-8014.
- (55) Jalbert, I., Sweeney, D.F., Holden, B.A., *The characteristics of corneal staining in successful daily and extended disposable contact lens wearers*, Clin. Exp. Optom., 1999, 82(1):4-10.
- (56) Johnson, M., Berk, D., Blankschein, D., Golan, D., Jain, R., Langer, R., *Lateral diffusion of small compounds in human stratum*, Biophys. J., 1996, 71:2656–2668.
- (57) Jones, R.F., Maurice, D.M., *New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein*, Experimental Eye Research, 1966, 5(1): 208-220.
- (58) Kaye, D.B., *Epithelial response in penetrating keratoplasty*, Am J Ophthalmol, 1980, 89: 381–387.
- (59) Kaufman P.L. et al., *Adler's physiology of the eye*, Eleventh edition, Elsevier, 2011, 88-96.
- (60) Kim, J., *The use of vital dyes in corneal disease*, Curr. Opin. Ophthalmol, 2000, 11(4):241-7.

- (61) Kikkiwa, Y., *Normal corneal staining with fluorescein*, Exp. Eye Res., 1972, 14:13-20.
- (62) Klyce, S.D., Crosson, C.E., *Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review*, Curr. Eye Res., 1985, 4:323.
- (63) Korb, D.R., Exford Korb, J.M., *Corneal staining prior to contact lens wearing*, J. Am. Optom. Assoc., 1970, 41:228-232.
- (64) Korb, D.R., Herman, J.F., Finnermore, V.M., Blackie, C.A., *An evaluation of the efficacy of fluorescein, rose bengal, lissamine green, and a new dye mixture for ocular surface staining*, Eye Contact Lens, 2008, 34(1):61-64.
- (65) Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Edward, J., *Cornea E-Book*, Mosby, 2010.
- (66) Krachmer, J.H., Mannis, J.M., Edward, J., *Cornea: Fundamentals, Diagnosis, and Management,, 3^o edition*, Mosby Elvise, Amsterda, 2011, 6
- (67) Lemp, M.A., Mathers, W.D., *Corneal epithelial cell movement in humans*, Eye, 1989, 3:438-445.
- (68) Li, Y., Liu, J., Pan, D., Hopfinger, A.J., *A Study of the Relationship between Cornea Permeability and Eye Irritation Using Membrane-Interaction QSAR Analysis*, Toxicological Sciences, 2005, 88(2):434-446.
- (69) Liaw, J, Robinson, J.R, *Ophthalmic frug delivery systems*, edited by A.K.Mitra, s.l., 1993, 372.
- (70) Liu, F.F., Li, W., Liu, Z.G., Chen, W.S., *Recent studies on corneal epithelial barrier function*, Chin. J. Ophthalmol, 2016, 52: 631-635.
- (71) Lopez-Saez, M.P., Ordoqui, E., Tornero, P., Baeza, A., Sainza, T., Zubeldia, J.M., Baeza, M.L., *Fluorescein-Induced Allergic Reaction*, Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 1998, 81(5): 428–430.
- (72) Lu, L., Reinach, P.S., Kao, W.W., *Corneal epithelial wound healing*, Exp Biol Med, Maywood, 2001, 226:653–664.
- (73) Lupelli, L., *Scale di gradazione per immagini delle complicanze indotte dall'uso di lenti a contatto*, LAC IMPA N°3, Roma, 2002, 10-14.

- (74) Malhotra, M., Majumdar, D.K., *Permeation through cornea*, Indian Journal of Experiment Biology, 2001, 39: 11-24.
- (75) Mann, I., *A study of epithelial regeneration in the living eye*, Br J Ophthalmol, 1944, 28:26–40.
- (76) Maurice, D.M., *The permeability of the cornea*, Ophthal. Lit., 1953, 7:3–26.
- (77) Maurice, D.M., *The Movement of Fluorescein and Water in the Cornea*, PlumXMetrics, 1960, 5(1):1011–1016.
- (78) Maurice, D.M., Watson, P.G., *The distribution and movement of serum albumin in the cornea*, Exp. Eye Res., 1965, 4:355.
- (79) Mishima, S., Gasset, A., Klyce, S.D.Jr, et al., *Determination of the tear volume and tear flow*, Invest. Ophthalmol., 1966; 5:264-276.
- (80) Mishima, S., *Some Physiological Aspects of the Precorneal Tear Film*, Arch Ophthalmol, 1965, 73:233-241.
- (81) Mishima, S., Maurice, D.M., *Oily Layer of Tear Film and Evaporation From Corneal Surface*, Exp. Eye Res., 1961, 1:39-45.
- (82) Mishima, S., Trenberth, S.M., *Permeability of the corneal endothelium to nonelectrolytes*. Invest Ophthalmol, 1986, 7:34.
- (83) Mitchell, N., Oliver, J., *Oftalmologia del gatto*, Edra, s.l., 2018, 19.
- (84) Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins*, American journal of physiology, 2000, 279:250-254.
- (85) Mokhtarzadeh, M., Casey, R., Glasgow, B.J., *Fluorescein punctate staining traced to superficial corneal epithelial cells by impression cytology and confocal microscopy*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2011, 52:2127-35.
- (86) Moses, R.A., *Fluorescein in applanation tonometry*, American Journal of Optometrist, 1960, 49(5):1149-1153.

- (87) Morgan, P.B., Maldonado-Codina, C., *Corneal staining: do we really understand what we are seeing?*, Cont Lens Anterior Eye, 2009, 32(2):48-54.
- (88) Nallapati, S., Gary, B.D.S, Glassman, D., *L'uso di coloranti oftalmici nella localizzazione del canale radicolare*, L'informatore endodontico, 2003, 6(4).
- (89) Nichols K, Mitchell G, Simon KM, *Corneal staining in hydrogel lens wearers*, Optom. Vis. Sci., 2002, 79:20-30.
- (90) Nichols, J.J., King-Smith, P.E., Hinel, E.A., *The use of fluorescent quenching in studying the contribution of evaporation to tear thinning*, Invest Ophthalmol. Vis. Sci., 2012, 53:5426-5432.
- (91) Nishida, T., Tanaka, T., *Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing*, Curr. Opin. Ophthalmol., 1996, 7:2-11.
- (92) Norn, M.S., *Dessication of the precorneal film*, Acta Ophthalmol, 1969, 47:865-80.
- (93) Norn, M.S., *Micropunctate fluorescein vital staining of the cornea*, Acta Ophthalmol, 1970, 48:108-118.
- (94) O'Hare, N., Stapleton, F., Naduvilath, T., Jalbert, I., Sweeney, D.F., Holden, B.A, *Interaction between the contact lens and the ocular surface in the etiology of superior epithelial arcuate lesions*, Adv. Exp. Med. Biol., 2002, 506:973-80.
- (95) Ohashi, Y., Ishida, R., Kojima, T., Goto, E., Matsumoto, Y., Watanabe, K., et al., *Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome*, Am J Ophthalmol, 2003, 136:291-9.
- (96) Oyster, C.W., *The human eye*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 1999.
- (97) Panwar, Y., Anderson, J.L., *Hindered diffusion in slit pores: an analytical result*, Ind. Eng. Chem. Res., 1993, 32:743-746.
- (98) Pfister, R.R., *The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study*, Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1973, 12: 654-658.

- (99) Prausnitz, M.R., Noonan, J., *Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye*, J. Pharm. Sci., 1998, 87:1479–1488.
- (100) Pritchard, N., Fonn, D., Brazeau, D., *Discontinuation of contact lens wear: a survey*, Int. Contact Lens Clin., 1999, 26(6):157-162.
- (101) Rame, P., *Usa terapeutico delle cellule staminali per la riparazione della cornea*, Scienza attiva[®], Milano, 2018, 6.
- (102) Richdale, K., Sinnott, L.T., Skadahl, E., Nichols, J.J., *Frequency of and factors associated with contact lens dissatisfaction and discontinuation*, Cornea, 2007, 26(2):168-174.
- (103) Ren, H., Wilson, G., *Apoptosis in the corneal epithelium*, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37:1017-25.
- (104) Romanchuk, K.G., *Fluorescein: physiochemical factors affecting its fluorescence*, Surv Ophthalmol, 1982, 26:269-83.
- (105) Rumpakis, J., *New data on contact lens dropouts: an international perspective*, Review of Optometry, 2010.
- (106) Scherz, W., Doane, M.G., Dohlman, C.H., *Tear volume in normal eyes and keratoconjunctivitis sicca*, Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1974, 192:141-150.
- (107) Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., *The tight junction: a multifunctional complex*, Am J Physiol. Cell. Physiol., 2004, 286:1213-1228.
- (108) Schwallie, J. D., McKenney, C. D., Long, W. D. and McNeil, A., *Corneal staining patterns in normal non-contact lens wearers*, Optom. Vision Sci., 1997, 74: 92-98.
- (109) Scudieri, G., *La cornea*, Elviser, Masson, 1998, 10-20.
- (110) Scudieri, G., *La cornea*, Elviser, Masson, 1998, 37-40.
- (111) Shahid, H., Salmon, J.F., *Anaphylactic response to topical fluorescein 2% eye drops: a case report*, Journal of Medical Case Reports, 2010, 4(1):27.
- (112) Soni, P. S., Horner, D.G. and Ross, J., *Ocular response to lens care*

- systems in adolescent soft contact lens wearers*, *Optom. Vision Sci.*, 1996, 73:70-85.
- (113) Standing, S., *Anatomia del Grey 41° edizione*, Edra, s.l., 2017.
- (114) Svederbergh, B.; Bill, A., *Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys*, *Acta Ophthalmologica*, Copenhagen, 1972, 50(3):321- 336.
- (115) Tabery, H.M., *Dual appearance of fluorescein staining in vivo of diseased human corneal epithelium. A non-contact photomicrographic study*, *Br. J Ophthalmol*, 1992, 76:43–44.
- (116) Tabery, H.M., *Corneal surface changes in keratoconjunctivitis sicca. Part II: the mucus component. A non-contact photomicrographic in vivo study in the human cornea*. *Eye*, Londra, 2003, 17:488–491.
- (117) Tabery, H.M., *Corneal surface changes in keratoconjunctivitis sicca. Part I: the surface proper. A non-contact photomicrographic in vivo study in the human cornea*, *Eye*, Londra, 2003, 17:482–487.
- (118) Thoft, R.A., Friend, J., *Biochemical aspects of contact lens wear*, *Am I Ophthalmol.*, 1975; 80:139-145.
- (119) Thomas, M.L., Szeto, V.R., Gan, C.M., Polse, K.A., *Sequential staining: the effects of sodium Fluorescein, osmolarity, and pH on human corneal epithelium*, *Optom. Vision Sci.*, 1997, 74: 207-210.
- (120) Tiffany, J.M., *The normal tear film*, *Dev. Ophthalmol*, 2008, 41:1-20.
- (121) Troiano, P., Caruso, C., Troisi, S., *I coloranti della superficie oculare* , *Notiziario SOI n°1*, Moasca, 2017.
- (122) Tsukita, S., Yamazaki, Y., Katsuno, T., Tamura, A., *Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation*, *Oncogene* 27, 2008, 6930-6938.
- (123) Turner, S.M, *Saunders solutions in Veterinary Practise: Small Animal Ophthalmology 1°ed* , Elsevier srl, Masson, 2008.

- (124) Twelker, J.D., Bailey, I.L., *Grading conjunctival hyperemia using a photographybased method*, Invest Ophthalmol Vis. Sc., 2000, 41: 927
- (125) Van Setten, G.B., Viinikka, I., Tervo, T., et al., *Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid*, Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol, 1989, 227: 184-187.
- (126) Verkman, A.S., Levin, M.H., *Acquaporins and CFTR in ocular epithelial fluid transport*, J Membr Biol, 2006, 210(2): 105-115.
- (127) Verkman, A.S., Ederra, J.R., Levin, M.H., *Progress in Retinal and Eye Research*, PubMed, giugno 2008, 27(4): 420-433.
- (128) Veys, J., Meyler, J., Davies, I., *Elementi essenziali nella Pratica delle Lenti a Contatto*, The vision care institute® of JohnsonandJohnson Medical Ltd, prima edizione italiana 2009 (2008), 38-39, 42-47, 62-78.
- (129) Wagoner, M.D., *Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy*, Surv Ophthalmol, 1997,41:275–313.
- (130) Wang, Y., Chen, M., Wolosin, J., *ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal*, Exp. Eye Res., 1993, 57:283-292.
- (131) Wessman, B.A., Fatt, I., Rasson, J., *Diffusion of oxygen in human corneas in vivo*, Invest Ophthalmol Vis. Sci., 1981, 20:123-125.
- (132) Wilson, G., Ren, H., Laurent, J., *Corneal epithelial fluorescein staining*, J. Am. Optom. Assoc, 1995, 66:435-441.
- (133) Wolff, E., *Mucocutaneous Junction of LidMargin and Distribution of Tear Fluid*, Trans. Ophthal. Soc. UK, 1946, 66:291-308.
- (134) Wolff, E., *Anatomy of Eye and Orbit*, ed 4, Blakiston Co., New York and Toronto, 1954, 207-209.
- (135) Worth, A. P., and Cronin, M. T. D., *Structure-permeability relationships for transcorneal penetration*, ATLA, 2000, 28:403–413.
- (136) Yoon, J.J., Ismail, S., Scherwin, T., *Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis*, World J Stem. Cells, 2014, 26, 6(4):391–403.

SITOGRAFIA

- (1) <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali> consultato il 27/09/2018.
- (2) <http://www.oftaunibologna.it/cms/index.php?page=colorazioni-vitali> consultato il: 10/10/2018.
- (3) <http://physicsopenlab.org/2015/12/15/cose-la-fluorescenza/> consultato il: 05/11/2018.
- (4) <https://www.paolorama.it/anatomia-cornea/> consultato il 21/09/2018
- (5) <http://testdimedicina.altervista.org/blog/glicocalice/> consultato il 25/09/2018
- (6) <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/conjugate-selection/fit> consultato il 16/11/2018

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia, senza la quale non potrei mai aver concluso questo percorso. Mi hanno permesso di raggiungere questo obiettivo e per questo li sarò sempre grata.

Voglio ringraziare tutti coloro che mi sono stati vicini, nei periodi belli e in quelli brutti. Tutti coloro che mi hanno supportata, ma soprattutto sopportata nei momenti di sconforto.

Grazie ai miei compagni di corso, in particolare Ilaria e Giorgia, con cui ho condiviso momenti di panico, pranzi congelati, corse in stazione e la passione per l'optometria.

Grazie a tutti coloro che mi hanno fatto sorridere, piangere, ma soprattutto grazie a chi mi ha fatto veramente capire cosa vuol dire vivere.

Grazie alla danza, che mi ha insegnato disciplina, educazione, rispetto ma soprattutto mi ha fatto capire cosa significa avere passione per quello che si fa.

Grazie a tutti coloro che mi hanno fatto aprire gli occhi.

Grazie a Gian Marco, che mi ha insegnato che casa non è un luogo, ma bensì una persona.

Grazie a me stessa, che nonostante le cadute, i sacrifici, le delusioni, l'amarezza e lo sconforto, sono riuscita a capire cosa voglio fare nella vita, ma soprattutto la persona che voglio essere.