

CAMBIAMENTI MORFOLOGICI E FUNZIONALI DELLA SUPERFICIE OCULARE IN PAZIENTI TRATTATI CON ANALOGHI DELLE PROSTAGLANDINE DOPO L'USO DI TSP 0,5%®, COLLIRIO PRIVO DI CONSERVANTI. STUDIO PROSPETTICO E MULTICENTRICO

Aldo VAGGE¹, Michele BONINO¹, Michele IESTER¹, Carlo E. TRAVERSO¹, Francesco ODDONE², Paolo FOGAGNOLO³, Paolo FREZZOTTI⁴, Michele FIGUS⁵, Stefano LAZZERI⁵, Chiara POSARELLI⁵, Luca MARTINI⁵, Marco NARDI⁵, Ilenia MOTOLESE⁴, Edoardo MOTOLESE⁴, Luca ROSSETTI⁵, Marco CENTOFANTI⁵, Lucia TANGA⁵

¹Laboratorio clinico anatomico-funzionale per la diagnosi e il trattamento del glaucoma e della malattie neurooftalmologiche, Clinica Oculistica, DiNOGMI, Università di Genova, Genova

²IRCCS Fondazione G.B. Bietti, Roma

³Clinica Oculistica, Ospedale San Paolo, Università degli Studi di Milano, Milano

⁴Dipartimento di Chirurgia, Clinica Oculistica, Università di Siena, Siena

⁵Clinica Oculistica, Università di Pisa, Pisa

69

ABSTRACT

Purpose: To investigate and compare the effects of topical BAK-preserved PGAs on the ocular surface in patients with primary open-angle glaucoma (POAG) before and after use of three months treatment with additional 0.5% TSP® eye drops single-dose preservative free (Oftagen, Pisa, Italy).

Methods: This was prospective, longitudinal, multicenter study. From 5 different glaucoma centers (Genoa, Milan, Pisa, Rome, Siena) 10 glaucomatous patients were recruited in each center. All the patients were treated with a prostaglandin analogue with preservative for at least one year. Preservative free artificial tears were prescribed three times per day. The participants were underwent to clinical and instrumental evaluation with a digital corneal confocal laser-scanning microscope (HRT III

Rostock Cornea Module; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) at baseline (T0), after one month (T1) and after three months (T3) of treatment.

Results: An improvement of some ocular signs and symptoms was found after 3 months of TSP treatment. The percentage of conjunctival hyperemia decreased from 67% to 13%. After three months Schirmer's test and break-up time significantly changed from the baseline. Moreover a significant increase of conjunctival goblet cells with confocal microscopy were showed.

Conclusion: Artificial substitutes, in particular TSP 0.5%, might protect ocular surface therefore giving higher compliance, adherence and quality of life of the patients.

Ottica fisiopat 2014; XIX: 69-75

Parte di questo lavoro è stato pubblicato su: Iester M, Oddone F, Fogagnolo P et al. Changes in the Morphological and Functional Patterns of the Ocular Surface in Patients Treated with Prostaglandin Analogues after the Use of TSP 0.5%® Preservative-Free Eyedrops: A Prospective, Multicenter Study. *Ophthalmic Res* 2014;51(3):146-52

INTRODUZIONE

Il glaucoma è una condizione patologica che costringe il paziente ad una terapia cronica, mirata soprattutto a monitorare la pressione intraoculare (IOP), considerata uno dei maggiori fattori di rischio.

Le principali formulazioni commerciali dei colliri antiglaucoma contengono concentrazioni variabili di benzalconio - cloruro (BAK), una miscela di cloruri di alchil - benzil - dimetilammonio con proprietà conservanti e germicide. Diversi studi¹⁻⁷ hanno valutato il ruolo del BAK nelle reazioni

farmaco indotte indicandolo, a causa delle sue proprietà citotossiche e pro infiammatorie, come il maggior responsabile del corneo sintomatologico, in particolare arrossamento oculare ed irritazione, che accompagna la terapia cronica causando un peggioramento della qualità di vita del paziente ed obbligando di conseguenza ad un cambio di terapia^{1,2}.

L'azione infiammatoria del BAK, già dopo appena 6 mesi di terapia, sembra essere a carico delle cellule calciformi a cui conseguono una ridotta produzione di film lacrimale e

AUTORE CORRISPONDENTE

Michele Iester
University Eye Clinic,
Viale Benedetto XV, 5
16132 Genova
Tel: 010 353 7783,
Fax: 010 353 8494
iester@unige.it

PAROLE CHIAVE:

Trattamento, Analoghi delle Prostaglandine, Superficie Oculare, Microscopio Confocale a Luce Laser.

KEY WORDS:

BAK, Confocale, Prostaglandine, POAG.

alterazioni a carico dell'epitelio corneale e congiuntivale^{3,4}.

Scopo di questo studio è stato quello di esaminare e confrontare gli effetti indotti dal trattamento topico con analoghi delle prostaglandine (PGA) sulla superficie oculare in pazienti affetti da glaucoma ad angolo aperto (POAG) prima e dopo l'uso di TSP 0,5%®, collirio monodose privo di conservanti (Oftagen, Pisa, Italy). Le PGA, nonostante la presenza di BAK come conservante, sono largamente utilizzati in clinica grazie alla loro efficacia nel ridurre la pressione intraoculare e alla buona sicurezza sistemica⁸. Il BAK, unitamente alla naturale tendenza delle prostaglandine a determinare reazioni infiammatorie, contribuisce all'insorgenza dei problemi a livello oculare che si osservano durante le terapie croniche^{1,2}.

PAZIENTI E METODI

Questo studio, multicentrico, longitudinale, a singolo braccio, ha ottenuto l'approvazione del comitato etico e si è attenuto ai Principi di Helsinki. I pazienti hanno firmato il consenso informato.

Lo studio è stato condotto in cinque centri italiani, Genova, Roma, Pisa, Milano e Siena, dove sono stati reclutati 50 pazienti secondo i seguenti criteri di inclusione:

- età >18
- diagnosi di glaucoma ad angolo aperto
- trattamento in monoterapia da almeno un anno con instillazione 1/die di un analogo delle prostaglandine contenente BAK
- acuità visiva >5/10

Criteri di esclusione:

- condizioni oculare particolari differenti dal glaucoma tali da interferire con i risultati dello studio
- uso corrente di lenti a contatto
- soggetti sottoposti ad interventi di chirurgia oculare negli ultimi tre mesi
- infiammazione o infezione oculare negli ultimi tre mesi
- pazienti neurovascolari (compresi diabetici e affetti da glaucoma neurovascolare)
- medicazioni topiche oculari concomitanti (compresi sostituti lacrimali)
- controindicazioni all'uso topico di componenti della soluzione oggetto del trial
- storia di traumi oculari
- malattie reumatologiche ed autoimmuni
- uso di terapia sistemica con noti disturbi retinici
- in trattamento sistemico con steroidi
- condizioni neurologiche tali da interferire sul campo visivo

Alla prima visita (T0) sono state prescritte ai pazienti, in aggiunta alla loro terapia topica oftalmica abituale, tre instillazioni al giorno di TSP 0,5%®. TS-polisaccaride è un sostituto lacrimale che contiene una sostanza naturale, estratta dai semi della pianta *Tamarindus Indica*, utile per la protezione corneale, trasparente, viscoelastico, sterile^{9,10}.

I partecipanti allo studio, dopo un'accurata anamnesi sistemica ed oculare, sono stati sottoposti ad una valutazione clinico-strumentale della superficie oculare di entrambi gli occhi mediante lampada a fessura prima dell'inizio del trattamento (T0)

a distanza di 1 mese (T1) e dopo 3 mesi (T3).

In particolare in T0, T1 e T3 sono stati valutati: iperemia congiuntivale, danno epiteliale della superficie corneale, test di Schirmer, break up time (BUT).

Ad ogni visita sono stati raccolti sintomi relativi al discomfort oculare usati per l'analisi statistica finale. Sono state inoltre misurate la pressione intraoculare (IOP) e l'acuità visiva.

Indagine al microscopio confocale

I pazienti sono stati esaminati durante ogni visita mediante l'uso del Microscopio Confocale a luce laser (*HRT II-Rostock Cornea Module; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany*) sempre dallo stesso operatore.

L'HRT utilizza una sorgente laser a diodo Elio-Neon a 670 nm, fornendo sezioni di cornea di 10 micron di spessore e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco¹¹.

Il protocollo dell'indagine, effettuata con gli stessi metodi in ogni Centro Universitario per il Glaucoma, prevedeva:

- anestesia locale con benoxinato 0,4% cloridrato, installata nel fornice congiuntivale inferiore
- posizionamento corretto del capo con l'aiuto di una mira mobile a luce rossa per l'occhio contro laterale
- interposizione di un gel sterile trasparente e viscoso (Viscotears 0,2% gel) tra la lente dell'obiettivo e la cornea

- almeno 20 immagini per occhio dell'epitelio corneale, del plesso nervoso sub-basale e dello stoma nell'area centrale della cornea
- durata dell'esame: dai 2 ai 5 minuti
- osservazione alla lampada a fessura per verificare l'integrità della superficie corneale
- instillazione di una goccia di collirio antibiotico alla fine dell'esame

Valutazione delle immagini

Sono state scelte dalle 3 alle 5 immagini, le più nitide e significative, per ogni parametro che è stato considerato nello studio:

- morfologia dell'epitelio corneale
- densità delle cellule superficiali e basali dell'epitelio: i risultati sono stati espressi in numero cellule per mm² (cell/mm²)
- morfologia dell'epitelio congiuntivale
- densità dell'epitelio congiuntivale: cell/mm²
- densità delle cellule calciformi congiuntivali: cell/mm²

Analisi statistica

Per la normale distribuzione delle variabili è stato applicato il test parametrico T di Student; quando non è stato possibile considerare i postulati del T test è stato utilizzato il test di Mann-Whitney.

Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

I risultati ottenuti si riferiscono a quarantadue pazienti (21 M, 21 F) dei cinquanta iniziali, di età compresa tra i 25 e gli 80 anni, con diagnosi di glaucoma primario ad angolo aperto

Tabella 1

Sintomi della superficie oculare

	baseline	1 mese	3 mesi	baseline 1 mese	baseline 3 mesi	1 mese vs 3 mesi
Bruciore (n. occhi)	22	17	4	<0.01	0.010	0.030
Dolore (n. occhi)	9	6	2	n.s.	0.040	0.031

e in terapia con analoghi delle prostaglandine. Dall'anamnesi dei soggetti seguiti dallo studio è stato riscontrato un miglioramento statisticamente significativo del sintomo "bruciore" in seguito a trattamento con TSP 0,5%® già evidente in T1 e ancora più marcato in T3 (Tab. 1).

È stato riscontrato un miglioramento statisticamente significativo in T3 in alcuni dei parametri analizzati con lampada a fessura: in particolar modo l'iperemia congiuntivale è diminuita dal 67% al 13%, già evidente in T1, mentre il Test di Schirmer e il BUT sono migliorati dopo tre mesi di trattamento (Tab. 2).

I risultati ottenuti al microscopio confocale hanno evidenziato miglioramenti nelle cellule caliciformi congiuntivali, il cui numero è aumentato in modo statisticamente significativo già dopo un mese di trattamento (T1) ed è rimasto invariato nei successivi controlli (T2 e T3).

Inoltre è stato riscontrato un incremento, seppur non statisticamente significativo, della densità delle cellule epiteliali e del numero di fibre nervose del plesso sub epiteliale.

Il numero delle cellule endoteliali, congiuntivali e corneali, è rimasto invariato durante il follow-up. Così

pure negli altri parametri analizzati al microscopio confocale non sono state rilevate variazioni significative (Tab. 3).

DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare, mediante test clinici ed indagini in vivo al microscopio confocale in pazienti glaucomatosi, in trattamento con analoghi delle prostaglandine contenenti BAK, l'effetto sulla superficie oculare di un sostituto lacrimale contenente 0,5% di TS-polisaccaride, del quale sono stati riscontrati in vitro effetti protettivi sulle cellule epiteliali corneali.

La terapia medica topica è generalmente la prima scelta nel trattamento del glaucoma ad angolo aperto. Riducendo la pressione intraoculare (IOP) si può ridurre il rischio di danno al nervo ottico e preservare il campo visivo¹². Tuttavia il trattamento a lungo termine è associato ad effetti collaterali della superficie oculare¹³.

Le formulazioni commerciali di colliri anti-glaucoma contengono, per motivi di tecnica farmaceutica, concentrazioni variabili di benzalconio cloruro (BAK), un sale d'ammonio quaternario con elevata capacità disinfettante e germicida¹⁴.

I colliri multidose normalmente vengono contaminati dopo una-due

Tabella 2 Segni oculari

	baseline media	DS	1 mese media	DS	3 mesi media	DS	baseline 1 mese	baseline 3 mesi	1 mese vs 3 mesi
Iperemia congiuntivale (%)	67		32		13		<0.001	<0.001	<0.001
Test di Schirmer (mm)	9.30	4.70	11.7	5.30	11.06	4.91	0.050	0.018	0.050
BUT (sec)	7.65	3.40	8.40	4.60	8.77	2.89	n.s.	<0.001	<0.001

Tabella 3 Microscopia confocale

	baseline		1 mese		3 mesi		baseline 1 mese	baseline 1 mese	1 mese vs 3 mesi
Cornea									
Morfologia epitelio corneale	100		100		100		n.s.	n.s.	n.s.
Densità cellule epiteliali	6365	2362	6412	2095	7329	1867	n.s.	n.s.	n.s.
Congiuntiva									
Morfologia	92.9		90.5		100		n.s.	n.s.	n.s.
Densità cellulare	4033	1706	4307	2032	3972	1169	n.s.	0.060	0.047
Cellule calciformi	326	178	651	737	639	500	0.041	0.046	n.s.

settimane se privi di conservanti¹⁵, i cui effetti collaterali, di natura allergica e tossica sui tessuti oculari, sono ben conosciuti anche se i meccanismi d'azione non sono ancora completamente noti¹⁶⁻¹⁸.

Il BAK promuove l'attivazione di lipossigenasi, la sintesi e la secrezione di mediatori dell'infiammazione e citochine (IL-1a, IL-8, IL-10 e TNF-α) causando ipersensibilità e reazioni allergiche¹⁹.

La tossicità del BAK agisce essenzialmente attraverso tre meccanismi: instabilità del film lacrimale a causa del suo effetto detergente, danno diretto all'epitelio corneale e congiuntivale, reazioni immuno-allergiche²⁰.

In questo studio l'iperemia congiuntivale e i sintomi clinici sono stati ridotti grazie all'instillazione tre volte al giorno di TS-Polisaccaride 0,5%, in aggiunta alla normale terapia. Anche i valori medi ottenuti al test di Schirmer e al BUT

sono aumentati dopo tre mesi di trattamento.

Le immagini al microscopio confocale hanno documentato inoltre un incremento della densità delle cellule epiteliali e delle fibre nervose del plesso sub-epiteliale, dato importante per il trofismo corneale. Dal punto di vista clinico infatti i pazienti trattati con TS-Polisaccaride 0,5% hanno avuto un sostanziale miglioramento della tolleranza alla terapia antiglaucomatosa dopo appena tre mesi di trattamento.

La terapia, con la necessità di essere somministrata spesso pluriquotidianamente e con i suoi effetti collaterali, è uno dei primi fattori in grado di compromettere la qualità di vita del malato.

Di conseguenza è importante riconoscere una disfunzione del film lacrimale e trattarla adeguatamente. Per migliorare la tollerabilità del paziente alla terapia abbiamo alcune possibilità: ridurre il numero

di somministrazioni giornaliere prescrivendo quindi un farmaco a lunga durata d'azione come le PGA in associazione a lacrime artificiali prive di conservanti, oppure prediligere una terapia senza conservanti. I risultati ottenuti dallo studio, dopo tre mesi di trattamento con TS-Polissacaride 0,5%, hanno mostrato un sostanziale miglioramento dei segni e dei sintomi di irritazione oculare. Ciò evidenzia la necessità, quando è possibile nei nostri pazienti glaucomatosi, di passare ad una terapia priva di conservanti o con conservanti a bassa tossicità, o di prescrivere in associazione alla normale terapia con conservanti un sostituto lacrimale per proteggere la superficie oculare. I sintomi e i segni di irritazione oculare nei pazienti trattati con PGA, devono essere monitorati attentamente. Riconoscere la presenza di disfunzione del film lacrimale potrebbe essere importante per migliorare la compliance e l'aderenza del paziente alla terapia, e la prescrizione di un sostituto lacrimale, come il TS-Polissacaride 0,5%, potrebbe esserne la soluzione.

RIASSUNTO

Scopo: valutare e comparare gli effetti del benzalconio cloruro in soggetti affetti da glaucoma cronico ad angolo aperto (POAG) in terapia con analoghi delle prostaglandine (PGAs) prima e dopo 3 mesi di trattamento con un sostituto lacrimale monodose privo di conservante (TSP®, Oftagen, Pisa, Italia).

Metodi: studio prospettico,

longitudinale e multicentrico. In 5 centri glaucoma italiani (Genova, Milano, Roma, Pisa e Siena) sono stati arruolati 10 pazienti per centro trattati con PGA con conservante per almeno 1 anno. A tali pazienti è stato aggiunto un trattamento con un sostituto lacrimale monodose privo di conservante 3 volte al giorno.

I partecipanti erano sottoposti a una valutazione clinica e strumentale alla baseline, dopo 1 mese e dopo 3 mesi dal trattamento. Tutti i pazienti erano esaminati con microscopia laser confocale (HTR II Rostock Cornea Module).

Risultati: dopo 3 mesi dal trattamento con TSP 0,5% si è potuto notare un miglioramento di alcuni segni e sintomi oculari. La percentuale di iperemia congiuntivale è diminuita dal 67 al 13%. Il test di Shirmer e del Breakup time sono variati dopo 3 mesi in maniera statisticamente significativa. La microscopia confocale ha mostrato un incremento significativo delle globet cells congiuntivali.

Conclusioni: sostituti lacrimali, in particolare TSP 0,5%, può avere un ruolo protettivo sulla superficie oculare aumentando la compliance, l'aderenza terapeutica e la qualità di vita dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Valente C, Iester M, Corsi E, Rolando M. *Symptoms and Signs of Tear Film Dysfunction in Glaucomatous Patients.* J Ocul Pharmacol Ther **27**: 281-285, 2011
2. Valente C, Iester M. *Impact of glaucoma medication on ocular tissue.* Expert Rev Ophthalmol **5**: 405-412, 2010
3. Baudouin C, Hamard P, Liang H, et al.

- Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term.* *Ophthalmology* **111**: 2186-2192, 2004
4. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P et al. *Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 1360-1368, 2004
 5. Hong Liang, Aude Pauly, Luisa Riancho et al. *Toxicological evaluation of preservative-containing and preservative-free topical prostaglandin analogues on a three-dimensional-reconstituted corneal epithelium system.* *Br J Ophthalmol* **95**: 869-875, 2011
 6. Walker TD. *Benzalkonium toxicity.* *Clin Experiment Ophthalmol* **32**: 180-184, 2004
 7. Noecker R, Miller KV. *Benzalkonium chloride in glaucoma medications.* *Ocul Surf* **9**: 159-162, 2011
 8. European Glaucoma Society. *Terminology and Guidelines for Glaucoma, European Glaucoma Society III edn, Chapter 3.* Dogma: Savona, 2008
 9. Raimondi L, Lodovici M, Guglielmi F, et al. *The polysaccharide from Tamarindus indica (TS-polysaccharide) protects cultured corneal-derived cells (SIRC cells) from ultraviolet rays.* *J Pharm Pharmacol* **55**: 333-338, 2003
 10. Rolando M, Valente C. *Establishing the tolerability and performance of tamarind seed polysaccharide (TSP) in treating dry eye syndrome: results of a clinical study.* *BMC Ophthalmol* **7**: 5, 2007 Mar 29
 11. Martone GL, Frezzotti P, Tosi GM, et al. *An In Vivo Confocal Microscopy Analysis of Effects of Topical Antiglaucoma Therapy With Preservative on Corneal Innervation and Morphology.* *Am J Ophthalmol* **147**: 725-735, 2009
 12. Baudouin C, Labbé A, Liang H, et al. *Preservatives in eye drops: The good, the bad and the ugly.* *Prog Retinal Eye Research* **29**: 312-334, 2010
 13. Ciancaglini M, Carpineto P, Agnifili L, et al. *An in vivo confocal microscopy and impression cytology analysis of preserved and unpreserved levobunolol-induced conjunctival changes.* *Eur J Ophthalmol* **18**: 400-407, 2008
 14. Freeman PD, Kahook MY. *Preservatives in topical ophthalmic medications: historical and clinical perspective.* *Expert Rev Ophthalmol* **4**: 59-64, 2009
 15. Schein OD, Hibberd PL, Starck T et al. *Microbial contamination of in-use ocular medications.* *Arch Ophthalmol* **110**: 82-85, 1992
 16. Herrears JM, Pastor JC, Calonge M, Asensio VM. *Ocular surface alteration after long-term treatment with an antiglaucomatous drug.* *Ophthalmology* **99**: 1082-1088, 1992
 17. Yalvac IS, Gedikoglu G, Karagoz Y et al. *Effect of antiglaucomatous drugs on ocular surface.* *Acta Ophthalmol Scand* **73**: 248-256, 1995
 18. Derous D, De Keizer W, De Wolff-Rouendall D, Soudjin W. *Conjunctival keratinisation, an abnormal reaction to an ocular b-blocker.* *Acta Ophthalmol Scand* **67**: 333-338, 1989
 19. De Saint JM, Brignole F, Bringuier AF et al. *Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of change conjunctival cells.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 619-630, 1999
 20. Yee RW. *The effect of drop vehicle on the efficacy and side effects of topical glaucoma therapy: a review.* *Curr Opin Ophthalmol* **18**: 134-139, 2007