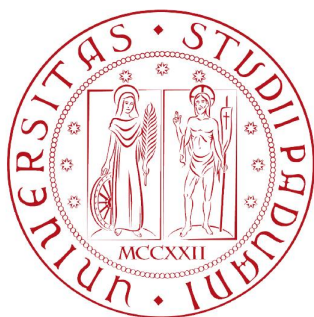


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Fisica e Astronomia

Corso di Laurea in Ottica e Optometria



Tesi di Laurea:

**Depositi proteici sulle lenti a contatto
idrogel: valutazione visiva e quantitativa
a confronto**

Relatore: Prof. Pietro Gheller

Studente: Giorgia Guernieri
Matricola: 1025200

Correlatore: Prof. Stefania Bortoluzzi

8 Luglio, 2015
Anno Accademico 2014/2015

Indice

Sigle	iii
Introduzione	v
1 Concetti introduttivi	1
1.1 Il film lacrimale: caratteristiche e funzioni	1
1.2 Le proteine	2
1.2.1 Gli amminoacidi	3
1.2.2 Struttura delle proteine	3
1.2.3 Funzione delle proteine	4
1.2.4 Denaturazione	5
1.3 Le proteine del film lacrimale	5
1.3.1 Caratteristiche generali	5
1.3.2 Lisozima	6
1.3.3 Lattoferrina	7
1.3.4 Immunoglobuline	7
1.3.5 Albumina	8
1.3.6 Altre proteine	8
1.4 Le lenti idrogel	9
1.4.1 Storia	9
1.4.2 Caratteristiche	10
1.4.3 Classificazione	10
1.4.4 Tempo di utilizzo	11
2 I depositi	13
2.1 Interazione tra film lacrimale e lenti	13
2.2 I depositi e le lenti a contatto	14
2.2.1 Caratteristiche	14
2.2.2 I depositi e le lenti idrogel	16
2.3 Depositi proteici e lenti idrogel	17
2.3.1 Caratteristiche dei depositi proteici sulle lenti idrogel .	19
2.3.2 Lenti idrogel e depositi proteici	20
2.3.3 Lisozima e lenti idrogel	21

2.3.4	Albumina e lenti idrogel	22
2.3.5	Effetti delle idrogel sulle proteine e sui mediatori della risposta infiammatoria	22
2.3.6	Rimozione dei depositi proteici	22
2.4	Complicazioni legate ai depositi proteici	23
2.4.1	Diminuzione del comfort	23
2.4.2	Congiuntivite papillare gigante e congiuntivite papil- lare indotta da lenti a contatto	23
2.4.3	Batteri e depositi	25
2.4.4	Soluzione dei problemi legati ai depositi proteici sulle lenti idrogel	26
2.5	Analogie e differenze con le lenti silicone idrogel	27
2.5.1	Depositi sulle silicone idrogel	27
3	Valutazione dei depositi proteici sulle lenti idrogel	31
3.1	Tecniche di valutazione dei depositi proteici soggettive	31
3.2	Tecniche di valutazione dei depositi proteici oggettive	32
3.3	Studio di Recknor (1998) [40]	35
3.4	Studio di Minno (1991) [33]	35
3.4.1	Metodi	36
3.4.2	Risultati	38
3.4.3	Discussione	47
	Conclusioni	49
	Bibliografia	51

Sigle

AFM: microscopio a forza atomica
ATP: adenosintrifosfato
ATR: riflettanza totale attenuata
BCA: acido bicinconinico
BUT: *break up time*
CLPC: congiuntivite papillare indotta da lenti a contatto
CLSM: microscopio confocale a scansione laser
CSAS: *Institute of Macromolecular Chemistry of the Czechoslovak Academy of Science*
DNA: acido desossiribonucleico
DS: deviazione standard
DW: *daily wear*
ESCA: spettroscopia elettronica per analisi chimiche
ESR: spettroscopia di risonanza di spin elettronico
EW: *extended wear*
FDA: *United States Food and Drug Administration*
FTIR-ATR: spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata
GPC: Congiuntivite papillare gigante
HPLC: cromatografia liquida ad alta prestazione
IgA: Immunoglobuline A
IgD: Immunoglobuline D
IgE: Immunoglobuline E
IgG: Immunoglobuline G
IgM: Immunoglobuline M
IL-8: interleuchina 8
IOL: lente intraoculare
lac: lente a contatto
MA: acido metacrilico
MALDI: desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice
MMA: acido metil-metacrilato
NVP: N-vinil pirrolidone
p-HEMA: poli-2-drossimetilmetacrilato
PLA2: fosfolipasi A2
PMFA: proteine migranti più velocemente dell'albumina

PMMA: polimetilmetacrilato

PVP: polivinilpirrolidone

RM: Rudko modificato

SDS-PAGE: elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato

SEM: microscopio elettronico a scansione

sIgA: Immunoglobuline A secretorie

SLPI: inibitore secretorio delle proteasi liberate dai leucociti

sPLA2: fosfolipasi A2 secretoria

TEM: microscopio elettronico a trasmissione

TGFs: fattori di crescita secretori

Introduzione

Questo lavoro di tesi è stato ispirato dal desiderio di colmare una lacuna personale riguardo ai depositi proteici. Nel periodo di tirocinio, ho visto per la prima volta le pastiglie enzimatiche: nel corso di Contattologia II avevamo accennato alla loro funzione, ma, incuriosita, ho iniziato a svolgere delle ricerche personali. Subito sono stata colpita dai numerosi studi condotti sui depositi e ho compreso che è molto importante riconoscerli nella pratica contattologica, in quanto possono diventare causa di intolleranza, *drop out* e patologie oculari. Ogni contattologo deve essere in grado di riconoscerli e di gestire al meglio la situazione così da garantire al portatore la massima performance della lente, a partire dalla prima applicazione. Quello dei depositi è un argomento complesso in quanto l'interazione tra essi e la lente non può essere totalmente eliminata e neanche la pulizia professionale è in grado di rimuovere i depositi proteici dalla lente.

I depositi proteici sono uno dei problemi più frequenti delle lenti a contatto idrogel e capire le dinamiche tra film lacrimale e lente è fondamentale per ridurre le conseguenze negative di questo fenomeno. In particolare mi sono chiesta quali strumenti possiede un contattologo per identificarli: tecniche di laboratorio avanzate, molto costose e che necessitano di conoscenze bio-chimiche ad alto livello oppure l'osservazione a occhio nudo o con ingrandimenti non elevati, dove l'esperienza gioca un ruolo fondamentale. Non essendo le tecniche di laboratorio alla portata della maggior parte dei contattologi, ho deciso di riportare due studi, i quali hanno confrontato le tecniche oggettive con quelle soggettive e hanno valutato, quindi, l'osservazione effettuata nell'ambulatorio.

Nel primo capitolo, ho sintetizzato i concetti chiave che permettono di capire la natura dei depositi: la composizione del film lacrimale, le proteine e la natura delle lenti a contatto idrogel. Il secondo capitolo, invece, tratta della specifica interazione tra proteine e lenti, in particolare delle lenti idrogel e la correlazione tra depositi e classificazione dell'FDA. Nel terzo capitolo ho riportato due studi sulla correlazione tra valutazione visiva dei depositi secondo Rudko e la quantità di proteine presenti sulle lenti.

Capitolo 1

Concetti introduttivi

1.1 Il film lacrimale: caratteristiche e funzioni

In fisica il film è un sottile strato liquido che può aderire a una superficie verticale senza subire in modo apprezzabile gli effetti della forza gravitazionale: il film lacrimale è, infatti, un velo liquido che copre la superficie esterna del bulbo oculare [32]. È un fluido regolare, essenziale per la superficie congiuntivale e corneale e viene distribuito sulla superficie tramite gli ammiccamenti palpebrali. È lievemente ipertonico con pH in media di 7 (più precisamente tra 6.5-7.7) [4]. La classica descrizione del film lacrimale di tre strati è stata introdotta da Wolff nel 1946 [24], ma è difficile separarli nettamente: dall'esterno all'interno, riconosciamo lo strato lipidico, lo strato acquoso e quello mucoso [4]:

1. Lo strato lipidico con spessore di 0.1μ è lo strato più esterno e meno spesso; ha tre funzioni principali, quali diminuire il tempo di evaporazione della fase acquosa, evitare la contaminazione del film con i lipidi altamente polari della pelle e abbassare la tensione superficiale lacrimale. Non solo, garantisce una superficie liscia per una buona qualità ottica, forma una barriera idrofoba lungo il bordo palpebrale per evitare la fuga dello strato acquoso e mantiene l'idratazione oculare durante il sonno. Le sue componenti sono prodotte principalmente dalle ghiandole del Meibomio e dalle ghiandole di Zeiss e di Moll
2. La fase acquosa rappresenta lo strato intermedio, con il suo spessore di circa $7-10\mu$ è la parte più importante del film e rappresenta il 95% del volume totale. È prodotto dalla ghiandola lacrimale principale e dalle ghiandole lacrimali accessorie di Krause e di Wolfring ed è costituito per il 98% da acqua, dove troviamo elettroliti (come sodio, potassio, cloro, calcio), sostanze inorganiche (carbonati, bicarbonati) e sostanze organiche sia a basso che ad alto peso molecolare (acido ascorbico, proteine). Le sue funzioni sono molteplici come separare fisicamente

il bulbo oculare dalle palpebre e ridurre l'attrito, veicolare l'ossigeno proveniente dall'atmosfera, idratare la cornea, rimuovere cellule morte, scorie metaboliche e corpi estranei. Inoltre la pressione osmotica viene mantenuta dagli elettroliti, mentre il pH è dovuto ai carbonati e ai bicarbonati. L'azione batteriolitica è a carico del lisozima, della lattoferrina e delle Immunoglobuline A secretorie (sIgA)

3. Lo strato mucoso è il più profondo, è a contatto con la cornea e con la congiuntiva, ha uno spessore di $0.02-0.05\mu$ ed è costituito maggiormente da glicoproteine secrete dalle cellule caliciformi congiuntivali. L'adesione all'epitelio corneale e congiuntivale è dovuta ai microvilli e alle micropliche degli epiteli stessi e al glicocalice, un mucopolisaccaride complesso con struttura filamentosa. Il compito principale dello strato mucoso è quello di facilitare la distribuzione della fase acquosa sulla superficie oculare che è idrofoba, ma non solo, esso infatti rende la superficie corneale liscia e otticamente perfetta, diminuisce la tensione superficiale, favorisce l'eliminazione dei corpi estranei avvolgendoli e annullandone il potere abrasivo e crea un reticolo dove le sIgA e il lisozima possono interagire in maniera più facile ed efficace [4].

Il film lacrimale ha funzioni essenziali per la salute, la salvaguardia e la protezione della superficie oculare, in particolare per il mantenimento delle normali proprietà ottiche della cornea. Le sue funzioni sono possibili solo se il film è integro:

- funzione ottica: rende liscia e regolare la superficie corneale
- funzione metabolica: mantiene idratata la cornea trasportando ossigeno atmosferico e ioni
- funzione lubrificante tra palpebre e superficie oculare
- funzione di rimozione-pulizia: col suo defluire allontana i corpi estranei
- funzione di difesa-battericida: grazie alle proteine antibatteriche che proteggono l'epitelio [22].

1.2 Le proteine

Le proteine sono macromolecole organiche, ovvero polimeri formati da una o più catene non ramificate di monomeri detti amminoacidi. In natura ci sono proteine costituite da soli 3 amminoacidi e altre da 50000 [51], ma quelle più comuni e diffuse presentano una media di circa 300 amminoacidi [3].

1.2.1 Gli amminoacidi

Gli amminoacidi che vengono utilizzati per creare i polimeri sono 20, 19 hanno lo stesso schema strutturale che prevede un atomo di carbonio al centro che si lega con un gruppo amminico (NH_2), un gruppo carbossilico (COOH), un atomo di idrogeno e un gruppo laterale detto R, proprio di ogni tipologia di amminoacido. Il gruppo R varia da un semplice atomo di idrogeno a catene ad anelli carboniosi complessi. Il ventesimo amminoacido è la prolina che ha un'organizzazione ad anello e presenta il gruppo imminico anziché quello amminico. Il gruppo laterale conferisce a ciascun amminoacido le proprie caratteristiche specifiche: polare o apolare, acido (carico negativamente) o basico (carico positivamente). Gli amminoacidi possono comportarsi come basi quando il gruppo amminico si lega a un H^+ oppure come acidi quando il gruppo carbossilico si lega a un H^- . Le proprietà e le funzioni delle proteine dipendono dalla localizzazione, dalla tipologia delle catene laterali degli amminoacidi, dal numero e dalla sequenza degli amminoacidi. Gli amminoacidi di una singola catena polipeptidica sono connessi da legami covalenti detti legami peptidici. Il legame peptidico è generato dalla condensazione tra il gruppo NH_2 del primo amminoacido e il gruppo COOH del secondo. La catena polipeptidica presenta due terminali, quello N-terminale e quello C-terminale. Dopo la sintesi, la catena polipeptidica si ripiega assumendo una struttura nello spazio tridimensionale grazie alla quale svolge le sue funzioni. Alcune proteine sono costituite da più catene [51].

1.2.2 Struttura delle proteine

La solubilità delle proteine è variabile, alcune sono idrofile, altre invece idrofobe; alcune svolgono un'unica funzione, mentre altre sono capaci di svolgere numerose funzioni. Diverse sono le strutture che le proteine possono assumere: sferiche, fibrose allungate. Solitamente le proteine hanno una struttura tridimensionale dovuta alle forze idrofobiche, ai legami idrogeno e alle forze di Van der Waals. Possiamo individuare quattro livelli di complessità nella struttura delle proteine:

- struttura primaria: particolare e peculiare sequenza degli amminoacidi, è il punto di partenza su cui si basano gli altri livelli di organizzazione
- struttura secondaria: alcune regioni della catena si organizzano in α -elica, foglietti β , forcine (*loop*) o zone disordinate. I primi due schemi sono regolari e ordinati, sono stabili e conferiscono alla catena resistenza alle distorsioni strutturali, mentre il *loop* conferisce un'elevata flessibilità
- struttura terziaria: organizzazione spaziale tridimensionale nella sua complessità o, meglio, rappresenta la conformazione della proteina.

La catena si ripiega grazie a interazioni idrofobiche, legami idrogeno e a ponti disolfuro nascondendo alcuni gruppi amminoacidici all'interno della proteina ed esponendone altri sulla superficie, definendo così l'attività chimica globale della proteina e la sua solubilità. La funzione delle proteine è strettamente correlata alla conformazione spaziale

- struttura quaternaria: disposizione delle diverse catene polipeptidiche in una proteina costituita da più catene (proteine oligomeriche) [51].

1.2.3 Funzione delle proteine

La struttura è importantissima in quanto da essa dipende la funzione stessa della proteina. Modificazioni strutturali, dovute a cambiamenti nella struttura primaria (sequenza amminoacidica), possono comportare la perdita della funzionalità. Le proteine svolgono numerose funzioni vitali negli organismi e possiamo dividere queste molecole organiche in:

- strutturali: costituiscono la maggior parte dell'impalcatura cellulare (es. proteine dei microtuboli e dei microfilamenti, collagene, fibrina)
- enzimatiche: accelerano le reazioni biologiche fungendo da catalizzatori (es. DNA polimerasi, lipasi e proteasi)
- trasporto di membrana: rendono più veloce il trasporto di diverse sostanze attraverso le membrane (es. acquaporine)
- motrici: producono movimenti cellulari consumando ATP (es. miosina)
- regolatrici: promuovono o inibiscono l'attività molecolare di altre proteine (es. fattori di trascrizione)
- recettori: legano particolari molecole a livello della membrana o all'interno di essa, attivando o bloccando una risposta cellulare (es. recettori ormonali)
- ormoni: veicolano segnali regolatori tra cellule (es. insulina)
- anticorpi: difendono l'organismo riconoscendo e inattivando agenti estranei come molecole o organismi invasori (es. immunoglobuline)
- accumulo: mantengono gli amminoacidi e altre sostanze nella forma di riserva (es. ovalbumina)
- veleni e tossine: ostacolano gli organismi competitori (es. ricina, botulino) [51].

1.2.4 Denaturazione

Le proteine sono metastabili perché possono perdere la loro conformazione tridimensionale se esposte a condizioni estreme di temperatura, pH o salinità, e, se cambia la loro struttura, esse perdono la loro funzione biologica. Una condizione estrema è il calore: le temperature elevate rompono i legami idrogeno, per questo la maggior parte degli organismi non sopporta temperature maggiori ai 45°C. Anche i cambiamenti estremi del pH portano a denaturazione in quanto modificano le cariche dei gruppi laterali degli amminoacidi, indebolendo o distruggendo i legami ionici. La denaturazione può avvenire anche a causa di solventi come l'alcol e l'acetone o a causa di soluti, come l'urea e i detergenti.

Per alcune proteine la denaturazione è una condizione reversibile, per altre è stabile e irreversibile, come l'albumina che nella sua forma fisiologica è trasparente e solubile, mentre denaturata è bianchiccia e insolubile [51]. Se le proteine non sono ripiegate, non possono più svolgere le loro funzioni, ma possono interagire con altre molecole in modo indesiderato creando aggregati tossici o scatenando una reazione immunitaria [29].

1.3 Le proteine del film lacrimale

1.3.1 Caratteristiche generali

Le proteine sono la maggior componente del film lacrimale e svolgono numerose funzioni, quali antibatterica, trasporto, regolazione della risposta immunitaria, antiossidante e inibizione della proteasi. La concentrazione proteica nel film lacrimale è di circa 6.5-9.0mg/mL ed è diversa da individuo a individuo; essa dipende anche dal momento della giornata, dall'età, dall'uso di lenti a contatto, da disfunzioni oculari (come la sindrome di Sjogrens) e dalla stimolazione delle lacrime [29]. De Souza identificò 491 diverse proteine e mucine con una grandezza dai 10kDa ai 2360kDa [5]: l'80% delle proteine del film lacrimale ha una grandezza minore di 100kDa e ha punto isoelettrico del pH tra 1 e 11 [29]. Le proteine del film lacrimale sono prodotte da tre fonti: l'epitelio oculare, i vasi sanguigni della congiuntiva, ma soprattutto dalla ghiandola lacrimale principale. La ghiandola lacrimale, ghiandola esocrina tubolo-acinosa, produce la maggior parte degli elettroliti, dell'acqua e delle proteine del film lacrimale, come le proteine antibatteriche, le immunoglobuline e i fattori di crescita. Le proteine secrete dalle ghiandole accessorie sono le stesse prodotte dalla ghiandola principale: lisozima, lattoferrina, lipocaline, IgAs, diversi fattori di crescita (TGFs) come fattori di crescita dell'epidermide e interleuchine [7]. Lisozima, lattoferrina e lipocaline sono originate dagli acini della ghiandola lacrimale e la loro secrezione corrisponde al flusso lacrimale. Gli acini sono cellule piramidali tenute insieme da giunzioni strette che separano la membrana apicale da quella laterale.

A livello cellulare, le proteine sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico ruvido, vengono modificate nell'apparato del Golgi, "impacchettate" e conservate nei granuli secretori e, infine, vengono secrete nel lume. Ci sono due tipi di secrezione delle proteine da parte della ghiandola lacrimale: costitutiva e regolata. Nella secrezione costitutiva, dopo la produzione, le proteine avvolte nelle vescicole vengono rilasciate immediatamente: le vescicole si fondono con la membrana apicale e si dirigono all'interno del lume (come per le sIgA). La secrezione costitutiva è continua e può avvenire in tutte le cellule. La secrezione regolata, come suggerisce il termine, è controllata e avviene solo dopo il segnale di rilascio appropriato; lo stimolo arriva dai neurotrasmettitori grazie ai nervi o agli ormoni che interagiscono con la membrana basale degli acini. Le proteine prodotte vengono "impacchettate" in vescicole nei granuli secretori e portate nella parte apicale degli acini dove vengono concentrate. Questa secrezione non è continua e avviene solo in cellule specializzate. La maggior parte delle proteine è prodotta dalla secrezione regolata e solo il 5% vengono rilasciate dopo stimolazione [22].

Durante il sonno, il film lacrimale si modifica, non solo cambia la concentrazione delle maggiori proteine, ma ne compaiono di nuove per mediare la risposta infiammatoria, come il sistema del complemento. Essendo prodotto meno film lacrimale, la concentrazione di lisozima e di lattoferrina diminuisce del 10%, mentre le mucine aumentano di circa 5 volte e l'SLPI (inibitore secretorio delle proteasi liberate dai leucociti) di circa 7. Le sIgA aumentano notevolmente andando a ricoprire il 60% delle proteine totali; anche la transferrina (simile alla lattoferrina) aumenta durante il sonno. Le IgG, le citochine e il sistema del complemento si attivano durante le ore di sonno. Il sistema del complemento promuove il rilascio di C3a e C5a, piccoli peptidi che hanno effetti vasodilatatori e richiamano globuli bianchi. Anche l'interleuchina 8 (IL-8) aumenta la sua quantità di notte e richiama i globuli bianchi [46].

Nella ricerca, le proteine su cui si concentra maggiormente l'attenzione sono il lisozima, l'albumina e la lattoferrina [46].

1.3.2 Lisozima

Il lisozima è un enzima costituito da una sola catena polipeptidica formata dall'unione di 129 amminoacidi con un peso molecolare di circa 14,6kDa [57]. E' prodotto dalla ghiandola lacrimale principale e ha azione antibatterica e mucolitica. Descritto per la prima volta da Flemming nel 1922, svolge la sua azione contro i batteri Gram-positivi [4]. La sua struttura terziaria presenta pochi tratti ad α -elica, un tratto simile alla struttura β a foglietti antiparalleli e quattro ponti disolfuro: esso presenta una fenditura che si unisce al legame glicosidico della parete cellulare batterica [51]. E' detto anche muramidasi in quanto catalizza l'idrolisi tra il legame tra l'acido N-acetil muramico e l'N-acetil glucosamine, blocchi portanti del peptidoglicano dei

batteri. Dopo che il lisozima rompe il legame, all'interno della cellula batterica entra acqua e di conseguenza avviene la lisi osmotica del batterio. Il lisozima è quindi un battericida, in particolare svolge la sua funzione contro i Gram-positivi come lo *Stafilococco aureo* e i micrococchi (*Micrococco luteus* [53]) e non contro i Gram-negativi (*Pseudomonas aeruginosa*) in quanto il loro peptidoglicano è nascosto dalla membrana lipidica [46]. Il lisozima costituisce circa il 30% delle proteine totali del film lacrimale a occhio aperto [46] ed è la proteina più adsorbita dalle lenti idrogel. Il 90% del lisozima legato alle lenti ioniche mantiene le sue proprietà, mentre si inattiva quando si lega a lenti non ioniche [31].

1.3.3 Lattoferrina

La lattoferrina ha peso molecolare di circa 75kDa [56] e carica positiva, è contenuta in abbondanza nelle lacrime, è presente per circa il 30% delle proteine totali del film lacrimale a occhio aperto [46] e se raggiunge circa 1.40mg/ml indica un deficit della funzione della ghiandola lacrimale [32]. Ha funzioni multiple all'interno delle lacrime: antimicrobica (non uccide i batteri, ma li previene), battericida, fungicida e anti-infiammatoria. La lattoferrina lega il ferro [46], così che i batteri non lo utilizzino per il loro metabolismo [7] e riduce la presenza dei radicali liberi. La lattoferrina, ottenuta per digestione della lattoferrina, ha carica altamente positiva e attività antimicrobica maggiore della lattoferrina nativa, infatti distrugge la membrana esterna dei microrganismi: non è ancora ben chiaro come agisca, se porta la distruzione dell'intera membrana o se crea dei canali che demoliscono enzimi essenziali che si trovano nello spazio tra l'interno e l'esterno della membrana. Inoltre la lattoferrina permette il passaggio del lisozima all'interno dei Gram-negativi, così da permettere l'eliminazione del peptidoglicano: è stato infatti dimostrato che queste due proteine collaborano nella distruzione degli stafilococchi [26]. Non solo, si stima che collaborino anche nella distruzione dei Gram-positivi [46].

1.3.4 Immunoglobuline

Le immunoglobuline sono proteine sintetizzate dai globuli bianchi in molte varianti, ciascuna specifica per particolari antigeni [46]. La molecola delle immunoglobuline è composta da due catene leggere identiche di 214 amminoacidi (peso molecolare 22kDa) e da due catene pesanti di 450 amminoacidi (peso molecolare 55kDa); i due tipi di catene sono tra loro legati da ponti disolfuro. Vengono riconosciute 5 classi di immunoglobuline: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, distinguibili in base alla struttura della molecola e identificabili nella pratica clinica in base al diverso peso molecolare [55]. Le IgA sono le immunoglobuline più presenti nel film lacrimale e nell'occhio aperto di un non portatore di lenti a contatto sono presenti per 1mg/ml [46]. Esse vengo-

no prodotte come un dimero dalle plasma cellule dell'interstizio tra gli acini lacrimali, il dimero si lega ai recettori basolaterali degli acini, attraversa la cellula e viene secreto nel film lacrimale. La sua quantità non dipende dalla portata delle lacrime. Le IgA provvedono alla difesa antibatterica e antivirale di primo livello; tra le IgA riconosciamo le Immunoglobuline A secretorie (sIgA) che possiedono una catena polipeptidica addizionale, la componente secretoria, aggiunta alla molecola IgA dopo la sua sintesi. La funzione delle sIgA è principalmente anti-adesiva perché si legano alla parte esterna dei microrganismi (batteri, funghi o virus) prevenendo l'adesione con altre superfici. Quando si legano, agiscono anche come opsonine, le quali facilitano la fagocitosi del microrganismo da parte dei globuli bianchi, essendo riconosciute da recettori espressi sulla membrana dei fagociti. Nel film lacrimale sono presenti anche altre immunoglobuline in quantità inferiore: IgG, IgM e IgE che possono agire come opsonine o favorire attività infiammatorie [46].

1.3.5 Albumina

L'albumina è una proteina molto più grande del lisozima in quanto ha un peso molecolare di 66kDa (il lisozima di 14kDa), ha carica negativa (il lisozima positiva) e presenta un modello diverso di adsorbimento rispetto al lisozima. La concentrazione dell'albumina nel film lacrimale è relativamente bassa se comparata con quella del siero del sangue, ma aumenta quando l'occhio è chiuso, quando vengono indossate lenti a contatto e in alcune situazioni di occhio secco. L'albumina viene sintetizzata nel fegato e ha una durata di vita di circa 27 giorni. E' la proteina più presente nel siero ed è la più solubile nell'organismo dei vertebrati. Ha diverse funzioni: mantiene costante la pressione osmotica e il pH del sangue e trasporta diverse molecole, come ormoni, grassi e farmaci. L'albumina è una proteina sierica che si mescola con il film lacrimale tramite la dispersione dai capillari congiuntivali [28].

1.3.6 Altre proteine

Qu e Lehrer nel 1998 hanno dimostrato che nel film lacrimale è presente un'abbondante concentrazione di fosfolipasi A2 (PLA2), tale da poter uccidere i Gram-positivi, ma non i Gram-negativi [39]. E' presente anche la fosfolipasi A2 secretoria (sPLA2), prodotta dalla ghiandola lacrimale principale nelle celle ad acino distinte da quelle che producono il lisozima. La sPLA2 è in grado di idrolizzare i fosfolipidi e svolge il suo effetto battericida soprattutto nei confronti dello *Stafilococco*. Sono presenti altri gruppi antimicrobici con carica positiva, come le defensine e gli SLPI. Le defensine α e β sono presenti soprattutto quando la cornea viene aggredita, come nelle cheratiti microbiche; esse agiscono sui batteri creando dei fori sulla loro membrana plasmatica, danneggiando il loro metabolismo e permettendo uno shock osmotico. Gli SLPI hanno una concentrazione maggiore a occhio

chiuso, possiedono duplice funzione in quanto sono dotate di un dominio inibitore della proteasi e di uno con un'attività antimicrobica la cui azione non è ancora conosciuta. Altre proteine antibatteriche sono le mucine e le β -lisine. Le mucine non solo provocano lisi come il lisozima e la lattoferrina, ma anche "impacchettano" i microrganismi per impedire l'adesione con la cornea e facilitarne l'eliminazione. La concentrazione di mucine è circa $70\mu\text{g/ml}$ a occhio aperto [46].

Le lipocaline sono una famiglia di proteine che legano una vasta gamma di lipidi come fosfolipidi, acidi grassi e colesterolo. Sono importanti per la stabilità del film lacrimale in quanto diminuiscono la tensione superficiale e legano e rimuovono lipidi prodotti dalle ghiandole del Meibomio che perturbano la bagnabilità corneale [7]. Costituiscono il 30% delle proteine nella lacrimazione riflessa [46].

Nel film lacrimale troviamo anche l'amilasi, enzima digestivo che scinde gli amidi [32].

1.4 Le lenti idrogel

1.4.1 Storia

Negli anni '50, presso l'*Institute of Macromolecular Chemistry of the Czechoslovak Academy of Science* (CSAS), il professor Otto Wichterle e il dottor Drahodlav Lim sintetizzarono il poli-2-drossimetilmetacrilato o pHEMA, un biomateriale capace di assorbire il 38% del suo peso d'acqua: diedero vita alla prima lente a contatto idrogel per correggere la miopia nel dicembre 1961. Un limitato numero di lenti fu distribuito nei primi degli anni '60 in Europa, in seguito nel 1965 la CSAS vendette senza il consenso di Wichterle il brevetto alla *United States National Patent Development Corporation*. Nel 1966 l'azienda Baush & Lomb ottenne l'accordo di sub licenza, ne migliorò la tecnologia, nel 1971 ottenne l'approvazione dell'FDA e da qui iniziò un'importante proliferazione di nuovi materiali. Negli anni '80 si svilupparono materiali ad alto contenuto d'acqua conducendo parte della contattologia all'EW. Per far fronte all'aumento dei casi di ipossia, di complicazioni infiammatorie e di ulcere corneali dovuti all'utilizzo di lenti EW, sempre negli anni '80, in Danimarca, iniziarono a nascere le lenti usa e getta, ma senza successo perché era difficile produrle; nel 1984 la Johnson and Johnson ne comprò il brevetto, nel 1988 ricevette l'autorizzazione sul sistema di costruzione sul materiale dal'FDA e nel 1991 venne lanciata nel mercato la prima vera lente usa e getta. L'ultimo grande successo delle lenti morbide è stato il silicone idrogel [37].

1.4.2 Caratteristiche

Il pHEMA è un materiale biocompatibile usato tutt'oggi nel campo biomedico, come per impianti a contatto col sangue, organi artificiali, dispositivi di somministrazione dei farmaci, IOL e lenti a contatto [29]. Nelle idrogel la permeabilità all'ossigeno è proporzionale al contenuto d'acqua [47]: il trasporto dell'ossigeno da parte del pHEMA avviene tramite l'acqua, ma questa ha un'abilità limitata nel trasportare l'O₂ perché la sua permeabilità all'ossigeno è di soli 80Dk circa [37]. Per questo motivo il pHEMA viene integrato con monomeri o polimeri che aumentano la trasmissibilità dell'ossigeno, come il silicone (lenti silicone idrogel) [29]. Si annettono MMA (acido metil-metacrilato) NVP (N-vinil pirrolidone) o MA (acido metacrilico) che conferiscono durezza e resistenza al materiale e modificano la bagnabilità, ma al contempo richiamano depositi grazie alle loro cariche (negativa per MMA e MA, positiva per NVP) o intaccano la stabilità del materiale essendo più sensibili alla temperatura e ai prodotti usati per la manutenzione rispetto al pHEMA (che è stabile e cambiamenti della temperatura, del pH e dell'osmolarità hanno pochi effetti sul contenuto d'acqua).

L'MA è il monomero idrofilico più comunemente usato con il pHEMA, è presente in alcuni materiali del Gruppo III e in quasi tutti quelli del Gruppo IV della classificazione dell'FDA [29]. L'NVP o il suo polimero PVP (polivinilpirrolidone) sono anch'essi monomeri idrofilici che possono essere incorporati all'interno del materiale o innestati sulla superficie della lente [41]. Si trovano nella maggior parte delle lenti del Gruppo II, ma anche in quelle del Gruppo IV insieme all'MMA [29].

1.4.3 Classificazione

I polimeri sono stati classificati dall'FDA in quattro gruppi in base al contenuto d'acqua e alle proprietà ioniche: è una classificazione non tanto clinica, quanto dei materiali. Permette di comprendere meglio come il materiale interagisca sia con il film lacrimale che con le soluzioni utilizzate nella manutenzione. Il contenuto d'acqua risulta elevato quando supera il 50% e i polimeri ionici contengono più dello 0.2% di acido metacrilico. Classificazione FDA:

- Gruppo I: Polimeri non ionici a basso contenuto d'acqua: HEMA, *Crofilicon*, *Polimacon*, *Phemfilicon A*. Sono le lenti più stabili e generalmente sono le meno affette da cambiamenti, sia da parte del film che dell'ambiente. Mostrano i livelli più bassi di depositi proteici
- Gruppo II: Polimeri non ionici ad alto contenuto d'acqua: *Lidofilicon A*, *Atlafilicon A*, *Surfilicon A*. Non è da usare la disinfezione con il calore e l'acido scorvico per non scolorire la lente

- Gruppo III: Polimeri ionici a basso contenuto d'acqua: *Bufilicon A*. Presentano depositi proteici moderati
- Gruppo IV: Polimeri ionici ad alto contenuto d'acqua: *Etafilicon A*, *Perfilicon*, *Vifilicon A*. Sono le lenti più reattive, mostrano il più alto livello di depositi proteici con carica positiva, come il lisozima, presentano una quantità di depositi che è dieci volte tanto quella del Gruppo I. Si dovrebbero evitare il calore e l'acido scorbico per la disinfezione.

Le lenti ad alto contenuto d'acqua favoriscono maggiormente l'attrazione di depositi [9].

Gruppo	Contenuto d'acqua %	Acido Metacrilico % (m/m)
Gruppo I	< 50	< 0.2
Gruppo II	> 50	< 0.2
Gruppo III	< 50	> 0.2
Gruppo IV	> 50	> 0.2

Tabella 1.1: Classificazione lenti idrogel secondo l'FDA

1.4.4 Tempo di utilizzo

Le lenti a contatto idrogel possono essere suddivise secondo la modalità di tempo di utilizzo in:

- Uso giornaliero: lenti utilizzate durante le ore di veglia, di solito dalle 8 alle 16 ore e quando vengono tolte o vengono disinfettate e riposte per l'uso successivo o vengono eliminate
- Uso flessibile: vengono utilizzate principalmente di giorno, ma occasionalmente anche di notte. Quando vengono tolte vengono disinfettate o eliminate
- *Extended wear* (EW) o uso prolungato: vengono utilizzate per sette giorni e sette notti consecutivamente. Quando vengono rimosse, vengono disinfettate (EW riutilizzabili) o eliminate (EW usa e getta). Storicamente, le lenti EW venivano usate per le applicazioni terapeutiche, come per l'afachia
- Uso continuo: alla fine degli anni '70, l'utilizzo del termine "uso continuo" significava un tempo di 3 mesi consecutivi, ma uno studio nel 1989 condotto da Poggio et al. dimostrò che l'utilizzo notturno aumentava le probabilità di infezioni corneali e il rischio accresceva

all'aumentare del numero di notti consecutive. L'FDA, quindi, impose di utilizzare queste lenti non oltre le sette notti consecutive; dopo l'introduzione nel mercato delle lenti silicone idrogel, il concetto di utilizzo continuo è riemerso: le lenti vengono portate 24 ore al giorno per 30 giorni e in seguito vengono eliminate [37].

Capitolo 2

I depositi

2.1 Interazione tra film lacrimale e lenti

L'interazione tra film lacrimale e lente a contatto è un concetto conosciuto dal concepimento della lente a contatto di Leonardo da Vinci. Dopo l'invenzione della lente corneale di Touhy nel 1947, nel rapido sviluppo delle lenti a contatto, ci si focalizzò sull'interazione tra film e lente; nel 1951 Graham disse che "il primo oggetto di studio nella costruzione della lente è quello di permettere un ottimo scorrimento del film sotto la lente" [24]. Il film lacrimale è un liquido complesso costituito principalmente da acqua, lipidi, proteine, zuccheri, mucine e carboidrati. Quando una lente a contatto viene posizionata sull'occhio, un materiale sintetico viene immerso in un ambiente naturale; questa situazione si presenta nelle altre parti del corpo dove si inseriscono impianti sintetici e una delle sfide biomediche è ottenere la corretta biocompatibilità. Un dispositivo è idealmente considerato biocompatibile al 100% se i tessuti e i fluidi corporei non influiscono negativamente sul dispositivo e, a sua volta, il dispositivo non influisce significativamente sulla fisiologia dell'ambiente corporeo. Una bassa biocompatibilità porta a depositi corporei sul dispositivo e, conseguentemente, vi è una ridotta performance e una reazione avversa da parte del corpo nei confronti del dispositivo (come la CLPC).

Nella contattologia un dispositivo sintetico viene immerso nel film lacrimale, ma non solo, esso è anche esposto all'aria. Bisogna considerare che l'ammiccamento cambia da una persona all'altra, così come la natura del film lacrimale varia da individuo a individuo; inoltre nella società odierna, il sistema lacrimale non è sempre ottimale e fattori quali l'aria condizionata, il lavoro al computer, la dieta e i farmaci possono modificare la natura del film [38].

La superficie posteriore della lente a contatto è apposta al film lacrimale. Il film lacrimale è poco spesso (10μ) in confronto allo spessore delle lenti a contatto che si aggira intorno ai $30/120\mu$ e può raggiungere i 250μ

nelle lenti con poteri considerevoli: per questo le lenti a contatto possono compromettere le funzioni del film lacrimale come lavaggio, prevenzione dell'essiccamento dei tessuti oculari, trasporto di ossigeno e del biossido di carbonio, protezione della cornea da traumi, infezioni e malattie [24].

2.2 I depositi e le lenti a contatto

2.2.1 Caratteristiche

Con l'introduzione delle idrogel negli USA nel 1972, i depositi sulle superfici e la *spoilation* della lente divennero un problema nuovo e importante che prima non era significativo con le lenti in polimetilmetacrilato (PMMA) [34]. Il termine *spoilation* venne coniato da Ruben negli anni '70 per indicare l'importanza dell'irreversibile interazione tra il film lacrimale e le lenti a contatto morbide. Con *spoilation* lo scienziato intendeva i cambiamenti fisici e chimici del materiale e dei diversi depositi che possono causare danneggiamenti o alterazioni delle proprietà ottiche della lente, discomfort e intolleranza. Due delle principali variabili nello sviluppo della *spoilation* sono le ore di utilizzo e la chimica del film lacrimale del portatore [46].

I depositi sulle lenti a contatto hanno varia natura, possono essere organici o inorganici. Tra i depositi organici troviamo i lipidi e le proteine, mentre tra quelli inorganici troviamo il ferro e il calcio: questi rovinano irreversibilmente la lente perché, quando penetrano all'interno della matrice, non possono essere rimossi. Inoltre i depositi possono essere microrganismi, quali batteri, funghi o virus.

I depositi si presentano principalmente sotto forma di:

- *pellicola*: rivestimento fisiologico di 1μ che presenta principalmente glicoproteine e si costituisce nelle prime 5 ore. La pellicola fisiologica è un'entità morfologicamente distinta che copre la superficie anteriore della lente; depositi abnormali non fanno parte della pellicola fisiologica e possono indurre patologie [12]. La pellicola è essenziale per l'accettazione clinica e la compatibilità oculare della lente [20]
- *coating*: è la trasformazione della pellicola dopo 4-5 giorni in un vero e proprio rivestimento. Ha uno spessore maggiore rispetto alla pellicola, non è da considerare fisiologico in quanto modifica le caratteristiche della superficie della lente, come la bagnabilità.

I depositi vengono adsorbiti oppure assorbiti:

- *adsorbimento*: proprietà di alcuni corpi solidi porosi di fissarne altri, gassosi o liquidi, sulla loro superficie, trattenendo un sottile strato di molecole o di ioni. L'interazione chimico-fisica si verifica attraverso

forze di Van der Waals o legami chimici intramolecolari [54]. Più semplicemente si può definire come l'attrazione superficiale tra materiale e molecole

- assorbimento: fenomeno fisico in cui i depositi si legano e penetrano nella matrice del materiale; dipende dalla porosità del materiale (poco o molto poroso, pori grandi o piccoli) e dalle caratteristiche delle molecole (la loro grandezza e la loro flessibilità) [38]. I depositi si trovano all'interno del materiale.

I depositi sulle lenti rappresentano una tipologia di evento di conversione interfacciale biologico e alcuni caratteri sono molto simili ad eventi quali la formazione della placca dentale e la coagulazione del sangue. Ci sono diversi tipi di depositi e diverse sono le categorizzazioni e secondo Franklin (2001) le categorie più comuni sono: pellicola superficiale, discrete macchie di depositi, placche, particolati, decolorazioni e misti [37].

- Pellicola superficiale: i depositi sono normalmente riconosciuti utilizzando la lampada a fessura quando la lente è posizionata sull'occhio. Sono biancastri-grigi e la lente perde la sua trasparenza; ci sono quattro sottocategorie, ovvero proteine, lipidi, batteri, minerali e misti [38]. La performance viene affetta avversamente dall'abnormale modificazione o dalla denaturazione del film [12]. La formazione della pellicola è influenzata dalle caratteristiche del materiale perché da essa dipende la specifica interazione sia con le proteine che con i lipidi durante l'utilizzo delle lenti
- Discrete macchie di depositi: macchie di origine organica di colore bianco che si osservano soprattutto sulle lenti idrogel. Sono visibili con la lampada a fessura e con un ingrandimento di 10x. Sono composte da tre strati: lo strato basale costituito da calcio e acidi grassi non saturi, il secondo più cospicuo e con forma a cupola, composto da colesterolo, esteri di colesterolo e mucine e il terzo da proteine
- Placche: sono costituite da più strati, quello più interno di acidi grassi non saturi, quello centrale di mucine e quello esterno di proteine. La forma può essere regolare o irregolare, il colore è bianco e possono essere granulose
- Particolati: solitamente sono macchie di "ruggine", sono marroni-arancioni, le particelle di ferro sono aerotrasportate oppure sono dovute al contatto con le mani
- Decolorazioni: dovute principalmente ai sistemi di manutenzione [38], ma sono poco comuni nella pratica moderna.

2.2.2 I depositi e le lenti idrogel

La formazione di depositi sulle lenti idrogel dipende da più fattori: in particolare dal materiale e dal film lacrimale, ma incidono anche la qualità e la quantità dell'ammiccamento e il microclima. A causa delle complessità del film lacrimale, la formazione dei depositi è inevitabile: essa avviene un minuto dopo l'applicazione. Dallo studio di Flower e Allansmith (1980), risulta che dopo 30 minuti il 50% della superficie della lente a contatto è coperto da depositi sparsi e 8 ore dopo il 90% della superficie presenta un *coating* molto più complesso e difficile da eliminare con i prodotti per la manutenzione, tanto che i depositi permangono dopo una pulizia professionale [8].

Utilizzate *open time*, le lenti del Gruppo I, II e III riportano una quantità di depositi che mediamente è inferiore ai $100\mu\text{g}/\text{lens}$, mentre quelle del Gruppo IV riportano numeri dai 400 ai $2000\mu\text{g}/\text{lens}$ *open time* [29]. Nello studio di Myers (1991), è stata studiata la quantità di depositi per lenti idrogel dei Gruppi I e IV indossate da 74 portatori *heavy* per 80 giorni (DS=32): per il Gruppo I la quantità è di $45\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $1016\mu\text{g}/\text{cm}^2$ per il Gruppo IV [34]. Le lenti del Gruppo IV attraggono di più i depositi a causa della loro alta porosità in combinazione con la forza di Coulomb che si sviluppa tra il polimero e le proteine [52].

I depositi causano alterazione strutturale del polimero e aumentano la possibilità di complicanze oculari [37]. Fortunatamente, le lenti che presentano depositi cospicui sono riconoscibili sia dai segni che dai sintomi dei portatori [38]. I depositi nella o sulla lente riducono la trasmissione dell'ossigeno, possono influenzare il movimento e il centraggio della lente e possono essere la causa di occhio rosso, irritazione meccanica e risposta infiammatoria [38]. I depositi sulle lenti a contatto causano:

- discomfort [25]
- intolleranza della lente [25]
- riduzione tempo di utilizzo delle lac
- *drop out*
- ridotta trasmissione dell'ossigeno [38]
- aumento della probabilità di ipossia [38]
- diminuzione acuità visiva, soprattutto a bassi contrasti (Gellatly et al. 1988)
- irritazione meccanica [38]
- aumento della probabilità che si verifichino infiammazioni

- risposta infiammatoria [38]
- risposte immunitarie
- iperemia congiuntivale [25]
- adesione batterica [25]
- distruzione del film lacrimale [25]
- complicanze oculari [37]
- alterazione del polimero [37]
- modificazione del fitting (centraggio e movimento) [38]
- *staining* [25] [30]
- diminuzione della vita della lente [25].

L'industria cerca di sviluppare materiali resistenti ai depositi e si raccomandano lenti a ricambio frequente [34]. Ilahn (1998) ha dimostrato che rispetto alle lenti a uso prolungato, le lenti a ricambio frequente presentano una minor quantità di depositi, ma questi non possono essere totalmente evitati [17]. Anche Lupelli (2001) riporta una drastica riduzione di depositi proteici sulle lenti a ricambio frequente a uso giornaliero rispetto a quelle a uso prolungato sempre a uso giornaliero [31].

2.3 Depositi proteici e lenti idrogel

L'interazione delle proteine con le superfici ha importante implicazione in tutte quelle situazioni in cui materiali artificiali interagiscono coi i fluidi del corpo [47]. I depositi proteici sulle lenti idrogel sono dovuti soprattutto alla tipologia del materiale, ma anche alla concentrazione, alla struttura e alla carica delle proteine contenute nel film lacrimale. Numerosi sono i fattori coinvolti nell'interazione tra la lente a contatto e i depositi proteici, quali:

- la composizione del materiale
- il contenuto d'acqua del materiale (Franklin et al. 2001)
- la presenza e la dimensione dei pori
- la rugosità della superficie
- l'idrofobicità del materiale
- la carica del materiale (Franklin et al. 2001)
- il pH del film lacrimale

- la ionicità del film lacrimale
- la quantità delle proteine del film lacrimale
- la grandezza delle proteine del film lacrimale
- la carica delle proteine del film lacrimale
- il tempo di utilizzo della lente [28].

Le cause sono così numerose e varie che non c'è alcuna aspettativa di trovare depositi uguali nell'occhio destro e sinistro dello stesso portatore, ma solo di poter riscontrare quantità di depositi *light* o *heavy* [47]. Tomlinson e Caroline nel 1990 classificarono i portatori in coloro che tendono a produrre “tanti” depositi o “pochi” definendoli *heavy* o *light* [49]. La concentrazione di depositi proteici dipende anche dalla tecnica con cui è stata realizzata la lente: dallo studio di Castillo emerge che le lenti EGDMA-*crosslinked* presentano 1.5-2 volte in più albumina e lisozima rispetto alle lenti costruite con la tecnica del tornio o con lo *spin casting* [29].

Al pHEMA vengono aggiunti monomeri o polimeri per renderlo più efficiente, ma questi vanno a influire sull'interazione con i depositi, in particolare modo con le proteine. MA, MMA e NVP sono i più utilizzati nella costruzione delle lenti idrogel:

- MA: ha carica altamente negativa e attrae proteine con carica positiva come il lisozima
- MMA: studi sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che l'MMA aumenta la presenza di lisozima e diminuisce quella dell'albumina, che ha carica negativa [29]
- NVP: riduce l'attecchimento di proteine positive come il lisozima, ma favorisce quello delle proteine negative come l'albumina [29]. Aumenta l'assorbimento di lipidi [44].

Il film proteico è adsorbito o assorbito dalla lente; l'adsorbimento e l'assorbimento sono processi a senso unico e gli effetti peggiorano col passare del tempo. L'assorbimento dipende sia dalla grandezza delle proteine sia dalla grandezza dei pori della matrice; quando le proteine sono assorbite nella matrice della lente c'è meno spazio per l'acqua e più numerose sono le proteine, meno percentuale d'acqua può essere trattenuta dalla lente [38]. Non è ancora nota l'interazione indotta dai depositi assorbiti dalla lente. L'adsorbimento proteico non è un fenomeno che richiede giorni o settimane, esso inizia appena viene applicata la lente [38].

I depositi proteici non sempre vanno considerati in maniera negativa, infatti per un periodo di tempo che va dai 6 ai 7 giorni non si manifesta

l'inattivazione proteica e i depositi non rappresentano un elemento tossico-allergico, ma rendono la lente più biocompatibile. Potremmo affermare che ci sono proteine "buone" se rimangono legate al polimero mantenendo la loro configurazione naturale e la loro attività batteriolitica o batteriostatica rimane inalterata, mentre possono essere ritenute "cattive" quando, denaturandosi, alterano la loro composizione chimica e sono batteriologicamente inattive causando una risposta immunitaria [31].

2.3.1 Caratteristiche dei depositi proteici sulle lenti idrogel

Franklin (1992) diede una descrizione dei depositi proteici che possono essere: discreti, elevati, velati, *coating* sottili, semi opachi, bianchi e stratificati superficialmente; la copertura varia in estensione e range da piccole macchie al rivestimento completo [37]. Al passare del tempo aumenta la loro crescita, tanto da ridurre progressivamente la vista e aumentare la rugosità della superficie.

Lo strato di depositi proteici è costituito principalmente da lisozima, albumina e lattoferrina [38]. Le proteine più abbondanti nel film lacrimale, come il lisozima o la lattoferrina, si depositano sul pHEMA con la stessa quantità o addirittura con una quantità minore rispetto a proteine meno presenti nel film lacrimale quali l'albumina o l'IgG [25].

Nella maggior parte degli studi, i depositi sono stati analizzati *in vitro* utilizzando lacrime artificiali o soluzioni proteiche standardizzate, ma *in vivo* si possono ottenere risultati diversi perché entrano in gioco altri parametri, come l'azione delle palpebre, la disidratazione della lente, il pH, la concentrazione ionica. Numerose prove indicano che la formazione dei depositi è dovuta più allo spessore e alla disidratazione del film lacrimale che alla concentrazione delle proteine. Il ciclo di idratazione e disidratazione non è preso in considerazione *in vitro*. La disidratazione è dovuta alla semplice evaporazione e non è riproducibile *in vitro*, così come la forza delle palpebre che può incrementare il processo di denaturazione e aggravare la risposta immunologica.

L'identificazione delle proteine che si depositano nel tempo può dare informazioni riguardo al processo di *coating* e la formazione degli antigeni. Nello studio di Leahy, le proteine presenti sulle lenti idrogel sono state divise in sei gruppi in base al peso molecolare:

- gruppo 1: lisozima con un peso molecolare di 15K
- gruppo 2: PMFA (proteine migranti più velocemente dell'albumina), probabilmente sei diversi tipi di proteine con peso da 15K a 20K
- gruppo 3: costituito da proteine G con peso da 31K a 55K
- gruppo 4: albumina con peso da 62K a 68K

- gruppo 5: costituito dalla lattosio con peso da 75K a 82K
- gruppo 6: costituito da quelle proteine che sono più pesanti dell'albumina, come le IgG e le sIgA.

Le proteine predominanti sono il lisozima, le proteine G e le PMFA. Ci sono differenze nelle due superfici della lente in quanto in quella posteriore la quantità di depositi è minima. Sempre nello studio di Leahy, ai soggetti è stato chiesto di indossare le lenti per 4 periodi di tempo: 1 minuto, 15 minuti, 1 ora e 8 ore. Dopo 1 minuto sul materiale sono state trovate proteine e l'incremento dei depositi è aumentato sia dopo 15 che dopo 60 minuti. I depositi si presentano dopo un minuto dall'applicazione, sia in chi utilizza lenti usa e getta sia in chi presenta problemi legati all'accumulo di proteine e maggiore è il tempo di utilizzo delle lenti, maggiore sarà la quantità di proteine depositate. L'aumento maggiore si riscontra per il Gruppo IV di lenti idrogel e l'incremento più importante nel tempo si è verificato per il lisozima e per le PMFA fino a un'ora di utilizzo. E' possibile rilevare la presenza di tutti i sei gruppi proteici dopo un minuto e con un diverso grado di adsorbimento nel tempo [25]. Subito dopo l'applicazione, la lente a contatto viene coperta da uno strato di proteine che aderiscono in modo così saldo con il biomateriale che poco meno del 50% viene rimosso con la pulizia. Alcune proteine attecchite aumentano il rischio di adesione batterica alla lente e il rischio di complicanze infiammatorie come la congiuntivite papillare gigante [29].

2.3.2 Lenti idrogel e depositi proteici

E' importante considerare i diversi fattori che influenzano lo studio sui depositi proteici: per quanto tempo è stata indossata la lente, la manutenzione, il metodo di estrazione e di quantificazione, le differenze da portatore a portatore e infine dobbiamo tener conto del fatto che le analisi *in vitro* non sono come quelle *in vivo* [29].

Generalmente sulle lenti in pHEMA (*open time*) troviamo una quantità di depositi proteici con un range che va da 4 a 75 μ g/lens ed esami *in vitro* hanno riportato circa una quantità di lisozima di 16-23 μ g e di albumina di 4.5-41 μ g. Il *coating* di una lente indossata per circa due ore è di 10-300 ng/cm² [29]. Heiler et al. nel 1991 scoprirono che la distribuzione delle proteine sulle lenti idrogel dipende dalla classificazione dell'FDA in quanto le lenti ioniche (III e IV Gruppo dell'FDA) presentano più depositi proteici nella periferia, mentre quelle non ioniche presentano una copertura uniforme [16]; inoltre le lenti ioniche presentano un'alta percentuale di proteine assorbite rispetto alle lenti non ioniche [20]. La natura ionica del materiale influisce sul tipo di proteine che si legano sulla superficie, in particolare la carica anionica del materiale promuove la rapida penetrazione delle proteine

nella matrice e una maggiore concentrazione delle proteine adsorbite rispetto ai materiali non ionici [20].

Il Gruppo II mostra affinità per le proteine più che i Gruppi I e III, ma significativamente meno del Gruppo IV [10]: i Gruppi II e IV sono i più reattivi ai depositi per la polarità delle loro superfici e per la porosità dei materiali. I polimeri *Vifilicon* (IV), *Atlafilicon* (II) e *Tefilicon* (I) trattengono rispettivamente 4, 0.5 e 0.4 μ g di proteine in circa 30 giorni [52].

Sono state studiate le lenti del Gruppo II e IV in 20 soggetti, le lenti sono state rimpiazzate dopo un mese, per tre mesi consecutivi. Alla fine di ogni mese le lenti venivano raccolte per le analisi sia delle proteine che dei lipidi. Ci sono differenze significative nei profili dei depositi dei due materiali: il Gruppo II presentava il doppio dei lipidi rispetto al IV e il IV ben 17 volte di più il numero di proteine [18]. I depositi proteici sono dovuti principalmente alla carica ionica, mentre quelli lipidici al contenuto di NVP [12].

L'albumina e la lattoferrina costituiscono la maggior parte delle proteine ritrovate nel Gruppo II [20], mentre nel IV ritroviamo quasi esclusivamente il lisozima seguito dall'IgA [47].

2.3.3 Lisozima e lenti idrogel

Il lisozima costituisce circa il 30% delle proteine totali del film lacrimale a occhio aperto ed è la proteina che si riscontra maggiormente depositata sulle lenti idrogel [51]. Più aumenta la carica negativa della lente, più il lisozima viene attratto a causa della sua carica positiva. Nelle lenti idrogel, al pHEMA vengono aggiunti MA e MMA carichi negativamente che aumentano il depositarsi del lisozima [28].

Per determinare la curva del deposito del lisozima sono state utilizzate lenti del Gruppo IV in quanto, avendo carica negativa, attraggono depositi con carica positiva come appunto il lisozima (circa 1000 μ g per lente) [46]. Le lenti sono state indossate per 15 minuti, 2, 4, 6 e 8 ore e per 1, 2 e 11 giorni consecutivi. Il lisozima si accumula in modo rapido, dopo 15 minuti è stata stimata la presenza di 55 μ /lente e raggiunge il picco il quinto/sesto giorno, circa 1300 μ /lente. I pazienti dello studio hanno riportato un *plateau* tra i 1200 e i 1400 μ /lente. L'utilizzo dai 6 ai 12 mesi ha riportato variazioni minime rispetto al quinto giorno: il *plateau* quindi si raggiunge dopo circa una settimana e rimane stabile [23].

L'attività biologica del lisozima si modifica parzialmente con l'adsorbimento da parte del materiale [46]; sia studi *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che la percentuale di lisozima attivo è più del doppio nei materiali ionici che nei non ionici [29].

2.3.4 Albumina e lenti idrogel

L'adsorbimento dell'albumina avviene in tre fasi: viene trasportata dal film attraverso la lente, attecchisce sul materiale e modifica la sua conformazione. E' particolarmente presente nelle lenti a basso contenuto d'acqua, ma alcuni studiosi ritengono che il suo adsorbimento non dipenda dal contenuto d'acqua, ma dalla composizione del materiale. I depositi di albumina sono più copiosi sui materiali con carica positiva o neutra; si deposita sulle lenti che hanno un alto contenuto di EGDMA, HEMA e PMMA, ma diminuisce con la presenza di MAA e NVP. Infine se la lente presenta pori di grandi dimensioni, l'adsorbimento dell'albumina è più facile e veloce [28].

2.3.5 Effetti delle idrogel sulle proteine e sui mediatori della risposta infiammatoria

Sono stati condotti diversi studi sulla modificazione delle proteine e dei mediatori della risposta infiammatoria con l'uso di lenti idrogel, sia per le giornaliere che per lenti a uso prolungato. Le lenti idrogel non modificano la concentrazione del lisozima, della lattoferrina e delle lipocaline; le lenti del Gruppo IV assorbono molto lisozima, ma si presume che la quantità di questa proteina venga ripristinata durante il ricambio lacrimale. Non è ben chiaro, invece, se c'è un cambiamento delle immunoglobuline: alcuni studi hanno riportato che c'è una diminuzione delle sIgA nell'EW e nel DW di lenti del Gruppo IV, ma non se il DW è minore di 6 ore. Le lenti a contatto non influenzano il complemento C3, ma riducono la concentrazione dell'IL-8 durante il sonno e aumentano quella di alcuni lipidi infiammatori. [46].

2.3.6 Rimozione dei depositi proteici

La rimozione dei depositi proteici è di tipo enzimatico o non enzimatico. Nel 1990, Begley scoprì che gli enzimi più efficaci sono la papaina, la subtilisina e la pancreatina e che il formarsi di nuovi depositi dipende dall'enzima utilizzato (la pancreatina è da preferire). Altri enzimi utilizzati sono l'amilasi, la lipasi, la pronasi, la proteasi e il sodio edetato, mentre la rimozione non enzimatica avviene per mezzo di proteine come il citrato o l'idranate R o i lipidi come i surfattanti.

I trattamenti enzimatici vengono effettuati con pastiglie enzimatiche una volta alla settimana, ma i portatori che utilizzano il perossido nella manutenzione possono utilizzarle meno frequentemente. Le pastiglie vengono disciolte in soluzione salina o acqua distillata [9]. E' stato dimostrato che gli enzimi non eliminano tutti i depositi e l'aumentare dei depositi sulla lente trattata è molto rapida (Baines et al. 1990 e Lowther 1977). La parziale rimozione delle proteine lascia sulla superficie della lente una matrice alterata che causa un film lacrimale irregolare, discomfort, altera la bagnabilità e promuove la formazione di depositi [37]. Solo 1/3 o 1/2 delle proteine

depositate è rimosso dai sistemi di pulizia e tra le proteine delle lacrime artificiali, il lisozima è stato maggiormente rimosso, mentre la lattoferrina, l'albumina e le immunoglobuline tendono a permanere [21]. Il trattamento enzimatico non riduce significativamente la quantità dei depositi, ma riduce le proteine depositate visibili: per il trattamento enzimatico ci sono differenze significative di $p=0.001$ per i depositi visibili, ma non nella quantità di depositi [34].

Il trattamento enzimatico migliora il comfort e la visione dei pazienti, mentre i 2/3 degli *heavy* depositori non ha riportato differenze soggettive [34].

2.4 Complicazioni legate ai depositi proteici

I depositi nella o sulla lente riducono il comfort e la trasmissione dell'ossigeno con conseguente aumento della probabilità di ipossia [25]; possono influenzare il movimento e il centraggio della lente ed essere la causa di occhio rosso, irritazione meccanica e risposta infiammatoria [38]. I depositi proteici sono causa di alcune anomale reazioni oculari come la cheratocongiuntivite limbare superiore, la congiuntivite papillare e l'iperemia congiuntivale acuta, inoltre possono favorire l'adesione batterica [31]. Anche il test di Schirmer e il BUT sono stati comparati con la produzione di depositi: esiste una correlazione, per esempio coloro che presentano depositi velocemente presentano un BUT basso [14].

2.4.1 Diminuzione del comfort

Nello studio di Gentile (2007) sono stati messi a confronto i livelli di comfort dei portatori tramite l'utilizzo di un questionario compilato giornalmente. Dopo 4 ore dall'utilizzo, il comfort è minore per chi ha utilizzato lenti che hanno accumulato una maggior quantità di depositi, mentre nell'utilizzo dalle 24 ore alle 3 settimane il discomfort è diminuito, probabilmente per due motivi: il segmento anteriore dell'occhio si adatta attraverso la diminuzione sensoriale della cornea e la distribuzione dei depositi col tempo diventa omogenea e regolare riducendo l'attrito [10]. Inoltre dal suo studio, Lever (1995) concluse che non c'è una diretta correlazione tra depositi proteici e discomfort, ma che i depositi non sono i soli o il determinante primario che indica discomfort e intolleranza [27].

2.4.2 Congiuntivite papillare gigante e congiuntivite papillare indotta da lenti a contatto

La congiuntivite papillare indotta da lenti a contatto (CLPC) è una condizione infiammatoria della congiuntiva tarsale superiore comunemente chiamata

in letteratura congiuntivite papillare gigante (GPC), la maggior causa di sospensione delle lac. I segni sono presenza di muco, rossore nel tarso superiore e papille poligonali irregolari distribuite in modo uniforme solo in poche aeree oppure su tutto il tarso, solitamente in corrispondenza del bordo della lente. Il termine GPC implica papille molto larghe che non sempre si presentano con l'utilizzo delle lenti a contatto se la condizione è severa o avanzata. La GPC è associata all'utilizzo di protesi oculari, suture protendenti di nylon, fibbie sclerali, elevati depositi corneali [46] e risposte infiammatorie di tipo allergico che si presentano durante la stagione della febbre da fieno [9]. La GPC è una risposta sia meccanica che immune alle proteine denaturate che si trovano sulla superficie delle lenti a contatto. Le proteine rendono rugosa la superficie che meccanicamente irrita la congiuntiva palpebrale superiore e, allo stesso tempo, si sviluppa una risposta ipersensibile perché queste proteine, denaturandosi, diventano "corpi estranei" per il sistema immunitario e vengono prodotti anticorpi [2] [50] con conseguente ingrandimento delle papille (risposta immune da parte delle IgE [37]). La quantità e la natura dei depositi proteici atti a innescare una risposta antigenica non sono ancora stati determinati [25].

La congiuntivite CLPC fu riportata per la prima volta da Spring nel 1974 che la descrisse come una reazione allergica della palpebra superiore dovuta all'uso di lenti morbide. Essa si presenta sia con l'utilizzo di lenti rigide che morbide [46], più precisamente con una frequenza dell'85% con lenti morbide e il 15% con lenti rigide [37]. Può presentarsi anche dopo anni da un'applicazione eseguita con successo.

La CLPC provoca un acuto discomfort oculare e intolleranza alla lente, tanto da causare *drop out*; comporta prurito, emissioni mucose o viscosse, eccessivi movimento della lente, aumento di depositi, visione offuscata, sensazione di corpo estraneo e rossore. Per chi porta le lenti in modo discontinuo, i sintomi spariscono dopo pochi giorni dalla rimozione della lente, tuttavia i segni possono rimanere più a lungo, come le papille. Può succedere che con il riutilizzo delle lenti la CLPC si manifesti nuovamente e, per evitare ricadute, è meglio ridurre le ore di utilizzo oppure cambiare le lenti più frequentemente. L'incidenza della CLPC è maggiore nei portatori di lenti morbide rispetto ai portatori di quelle rigide ed è maggiore negli EW anziché nei DW [46]. Inoltre l'incidenza aumenta nei portatori di lenti a basso contenuto d'acqua e lenti ad alto contenuto d'acqua disinfettate con il calore [9]. La CLPC può essere unilaterale o bilaterale e all'inizio il portatore può essere asintomatico [46]. Nel 1977, Allansmith categorizzò la CLPC in quattro stadi:

1. preclinico: minimi sintomi, ma non segni oculari
2. clinico: sintomi blandi, lieve iperemia e prime papille

3. moderato: sintomi moderati o severi, *coating* moderato o severo sulla superficie della lente
4. severo: papille grandi e intolleranza alla lente [46].

2.4.3 Batteri e depositi

I batteri che aderiscono ai depositi proteici sono principalmente la *Pseudomonas aeruginosa* e lo *Stafilococco aureo*. La *Pseudomonas aeruginosa* è un bastoncello Gram-negativo rettilineo o ricurvo, con crescita ottimale a 37°, ancora possibile a 42°. Aerobio, mobile con un flagello polare, produce molti fattori che possono contribuire alla sua virulenza (endotossine, esotossina A, esoenzima S1,2). Può causare cheratiti e ulcere corneali batteriche. Lo *Stafilococco aureo* è un organismo Gram-positivo, sferico, non mobile, aerobio, facoltativamente anaerobio. Forma numerose esotossine, leucocidine ed enterotossine. A contatto con l'occhio può causare cheratite, congiuntivite e ulcera corneale batterica.

Le lenti a contatto possono esser contaminate dall'atmosfera, dalle mani del portatore o dell'applicatore (*Stafilococco*), dai prodotti usati nella manutenzione, dal portamenti (*Pseudomonas aeruginosa*), dalle componenti del film lacrimale o dai bordi palpebrali (*Stafilococco aureo*) [37]. I batteri solitamente non aderiscono sul materiale, ma sui depositi. La letteratura presenta numerosi studi riguardo al rapporto depositi-batteri [37] e non tutti concordano su questa relazione; alcuni hanno dimostrato che c'è una relazione tra l'adesione e l'aumentata rugosità (Brutus 1990), altri la smentiscono (Bruinsma 2001) [46]. Le infiammazioni e le infezioni sono più probabili nei portatori che utilizzano lenti dove si riconoscono copiosi depositi proteici perché questi facilitano l'aderenza di microrganismi e l'insorgenza di cheratiti infettive. I microrganismi che si legano alle lenti a contatto non derivano dalla parte anteriore del bulbo oculare, ma dalle dita, da un cattivo regime di manutenzione e dai margini palpebrali [37]. Nelle lenti idrogel, i batteri molto idrofili aderiscono 10 volte di più di quelli poco idrofili ($p < 0.005$) [42]; l'adesione riporta numeri bassi, infatti solo il 38% delle lenti idrogel evidenziavano tracce batteriche [13]. Forme batteriche sono state ritrovate nelle lenti di depository *heavy*. Statisticamente significativi sono i risultati che stimano un maggior attecchimento batterico per le lenti EW dipendente dall'età della lente stessa ($p = 0.028$) e con la presenza di depositi ($p = 0.093$). L'EW sia per le idrogel che le silicone idrogel presenta cheratiti microbiche in 10-20 ogni 100000 portatori e il rischio di infezioni è maggiore per il genere maschile, per i fumatori, per coloro che fanno un utilizzo notturno e per che hanno una scarsa igiene.

L'albumina aumenta l'adesione della *Pseudomonas aeruginosa* e le lacrime artificiali permettono l'adesione di alcuni ceppi di *Serratia*. L'adesione dello *Stafilococco aureo* aumenta con la presenza di lisozima [46], ma que-

st'ultimo non altera la produzione delle tossine α e β , ma inibisce l'attività elastasi [48]. Il lisozima lega lo *Stafilococco aureo* [48] e non la *Pseudomonas aeruginosa* [46]. La *Pseudomonas aeruginosa* aderisce sulle lenti EW in proporzione diretta alla quantità di depositi determinata con la scala di Rudko ($p < 0.05$). I depositi sono i maggiori determinanti dell'attaccamento della *Pseudomonas* e gli enzimi utilizzati nella pulizia non riducono significativamente l'adesione del batterio [42]. L'infezione da *Acanthamoeba* con le lenti idrogel è una complicanza rara. L'attecchimento dell'*Acanthamoeba* avviene anche nelle lenti non ancora utilizzate e dipende dalle caratteristiche del materiale, in particolare le lenti ioniche e ad alto contenuto d'acqua che attaccano sia il trofozoo che le cisti, ma l'assorbimento del trofozoo è maggiore rispetto alle cisti [43].

2.4.4 Soluzione dei problemi legati ai depositi proteici sulle lenti idrogel

Il deposito di sostanze costituenti il film lacrimale sulle lenti a contatto è una condizione clinica che induce riduzione del comfort, diminuzione della qualità della visione, incremento della risposta infiammatoria e dell'adesione batterica. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno avuto come oggetto l'adesione dei depositi proteici sulle lenti, ma esso rimane un problema parzialmente risolto in quanto può portare a intolleranza e *drop out* [10]. Non è possibile nella pratica prevedere i livelli dei depositi proteici perché il fenomeno varia da un soggetto all'altro per le caratteristiche intrinseche del film lacrimale, per i materiali scelti, per il metodo di manutenzione e per il rispetto da parte del portatore delle indicazioni fornite per la manutenzione.

La riduzione del tempo di utilizzo delle lenti a contatto morbide ha permesso di risolvere problematiche dovute principalmente all'accumulo di depositi sulla superficie [31]. Tipi di lenti:

- monouso: solitamente durata di 1 giorno con uso giornaliero
- ricambio frequente: durata da 1 settimana a 3-4 mesi, uso giornaliero
- ricambio prolungato: dai 6 ai 12 mesi di uso giornaliero [31].

Con l'avvento delle lenti monouso e di quelle a ricambio frequente, le ore di utilizzo sono più controllate e diminuiscono i problemi, soprattutto per i depositori *heavy*. Studi clinici hanno dimostrato che l'incidenza della congiuntivite papillare diminuisce se vengono usate lenti a ricambio frequente [31]. Per diminuire il rischio di complicazioni oculari, è importante scegliere il materiale più adeguato alla fisiologia dell'occhio del portatore: ai depositori *light* sono consigliabili lenti a basso contenuto d'acqua HEMA o lenti non-HEMA, mentre per gli *heavy* solo HEMA, non ioniche e ad alto contenuto d'acqua [16].

2.5 Analogie e differenze con le lenti silicone idrogel

Le silicone idrogel sono la combinazione tra idrogel e gomma siliconica: il silicone ha grande permeabilità all'ossigeno, mentre l'idrogel è flessibile, bagnabile, consente il trasporto dei fluidi e aiuta il movimento della lente. Le silicone idrogel offrono un'eccezionale trasmissione dell'ossigeno e una durata superiore della lente, ma presentano delle problematiche quali la diminuzione della bagnabilità, l'aumento dell'interazione lipidica e un maggior rischio che si formi un legame tra occhio e lente perché il film lacrimale non attraversa il materiale. Le silicone idrogel differiscono dalle idrogel per la loro maggiore permeabilità all'ossigeno, dovuta alla presenza di una significativa presenza di gruppi silossani: questi gruppi contengono l'elemento del silicone che è connesso direttamente sia ad atomi di ossigeno che di carbonio. I termini silossani e silicone si riferiscono a miscele di silicone organico, mentre la silice e i silicati sono materiali inorganici che contengono ossigeno, ma non carbonio organico. Le lenti in silicone aumentano la permeabilità all'ossigeno, sebbene contengano poca acqua: al contrario delle idrogel, le silicone idrogel meno acqua trattengono, più ossigeno trasmettono. Le silicone idrogel appaiono nel mercato a partire dal 1998-1999, prima ad uso esteso, poi ad uso notturno e diurno [37].

2.5.1 Depositi sulle silicone idrogel

Il livello di depositi proteici che si trova normalmente sulle silicone idrogel è minimo ($<34\mu\text{g}/\text{lens}$ mentre per le idrogel è almeno di $100\mu\text{g}/\text{lens}$ [29]) e i depositi sono più comuni dopo i 30 giorni di utilizzo, indipendentemente dall'uso continuo o giornaliero [6]. Alcuni portatori sono predisposti a sviluppare alti livelli più rapidamente.

La superficie della lente, essendo idrofobica, comporta maggiori depositi di muco e di lipidi (soprattutto di colesterolo, circa il 70-80% dei lipidi assorbiti [15]) e livelli più bassi di depositi proteici rispetto alle idrogel: i materiali in silicone idrogel hanno scarsa affinità alle proteine e tra le lenti portate per 4 ore, 24 ore e 3 settimane, la quantità proteica non cambia molto.

Al contrario delle lenti idrogel, l'assorbimento delle proteine dipende non dal materiale, ma dalla tipologia di lente:

- *Balafilicon A*: il processo gas-plasma trasforma l'idrofobo silossano sulla superficie in silicato idrofilico, ma questa trasformazione della superficie non rappresenta una barriera per il lisozima e l'albumina. Il *balafilicon A* è l'unico materiale silicone idrogel considerato ionico a causa della presenza di N-vinil acido amminobutirrico e attrae più proteine rispetto agli altri silicone idrogel, circa 3 volte di più

- *Lotrafilicon A* e *B*: la trasformazione permanente avviene attraverso il processo gas-plasma con l'aggiunta di trimetilsilano, ossigeno e metano per formare un rivestimento idrofobo di 25nm sulla superficie; esso minimizza l'assorbimento di lisozima e albumina. Il *lotrafilicon B*, che ha un maggior contenuto d'acqua, permette un leggero aumento dell'accumulo di proteine rispetto al *lotrafilicon A*
- *Galyfilicon A* e *senofilicon A*: presentano all'interno grosse molecole di PVP per aumentare la bagnabilità superficiale; assorbono il lisozima dopo circa 24 ore. Il *galyfilicon A* attrae più proteine [29].

Materiale	Lisozima	Lattoferrina	Albumina	Attività del lisozima
<i>Balafilicon A</i>	10-50 μ g	6-7 μ g	<2 μ g	50%
<i>Lotrafilicon A</i>	2-4 μ g	1-2 μ g	-	<25%
<i>Lotrafilicon B</i>	4-10 μ g	2-3 μ g	-	<25%
<i>Galyfilicon A</i>	8-17 μ g	3-5 μ g	-	42-60%
<i>Senofilicon A</i>	6-13 μ g	3-5 μ g	-	28-52%

Tabella 2.1: Quantità di proteine ritrovate su alcuni materiali in silicone idrogel esaminati *in vitro* [29].

Il livello di lisozima attivo è molto variabile tra i vari materiali [45]. Il lisozima presente sulle lenti in *etafilicon* è significativamente maggiore a quello sulle silicone idrogel: 985 μ g vs 10 μ g per le *balafilicon* e 3 μ g per le *lotrafilicon*, ma la percentuale della sua denaturazione è maggiore sulle silicone idrogel: 50% *balafilicon*, 80% *lotrafilicon*, mentre 22% per le *etafilicon*. La concentrazione di depositi lipidici è maggiore sulle *balafilicon* (600 μ g) che sulle *etafilicon* (20 μ g) [19].

La competizione tra lisozima e lattoferrina dipende dal materiale: il co-adsorbimento di lattoferrina e lisozima non intacca l'attività del lisozima legato alla superficie, ma può ridurre l'attività del lisozima rilasciato. E' stato dimostrato che il co-adsorbimento di lattoferrina e lisozima diminuisce l'attività del lisozima sulle *senofilicon A* e sulle *lotrafilicon B*, mentre non ha alcun effetto sulle *balafilicon A* [11]. E' stato inoltre dimostrato che il contenuto di proteine sulle silicone idrogel dipende dal sistema di manutenzione: le lenti disinfettate con il Poliquad presentano più proteine rispetto a quelle disinfettate con il poliesanide [36].

Analizzate con il SEM, le lenti *balafilicon A* e *galyfilicon A* presentano un'elevata quantità di lisozima e albumina rispetto alle *lotrafilicon A* e *B* e con l'AFM si è scoperto che sulle *balafilicon A* e sulle *lotrafilicon A* il lisozima si è depositato aggregato in aree discrete, mentre sulle *galyfilicon A* è sia aggregato che a stringhe [47].

2.5. ANALOGIE E DIFFERENZE CON LE LENTI SILICONE IDROGEL 29

Sebbene le lenti in silicone idrogel presentino una minor quantità di depositi proteici, la percentuale di proteine denaturate è più alta rispetto alle lenti in pHEMA [29]. La lattoferrina e i lipidi contribuiscono alla denaturazione del lisozima depositato sulle silicone idrogel, ma non sulle idrogel [35].

Si riscontrano alti livelli di depositi sulla superficie frontale rispetto a quella interna [6].

La CLCP è più frequente nelle silicone idrogel che nelle idrogel e lo spettro di batteri isolati dalle lenti a contatto morbide è lo stesso sia per le idrogel che per le silicone idrogel sebbene quest'ultime aumentino il rischio di cheartiti da *Acanthamoeba*.

Recentemente si è scoperto che l'aggiunta di poliesteri o acido ialuronico diminuisce l'attecchimento dei depositi [29].

Capitolo 3

Valutazione dei depositi proteici sulle lenti idrogel

3.1 Tecniche di valutazione dei depositi proteici soggettive

Le scale cliniche soggettive sono un metodo veloce e non distruttivo di valutare visibilmente i depositi. Rudko e Proby nel 1974 descrissero una scala visiva per le lenti idrogel utilizzando la lampada a fessura e i suoi ingrandimenti, sia per lenti bagnate che asciutte [29]. Con gli ingrandimenti è possibile rilevare discreti depositi come i *white spots*, mentre strati sottili come quelli proteici sono visibili a occhio nudo. La miglior tecnica è quella dell'illuminazione a campo scuro: con la lampada a fessura si può ottenere un ingrandimento notevole utilizzando un raggio obliquo e selezionando uno sfondo scuro [9].

La scala di Rudko è usata in modo esteso dagli applicatori. Il sistema di Rudko è un sistema soggettivo che manca di ripetibilità e necessita di una tecnica più oggettiva: c'è bisogno di una tecnica ripetibile, quantificabile e oggettiva [37]. Nonostante le modificazioni che sono state apportate alla scala di Rudko, è stato dimostrato che non c'è corrispondenza tra la scala visiva e la reale presenza proteica effettuata con tecniche quantitative; è difficile differenziare a occhio nudo la tipologia dei depositi [29] e i depositi visibili sono marginalmente predittivi del livello di proteine adsorbito dalla lente [40]. Nella pratica contattologica non è possibile controllare in modo oggettivo il livello dei depositi, quindi una valutazione visiva non è da sottovalutare. Rudko e Proby descrissero quattro tipologie di depositi (vedi tabella 3.1).

Hathaway & Lowther nel 1978 modificarono la scala di Rudko (scala RM) introducendo la tipologia dei depositi e la loro estensione. La scala più utilizzata dagli applicatori è questa in quanto fornisce un quadro più completo (vedi tabella 3.2).

Tipo	Caratteristiche
Tipo I	Non ci sono depositi visibili con ingrandimento di 15x
Tipo II	Depositati visibili su lente bagnata con ingrandimento 15x
Tipo III	Depositati visibili su lente asciutta senza ingrandimento
Tipo IV	Depositati visibili su lente bagnata senza ingrandimento

Tabella 3.1: Scala di Rudko e Proby (1974)

Hathaway & Lowther hanno analizzato e identificato principalmente due tipi di depositi:

- il primo si forma dopo due settimane ed è piccolo, bianco con *spot* discreti e caratteri cristallini; può penetrare la lente ed è costituito da carbonati di calcio, cloruro di sodio e lievi tracce di proteine e mucopolisaccaridi
- il secondo si forma dopo un mese circa (dipende dal portatore), è diffuso, uniforme e granuloso. E' composto principalmente da proteine e mucopolisaccaridi [14].

3.2 Tecniche di valutazione dei depositi proteici oggettive

La maggior parte dei test per valutare la quantità e la qualità dei depositi prevede un'estrazione che purtroppo non è completa, soprattutto per le proteine. Paradossalmente, il lisozima è il più suscettibile alla rimozione e qui nasce un problema di quantificazione: se si vuole valutarne la quantità, bisogna farlo appena la lente viene messa nello stoccaggio, perché la lente inizierà a rilasciarlo immediatamente. La quantità delle proteine viene sotto-stimata, soprattutto se un materiale ha poca quantità di depositi: la miglior tecnica è quella di valutare i depositi direttamente sulla matrice. L'analisi viene effettuata quando la lente è completamente idratata, a differenza delle tecniche nel vuoto: in questo modo vengono analizzati i depositi in contatto coi tessuti oculari piuttosto che quelli diffusi nella matrice e il test è meno influenzato da risposte avverse. Inoltre la faccia anteriore e quella posteriore possono essere analizzate separatamente, anche se le superfici devono essere trattate con molta attenzione [46].

Esistono diverse tecniche per analizzare i depositi proteici, sia di tipo qualitativo che quantitativo e possono essere riassunte in tre categorie: valutazione clinica (*clinical assessment*), valutazione biochimica e tecniche d'immagine [29]:

3.2. TECNICHE DI VALUTAZIONE DEI DEPOSITI PROTEICI OGGETTIVE³³

Gruppo	Livello di depositi
I	Pulito
II	Visibili con lente bagnata, luce obliqua con ingrandimento di 7x
III	Visibili con lente asciutta senza luci particolari, a occhio nudo
IV	Visibili con lente asciutta o bagnata a occhio nudo

Gruppo	Tipologia di depositi
C	Cristallini - <i>Crystalline</i>
G	Granulari - <i>Granular</i>
F	Velati - <i>Filmy</i>
P	A placche - <i>Plaque</i>
D	Detriti - <i>Debris</i>
Co	Rivestimento - <i>Coating</i>

Gruppo	Estensione dei depositi
a	0-25% della lente
b	26-50% della lente
c	51-75% della lente
d	76-100% della lente

Tabella 3.2: Classificazione dei depositi Rudko modificata di Hathaway & Lowther (1978)

- Valutazione clinica: effettuata dall'applicatore grazie all'osservazione della lente e al confronto con la scala di Rudko
- Valutazione biochimica: le tecniche biomediche sono eseguite in laboratorio e permettono di raccogliere un'accurata serie di dati, come la quantità e la tipologia dei depositi. L'esaminazione proteica prevede l'estrazione delle proteine dalla lente prima dell'analisi e si focalizza sulla quantità e sull'identificazione delle varie proteine. Per l'estrazione vengono utilizzati composti chimici quali l'urea e il cloridrato di guanidina; l'efficacia della rimozione da parte di questi composti dipende dal tipo di proteine e dal materiale della lente, ma la quantità di proteine raccolta rimane minima, intorno al 25%. Dopo l'estrazione si utilizzano il BCA (acido bicinconinico) che fornisce la quantità di proteine oppure l'SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) o l'HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione) che non solo quantificano, ma identificano le proteine [9]
- Tecniche d'immagine: numerose tecniche vengono utilizzate per esaminare aspetti come la grandezza morfologica; le più comuni sono la microscopia in campo di luce o scuro, la microscopia a contrasto di fase o a interferenza. Per una risoluzione più alta delle immagini si utilizzano il SEM (microscopio elettronico a scansione) oppure il TEM (microscopio elettronico a trasmissione). L'AFM (microscopio a forza atomica) fornisce dettagli al livello del nanometro ed è quindi il microscopio più avanzato: è utile per valutare la rugosità della superficie, la sua interazione col film lacrimale [9] e la tendenza alla disidratazione [10] e ha come vantaggio quello di analizzare le lenti sotto le condizioni fisiologiche, senza che vengano disidratate o distrutte [1]. Il CLSM (microscopio confocale a scansione laser) è una tecnica unica che scannerizza direttamente il materiale della lente permettendo di valutare a quale profondità sono stati assorbiti i depositi. Un'altra tecnica è rappresentata dalla spettroscopia che misura l'energia emessa o assorbita identificando proteine, lipidi o carboidrati in base alla banda assorbita. Esempi di spettroscopia sono: spettroscopia a UV, spettroscopia a fluorescenza (non è sensibile per tutte le componenti organiche, come per i lipidi [46]) ATR (riflettanza totale attenuata), ESCA (spettroscopia elettronica per analisi chimiche), MALDI (desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice), ESR (spettroscopia di risonanza di spin elettronico) e FTIR-ATR (spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata) [9].

I vantaggi dello studiare le immagini *in situ* permette di ritrovare le proteine presenti sui diversi materiali senza bisogno di rimuoverle: i più

utilizzati sono il microscopio a forza atomica e il microscopio elettronico a scansione [47].

3.3 Studio di Recknor (1998) [40]

Recknor nel 1998 ha effettuato uno studio per cercare una correlazione *in vitro* tra la scala di Rudko modificata e la valutazione con l'analisi d'immagine. Sono state analizzate 70 lenti in *Vifilicon* (Gruppo IV) utilizzate per un mese, pulite lievemente e disinfettate con il calore. Utilizzando un microscopio a campo scuro e una scala di RM con gradi di 0.5, un applicatore ha valutato le lenti utilizzando come riferimento una scala fotografica, mentre l'analisi delle immagini è stata effettuata da un ricercatore di laboratorio che ha misurato la media della densità dei pixel in aree circolari. I dati sono stati analizzati sia grezzi sia con l'aggiustamento *for blanks*. Sia i dati grezzi che normalizzati sono statisticamente correlati con la scala di RM, rispettivamente con il coefficiente di correlazione Spearman=0.907 e $p=0.001$ e il coefficiente di correlazione Spearman=0.916 e $p=0.001$. L'analisi della varianza ANOVA ha invece riportato delle differenze per entrambi i data set: c'è un aumento significativo con $p=0.001$ ad ogni livello crescente della scala di RM. Un test di comparazione multipla per i dati non aggiustati ha trovato una significativa differenza tra l'analisi delle immagini e tutti i livelli della scala RM, tranne che per i due più bassi e i due più alti, mentre il test di comparazione multipla per i dati normalizzati ha trovato differenze per tutti i livelli tranne che per i due più bassi.

3.4 Studio di Minno (1991) [33]

Uno dei problemi più comuni associati all'uso di lenti a contatto morbide è la presenza di depositi proteici. Capire l'interazione tra le proteine del film e la lente a contatto è la chiave per minimizzare i problemi correlati ai depositi. Numerosi metodi sono stati utilizzati per studiare l'adsorbimento delle proteine sulle lenti, sia oggettivi che soggettivi. Questo studio vuole provvedere a far capire la composizione dei depositi e la formazione di questo meccanismo. In contrasto alle tecniche sofisticate di laboratorio, molti applicatori si limitano alla determinazione visiva e alla classificazione dei depositi. L'esaminazione visiva della lente può essere effettuata durante uno dei controlli periodici se il paziente presenta problemi legati ai depositi. Durante questa esaminazione, si determina la pellicola e viene classificata secondo le apparenze dei depositi. La tecnica visiva è uno strumento utilizzato per stimare il livello di incrostazione della lente, però non fornisce informazioni quantitative. Purtroppo la letteratura non è sempre sufficiente ad aiutare e assistere l'applicatore. Lo scopo di questo studio è di scoprire la relazione tra i depositi visibili e l'analitica misurazione della quantità delle

proteine sulle lenti. Lenti a contatto morbide idrofiliche sono stati analizzate sia con il metodo visivo di Rudko modificato, sia con test quantitativi delle proteine e i risultati dei due test sono stati confrontati. E' stato inoltre stimato l'effetto dei materiali sui depositi.

3.4.1 Metodi

I 1058 portatori facevano parte del *Bausch & Lomb Personal Products Clinical Lens Analysis Program*; sono state utilizzate lenti approvate dall'FDA; tutti i pazienti hanno utilizzato prodotti per la manutenzione approvati negli USA. La maggior parte dei pazienti ha fatto un uso giornaliero delle lenti. Le lenti sono state disinfettate dagli applicatori prima del trasporto alla *Bausch & Lomb* per evitare che, durante il trasporto, avvenisse contaminazione microbica. Ai pazienti è stato indicato quale tipo di lente avrebbero indossato, per quanto tempo, il modo di utilizzo EW o DW, il modo di pulire e di disinfettare la lente.

Preparazione delle lenti

All'arrivo delle lenti alla *Bausch & Lomb*, le idrogel sono state preparate per l'analisi: sono state rimosse dal portalenti e sfregate e risciacquate con la soluzione *Bausch & Lomb Sensitive Eyes Saline Solution* per rimuovere qualsiasi materiale aderente. Le lenti sono state messe in una soluzione salina nuova per prevenirne la disidratazione prima dell'analisi.

Esame visivo

Le lenti sono state esaminate visivamente osservando difetti e discolorazioni con l'aiuto di una luce posteriore. La discolorazione è stata stimata paragonando le lenti alla *Kodak Standard Color Filters*. I depositi delle lenti sono stati classificati secondo il metodo di Rudko e Proby modificato:

- I: Lente visibilmente pulita. No depositi o film visibili con ingrandimento 7x
- II: Depositivi visibili con ingrandimento 7x
- III: Depositivi visibili solo su lente disidratata con luce normale a occhio nudo; i depositivi non sono visibili su lente bagnata
- IV: Depositivi visibili su lente disidratata o bagnata con luce normale a occhio nudo.

Test con la ninidrina per le proteine

L'adsorbimento è stato quantificato utilizzando il test della ninidrina, un test adatto per le lenti morbide idrofiliche. In questo modo le proteine e i peptidi sono stati idrolizzati nei corrispondenti componenti amminoacidici e quantificati da una procedura colorimetrica basata sulla reazione tra la

ninidrina e gli amminoacidi.

Preparazione dei campioni e delle proteine standard

Dopo l'esaminazione visiva, le lenti sono state analizzate in laboratorio e lenti nuove sono state analizzate come gruppo controllo. Le lenti sono state tagliate in quattro parti così che tutta la superficie rimanesse immersa nella soluzione durante l'idrolisi. I quarti di lente sono stati posizionati in provette di cultura in vetro usa e getta con tappo a vite con 1.0ml di 2.5N di idrossido di sodio. Un composto di proteine standard è stato preparato con il lisozima (grado I dall'uovo di gallina, 3x cristallizzato, dializzato e liofilizzato; è stato fornito dalla *Sigma Chemical Company*). Una dose di lisozima è stata aggiunta e sciolta nel 1.0ml di 2.5N di idrossido di sodio. Le provette ben sigillate sono state poste in un blocco di riscaldamento preriscaldato a 100°C dove sono state idrolizzate per 2 ore, in seguito sono state estratte dal blocco di riscaldamento e lasciate raffreddare in una stanza fredda.

Metodo delle ninidrina

Il reagente alla ninidrina è stato preparato fresco ogni giorno e conservato in bottiglie di vetro scure. La soluzione tampone di citrato-acetato è stata preparata con 0.5M di acido acetico e 0.1M di acido citrico con pH 5 aggiustato con 10N di idrossido di sodio. Il reagente alla ninidrina è stato preparato sciogliendo 20mg di cloruro stannoso e 200mg di ninidrina in 10ml di metilcellosolve (monometiltere del glicol etilenico) e poi sono stati aggiunti 10ml di soluzione tampone. Aliquote di 0.15ml di campioni di soluzione idrolizzata sono state inserite in provette di coltura usa e getta in polistirolo. Alcuni campioni di lenti del Gruppo II, III e IV sono stati diluiti ulteriormente con 2.5N di idrossido di sodio prima delle analisi per garantire che i risultati fossero in linea con il test. Per neutralizzare l'idrossido di sodio, sono stati aggiunti a ogni provetta 0.05ml di acido acetico glaciale e ogni provetta è stata agitata; in seguito sono stati inseriti 40ml di reagente alla ninidrina e il tutto è stato agitato. Le provette in polistirolo sono state chiuse e riscaldate a bagnomaria a 90°C per 20 minuti, tempo che serve al colore per svilupparsi, in seguito sono state trasferite in un bagno di ghiaccio e diluite con 1.0ml di 50% di 2-propanolo acquoso. L'assorbanza di ogni campione è stata misurata a 570nm dal *Bausch & Lomb Spectronic 2000 Spectrophotometer*. La calibrazione standard della curva delle proteine (assorbanza vs concentrazione proteica) è stata preparata con range tra 0.00 e 15µg con quantità standardizzate di lisozima. Le curve standard sono state preparate per ogni analisi. La concentrazione delle proteine è stata determinata comparando l'assorbanza con la curva standard del lisozima e calcolando la concentrazione delle proteine per ogni lente basandosi sui fattori di diluizione appropriati.

Analisi statistica

Per valutare l'esistenza di differenze tra il livello medio di proteine presenti e la scala di RM, sono stati utilizzati i test:

- Analisi della varianza ANOVA
- Pearson
- Spearman
- Coefficiente Gamma.

I dati originali sono stati modificati per l'ANOVA per rispettare l'assunzione di uguaglianza della varianza.

3.4.2 Risultati

Distribuzione delle lenti

Partecipanti: 1058 portatori di lenti a contatto. 2/3 delle lenti erano a basso contenuto d'acqua (Gruppo I e III), mentre la distribuzione di lenti ioniche e non ioniche era uguale. Purtroppo non tutti i tipi di materiali sono stati utilizzati in questo studio (vedi tabella 3.3).

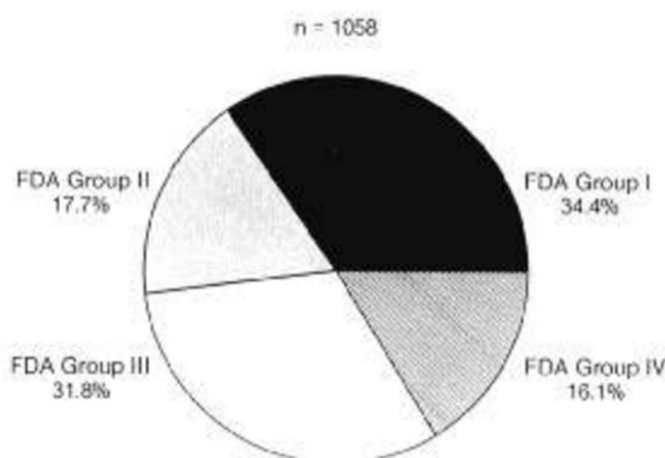


Figura 3.1: Distribuzione delle lenti idrofiliche utilizzate nello studio, classificate secondo l'FDA. *Figura tratta dallo studio di Minno (1991) [33].*

Esaminazione visiva

Il 65% delle lenti è stato classificato di tipo I nella scala RM, quindi è stato classificato come pulito. Solo il 3.4% delle lenti è stato considerato di tipo III e IV (vedi tabella 3.4).

La distribuzione dei depositi secondo RM è stata comparata alla classificazione dell'FDA attraverso l'analisi del χ^2 e, poiché numeri bassi vanno a

Gruppi FDA	%Totale	Materiale	Contento d'acqua (%)
I	34.4	Polymacon	38
		Hefilicon B	45
		Tefilicon	38
		Tetrafilicon A	43
		Crofilicon A	39
II	17.7	Surfilicon A	74
		Lidofilicon A	70
III	31.8	Phemfilicon A	38
		Buflicon A	45
		Etafilicon A	43
IV	16.1	Buflicon A	55
		Perfilicon A	71
		Etafilicon A	58
		Phemfilicon A	55

Tabella 3.3: Distribuzione dei materiali delle lenti

Tipo di depositi secondo RM	Numero di lenti	% del totale
I	688	65.0
II	334	31.6
III	27	2.6
IV	9	0.8
Totale	1058	100.0

Tabella 3.4: Classificazione dei depositi con la scala di RM

violare l'assunzione base del test, le lenti classificate III e IV dal RM sono state considerate insieme (vedi tabella 3.5). I risultati della distribuzione del χ^2 hanno dimostrato che esiste una correlazione tra la classificazione dell'FDA e l'esaminazione visiva: le lenti del Gruppo I sono visibilmente più pulite (73% RM I) mentre quelle del Gruppo IV presentano più depositi (10% RM III e IV).

Gruppi FDA	No. di lenti per Gruppo di FDA	Tipo di depositi secondo RM: No. di lenti (%)			
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
I	364	267 (73.4)	95 (26.1)	2 (0.5)	-
II	187	111 (59.4)	67 (35.8)	9 (4.8)	-
III	337	217 (64.4)	112 (33.2)	3 (0.9)	5 (1.5)
IV	170	93 (54.7)	60 (35.3)	13 (7.6)	4 (2.4)

Tabella 3.5: Distribuzione delle lenti secondo il tipo di depositi RM e la classificazione dell'FDA

Il tempo medio di utilizzo delle lenti è stato di 113 giorni, con un minimo di 5 a un massimo di 1675 (vedi tabella 3.6). Esso è stato simile per i primi tre gruppi dell'FDA, ma non per il Gruppo IV che ha avuto tempo medio 100 giorni (due settimane in meno rispetto agli altri gruppi).

Si è riscontrata la seguente tendenza: più si utilizzano le lenti, più si accumulano depositi, ma le lenti classificate con RM di tipo III e IV non hanno seguito il trend. Questo dato potrebbe essere stato falsato dal relativo basso numero di lenti o dall'uso di lenti a ricambio frequente, comportando un abbassamento artificiale del tempo medio di utilizzo. Non è propriamente corretto parlare di tempo di utilizzo, ma bensì di tempo indicato per l'utilizzo, in quanto non è stato effettivamente controllato per quanto tempo le lenti siano state indossate. I dati sul tempo di utilizzo servono solo come notizie di secondo piano.

Test delle proteine totali con ninidrina

Il test della ninidrina per valutare la quantità di proteine adsorbite è un metodo accettabile per le lenti a contatto idrofiliche. Il test rileva le proteine al livello del μg e reagisce con la maggior parte delle proteine del film lacrimale. E' stata osservata una risposta lineare da 0.00 a $75\mu\text{g}$ di proteine, ma il range migliore con cui lavorare è da 0.00 a $15\mu\text{g}$ in quanto permette di utilizzare i calcoli al limite della legge di Beer: questo test ha buona precisione e riproducibilità. Il test ha riportato delle variazioni da proteina a proteina, in modo simile alle procedure di Lowry e Biuret. Per

Gruppi FDA	Tipo di depositi secondo RM	No. di lenti	Tempo di utilizzo (giorni)	
			Media	Range
I	I	267	92.0	7-810
	II	95	170.6	14-840
	III	2	90	90
Totale Gruppo I		364	112.5	7-840
II	I	111	81.8	11-930
	II	67	152.1	14-584
	III	9	189.4	35-540
Totale Gruppo II		187	112.1	11-930
III	I	217	98.6	5-907
	II	112	157.9	6-900
	III	3	359.7	89-570
	IV	5	148.0	10-420
Totale Gruppo III		337	121.4	5-907
IV	I	93	62.5	7-210
	II	60	111.3	7-420
	III	13	300.8	13-1675
	IV	4	90.3	90-91
Totale Gruppo IV		170	98.6	7-1675
Totale di tutte le lenti		1058	113.0	5-1675

Tabella 3.6: Tipi di depositi vs tempo di utilizzo

minimizzare questa variazione, la proteina selezionata come curva standard deve essere la proteina più presente: in questo studio è stato selezionato il lisozima in quanto è la maggior proteina ritrovata tra i depositi delle lenti idrofiliche.

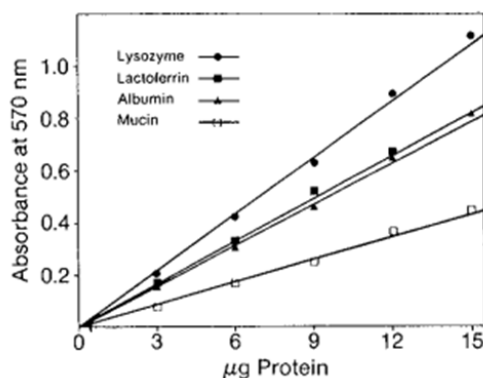


Figura 3.2: Curva standard di lisozima, albumina del siero bovino, mucina e lattoferrina umana. I dati sono rivatai con assorbanza a 570nm vs. μg di proteine. *Figura tratta dallo studio di Minno (1991) [33].*

La ninidrina può reagire con altre molecole contenenti amminoacidi e gruppi carbossilici, per questo sono stati effettuati dei controlli per valutare possibili interferenze: sono state esaminate lenti a contatto non utilizzate e i risultati hanno dimostrato che la maggior parte dei materiali non interferisce con il test. Altre interferenze possono essere causate dai prodotti di pulizia, ma essendocene una grande varietà, non è possibile eliminarle: eventuali interferenze hanno carattere minore grazie all'utilizzo di risciacqui e immersioni nella soluzione salina.

Proteine raccolte dalle lenti idrofiliche

Il quantitativo di proteine trovate nelle lenti ha un range da $0\mu\text{g}/\text{lente}$ (nessuna proteina) a $2319.6\mu\text{g}/\text{lente}$, i dati sono riportati in termini di μg di proteine totali per lente (vedi tabella 3.7). Il quantitativo di proteine rappresenta la somma di tutte le proteine trovate sulla/nella lente: legate, non legate, native, denaturate, sulla superficie, nella matrice o parzialmente idrolizzate. Essendo state scomposte in amminoacidi, non è possibile riconoscere quali proteine sono state studiate.

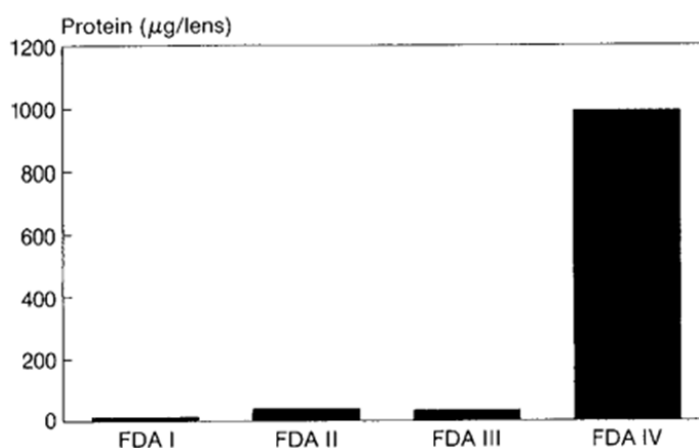
La quantità delle proteine depositate *in vivo* dipende dalla ionicità e dal contenuto d'acqua della lente e segue la classificazione dell'FDA, riportando:

- Gruppo I: $13.6 \pm 16.8\mu\text{g}/\text{lente}$
- Gruppo II: $37.7 \pm 135.0\mu\text{g}/\text{lente}$
- Gruppo III: $33.2 \pm 73.6\mu\text{g}/\text{lente}$

Gruppi FDA	No. di lenti per gruppo di FDA	Quantità di proteine assorbite ($\mu\text{g}/\text{lente}$)	
		Media \pm DS	Range
I	364	13.6 \pm 16.8	0.0-141.5
II	187	37.7 \pm 135.0	0.0-1317.0
III	337	33.2 \pm 73.6	0.0-833.9
IV	170	991.2 \pm 472.7	0.0-2319.6
Totale	1058	169.6 \pm 385.4	0.0-2319.6

Tabella 3.7: Proteine raccolte da ogni gruppo dell'FDA

- Gruppo IV: 991.2 \pm 472.7 $\mu\text{g}/\text{lente}$.

Figura 3.3: Quantità media ($\mu\text{g}/\text{lente}$) di proteine raccolte per ogni gruppo dell'FDA. *Figura tratta dallo studio di Minno (1991) [33].*

L'analisi con l'ANOVA ha riportato, con livello di significatività 0.05, differenze statistiche nelle medie di assorbimento per i vari gruppi, eccetto che per il Gruppo II e III che presentano un simile assorbimento di proteine.

Considerando l'ampio range e la deviazione standard, è stata riportata una grande differenza all'interno dei singoli gruppi dell'FDA e questo si può spiegare in diversi modi:

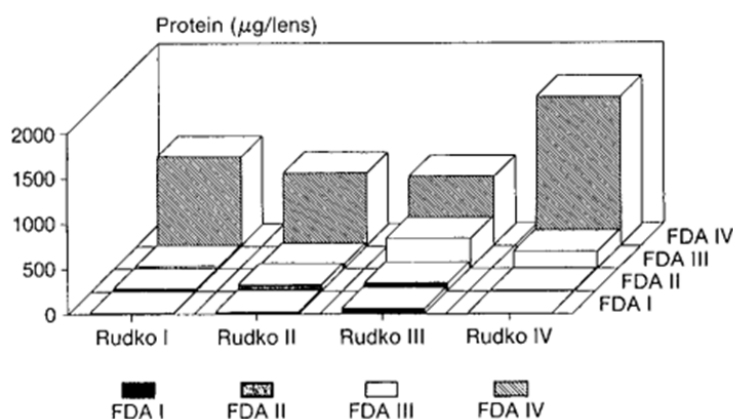
- diversi tipi di proteine assorbite
- diverso tempo di utilizzo delle lenti
- differenze tra individuo e individuo.

Confronto tra depositi visibili e proteine rilevate

La media delle proteine trovate è stata calcolata per ognuno dei quattro gruppi di Rudko (vedi tabella 3.8) e differenze statistiche (a livello di 0.05) sono state trovate per tutti i gruppi eccetto che per il III e IV. Date le differenze tra i singoli gruppi dell'FDA, è preferibile confrontare i depositi visibili e quelli quantificati per ogni singolo gruppo.

Tipo di depositi secondo RM	No. di lenti per tipo di Rudko	Quantità di proteine assorbite ($\mu\text{g}/\text{lente}$)	
		Media \pm DS	Range
I	688	147.6 \pm 372.3	0.0-2059.1
II	334	177.4 \pm 351.3	0.0-1381.2
III	27	435.3 \pm 550.4	12.3-2319.6
IV	9	833.7 \pm 903.9	2.8-2210.3

Tabella 3.8: Proteine raccolte vs. tipi di depositi di RM

Figura 3.4: Quantità media ($\mu\text{g}/\text{lente}$) di proteine raccolte per ogni tipo di RM per i gruppi dell'FDA. *Figura tratta dallo studio di Minno (1991) [33].*

Nella tabella 3.9 e nella figura 3.4 sono riportati i dati dei quattro gruppi dell'FDA, la loro classificazione secondo RM e la quantità oggettiva riportata di depositi. Il test ANOVA ha riportato differenze significative tra i dati di RM e quelli oggettivi per ogni categoria dell'FDA: la valutazione visiva è marginalmente predittiva della quantità di depositi presente nelle idrogel. Differenze statistiche sono state riportate per i prime tre gruppi dell'FDA, ma non per il quarto. I dati tra RM e oggettivi sono stati valutati anche

con i test Pearson, Spearman e il coefficiente gamma con risultati statisticamente significativi, ma bassi e clinicamente non importanti.

Per analizzare la relazione tra RM e quantità di depositi sono state compilate le categorie di Rudko con i livelli medi di proteine. Se l'RM è un buon metodo, non dovrebbero esserci differenze significative; in diversi casi, sono state trovate differenze significative tra il livello medio di proteine di lenti con lo stesso RM (allo 0.05), tranne tra il Gruppo II e il Gruppo III (vedi tabella 3.11).

Gruppi FDA	Tipo di depositi secondo RM	No. di lenti	Quantità di proteine assorbite (μg)		
			Media	DS	Range
I	I	267	11.3	14.4	0.0-113.2
	II	95	19.2	20.6	0.0-141.5
	III	2	49.4	22.0	33.9-64.9
Totale Gruppo I		364	13.6	16.8	0.0-141.5
II	I	111	17.5	12.3	0.5-57.0
	II	67	65.6	220.2	0.0-1317.9
	III	9	80.1	86.9	12.3-284.9
Totale Gruppo II		187	37.7	135.1	0.0-1317.9
III	I	217	20.0	24.5	0.0-206.4
	II	112	44.2	56.6	0.0-266.3
	III	3	327.9	442.3	14.6-833.9
	IV	5	182.9	360.9	2.8-826.3
Totale Gruppo III		337	33.2	73.6	0.0-833.9
IV	I	93	985.4	458.6	0.0-2059.1
	II	60	801.2	389.5	61.2-1381.2
	III	13	765.4	615.0	207.8-2319.6
	IV	4	1647.2	646.3	1020.4-2210.3
Totale Gruppo IV		170	919.2	472.7	0.0-2319.6

Tabella 3.9: Quantità di proteine trovate nelle lenti indossate e lenti non indossate vs. tipi di depositi secondo RM

Confronto tipi di depositi secondo RM	Gruppi FDA			
	I	II	III	IV
I-II	sì	no	sì	no
I-III	no	sì	sì	no
I-IV	-	-	no	no
II-III	no	sì	sì	no
II-IV	-	-	no	no
III-IV	-	-	no	no

Tabella 3.10: Confronto tra i tipi di RM e la media delle proteine presenti nei gruppi dell’FDA. sì: significativo allo 0.05, no: non significativo allo 0.05, -: non ci sono lenti di Tipo IV secondo RM

Confronto Gruppi FDA	Depositati secondo RM			
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
I-II	sì	no	no	-
I-III	sì	sì	no	-
I-IV	sì	sì	sì	-
II-III	no	no	no	-
II-IV	sì	sì	sì	-
III-IV	sì	sì	sì	no

Tabella 3.11: Confronto tra i gruppi dell’FDA e i depositi secondo RM. sì: significativo allo 0.05, no: non significativo allo 0.05, -: non ci sono lenti di Tipo IV secondo RM

3.4.3 Discussione

Le proteine sono la maggior componente dei depositi sulle lenti morbide idrofiliche; lo scopo di questo studio è valutare se c'è una relazione tra depositi visibili e la quantità di proteine assorbite. Il metodo di RM viene utilizzato per descrivere e classificare il grado di depositi e valutare l'efficacia della manutenzione. I metodi per quantificare la presenza di proteine richiedono estrazioni complesse e non efficienti al 100%. In questo studio sono stati stabiliti dei criteri, quali:

- la riproducibilità con un basso limite di rilevabilità
- la capacità di rilevare tutte le proteine legate, non legate, native, denaturate, adsorbite o assorbite
- la semplicità, così da poter analizzare un alto numero di campioni
- la compatibilità con tutti i materiali delle lenti
- la non dipendenza da tecniche di estrazione.

Publicazioni precedenti hanno dimostrato che la ninidrina è un ottimo strumento.

I livelli medi di proteine sono significativamente differenti per tre dei quattro gruppi dell'FDA: questo dato conferma che la presenza dei depositi proteici dipende dalla ionicità e dal contenuto d'acqua e quindi che c'è una stretta correlazione con la classificazione dell'FDA. I materiali con carica positiva attirano più lisozima e i materiali con alto contenuto d'acqua hanno pori più grandi a causa dei quali aumenta l'assorbimento delle proteine. Il simile assorbimento tra materiali del Gruppo II e III dimostra che la carica ionica e il contenuto d'acqua indipendentemente permettono lo stesso assorbimento. La drammatica differenza col Gruppo IV dimostra che c'è sinergia tra la ionicità e il contenuto d'acqua. Sia quantitativamente che visibilmente c'è una diversa distribuzione dei depositi proteici in base alla classificazione dell'FDA: essa è dunque un importante strumento nella previsione dei depositi e nella scelta della lente da applicare in base alle caratteristiche dei diversi portatori.

Comparando la tecnica di RM e il test della ninidrina, viene dimostrato che c'è una grande differenza di depositi tra lenti classificate con lo stesso punteggio RM. In molti casi non è stata trovata una relazione tra i risultati di RM e i livelli di proteine di lenti dello stesso gruppo dell'FDA. Per queste relazioni sono necessari alti numeri di campioni a causa delle numerose variabili. Questi risultati dimostrano che il metodo visivo non è un buon discriminatore per la quantità dei depositi proteici sulle lenti.

Questo studio ha anche un'importante valenza clinica in quanto alcun paziente del Gruppo IV ha riportato CLCP, sebbene la numerosa quantità

di depositi trovati: questo dimostra che la CLPC è dovuta non tanto alla quantità di depositi, ma alla loro natura, dove la denaturazione è il fattore scatenante. Portatori di lenti valutate visibilmente pulite hanno riportato intolleranza alla lente.

Il metodo visivo deve essere riesaminato, in quanto è molto lontano dalle tecniche oggettive. Tuttavia, i depositi visibili sono associati a complicazioni.

Conclusioni

Lo studio di Minno ha dimostrato che:

- Ci sono differenze statistiche tra i gruppi dell'FDA esaminati con Rudko
- Ci sono differenze statistiche tra i gruppi dell'FDA esaminati con la ninidrina
- Ci sono differenze statistiche tra il metodo Rudko e la quantità oggettiva di proteine presenti sulla lente: la scala di Rudko modificata non è sufficiente nel definire la quantità di depositi presenti
- Nella maggior parte dei casi non è stata ritrovata correlazione tra la quantità di proteine con lo stesso tipo di RM all'interno dei quattro gruppi dell'FDA.

La classificazione dell'FDA fornisce un quadro predittivo dell'interazione tra lente e depositi proteici, sia se osserviamo la lente con la scala di RM, sia se utilizziamo tecniche oggettive.

Il metodo Rudko è un metodo povero per la quantificazione delle proteine, non è predittivo della reale presenza di proteine; solo il tipo IV non ha riportato differenze statistiche. Quando una lente viene classificata di tipo I con la scala RM, viene considerata pulita, mentre la quantità di proteine presenti è estremamente elevata.

Lo studio di Recknor (1998) supporta gli studi precedenti che hanno riportato una correlazione tra l'analisi delle immagini e la scala di Rudko modificata nei livelli intermedi, mentre la relazione coi livelli più alti e più bassi non è attendibile. Inoltre non è stata ritrovata una differenza statistica tra la scala di Rudko e la quantità di depositi nel Gruppo IV. Questo studio è stato condotto *in vitro* e non *in vivo*.

Bibliografia

- [1] J. Baguet et al., *Characterization of lacrymal component accumulation on worn soft contact lens surfaces by atomic force microscopy*, *Biomaterials* (1995) 16(1), 3-9
- [2] E. S. Bennett, *Contact lens problem solving*, Mosby, 1995
- [3] L. Brocchieri, S. Karlin, *Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes*, *Nucleic Acids Res.* (2005) 33(10), 3390-3400
- [4] M. G. Bucci, *Oftalmologia*, Seu, 1993
- [5] G. A. de Souza, L. MF. Godoy, M. Mann, *Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors*, *Genome Biol.* (2006) 7(8), R72
- [6] R. du Toit, J. Stern, D. Sweeney, *Surfaces of Silicone Hydrogel Contact Lenses*, Elsevier Science Inc. (2002), 27, 2000
- [7] N. Efron, *Contact lens practice*, Butterworth Heinemann, 2005
- [8] S. A. Fowler, M. R. Allansmith, *Evolution of Soft Contact Lens Coatings*, *Arch Ophthalmol.* (1980) 98, 95-99
- [9] A. Gasson, J. Morris, a cura di M. Barca, R. Iazzolano, *Manuale di contattologia guida pratica all'applicazione*, Time Science, 2000
- [10] A. Gentile et al., *Adsorbimento delle proteine nelle lac morbose: analisi e confronto tra vari materiali*, *lac* (2007), 9(3)
- [11] B. Hall, L. Jones, J. A. Forrest, *Kinetics of Competitive Adsorption between Lysozyme and Lactoferrin on Silicone Hydrogel Contact Lenses and the Effect on Lysozyme Activity*, *Curr Eye Res.* (2015) 40(6), 622-31
- [12] D. E. Hart et al., *Defining the Physiologically Normal Coating and Pathological Deposit: An analysis of sulfur-containing moieties and pellicle thickness on hydrogel contact lenses*, *American Academy of Optometry* (1990)

- [13] D. E. Hart et al., *Microbial contamination of hydrophilic contact lenses: quantitation and identification of microorganisms associated with contact lenses while on the eye*, *Optom Vis Sci.* (1993) 70(3), 185-91
- [14] R. A. Hathaway, G. E. Lowther, *Factors Influencing the Rate of Deposit Formation on Hydrophilic Lenses*, *Aust. J. Optom.* (1978) 61, 92-96
- [15] S. Hatou, *Biochemical analyses of lipids deposited on silicone hydrogel lenses*, *J. Optom.* (2010) 3(3), 164-8
- [16] D. J. Heiler, S. Gambacorta-Hoffman, S. F. Groemminger, *The Concentric Distribution of Protein on Patient-worn Hydrogel Lenses*, *CLAO J.* (1991) 17(4), 249-251
- [17] B. Ilhan et al., *Surface deposits on frequent replacement and conventional daily wear soft contact lenses: a scanning electron microscopic study*, *CLAO J.* (1998) 24(4), 232-235
- [18] L. Jones et al., *Lipid and Protein Deposition of N-Vinyl Pyrrolidone-Containing Group II and Group IV Frequent Replacement Contact Lenses*, *Contact Lenses* (1997)
- [19] L. Jones et al., *Lysozyme and Lipid Deposition on Silicone Hydrogel Contact Lens Materials*, *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice* (2003) 29(1), S75-S79
- [20] C. Maissa, V. Franklin et al., *Influence of contact lens material surface characteristics and replacement frequency on protein and lipid deposition*, *Optom. Vis. Sci.* (1998) 75(9), 697-705
- [21] J. Jung, J. Rapp, *The efficacy of hydrophilic contact lens cleaning systems in removing protein deposits*, *CLAO Journal, Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists*, (1993) 19(1), 47-49
- [22] P. L. Kaufman, A. Alm, *Adler's physiology of the eye clinical application*, Mosby, 2003
- [23] D. J. Keith et al., *Determination of the lysozyme deposit curve in soft contact lenses*, *Eye Contact Lens* (2003) 29(2), 79-82
- [24] D. R. Korb, *Tear Film-Contact Lens Interactions, Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes Advances in Experimental Medicine and Biology*, (1994) 350, 403-410
- [25] C. D. Leahy, R. B. Mandell, S. T. Lin, *Initial in Vivo Tear Protein Deposition on Individual Hydrogel Contact Lenses*, *Optom. Vis. Sci.* (1990) 67(7), 504-511

- [26] E. Leitch, M. Willcox, *Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme*, J Med Microbiol. (1999) 48(9), 867-71
- [27] O. W. Lever et al., *Evaluation of the relationship between total lens protein deposition and patient-rated comfort of hydrophilic (soft) contact lenses*, I.C.L.C. (1995) 22(1), 5-13
- [28] D. Luensmann, L. Jones, *Albumin adsorption to contact lens material: A review*, Contact Lens & Anterior Eye (2008) 31, 179-187
- [29] D. Luensmann, L. Jones, *Protein deposition on contact lenses: the past, the present and the future*, BCLA (2012)
- [30] D. Luensmann et al., *Physiological response to protein and cholesterol deposition on silicone hydrogel contact lenses*, 2011
- [31] L. Lupelli, N. Pescosolido, V. Pescosolido, *Vantaggi e svantaggi delle lenti a contatto a ricambio frequente*, (2001) 1, 22-30
- [32] V. Lupi, *Lezioni di anatomia e fisiopatologia oculare per studenti di optometria*, Fabriano Editore, 2004
- [33] G. E. Minno et al., *Quantitative Analysis of Protein Deposits on Hydrophilic Soft Contact Lenses: I. Comparison to Visual Methods of Analysis. II. Deposit Variation among FDA Lens Material Groups*, Optometry & Vision Science (1991) 68(11)
- [34] R. I. Myers et al., *Quantity of protein deposited on idrogel contact lenses and its relation to visible protein deposits*, Optom. Vis. Sci. (1991) 68(10), 776-782
- [35] A. Ng et al., *Impact of tear film components on the conformational state of lysozyme deposited on contact lenses*, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. (2013) 101(7), 1172-81
- [36] N. B. Omali et al., *Quantification of protein deposition on worn silicone hydrogel contact lenses*, Contact Lens & Anterior Eye (2012) 35(1), 21-22
- [37] A. J. Phillips, L. Speedwell, *Contact Lenses*, Butterworth Heinemann, 2007
- [38] M. J. A. Port, *Contact lens surface properties and interactions*, Optometry today (1999) July 30
- [39] X. Qu, R. Lehrer, *Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears*, Infect Immun. (1998) 66(6), 2791-7

- [40] J. Recknor, *Correlation of in vitro Rudko Grades and imagine analysis average pixel density values*, Contact Lenses (1998) Poster 134
- [41] A. Rosseti, P. Gheller, *Manuale di optometria e contattologia*, Zanichelli 2003
- [42] I. B. Salim, S. A. Klotz, *Contact lens surface deposits increase the adhesion of Pseudomonas aeruginosa*, (1990) 9(8), 717-724
- [43] P. Simmons et al., *Effect of patient wear and extent of protein deposition on adsorption of Acanthamoeba to five types of hydrogel contact lenses*, Optom Vis Sci. (1996) 73(6), 362-8
- [44] F. Stapleton et al., *Silicone Hydrogel Contact Lenses and the Ocular Surface*, Elsevier Inc. (2006) 4(1), 24-43
- [45] M. Suwala, *Quantity and Conformation of Lysozyme Deposited on Conventional and Silicone Hydrogel Contact Lens Materials Using an In Vitro Model*, Lippincott Williams & Wilkins, Inc. (2007)
- [46] D. F. Sweeney, *Silicone Hydrogels continuous-wear contactl lens*, Butterworth Heinemann, 2004
- [47] J. H. Teichroeb et al., *Imaging protein deposits on contact lens materials*, Optom. Vis. Sci. (2008) 85(12), 1151-1164
- [48] A. Thakur, A. Chauhan, M. D. Willcox, *Effect of lysozyme on adhesion and toxin release by Staphylococcus aureus*, Aust. N. Z. J. Ophthalmol. (1999) 27, 224-227
- [49] A. Tomlinson, P. J. Caroline, *Comparative evaluation of surface deposits on high water content hydrogel contact lens polymers*, CLAO J. (1990) 16(2), 121-127
- [50] R. K. Watanabe, *Clinical cases in contact lenses*, Butterworth Heinemann, 2002
- [51] L. Wolfe et al., *Elementi di biologia cellulare*, EdiSES, 2011
- [52] G. Yan et al., *Quantitation of total protein deposits on contact lenses by means of amino acid analysis*, Optom. Vis. Sci. (1993) 34(5)
- [53] S. Zhang et al., *In vitro deposition of lysozyme on etafilcon A and balafilcon A hydrogel contact lenses: effects on adhesion and survival of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*, Cont Lens & Anterior Eye (2005) 28(3), 113-9

Sitografia

[54] definizione enciclopedia treccani <http://www.treccani.it/enciclopedia/adsorbimento/>

[55] definizione enciclopedia treccani <http://www.treccani.it/enciclopedia/immunoglobuline/>

[56] definizione enciclopedia treccani <http://www.treccani.it/enciclopedia/lattoferrina/>

[57] definizione enciclopedia treccani <http://www.treccani.it/enciclopedia/lisozima/>