

## STUDIO MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO DELLE ALTERAZIONI DELLA SUPERFICIE OCULARE INDOTTE DAL TRATTAMENTO TOPICO CON ANALOGHI DELLE PROSTAGLANDINE

Loredana ARRICO, Luigi COLELLA, Lucia RESTIVO, Francesca Romana PESCI

Dipartimento Testa-Collo, UOC Oftalmologia C - Dir. Prof. Paola Pivetti Pezzi  
Policlinico Umberto I, Università degli Studi di Roma "Sapienza"

ABSTRACT

**Purpose:** To study ocular surface changes induced by topical treatment with prostaglandin analogs containing benzalkonium chloride (BAC).

**Methods:** Fifteen patients (15 males; mean age: 43,6 ± 8,8 years) with unilateral ocular hypertension (intraocular pressure, IOP >20mmHg) that never undergone therapy were included in the study. All patients were treated with Latanoprost containing BAC in ocular hypertension affected eye and received BAC only in the contralateral eye. Control group consisted of 15 rights eyes of healthy volunteers. Schirmer test, tear Break-up time (BUT) and cytofluorimetric analysis to detect the expression Class II histocompatibility antigen, HLA-DR were performed in all the patients before treatment (T0) and after 3 months (T3).

**Results:** Schirmer and BUT test mean values at time T0 were similar in all groups, and they were lower at the time T3 in treated groups (P<0,001). The cytofluorimetric analysis at T0 showed a lack of expression of HLA-DR molecules in all the group, while only treated patients at the time T3 showed HLA-DR

molecules in conjunctival cells. The average percentage of HLA-DR molecules expressed in eyes treated with BAC was greater than those treated with latanoprost+BAC (45,23 ± 12,2 and 19,54 ± 5,9 respectively; P<0,001). The mean fluorescence intensity (MFI) of conjunctival cells treated with only BAC was greater than those treated with latanoprost+BAC (46,63 ± 24,21 and 17,35 ± 15,54 respectively; P=0,008).

**Conclusions:** The lack of expression at T0 of HLA-DR molecules in both ocular hypertension affected eye and in normal contralateral eye excludes a pathogenetic role of ocular hypertension in different expression of class II histocompatibility antigen. The BAC produces subclinical changes in tear film as confirmed by the increased expression of HLA-DR molecules after three months of use. The lower expression of HLA-DR in the eyes treated with latanoprost and BAC suggests a potential protective effect of prostaglandin analogues against BAC toxicity on conjunctival cells.

*Ottica fisiopat 2011; XVI: 153-162*

153

### INTRODUZIONE E OBIETTIVO

Nei pazienti affetti da glaucoma, l'irritazione e l'arrossamento oculare rappresentano un frequente corteo sintomatologico che spesso limita l'impiego dei colliri. Alcuni autori hanno osservato una riduzione delle cellule calciformi dopo uso topico prolungato di farmaci beta-bloccanti<sup>1,2</sup>, o un danno cellulare dopo esposizione in vitro ad isopropyl unoprostone, una prostaglandina F2- $\alpha$ <sup>3</sup>. Gli effetti collaterali dei farmaci antiglaucomatosi possono arrivare fino alla congiuntivite cicatriziale farmaco-indotta, una condizione anato-

clinica identica al pemfigoide cicatriziale<sup>4</sup>.

La flogosi reattiva e la propensione alla fibrosi in corso di terapia antiglaucomatosa sono convalidate dall'osservazione dell'espressione d'antigeni d'istocompatibilità di tipo II sulle cellule congiuntivali<sup>5</sup>. In questo studio abbiamo valutato, mediante indagini cliniche e citofluorimetriche, le alterazioni della superficie oculare indotte da una prostaglandina, in un gruppo di pazienti affetti da ipertensione oculare non ancora in trattamento topico con farmaci antiglaucomatosi. In parallelo si è voluto studiare il

### AUTORE CORRISPONDENTE:

Francesca Romana Pesci  
viale del Policlinico, 155  
Policlinico Umberto I,  
Oftalmologia C  
06-49975351  
00161 Roma

### PAROLE CHIAVE:

glaucoma, analoghi delle prostaglandine, benzalconio cloruro (BAC), citofluorimetria.

### KEY WORDS:

Glaucoma, prostaglandin analogs, benzalkonium chloride (BAC), cytofluorimetric analysis.

ruolo dei conservanti, in particolare il benzalconio cloruro (BAC), nella reazione infiammatoria farmacologica indotta.

### MATERIALI E METODI

Presso il Centro Glaucoma del Dipartimento di Scienze Oftalmologiche dell'Università degli Studi di Roma "Sapienza", sono stati selezionati 15 soggetti di sesso maschile di età compresa tra i 25 ed i 55 anni (media  $43,6 \pm 8,8$  anni), affetti da ipertensione oculare monolaterale (pressione oculare, IOP  $>20$  mmHg). Ciascun paziente ha aderito allo studio mediante consenso informato conforme ai principi di Helsinki. Sono stati inclusi nello studio pazienti con diagnosi iniziale d'ipertensione oculare monolaterale mai sottoposti a terapia locale ipotonizzante. Tali pazienti non avevano subito interventi chirurgici per patologie oculari concomitanti e non erano affetti da patologie sistemiche croniche. Sono stati invece esclusi dalla ricerca i soggetti con difetti refrattivi superiori alle tre diottrie e coloro che facevano uso di lenti a contatto. I valori pressori sono stati rilevati mediante tonometria ad applanazione secondo Goldmann in tre diversi momenti della giornata (h 8, 12, 16) (valore medio di IOP  $=22,26$  mmHg  $\pm 1,09$ ). I pazienti sono anche risultati positivi nell'occhio affetto al test di provocazione con ibopamina. Per convalidare il sospetto d'ipertensione oculare ogni paziente è stato sottoposto a pachimetria corneale ad ultrasuoni, al fine di misurarne lo spessore (valori medi

degli occhi con ipertensione =  $523,06$  mm  $\pm 7,85$ ). L'esame perimetrico computerizzato (Humphrey 30-2 con test di soglia) e l'esame perimetrico a duplicazione di frequenza (Frequency Doubling Technology, FDT) hanno infine rilevato difetti della sensibilità retinica compatibili con una condizione di neuropatia ottica glaucomatosa iniziale. Il gruppo di controllo normale, non sottoposto a terapia, era costituito da 15 soggetti volontari di età sovrapponibile a quella dei pazienti in oggetto. I pazienti ipertesi sono stati sottoposti de novo a trattamento con preparati oftalmici topici a base di un derivato della prostaglandina PGE<sub>2</sub>; in particolare sono stati sottoposti ad instillazione una volta al giorno di Latanoprost allo 0,005% (Xalatan® 0,005% collirio soluzione, Pfizer), contenente benzalconio cloruro (BAC) allo 0,02% nell'occhio con ipertensione oculare ed a instillazione di una soluzione commerciale a base di BAC allo 0,01% due volte al giorno nell'occhio controlaterale (Sguardi® collirio, Farmigea). È stata eseguita un'accurata valutazione clinico-strumentale della superficie oculare di entrambi gli occhi mediante esame biomicroscopico alla lampada a fessura prima dell'inizio del trattamento (T<sub>0</sub>) ed a distanza di 3 mesi (T<sub>3</sub>). In particolare al tempo T<sub>0</sub> e al tempo T<sub>3</sub> sono state valutate le alterazioni congiuntivali (iperemia), corneali (cheratopatia puntata) e iridee (pigmentazione). In ogni paziente sono stati eseguiti test per la valutazione lacrimale (Schirmer test e Break up time).

La citofluorimetria è una metodica

per l'analisi citologica qualitativa che sfruttando l'attività di specifici anticorpi monoclonali, riesce a separare in una sospensione eterogenea diverse sottopopolazioni di cellule con una purezza superiore al 95%. A tale scopo è stato eseguito un prelievo per spazzolamento con Cytobrush (Cytobrush®; Medscand, Malmö, Sweden: SCS International, Genova) della congiuntiva bulbare temporale in entrambi gli occhi (uno in trattamento con Latanoprost e BAC e l'altro con solo BAC) nei due tempi di analisi T0 e T3, al fine di rilevare l'espressione dell'antigene di istocompatibilità di classe II HLA-DR. Come controllo negativo sono stati utilizzati spazzolati congiuntivali ottenuti nei soggetti volontari sani e processati nel medesimo modo dei campioni in esame. I campioni citologici sono stati sciacquati in PBS (phosphate buffered saline) e risospesi in tampone contenente 1% BSA (bovine serum albumin), divisi ciascuno in due aliquote, incubate per 30 minuti a 4°C con anticorpo monoclonale murino (Bra 22 – Santa Cruz Biotchnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), specifico per le molecole HLA-DR umane o con IgG1 murine non immuni (Dakopatts, Danimarca), che rappresentano l'isotipo di controllo. Dopo lavaggio con PBS-BSA, tutte le cellule sono state incubate di nuovo per 30 minuti a 4°C con un siero di coniglio policlonale specifico per le immunoglobuline murine e coniugato con FITC (Fluoresceina isotiocianato) (Dako). In ultimo tutti i campioni sono stati sciacquati con

PBS-BSA, onde allontanare l'eccesso di anticorpi coniugati con FITC, risospesi in PBS-BSA e analizzati in un citofluorimetro Epics XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Per ogni anticorpo studiato sono state acquisite almeno 3500 cellule congiuntivali su di un istogramma biparametrico, avente come parametri il "side scatter" ed il "forward scatter", espressione rispettivamente, della grandezza e della granulosità cellulare. Entrambi i parametri sono stati acquisiti in modo lineare. Una finestra analitica è stata posta intorno alla popolazione cellulare più numerosa ed omogenea, in modo da escludere i frammenti cellulari. Di tale popolazione cellulare è stato ottenuto un istogramma della fluorescenza su scala logaritmica (LFL-1), indicativo del numero delle cellule in funzione dell'intensità di fluorescenza. Il livello più alto di intensità di fluorescenza ottenuto per l'anticorpo di controllo non immune, era considerato quale limite della fluorescenza di base non specifica e, quindi, limite minimo di positività dell'anticorpo specifico per le molecole di HLA-DR. I risultati per ogni singolo occhio trattato sono stati espressi in termini di percentuale di cellule positive e di intensità media di fluorescenza (MFI). Tutte le analisi citofluorimetriche sono state condotte in modo cieco riguardo al trattamento ed alle caratteristiche del paziente. L'analisi statistica è stata effettuata mediante test t di Student e sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $P < 0,05$ .

**Tabella 1****Valori medi al tempo T0 nei tre diversi gruppi di studio**

VALORI MEDI AL TEMPO T0	CONTROLLI	LATANOPROST	BAC
Pachimetria corneale ( $\mu\text{m}$ )	531,53 $\pm$ 10,69	523,06 $\pm$ 7,85	528,8 $\pm$ 11,07
Pressione oculare (mmHg)	14,6 $\pm$ 1,29	22,33 $\pm$ 1,32	17,30 $\pm$ 1,25
Schirmer Test (mm)	18 $\pm$ 2,39	17,87 $\pm$ 2,72	18,38 $\pm$ 3,30
BUT (sec)	12,4 $\pm$ 0,82	12,71 $\pm$ 1,32	12,92 $\pm$ 1,49

**Tabella 2****Valori medi al tempo T3 confrontati col tempo T0**

VALORI MEDI AL TEMPO T0 e T3	LATANOPROST		P	BAC		P
	T0	T3		T0	T3	
Pressione oculare (mmHg)	22,33 $\pm$ 1,32	<b>14,77 <math>\pm</math> 1,16</b>	-	17,30 $\pm$ 1,25	<b>16,69 <math>\pm</math> 1,10</b>	-
Schirmer Test (mm)	17,87 $\pm$ 2,72	<b>13,54 <math>\pm</math> 2,63</b>	<0,001	18,38 $\pm$ 3,30	<b>12,23 <math>\pm</math> 2,61</b>	<0,001
BUT (sec)	12,71 $\pm$ 1,32	<b>10,15 <math>\pm</math> 1,62</b>	<0,001	12,92 $\pm$ 1,49	<b>9,85 <math>\pm</math> 1,77</b>	<0,001

**Tabella 3****Valori medi al tempo T3 confrontati nei due gruppi**

VALORI MEDI AL TEMPO T3	LATANOPROST	BAC	P
Schirmer Test (mm)	<b>13,54 <math>\pm</math> 2,63</b>	<b>12,23 <math>\pm</math> 2,61</b>	0,19
BUT (sec)	<b>10,15 <math>\pm</math> 1,62</b>	<b>9,85 <math>\pm</math> 1,77</b>	0,64

## RISULTATI

I risultati ottenuti sono relativi a 14 pazienti. Un paziente infatti è stato perso durante il follow-up. Nella tabella 1 sono descritti i valori medi di pachimetria (m), pressione oculare (IOP, mmHg), Schirmer test (mm) e BUT (secondi) riscontrati al tempo T0 per i tre gruppi di studio (gruppo di controllo, occhi da trattare con Latanoprost e occhi da trattare con BAC). I valori ottenuti sono da considerare nei limiti della norma per tutti e tre i gruppi, eccezion fatta per il valore medio di IOP del gruppo Latanoprost, condizione necessaria per il reclutamento nel campione oggetto di studio (IOP >20 mmHg). Nella tabella 2 sono indicati i valori medi di IOP, test di Schirmer e BUT riscontrati negli occhi trattati con Latanoprost e con BAC nei

due tempi di analisi: prima dell'inizio del trattamento (T0) e a distanza di tre mesi (T3). Dai valori riportati si evince una netta riduzione dei valori di pressione media dopo l'inizio del trattamento con Latanoprost. Tali valori, che alla prima osservazione risultavano al di sopra della norma, hanno subito, dopo instillazione di Latanoprost, una netta riduzione verso valori normali. In entrambi i gruppi analizzati (Latanoprost e BAC) si è riscontrata inoltre una significativa riduzione dei valori medi dello Schirmer test e del BUT al tempo T3 rispetto al tempo T0 (P<0,001). Nel gruppo trattato con solo BAC i valori medi dello Schirmer Test e del BUT al tempo T3 sono risultati lievemente più bassi rispetto al gruppo trattato con Latanoprost ma non in modo significativo (P=0,19; P=0,64 rispettivamente) (Tab. 3). I valori medi

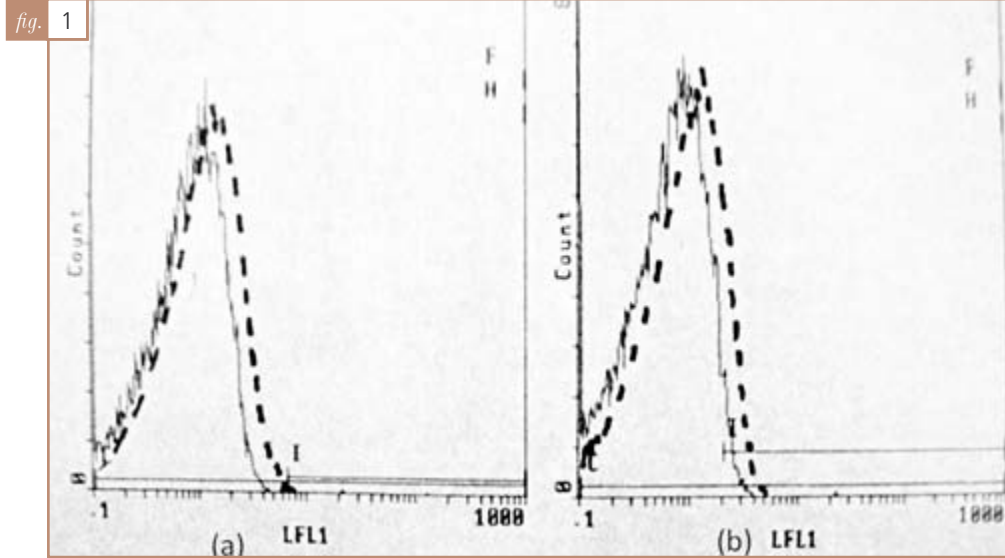


fig. 1  
Intensità di fluorescenza delle cellule congiuntivali di occhi di volontari sani trattate con Ab anti HLA-DR (a) e con l'anticorpo secondario da solo (b).

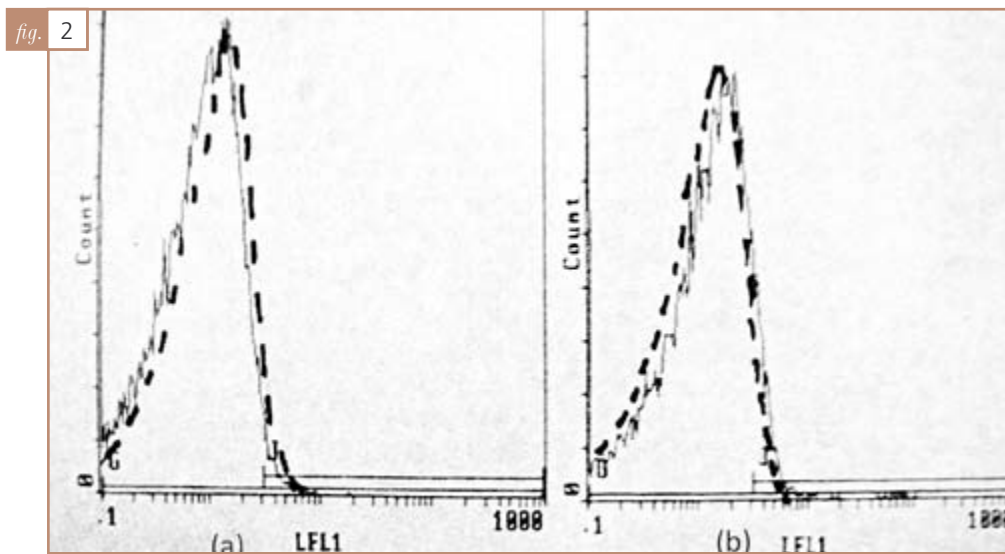
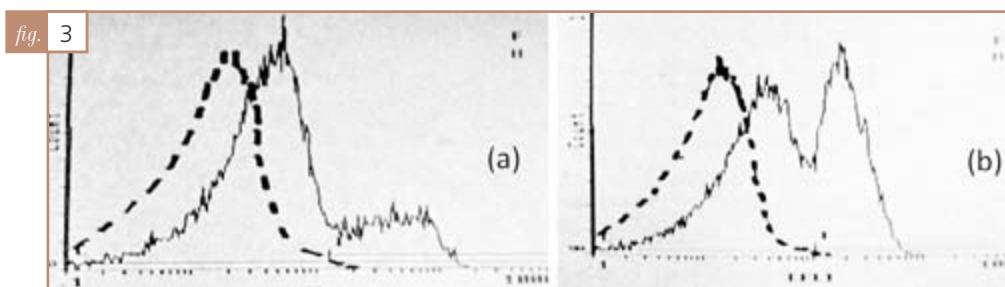


fig. 2  
Intensità di fluorescenza delle cellule congiuntivali degli occhi con ipertensione oculare trattate con Ab anti HLA-DR (a) e con l'anticorpo da solo (b).

osservati sono comunque ai limiti inferiori del range di normalità o lievemente ridotti, ma non francamente patologici. All'esame alla lampada a fessura al tempo T3 infine, non è stata riscontrata, in nessuno degli occhi in esame, la presenza di iperemia congiuntivale, né segni di cheratopatia puntata, né di aumento della pigmentazione iridea. L'analisi citofluorimetrica delle cellule congiuntivali di volontari sani, trattate con anticorpi anti HLA-DR, ha dato luogo ad un'intensità di fluorescenza del tutto sovrapponibile a quella emessa dalle stesse cellule trattate solo con l'anticorpo

secondario (controllo negativo ottenuto mediante omissione dell'anticorpo primario anti-HLA-DR) (Fig. 1). Questo risultato indica che le molecole HLA-DR sono scarsamente o non espresse sulla membrana plasmatica delle cellule in esame. Risultati analoghi ai precedenti sono stati ottenuti nell'analisi delle cellule prelevate dalla congiuntiva di entrambi gli occhi dei soggetti in esame al tempo T0, dimostrando che la condizione d'ipertensione oculare di per sé non comporta una diversa espressione di molecole di HLA-DR (Fig. 2). I risultati rilevati al T3 apparivano, per


**Tabella 4**
**Media delle percentuali di cellule positive per HLA-DR**

+ HLA-DR	LATANOPROST	BAC	P
Media %	<b>19,54 ± 5,9</b>	<b>45,23 ± 12,2</b>	<b>&lt;0,001</b>

**Tabella 5**
**Media dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle popolazioni**

MFI	LATANOPROST	BAC	P
MEDIA	<b>17,35 ± 15,54</b>	<b>46,63 ± 24,21</b>	<b>0,0008</b>

**fig. 3**

Intensità di fluorescenza delle cellule congiuntivali degli occhi trattati con Latanoprost+BAC (a) e solo BAC (b) al tempo T3.

contro, completamente differenti, in quanto l'impiego di ambedue i colliri (Latanoprost e BAC) ha causato una positivizzazione delle molecole di HLA-DR nelle cellule congiuntivali (Fig. 3). La media delle percentuali di cellule trattate con BAC risultate positive per l'espressione di molecole HLA-DR è risultata significativamente maggiore rispetto alla media percentuale di cellule prelevate dagli occhi trattati con Latanoprost + BAC ( $45,23 \pm 12,2$  e  $19,54 \pm 5,9$  rispettivamente;  $P < 0,01$ ) (Tab. 4). Inoltre anche la media d'intensità di fluorescenza (MFI) delle popolazioni cellulari degli occhi trattati con BAC è risultata statisticamente più alta rispetto a quella osservata nelle popolazioni cellulari degli occhi trattati con Latanoprost + BAC ( $46,63 \pm 24,21$  e  $17,35 \pm 15,54$  rispettivamente;  $P = 0,0008$ ) (Tab. 5).

## DISCUSSIONE

L'utilizzo cronico di farmaci topici ipotonizzanti nei pazienti affetti da glaucoma è spesso causa di discomfort oculare con conseguente irritazione e instabilità del film lacrimale tali da peggiorare la tolleranza alla terapia. Dai risultati della nostra analisi clinica è stata evidenziata una diminuzione dei valori medi allo Schirmer test e al BUT sia negli occhi in trattamento con Latanoprost che negli occhi in trattamento con solo BAC. I valori rilevati dopo i tre mesi di trattamento sono risultati comunque nei limiti della norma o lievemente ridotti tali da non essere in grado di causare una condizione di discomfort (fastidio, sensazione di corpo estraneo) né segni clinici evidenti di occhio secco. È tuttavia noto che l'iperemia congiuntivale associata

al trattamento topico con analoghi delle prostaglandine si manifesta nella prima settimana di terapia, raggiungendo l'apice nel secondo giorno e riducendosi d'intensità dopo la prima settimana<sup>6,7</sup>. Nel periodo compreso tra 1 e 6 mesi dall'inizio della terapia, la superficie oculare ritorna all'aspetto normale. Pertanto l'assenza di iperemia nei nostri pazienti è giustificata dal fatto che il protocollo prevedeva controlli a distanza di tre mesi. Inoltre come già evidenziato da altri autori, il fatto che l'instillazione di BAC (la cui azione tossica sull'epitelio è ben dimostrata<sup>8,9</sup>), non abbia causato nel tempo di studio una chiara evidenza di iperemia congiuntivale, conferma il carattere subclinico della tossicità e della conseguente infiammazione della superficie oculare a contatto con il conservante<sup>10,11</sup>. La presenza di una flogosi subclinica è inoltre avvalorata dall'espressione nei nostri pazienti dell'HLA-DR al tempo T3. L'HLA-DR è una molecola del complesso maggiore d'istocompatibilità normalmente espressa sulle cellule immunitarie presentanti l'antigene (macrofagi, cellule di Langerhans, linfociti B e T attivati). Nel tessuto congiuntivale sano l'espressione di questo antigene è ristretta alle cellule di Langerhans situate nello stroma e nell'epitelio della congiuntiva. Nel caso di reazioni infiammatorie e/o immunitarie l'HLA-DR è espresso anche dalle cellule epiteliali congiuntivali divenendo così un vero e proprio marcatore di flogosi<sup>12</sup>. I nostri risultati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica, relativa all'espressione di molecole HLA-DR sulla membrana plasmatica delle

cellule congiuntivali di volontari sani, indicano che esse sono scarsamente espresse. Questo dato, conferma quanto riportato in letteratura, ovvero che le cellule congiuntivali esprimono in condizioni di normalità solamente gli antigeni d'istocompatibilità di classe I e non quelli di classe II<sup>13,14</sup>. L'analisi citofluorimetrica dell'espressione dell'HLA-DR nei soggetti con ipertensione oculare monolaterale ha fornito importanti spunti di riflessione.

La sovrapponibilità dei risultati nei due occhi dello stesso paziente (uno con ipertensione oculare e l'altro normale) al tempo T0, ovvero l'assenza o la tenue espressione dell'antigene di istocompatibilità di classe II, indica che la condizione d'ipertensione oculare, di per sé, non comporta una diversa espressione di molecole di HLA-DR. L'HLA-DR è invece maggiormente espresso sulle cellule congiuntivali dei campioni ottenuti al tempo T3. Interessante è inoltre il dato relativo alla minore espressione dell'HLA-DR al T3 nell'occhio in terapia con Latanoprost, rispetto a quello venuto a contatto con solo BAC. Poiché il BAC è contenuto anche nel collirio antiglaucomatoso ad una dose unitaria doppia rispetto al solo BAC (somministrato nello studio per due volte al giorno), ci si sarebbe aspettati un risultato contrario. Tali risultati sono in accordo con precedenti studi citofluorimetrici. Infatti Cvenkel<sup>15</sup> ha evidenziato come la somministrazione, per un periodo di tempo  $\geq 3$  mesi, di un farmaco antiglaucomatoso topico conservato con BAC, indipendentemente

dal principio attivo, induce un significativo grado di infiammazione subclinica, rilevata dall'aumentata espressione di HLA-DR sulle cellule epiteliali della congiuntiva. Pisella<sup>16</sup> ha invece dimostrato come soluzioni di Latanoprost e timololo contenenti BAC determinano sulle cellule congiuntivali effetti proinfiammatori e proapoptotici maggiori rispetto a soluzioni di timololo non contenente BAC. Nello stesso lavoro si evidenzia inoltre una minore tossicità del Latanoprost rispetto al timololo conservato ed una minore tossicità di entrambi i farmaci rispetto al solo utilizzo di BAC. Questi risultati suggeriscono un potenziale effetto protettivo degli analoghi della prostaglandine e in misura minore del timololo contro la tossicità del BAC sulle cellule congiuntivali<sup>16</sup>. L'effetto antiapoptotico degli analoghi delle prostaglandine, che sarebbe alla base della loro azione protettiva sulla tossicità del BAC, è inoltre avvalorato da uno studio condotto in vitro su linee cellulari derivate dall'epitelio congiuntivale e trattate sia con soluzioni di Latanoprost, travoprost e bimatoprost, contenenti concentrazioni di BAC corrispondenti a quelle presenti nelle soluzioni commerciali (rispettivamente 0,02%, 0,015%, 0,005%) sia con soluzioni di solo BAC alle varie concentrazioni<sup>17</sup>. Si è evidenziato infatti un incremento dei marcatori infiammatori direttamente correlabile alla concentrazione di BAC, sia nei gruppi trattati con analoghi delle prostaglandine che nei gruppi trattati con il solo BAC. È stata inoltre rilevata un'induzione dell'apoptosi cellulare da parte del Latanoprost e travoprost

minore rispetto a quella indotta dalle corrispondenti concentrazioni di BAC da solo. Il meccanismo protettivo del Latanoprost e del travoprost contro gli effetti proapoptotici di BAC sulle cellule epiteliali della congiuntiva potrebbe derivare dalle loro proprietà antiossidanti. Studi recenti hanno riscontrato l'assenza di citotossicità indotta dall'utilizzo di una nuova formulazione di travoprost non contenente BAC<sup>18,19</sup>. Per tale ragione sono in corso di sperimentazione nuove formulazioni di analoghi delle prostaglandine privi di conservante per testarne la maggiore tollerabilità rispetto alle forme attualmente in commercio<sup>20</sup>. Recentemente è stata introdotta anche in Italia la prima prostaglandina in formulazione monodose senza conservanti (tafluprost)<sup>21,22</sup>.

In conclusione il nostro studio, pur avendo un numero limitato di pazienti arruolati, appare innovativo in quanto costituisce uno dei pochi studi condotti con tecniche citofluorimetriche in vivo e non su linee cellulari di congiuntiva. In accordo con quanto riportato in letteratura la nostra analisi pone il BAC, presente nelle soluzioni commerciali degli analoghi delle prostaglandine, come principale responsabile di una flogosi subclinica, evidenziata mediante la citofluorimetria a flusso e pertanto alla base degli effetti collaterali riscontrabili nei soggetti che fanno uso di colliri antiglaucوماتosi per lunghi periodi. In futuro sono auspicabili nuovi studi con più ampie casistiche per poter confermare i dati rilevati in considerazione del possibile risvolto terapeutico. Poiché infatti il glaucoma



è una condizione patologica che costringe il paziente ad una terapia cronica, si potrebbe delineare un diverso approccio terapeutico basato esclusivamente sull'utilizzo di formulazioni prive di conservanti<sup>2,3</sup>.

### CONCLUSIONE

La mancata espressione al tempo T0 di molecole HLA-DR negli occhi dello stesso paziente indica che la condizione d'ipertensione oculare, non comporta di per sé una diversa espressione dell'antigene di istocompatibilità di classe II. Il BAC può produrre alterazioni subcliniche del film lacrimale confermate dalla maggiore espressione delle molecole HLA-DR dopo tre mesi dall'inizio del trattamento. La minore espressione di HLA DR negli occhi trattati con Latanoprost e BAC suggerisce un potenziale effetto protettivo degli analoghi della prostaglandine contro la tossicità del BAC sulle cellule congiuntivali.

### RIASSUNTO

*Scopo del lavoro: analizzare mediante indagini cliniche e citofluorimetriche le alterazioni della superficie oculare indotte dal trattamento topico con farmaci antiglaucomatosi derivati dalle prostaglandine e contenenti benzalconio cloruro (BAC).*

*Metodi: per lo studio sono stati selezionati 15 pazienti (15 maschi; età media  $43,6 \pm 8,8$  anni) con diagnosi iniziale d'ipertensione oculare monolaterale (pressione oculare, IOP > 20 mmHg) mai sottoposti a terapia locale ipotonizzante. Il gruppo*

*di controllo era costituito da 15 volontari sani di età sovrapponibile a quella dei pazienti in oggetto. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a trattamento con Latanoprost contenente BAC nell'occhio con ipertensione oculare ed a trattamento con una soluzione a base di solo BAC nell'occhio controlaterale. Per ogni paziente, prima dell'inizio del trattamento (tempo T0) ed a distanza di 3 mesi (tempo T3) sono stati effettuati test per la valutazione lacrimale (Schirmer test e Break up time) e un'analisi citofluorimetrica per rilevare l'espressione dell'antigene di istocompatibilità di classe II, HLA-DR. Risultati: in entrambi i gruppi trattati (Latanoprost e/o BAC) si è riscontrata una riduzione dei valori medi dello Schirmer test e del BUT rispetto al tempo T0 ( $P < 0,001$ ). I risultati citofluorimetrici al tempo T0 hanno evidenziato una mancata espressione delle molecole HLA-DR sia nei controlli che nei pazienti trattati mentre al tempo T3 solo i pazienti trattati con Latanoprost e/o BAC hanno mostrato una positivizzazione delle molecole HLA-DR nelle cellule congiuntivali. La media delle percentuali di cellule, prelevate dagli occhi trattati con BAC, positive per l'espressione di molecole HLA-DR, è risultata significativamente maggiore rispetto a quella osservata nelle cellule trattate con formulazione Latanoprost+BAC ( $45,23 \pm 12,2$  e  $19,54 \pm 5,9$  rispettivamente;  $P < 0,001$ ). Inoltre la media dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle popolazioni cellulari congiuntivali trattate con solo BAC è risultata maggiore rispetto a quelle trattate con Latanoprost+BAC ( $46,63 \pm 24,21$  e  $17,35 \pm 15,54$  rispettivamente;  $P = 0,0008$ ).*

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Herreras JM, Pastor JC, Calonge M, Asensio VM. *Ocular surface alteration after long-term treatment with an antiglaucomatous drug*. *Ophthalmology* **99**(7): 1082-1088, 1992
- 2 Wróblewska E. *Goblet cells density of bulbar conjunctiva after long-term topical antiglaucoma agents*. *Klin Oczna* **101**(1): 45-47, 1999
- 3 Oda M, Takahashi N. *Cell injury effect of isopropyl unoprostone, an antiglaucoma agent, on cultured human conjunctival cells*. *J Ocul Pharmacol Ther* **15**(6): 489-496, 1999
- 4 Liesegang TJ. *Conjunctival changes associated with glaucoma therapy: implications for the external disease consultant and the treatment of glaucoma*. *Cornea* **17**(6): 574-583, 1998
- 5 Ihan A, Cvenkel B. *Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in glaucoma patients and its influence on the outcome of filtration surgery*. *Br J Ophthalmol* **84**(6): 648-650, 2000
- 6 Abelson MB, Mroz M, Rosner SA, Dirks MS, Hirabayashi D. *Multicenter, open-label evaluation of hyperemia associated with use of bimatoprost in adults with open-angle glaucoma or ocular hypertension*. *Adv Ther* **20**(1): 1-13, 2003
- 7 Stewart WC, Kolker AE, Stewart JA, Leech J, Jackson AL. *Conjunctival hyperemia in healthy subjects after short-term dosing with Latanoprost, bimatoprost, and travoprost*. *Am J Ophthalmol* **135**(3): 314-320, 2003
- 8 De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C. *Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(3): 619-630, 1999
- 9 Walker TD. *Benzalkonium toxicity*. *Clin Experiment Ophthalmol* **32**(2): 180-184, 2004
- 10 Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA. *Adverse effects of topical antiglaucoma medication. II. The outcome of filtration surgery*. *Arch Ophthalmol* **112**(11): 1446-1454, 1994
- 11 Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. *Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(3): 642-652, 2001
- 12 Rodrigues Mde L, Felipe Crosta DP, Soares CP, Deghaide NH, Duarte R, Sakamoto FS, Furtado JM, Paula JS, Donadi EA, Soares EG. *Immunohistochemical expression of HLA-DR in the conjunctiva of patients under topical prostaglandin analogs treatment*. *J Glaucoma* **18**(3): 197-200, 2009
- 13 Baudouin C, Fredj-Reygrobelle D, Gastaud P, Lapalus P. *HLA-DR and DQ distribution in normal human ocular structures*. *Curr Eye Res* **7**(9): 903-911, 1988
- 14 Tsubota K, Fukagawa K, Fujihara T, Shimmura S, Saito I, Saito K, Takeuchi T. *Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(1): 28-34, 1999
- 15 Cvenkel B, Ihan A. *Ocular surface changes induced by topical antiglaucoma monotherapy*. *Ophthalmologica* **216**(3): 175-179, 2002
- 16 Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, Baudouin C. *Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of Latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(5): 1360-1368, 2004
- 17 Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. *In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of Latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(12): 4594-4599, 2005
- 18 Baudouin C, Riancho L, Warnet JM, Brignole F. *In vitro studies of antiglaucomatous prostaglandin analogues: travoprost with and without benzalkonium chloride and preserved Latanoprost*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(9): 4123-4128, 2007
- 19 Mirza SK, Johnson SM. *Efficacy and patient tolerability of travoprost BAK-free solution in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension*. *Clin Ophthalmol* **9**: 877-888, 2010
- 20 Uusitalo H, Chen E, Pfeiffer N, Brignole-Baudouin F, Kaarniranta K, Leino M, Puska P, Palmgren E, Hamacher T, Hofmann G, Petzold G, Richter U, Riedel T, Winter M, Ropo A. *Switching from a preserved to a preservative-free prostaglandin preparation in topical glaucoma medication*. *Acta Ophthalmol* **88**(3): 329-336, 2010
- 21 Hommer A, Mohammed Ramez O, Burchert M, Kimmich F. *IOP-lowering efficacy and tolerability of preservative-free tafluprost 0.0015% among patients with ocular hypertension or glaucoma*. *Curr Med Res Opin* **26**(8): 1905-1913, 2010
- 22 Uusitalo H, Pillunat LE, Ropo A. *Efficacy and safety of tafluprost 0.0015% versus Latanoprost 0.005% eye drops in open-angle glaucoma and ocular hypertension: 24-month results of a randomized, double-masked phase III study*. *Phase III Study Investigators*. *Acta Ophthalmol* **88**(1): 12-19, 2010
- 23 Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. *Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly*. *Prog Retin Eye Res* **29**(4): 312-334, 2010