

## EFFETTI DI UN COLLIRIO CON ACIDO IALURONICO, ESTRATTO DI ECHINACEA E AMINOACIDI SULLE ALTERAZIONI DELL'EPITELIO CORNEALE IN PAZIENTI GLAUCOMATOSI IN TERAPIA CRONICA IPOTONIZZANTE

Giuseppe **BATTILORO**, Genoveffa **IANNACCI**, Domenico **LACERENZA**

ASP, Dipartimento di Oculistica, Presidio Ospedaliero San Francesco, Via Appia 68 - 85029 Venosa (PZ)

### ABSTRACT

**AIM:** Chronic use of topical drugs with hypotonic effect in glaucoma patients, often generates ocular surface alterations that may have a negative influence upon patient compliance. These alterations are the consequence of toxic effects on the corneal epithelium due to the presence of preservatives and sometimes the drug itself. The aim of this study was to evaluate if addition of natural compounds, such as Echinacea purpurea and aminoacids, enhances the lenitive effect of sodium hyaluronate as eye drop formulation, which is already well known for its corneal hydrating properties.

**METHODS:** Thirty-five patients affected by glaucoma were assigned to 2 groups (control and treated) and signs and symptoms were evaluated at time of enrolment (T0) and after 2 months (T1). Corneal conditions in sixteen of these patients were evaluated after one month of treatment using confocal microscopy.

**RESULTS:** Analysis of the results has

underlined that chronic use of a lachrymal substitute containing sodium hyaluronate allows a general improvement of the ocular surface condition in glaucoma patients which are subjected to chronic hypotonic treatment. The improvement was boosted when substances such as Echinacea purpurea and aminoacids were added to the formulation; in fact these compounds have demonstrated to significantly improve the signs of ocular discomfort such as burning, photophobia and dry eye, as well as to reduce the activation of stromal keratocytes of the cornea.

**CONCLUSIONS:** these results indicate that chronic use of an eye drop with hydrating, anti-inflammatory and re-epithelizing properties, can be a valid support for the treatment and prevention of iatrogenic damage induced by topical hypotonic therapy, contributing in this way to an improvement of the quality of life among patients with glaucoma.

*Ottica fisiopat 2013; XVIII: 49-57*

### INTRODUZIONE

I pazienti affetti da glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) necessitano di una terapia topica cronica che sia efficace nel produrre un effetto ipotonizzante. L'uso cronico di colliri può però causare fenomeni di irritazione a livello della superficie oculare, non solo a causa della presenza di conservanti<sup>1,2,3</sup>, ma anche provocati in alcuni casi dal principio attivo stesso<sup>4</sup>. La presenza dei conservanti svolge nei colliri una duplice funzione, in quanto essi esplicano la loro azione primaria nei confronti di possibili agenti patogeni, ed allo stesso tempo possono favorire la penetrazione

dei principi attivi attraverso l'epitelio corneale, incrementandone così l'efficacia. L'interazione tra la molecola di conservante e l'epitelio corneale innesca infatti dei processi infiammatori e citotossici, che in pazienti suscettibili possono provocare una reazione particolarmente intensa del sistema immunitario. Inoltre, a causa della loro natura anfifilica, molti conservanti interagiscono con la componente lipidica della lacrima, alterandone la stabilità e favorendo in questo modo la sua evaporazione, con un conseguente effetto irritante sulla superficie oculare. È stato infatti osservato che nei pazienti affetti da POAG ed in trattamento con farmaci ipotonizzanti le lacrime

#### AUTORE CORRISPONDENTE

Giuseppe Battiloro,  
giuseppebattiloro@gmail.com

#### PAROLE CHIAVE:

Echinacea purpurea;  
amminoacidi;  
ialuronato di sodio; compliance;  
glaucoma.

#### KEY WORDS:

Echinacea purpurea;  
aminoacids; sodium  
hyaluronate;  
compliance;  
glaucoma.

tendono ad avere una maggiore osmolarità, segno questo di una più elevata concentrazione di soluti in conseguenza di una maggiore evaporazione<sup>5</sup>. Inoltre, si osserva anche una diminuzione del numero delle cellule mucipare calciformi, deputate alla secrezione della componente mucinica della lacrima<sup>6</sup>. A livello dell'epitelio corneale, è stato osservato che a seguito di un trattamento protratto per una settimana con conservanti a base di ammonio quaternario, le cellule epiteliali corneali già mostravano la scomparsa dei caratteristici microvilli e delle giunzioni serrate. Clinicamente, l'uso cronico di queste sostanze provoca cheratite puntata superficiale e cheratite tossica, fibrosi, iperemia congiuntivale e flogosi. L'infiammazione e la conseguente disfunzione lacrimale appaiono, nei pazienti glaucomatosi, già dopo 1 anno dall'inizio del trattamento ipotonizzante cronico, ed è stato osservato che particolari proteine infiammatorie sono maggiormente presenti nelle lacrime dei pazienti glaucomatosi in terapia ipotonizzante cronica<sup>7</sup>. Le patologie iatrogene provocate dall'uso cronico dei colliri sono quindi causa di peggioramento della qualità della vita del paziente<sup>8</sup>, riduzione della aderenza alla terapia cronica<sup>9</sup>, con conseguente perdita dell'efficacia terapeutica ed aumento della spesa sanitaria. Infatti, la comparsa di patologie legate alla superficie oculare può esser causa di un cattivo controllo della pressione intraoculare, che torna ad essere ben controllata dal paziente nel momento stesso in cui lo stato della superficie oculare viene ad essere normalizzato<sup>10</sup>.

La prevalenza di patologie legate alla superficie oculare nella popolazione glaucomatosa è stato valutato essere di circa il 53%<sup>11</sup>.

L'utilizzo di sostanze naturali che abbiano un effetto lenitivo, senza tuttavia interferire con la terapia ipotonizzante, può essere una valida strategia per contrastare e ridurre gli effetti iatrogeni dovuti all'uso cronico di questi colliri. L'azione irritante iatrogena derivante dall'uso di colliri ipotonizzanti nel glaucoma determina uno stato di infiammazione corneale. A questo proposito ricordiamo le proprietà idratanti dell'acido ialuronico, molto diffuso tra le lacrime artificiali; le proprietà immunomodulatorie dell'Echinacea purpurea<sup>12</sup> e quelle riepitelizzanti degli aminoacidi<sup>13</sup>. L'acido ialuronico ha dimostrato di possedere capacità idratanti e riepitelizzanti, e di essere perciò efficace nel trattamento delle patologie della superficie oculare, soprattutto se utilizzato per tempi prolungati (superiori a 3 mesi)<sup>14</sup>. Inoltre, ha la capacità di proteggere la superficie corneale dalla tossicità indotta da conservanti quali il benzalconio cloruro (BAK)<sup>15</sup>. L'estratto secco di Echinacea purpurea ha proprietà antinfiammatorie ed immunomodulanti, grazie alla componente alchilamidica e all'azione dei derivati dell'acido caffeico come echinacoside, acido cicorico e echinacina B<sup>16,17</sup>. Gli aminoacidi hanno dimostrato di possedere proprietà riepitelizzanti a livello corneale<sup>13</sup>, e di contribuire alla sintesi e al rinnovamento della matrice extracellulare nello stroma, favorendone il rimodellamento e quindi un più pronto recupero

dell'omeostasi tissutale<sup>18,19,20</sup>.

Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di una formulazione oftalmica ad uso topico a base di ialuronato di sodio, estratto secco di Echinacea purpurea ed aminoacidi, confrontandola con una formulazione a base di solo ialuronato sodico, a livello delle alterazioni della superficie corneale di pazienti glaucomatosi in terapia topica cronica ipotonizzante, in modo tale da poter verificare se le componenti aggiunte di Echinacea purpurea ed aminoacidi possano portare ad un ulteriore beneficio.

## METODOLOGIE

Sono stati arruolati 35 pazienti affetti da POAG in trattamento cronico topico ipotonizzante da oltre 3 anni con colliri multidose a base di travoprost, latanoprost e bimatoprost, e conservati con poliquad o con cloruro di benzalconio. I pazienti arruolati al fine di valutarne stato ed evoluzione della sintomatologia a carico della superficie oculare sono stati randomizzati in due gruppi: uno trattato (18 pazienti) ed uno di controllo (17 pazienti). Il gruppo dei trattati ha applicato 1 goccia di collirio a base di ialuronato di sodio, estratto secco di Echinacea purpurea ed aminoacidi (Iridium A; Sooft Italia S.p.A., Montegiorgio, Italia) in ciascun occhio, 4 volte al giorno per 2 mesi, mentre il gruppo di controllo ha applicato, con la stessa modalità, un collirio a base di solo ialuronato di sodio (Blu Yal, Sooft Italia S.p.A., Montegiorgio, Italia). Entrambi i gruppi sono stati

valutati all'arruolamento (tempo T0) e dopo due mesi di trattamento (tempo T1). Ciascun paziente è stato esaminato valutandone segni (BUT e test di Schirmer) e sintomi (iperemia congiuntivale, bruciore, prurito, fotofobia, secchezza oculare e senso di corpo estraneo).

Ai sintomi sono stati assegnati dei valori arbitrari utilizzando una scala numerica da 0 a 4, in cui con 0 si è voluta rappresentare la scomparsa del sintomo, con 1 un marcato miglioramento, con 2 un leggero miglioramento, con 3 un valore invariato rispetto all'arruolamento e 4 un peggioramento. All'arruolamento è stato assegnato il valore standard di 3. L'analisi alla microscopia confocale è stata effettuata con un microscopio Confoscan 4 (Nidek Technologies) equipaggiato con una sonda 40x, utilizzando la tecnica a immersione per una miglior definizione delle immagini, su 16 pazienti con sintomi evidenti di secchezza oculare, di cui 8 in trattamento con solo acido ialuronico, ed 8 con Iridium A. La cornea dei pazienti è stata studiata al confocale al tempo 0 e dopo 30 giorni di applicazione dei colliri. Per ciascun paziente sono state valutate foto stratificate prese in doppia scansione (da epitelio a endotelio e ritorno) ad una distanza l'una dall'altra di circa 15 µm (per evitare di considerare la stessa cellula più di una volta) per un totale di 84 foto acquisite per paziente a ciascun tempo. Le foto acquisite al confocale sono state valutate in termini di densità delle cellule superficiali e basali dell'epitelio corneale; il numero, la tortuosità e la riflettività delle

fig. 1

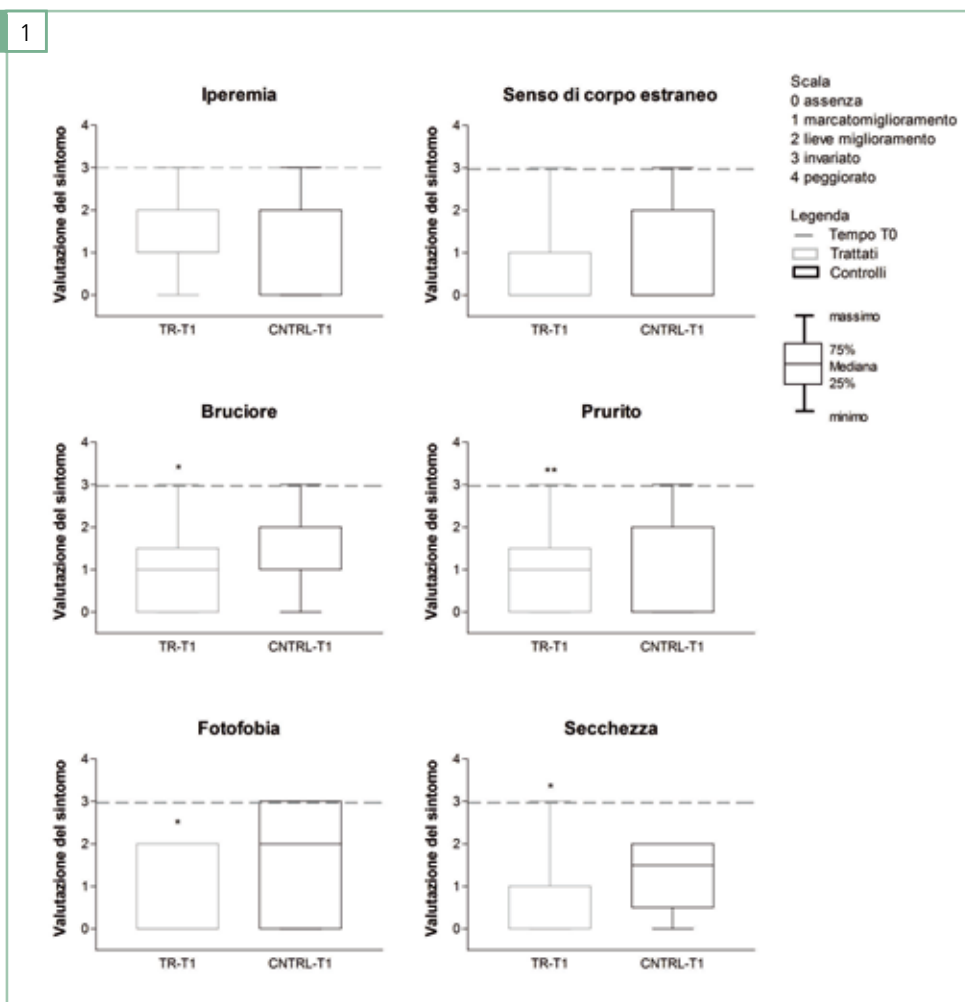


fig. 1

Variatione dei sintomi nei trattati (TR) e controlli (CNTRL) al tempo T0 (linea grigia tratteggiata) e al tempo T1 (box plot). La statistica tra trattati e controlli allo stesso tempo è indicata con: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . Tutti i dati del T1, sia per i controlli che per i trattati, sono stati trovati essere significativamente diversi dal tempo T0 ( $p < 0,05$ ).

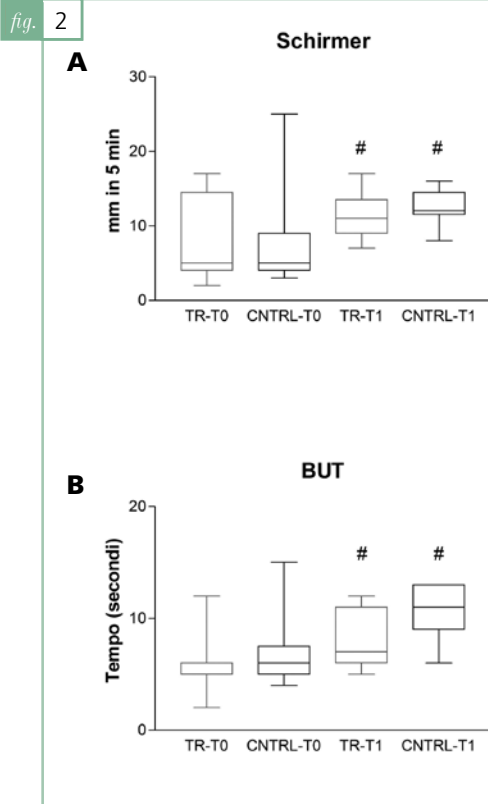
fibre nervose del plesso nervoso sub-epiteliale; la densità dei fibroblasti dello stroma anteriore e dello stroma posteriore e la iper-riflettività dei nuclei delle cellule stromali.

I dati raccolti sono stati analizzati in termini di significatività statistica utilizzando il t-test a due code per dati non appaiati per il confronto di dati ad uno stesso tempo nei due diversi gruppi (controllo e trattato), mentre i dati ottenuti in tempi diversi, ma per uno stesso gruppo, sono stati valutati usando il test ANOVA per dati ripetuti applicando il test di confronto multiplo di Bonferroni nella post analisi. In entrambi i casi, i dati sono stati ritenuti significativamente differenti considerando un valore di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### Studio della sintomatologia

La figura 1 riporta i punteggi ottenuti dai pazienti dopo due mesi di trattamento con solo acido ialuronico o con acido ialuronico, echinacea ed aminoacidi. La linea tratteggiata equivale al punteggio di arruolamento al T0 (pari a 3) ed i box-plot illustrano i miglioramenti ottenuti dai due gruppi di pazienti. È interessante notare che entrambi i gruppi migliorano significativamente rispetto al T0 (ANOVA per misurazioni ripetute  $p < 0,05$ ), indicando così che già il solo acido ialuronico è efficace nel produrre un miglioramento generale dei sintomi di discomfort oculare che si verificano nei pazienti



affetti da glaucoma che seguono la terapia ipotonizzante. Andando poi a confrontare tra loro i valori ottenuti al tempo T1 per il gruppo dei trattati e quello dei controlli, si osserva che il miglioramento relativo ai sintomi iperemia e senso di corpo estraneo è simile in entrambi i gruppi. Invece, i valori di bruciore ( $p < 0,05$ ), prurito ( $p < 0,01$ ), fotofobia ( $p < 0,05$ ) e secchezza ( $p < 0,05$ ) sono risultati statisticamente inferiori nel gruppo dei trattati rispetto a quello dei controlli. Perciò, a parità di quantità e qualità di acido ialuronico contenuto nelle due formulazioni (entrambe dello stesso produttore), appare che la presenza di estratto di Echinacea purpurea ed aminoacidi migliori l'efficacia lenitiva del collirio nei confronti dei sintomi provocati dall'uso cronico di farmaci topici con conservanti. Rispetto ai segni di disfunzione lacrimale, i risultati del test di Schirmer e del BUT (Fig. 2 A e B

rispettivamente), hanno evidenziato come, partendo da valori comparabili per i due gruppi al tempo T0, l'uso di ciascun collirio per i due mesi di trattamento ha prodotto in entrambi i casi un simile incremento sia dei valori di Schirmer sia di quelli di BUT. È probabile che il tempo di trattamento sia già sufficiente per evidenziare differenze tra i due gruppi a livello dei sintomi (soggettivi), mentre sia ancora troppo breve per verificare una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi a livello di parametri più complessi come il BUT o il turn-over delle lacrime.

### Analisi confocale

L'analisi confocale della cornea consente di valutare la condizione dei suoi tre strati epiteliale, stromale ed endoteliale, nonché delle fibre nervose che li attraversano. I dati dell'analisi confocale per gli occhi trattati con solo ialuronato sodico, sono riportati in tabella 1 mentre quelli ottenuti dal trattamento con il collirio Iridium A sono riportati in tabella 2. I dati indicano che dopo un mese di trattamento, i due gruppi differiscono solo per quanto riguarda lo stato proliferativo dei cheratociti dello stroma posteriore. Ciò è in accordo con altri studi comparativi tra pazienti sani e pazienti affetti da occhio secco, che hanno dimostrato come lo stato infiammatorio associato alla secchezza oculare sia correlato ad un aumento della densità dei fibroblasti dello stroma anteriore e posteriore<sup>18,19,20</sup>. Tale aumento di densità è a sua volta causato dalla presenza di citochine pro-infiammatorie, che inducono la

fig. 2  
Variazione della A) misurazione del test di Schirmer in mm e B) del break up time (BUT) in secondi, per i pazienti nel gruppo dei trattati (TR) ed in quello dei controlli (CNTRL) al tempo basale T0 e dopo 2 mesi di trattamento, T1. # indica una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al T1 rispetto al tempo T0 per lo stesso gruppo di pazienti.

Tabella 1

**Risultati dell'analisi confocale pre e post trattamento con un collirio a base di ialuronato sodico**

ialuronato sodico	T0	(± SD)	T1	(± SD)	P
epitelio densità	1249,33	(72,94)	1262,67	(43,34)	N.S.
numero nervi sub-basali/campo	2,67	(0,87)	2,44	(81,24)	N.S.
tortuosità nervi sub-basali/campo	1,11	(0,33)	1,22	(0,67)	N.S.
stroma ant cheratociti	1065	(22,83)	1049	(18,32)	0,02
stroma ant nuclei reflattivi/campo	1,4	(0,55)	1,4	(0,55)	N.S.
stroma post cheratociti	850,67	(22,43)	852,67	(13,88)	N.S.
stroma post nuclei reflattivi/campo	0,87	(0,52)	0,47	(0,52)	N.S.
Intero stroma cheratociti	936,4	(108,3)	931,2	(98,4)	N.S.

Tabella 2

**Risultati dell'analisi confocale pre e post trattamento con un collirio a base di ialuronato sodico, Echinacea purpurea ed aminoacidi**

Iridium A	T0	(± SD)	T1	(± SD)	P
epitelio densità	1209,6	(73,46)	1223,2	(59,56)	N.S.
numero nervi sub-basali/campo	2,56	(1,24)	3,44	(1,13)	N.S.
tortuosità nervi sub-basali/campo	1	(0,5)	0,78	(0,67)	N.S.
stroma ant cheratociti	1136,8	(37,6)	1110,2	(61,8)	0,01
stroma ant nuclei reflattivi/campo	2,72	(0,89)	2,2	(0,82)	N.S.
stroma post cheratociti	870,2	(42,88)	830	(34,58)	<0,0001
stroma post nuclei reflattivi/campo	1,9	(1,12)	1,5	(1,1)	N.S.
Intero stroma cheratociti	1003,5	(139,8)	970,1	(149,3)	<0,0001

proliferazione dei fibroblasti, che alla microscopia confocale mostrano una più marcata rifrangenza (Fig. 3). Nel gruppo dei pazienti trattati si osserva che la presenza di Echinacea purpurea ed aminoacidi nella formulazione testata porta ad una riduzione della densità dei fibroblasti stromali, in maniera statisticamente maggiore rispetto ad i valori ottenuti dall'uso del solo ialuronato sodico, sia nella interezza dello stroma (rispettivamente  $p < 0,0001$  e N.S.), e principalmente poi a livello della sua porzione posteriore (rispettivamente  $p < 0,0001$  e N.S.). Poiché la produzione di citochine infiammatorie avviene nello strato epiteliale della cornea infiammata, i risultati ottenuti sono compatibili con l'ipotesi che esista un gradiente di citochine dall'epitelio alla parte posteriore della cornea;

riducendosi la produzione di citochine infiammatorie nell'epitelio, a causa di una miglior efficacia del trattamento, la scomparsa di queste citochine nello stroma comincerà quindi dalla sua porzione posteriore, dove perciò apparirà più precocemente la normalizzazione dei fibroblasti (Fig. 4).

**CONCLUSIONI**

L'utilizzo cronico di colliri con conservanti, come avviene nei pazienti con POAG, può essere lesivo della superficie oculare e determinarne uno stato infiammatorio, che nel tempo porta allo sviluppo di una disfunzione lacrimale e ad una esacerbazione dei sintomi. È perciò utile e necessaria per prevenire o trattare queste situazioni la somministrazione di colliri in monodose (senza conservanti)

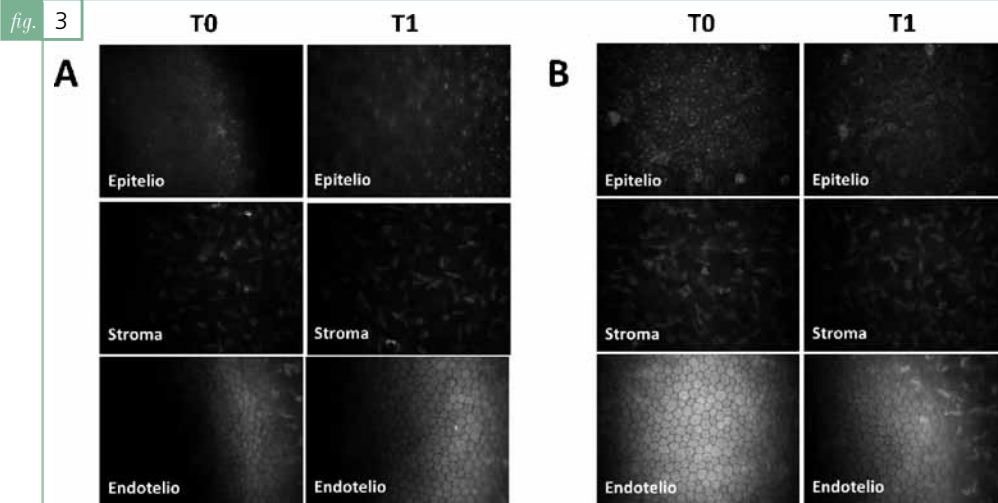


fig. 3  
Fotografie al confocale al tempo T0 e dopo 30 giorni di trattamento: A) un paziente in trattamento con solo ialuronato sodico e B) in trattamento con Iridium A.

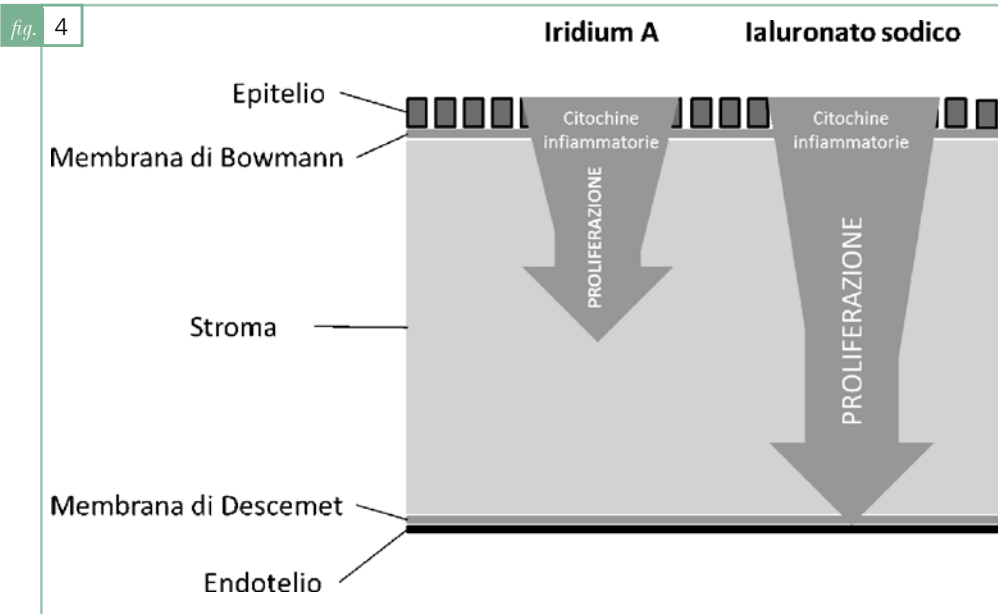


fig. 4  
Il gradiente di citochine infiammatorie prodotte dall'epitelio soggetto a processi infiammatori decresce passando dallo stroma anteriore allo stroma posteriore in maniera differente a seconda che sia stato usato il solo ialuronato sodico o la combinazione con Echinacea purpurea e aminoacidi presenti nell'Iridium A.

che abbiano un effetto lenitivo e possibilmente antinfiammatorio che consenta di attenuare gli eventi pro-infiammatori causati dal trattamento farmacologico. In questo lavoro abbiamo dimostrato come l'associazione di acido ialuronico con estratto di Echinacea purpurea e con aminoacidi abbia un effetto lenitivo superiore al solo acido ialuronico, a causa della presenza di diverse molecole antinfiammatorie e immunomodulanti nell'estratto di Echinacea, e dell'effetto metabolico degli aminoacidi. Sarà interessante andare a valutare gli effetti a più

lungo termine di questo trattamento, per vedere se le differenze col solo acido ialuronico si accentuano ulteriormente, e vedere anche se sia possibile prevenire l'insorgenza della secchezza oculare associando immediatamente al trattamento farmacologico topico anche il collirio con estratto di Echinacea e aminoacidi.

**RIASSUNTO**

*SCOPO: l'uso cronico di farmaci topici ad azione ipotonizzante nei pazienti affetti da glaucoma, porta*

spesso alla comparsa di alterazioni della superficie oculare che possono influire sulla compliance stessa del paziente. Queste alterazioni sono la conseguenza dell'azione tossica a livello dell'epitelio corneale derivante dalla presenza di conservanti e a volte dal farmaco stesso. Lo scopo di questo studio è stato perciò valutare se l'apporto di componenti naturali quali *Echinacea purpurea* e aminoacidi possa incrementare l'azione lenitiva dello ialuronato sodico in collirio, già noto per le sue proprietà reidratanti della cornea.

**METODI:** trentacinque pazienti affetti da glaucoma sono stati divisi in 2 gruppi (controlli e trattati) ed i segni e sintomi valutati all'arruolamento (T0) e dopo 2 mesi (T1). Lo stato corneale di sedici di questi pazienti è stato anche valutato dopo un mese di trattamento utilizzando la microscopia confocale.

**RISULTATI:** l'analisi dei risultati ha evidenziato che l'uso cronico di un sostituto lacrimale contenente ialuronato sodico porta ad un generale miglioramento dello stato della superficie oculare di pazienti glaucomatosi in terapia ipotonizzante cronica. Il miglioramento è accentuato dalla presenza di sostanze quali *Echinacea purpurea* e aminoacidi, che hanno dimostrato di migliorare significativamente i segni di discomfort oculare quali bruciore, fotofobia e secchezza oculare, nonché di attenuare l'attivazione dei cheratociti dello stroma corneale.

**CONCLUSIONI:** i risultati di questo studio indicano che l'uso cronico di un collirio ad attività idratante, antinfiammatoria e riepitelizzante può essere un valido supporto

nel trattamento e prevenzione dei danni iatrogeni da terapia topica ipotonizzante, contribuendo così ad un miglioramento della qualità della vita del paziente glaucomatoso.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nebbioso M, Evangelista M, Librando A, Di Blasio D, Pescosolido N. *Fixed topical combinations in glaucomatous patients and ocular discomfort*. Expert Opinion on Pharmacotherapy **13**(13): 1829-1835, 2012
2. Rossi G, Pasinetti M, Raimondi G, Ricciardelli, L, Scudeller M, Blini A, Amisano, Bianchi P. *Efficacy and ocular surface tolerability of preservative-free tafluprost 0.0015%: a 6-month, single-blind, observational study on naive ocular hypertension or glaucoma patients*. Expert Opinion on Drug Safety **11**(4): 519-525, 2012
3. O'Hare F, Ghosh S, Lamoureux E, Vajpayee R, Crowston J. *Prevalence of signs and symptoms of ocular surface disease in individuals treated and not treated with glaucoma medication*. Clinical and Experimental Ophthalmology [Epub ahead of print], 2012
4. Baudouin C, Hamard P, Liang H, Creuzot-Garcher C, Bensoussan L, Brignole F. *Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term*. Ophthalmology **111**(12): 2186-2192, 2004
5. Labbé A, Terry O, Brasnu E, Van Went C, Baudouin C. *Tear Film Osmolarity in Patients Treated for Glaucoma or Ocular Hypertension*. Cornea **31**(9): 994-999, 2012
6. Baudouin C, Pisella P, Fillaciern K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Béchetoille A. *Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies*. Ophthalmology **106**(3): 556-563, 1999
7. Wong T, Zhou L, Li J, Tong L, Zhao S, Li X, Yu S, Koh S, Beuerman R. *Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication*. Investigative Ophthalmology and Vision Science **52**(10): 7385-7391, 2011
8. Skalicky S, Goldberg I, McCluskey P. *Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma*. American Journal of Ophthalmology **153**(1): 1-9, 2012
9. Baudouin C, Renard J, Nordmann J, Denis P, Lachkar Y, Sellem E, Rouland J, Jeanbat



- V, Bouée S. *Prevalence and risk factors for ocular surface disease among patients treated over the long term for glaucoma or ocular hypertension*. European Journal of Ophthalmology [Epub ahead of print], 2012
10. Batra R, Taylor R, Mohamed S. *Ocular Surface Disease Exacerbated Glaucoma: Optimizing the Ocular Surface Improves Intraocular Pressure Control*. Journal of Glaucoma [Epub ahead of print], 2012
  11. Garcia-Feijoo J, Roberto Sampaolesi J. *A multicenter evaluation of ocular surface disease prevalence in patients with glaucoma*. Clinical Ophthalmology **6**: 441-446, 2012
  12. Clifford L, Nair M, Rana J, Dewitt D. *Bioactivity of alkamides isolated from Echinacea purpurea (L.) Moench*. Phytomedicine **9**(3): 249-253, 2002
  13. Vinciguerra P, Camesasca F, Ponzin D. *Use of amino acids in refractive surgery*. Journal of Refractive Surgery **18**(3 Suppl), S374-S377, 2002
  14. Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G. *Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye*. British Journal of Ophthalmology **86**(2): 181-184, 2002
  15. Debbasch C, De La Salle S, Brignole F, Rat P, Warnet J, Baudouin C. *Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells*. Investigative Ophthalmology and Vision Science **43**(11), 3409-3415, 2002
  16. ESCOP. *Echinacea purpureae herba (Purple Cornflower Herb)* 1-7, 1999
  17. Capasso F. *Farmacognosia* 2° Edizione, Springer 345-347, 2011
  18. Rusciano D, Meloni M, Bucolo C, Stagni E, La Bruna M. *Effetto degli aminoacidi sulla riepitelizzazione corneale in modelli in vitro e in vivo*. Superficie Oculare **1**: 7, 2009
  19. Favia G, Mariggio M, Maiorano F, Cassano A, Capodiferro S, Ribatti D. *Accelerated wound healing of oral soft tissues and angiogenic effect induced by a pool of aminoacids combined to sodium hyaluronate (AMINOGAM)*. Journal of Biological Regulator and Homeostatic Agents **22**(2): 109-116, 2008
  20. Mariggio M, Cassano A, Vinella A, Vincenti A, Fumarulo R, Lo Muzio L, Maiorano E, Ribatti D, Favia G. *Enhancement of fibroblast proliferation, collagen biosynthesis and production of growth factors as a result of combining sodium hyaluronate and aminoacids*. International Journal of Immunopathology and Pharmacology **22**: 485-492, 2009
  21. Benítez del Castillo JM, Wasfy M, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. *An In Vivo Confocal Masked Study on Corneal Epithelium and Subbasal Nerves in Patients with Dry Eye*. Investigative Ophthalmology & Visual Science **45**(9): 3030-3035, 2004
  22. Oliveira-Soto L, Nathan E. *Morphology of Corneal Nerves Using Confocal Microscopy*. Cornea **20**(4), 374-384, 2001
  23. Villani E, Galimberti D, Viola F, Mapelli C, Ratiglia R. *The Cornea in Sjögren's Syndrome: An In Vivo Confocal Study*. Investigative Ophthalmology & Visual Science **48**(5): 2017-2022, 2007