

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

Fabrizio Zeri*, Luigi Lupelli*o

* Istituto Superiore di Scienze Optometriche, Roma
o Istituto De Amicis, Scuola di Ottica, Roma

Sommario

L'endotelio corneale dei portatori di lenti a contatto è esposto a modificazioni morfologiche, transitorie (blebs) e durature (polimegatismo, polimorfismo e riduzione della densità cellulare). Quelle durature sono quelle che il contattologo dovrebbe monitorare, al fine di evitare successivi scompensi nel controllo della deturgescenza corneale. Comunque appare evidente che rimangono tuttora contrastanti le opinioni sulla gravità di tale reazione; per esempio il polimegatismo è considerato da alcuni un semplice fenomeno di adattamento volumetrico e, inoltre, contrastanti sono le opinioni sul ruolo che può avere l'uso delle lac sulla riduzione della densità cellulare. Nel lavoro vengono esaminati, oltre ai principi della microscopia speculare, tecnica clinica che ci consente di analizzare in vivo la morfologia del mosaico endoteliale, i principali microscopi speculari a contatto, non a contatto e computerizzati e i criteri di valutazione quantitativa dell'endotelio attraverso l'analisi morfometrica.

Maggiore enfasi verrà posta sulle procedure di più semplice esecuzione che possono essere utilizzate anche nella pratica contattologica quotidiana.

Parole chiave

endotelio corneale, blebs, polimegatismo, polimorfismo, microscopia speculare.

Introduzione

Gli effetti indotti sulla cornea dall'uso di lenti a contatto (lac) hanno occupato un capitolo consistente degli studi contattologici del passato ma dell'endotelio ci si è cominciati ad interessare soltanto alla fine degli anni '70. Prima di allora si dava per scontato che le reazioni endoteliali fossero poco probabili. L'endotelio era ritenuto metabolicamente indipendente dagli avvenimenti dell'occhio esterno. Troppo lontano quel sottile strato monocellulare dal "luogo del delitto". Per cui solo l'epitelio e lo strato meritavano le luci della ribalta.

Ricevuto il 10 aprile 1999

Accettato per la pubblicazione il 10 giugno 1999

Che le luci, e anche il microscopio, dovessero necessariamente essere focalizzati anche sull'endotelio è coscienza relativamente recente ed il merito principale va attribuito all'optometria accademica australiana che ha fatto, e fa tuttora, scuola in materia di reazioni endoteliali indotte dalle lenti a contatto.



Fig. 1

Sezione corneale nella porzione più interna. Sono chiaramente visibili nella parte alta della foto, lo strato, con le caratteristiche lamelle di collagene regolarmente orientate, seguito in basso da uno strato amorfo regolare, la Descemet, su cui si adagia l'endotelio. Di quest'ultimo compaiono alcune cellule con i relativi nuclei. Da *Ophthalmic Anatomy and Hystology, Education Interactive, 1994.*

Richiami anatomo-fisiologici

L'endotelio corneale, che è lo strato più interno della cornea a diretto contatto con l'umore acqueo, è un tessuto monostratificato dello spessore di circa 5 μm , (fig. 1).

La superficie anteriore, denominata anche superficie basale, è a contatto con la lamina limitante posteriore o membrana di Descemet, che è formata dalle secrezioni dell'endotelio stesso. L'endotelio gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della deturgescenza corneale e quindi della sua trasparenza, attraverso meccanismi di tipo attivo. Harris, Norquidquist e Davson¹² furono i primi, attraverso un blocco ipotermico del metabolismo corneale che causava edema, a dimostrare l'esistenza di questi meccanismi attivi e Maurice iden-

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

tificò nell'endotelio (esattamente negli spazi laterali tra le cellule) la sede di pompe attive³. Queste pompe trasporterebbero ioni bicarbonato in camera anteriore, producendo per osmosi un flusso idrico nella stessa direzione⁴.

Alla nascita lo strato endoteliale ha un aspetto regolare ed uniforme ed è composto da circa 500.000 cellule con una densità di 4.000-4.500 cell/mm²^{5,6}.

Tali cellule sono tutte approssimativamente della stessa dimensione e forma esagonale (fig. 2) e non presentano mitosi.

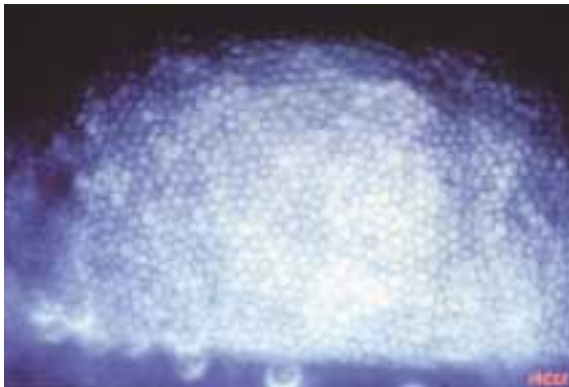


Fig. 2
Mosaico endoteliale osservato ad alto ingrandimento usando la tecnica di riflessione speculare.
(Per gentile concessione di Holden e Zantos, IACLE Slide Collection)

Con l'invecchiamento l'endotelio va incontro ad alcune modifiche quantitative e qualitative⁷⁻⁹:

- diminuzione del numero di cellule fino a livelli di densità di 1000-2000 cell/mm² (fig. 3);

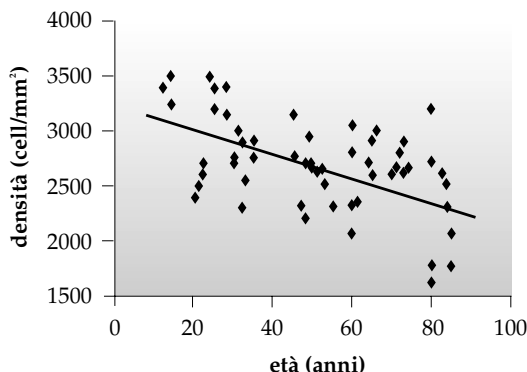


Fig. 3
Variazione della densità endoteliale in funzione dell'età
(ridisegnato da Yee e coll., 1988⁷).

- aumento di cellule con superfici di diversa grandezza (polimegatismo);

- alcune cellule assumono una forma diversa da quella esagonale (polimorfismo o pleomorfismo).

L'effetto delle lenti a contatto

La letteratura scientifica ha messo ampiamente in evidenza come l'utilizzo delle lenti a contatto produce nel mosaico endoteliale delle alterazioni transitorie di carattere edematoso, le "blebs", e durature di carattere morfologico, polimegatismo e polimorfismo⁹⁻²⁹.

Contrastanti sono invece le opinioni sull'effetto che l'uso delle lenti a contatto provochi alterazioni nella densità delle cellule endoteliali¹⁰⁻²². Sono stati anche descritti un caso singolo di guttata endoteliale in associazione a sindrome da occhio rosso legato ad uso permanente²³, e casi di rugiada endoteliale, caratterizzata da presenza sulla superficie interna endoteliale di precipitati di materiale infiammatorio di provenienza uveale²⁴⁻²⁵.

Di seguito verranno esaminate soltanto le modificazioni endoteliali più rilevanti dal punto di vista contattologico e cioè: blebs, polimegatismo, polimorfismo e riduzione della densità cellulare. Comunque, va sottolineato che ogni variazione del mosaico endoteliale attribuita all'uso delle lenti a contatto va considerata nel contesto delle normali variazioni causate dall'invecchiamento.

Alterazioni endoteliali transitorie: "blebs"

Nel 1977, per primi Zantos e Holden osservarono delle modificazioni transitorie nell'aspetto dell'endotelio²⁶. La loro descrizione parla di piccole zone scure, non riflettenti, visibili nel mosaico endoteliale (fig.4), che

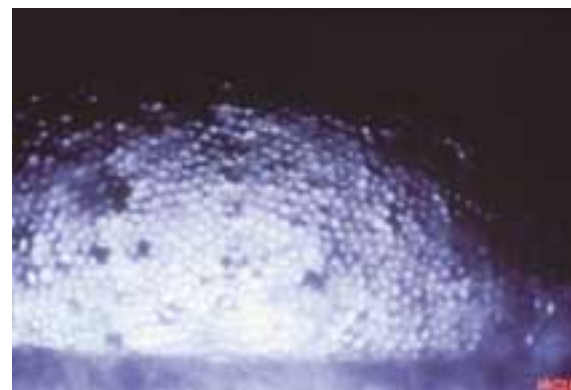


Fig. 4
Mosaico endoteliale osservato ad alto ingrandimento usando la tecnica di riflessione speculare. Dopo 15 minuti di uso di lac moribide sono evidenti le blebs.
(Per gentile concessione di Holden e Zantos, IACLE Slide Collection)

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

compaiono circa 10 minuti dopo l'inserimento nell'occhio, di pazienti non portatori, di una lente a contatto morbida notevolmente spessa (0.45mm).

Queste zone scure, denominate blebs, si manifestano in maniera caratteristica: aumentano, con l'uso della lac, in numero e grandezza fino al raggiungimento di un picco massimo in 20-30 minuti, dopo il quale cominciano a diminuire fino a raggiungere un livello minimo dopo 45-50 minuti. Tale livello rimane costante per il restante periodo d'uso delle lenti.

La rimozione della lente determina la totale scomparsa del fenomeno²⁷⁻²⁸.

Le blebs rappresentano un edema localizzato che interessa una o più cellule endoteliali, che rigonfiandosi divengono sporgenti nell'acqueo (fig.5).

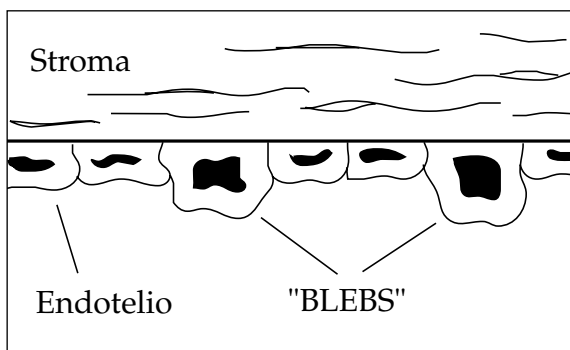


Fig. 5
Rappresentazione grafica dell'edema di singole cellule dell'endotelio. (In Lupelli e coll. 1988).

Il rigonfiamento si manifesta soltanto nella parte posteriore della cellula poiché è proprio dalla parte dell'acqueo che la cellula trova meno resistenza, mentre nella parte anteriore la membrana di Descemet è in grado di contenerne l'espansione.

All'osservazione in riflessione speculare queste cellule non riflettono la luce come le altre ma la deviano in direzione diversa dalla direzione di osservazione^{14,29}.

Le blebs sarebbero indotte dall'uso sia di lac morbide³⁰, che rigide³¹, presumibilmente nella totalità dei portatori, anche se sono evidenti larghe variazioni individuali. L'entità della risposta è inversamente proporzionale al valore di trasmissibilità (Dk/t) della lente a contatto³².

L'applicazione di lac in gomma siliconica non induce alcuna reazione edematosa dell'endotelio¹⁵. Nei soggetti operati di cheratoplastica la reazione edematosa della cornea risulta essere nettamente inferiore. È stato ipotizzato che ciò possa dipendere da una riduzione dello stress cellulare, dovuto alla ridotta sensibilità corneale che caratterizza tali soggetti³³.

Eziologia

Tali modificazioni endoteliali sono causate, oltre che dall'uso di lenti a contatto, anche da altri fattori quali anossia atmosferica sperimentale³¹, chiusura palpebrale³⁴, ed esposizione ad anidride carbonica³². Fattore comune presente in queste condizioni è l'acidificazione dell'ambiente endoteliale. Il fattore primario scatenante è rappresentato da una diminuzione del pH stromale dovuto alla produzione di anidride carbonica e acido lattico da parte della glicolisi attivata dal ridotto apporto di ossigeno atmosferico (ad occhi aperti) o della congiuntiva tarsale (ad occhi chiusi)³². Altro fattore coadiuvante è rappresentato dal rallentamento del flusso di anidride carbonica dall'interno della cornea verso l'atmosfera, che comporta accumulo della stessa (ipercapnia). Attraverso delle misure dirette del pH endoteliale Bonanno e Polse³⁵ hanno successivamente confermato il ruolo causale dell'ipossia e dell'ipercapnia. Infatti le loro ricerche evidenziano che le variazioni di pH endoteliale sono in accordo con il ciclo temporale che caratterizza la comparsa e la scomparsa delle blebs ed inoltre i valori di acidificazione endoteliale sono tali da giustificare un'alterazione funzionale delle cellule endoteliali.

Rilievo clinico

L'edema endoteliale è un fenomeno di notevole interesse dal punto di vista fisiologico ma molto meno dal punto di vista clinico poiché:

- è presente in quasi tutti i portatori di lenti a contatto anche se è quantitativamente diverso. Tale fatto determina una ridotta motivazione del contattologo ad esaminare il corso, poiché la reazione è prevedibile;
- dopo la rimozione delle lenti a contatto il fenomeno scompare in pochi minuti²⁷;
- il fenomeno decresce con il protrarsi dell'uso delle lac²⁷;
- non è noto se la diversa manifestazione del fenomeno sia da considerarsi di per sé positiva o negativa; infatti la presenza di un numero molto ridotto di blebs è stata anche interpretata come una indicazione che l'endotelio ha ridotto la sua capacità di rispondere ai cambiamenti che avvengono nell'ambiente in cui si trova.

Alterazioni endoteliali durature: polimegatismo e polimorfismo

Il polimegatismo dell'endotelio corneale è un feno-

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

meno fisiologico presente in tutti gli esseri umani per effetto dell'invecchiamento. L'utilizzo di lac può, però, avere l'effetto di accelerare il processo. I primi ad arrivare a tale conclusione furono Schoessler e Woloschak¹⁰. L'incremento del polimegatismo è stato confermato per portatori da lungo tempo di lac in PMMA^{11,17,36-37}, morbide³⁷ e nell'uso permanente di lac morbide^{12,33}, mentre non è stato trovato un incremento nei portatori di lenti in gomma siliconica³⁹. Per polimegatismo si intende l'aumento di cellule con area di dimensioni diverse l'una dall'altra (fig. 6 e 7), e si esprime in termine di coefficiente di variazione dell'area cellulare (CV): rapporto tra deviazione standard e superficie cellulare media¹⁴.



Fig. 6
Polimegatismo in una paziente di 25 anni ipermetrope di sf+10.50D, portatrice di lac rigide in CAB+EVA da 12 anni.

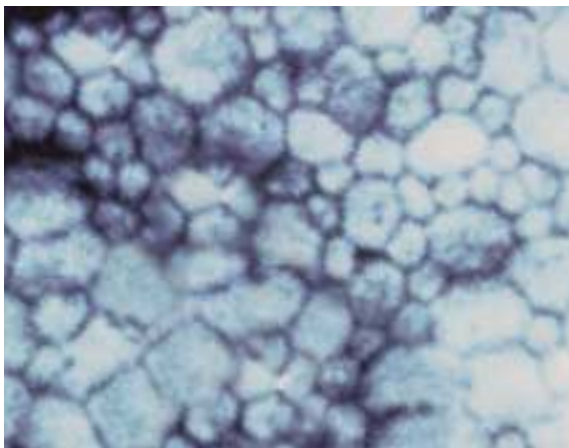


Fig. 7
Polimegatismo e polimorfismo.
Nel mosaico endoteliale è possibile riscontrare la presenza di cellule di forma non esagonale per esempio quadrata o pentagonale evidenza di polimorfismo.

Il valore medio del CV in un giovane adulto sano e non portatore di lac è di circa 0.307^{12,14}.

Una scala graduale di polimegatismo a 5 livelli di CV, utile per una rapida classificazione clinica, è stata proposta dal gruppo di Holden del Cornea and Contact Lens Research Unit di Sydney¹³ (fig.8).

CCLRU POLYMEGETHISM SCALE					
GRADE	0	1	2	3	4
DESCRIPTION:	Less than normal	Normal	Slight	Moderate	Severe
COEFFICIENT OF VARIATION (CV)	0.14	0.25	0.38	0.47	0.66
MEAN AGE:	15	30	45	60	80

Fig. 8
Scala graduata del polimegatismo del CCLRU.
(Per gentile concessione di Holden IACLE Slide Collection)

Dalla stessa istituzione è stata riproposta una scala fotografica semiquantitativa del polimegatismo con l'intento di standardizzare i livelli di gravità in 4 gruppi, come per altre reazioni indotte dall'uso di lac. Un ulteriore tentativo di classificazione semiquantitativa in 5 livelli di gravità è stata proposta da Efron e Tarrant utilizzando disegni invece che immagini fotografiche⁴⁰. Bergmanson⁴¹, dopo avere eseguito una ricerca ultrastrutturale su cornee di sei portatori di lenti a contatto, è giunto alla conclusione che ad una variazione morfologica sulla superficie più interna dell'endotelio (che è quella visualizzata con i microscopi speculari) non corrisponderebbe una variazione di volume. Tale tesi lo porta a considerare il polimegatismo una variazione endoteliale fisiologica. L'affermazione viene anche supportata dal fatto che sebbene l'endotelio di tali portatori appariva avere un edema intracellulare ed infracellulare, per il resto le cellule mostravano di essere in salute con organelli che non avevano subito alcun danno.

L'incremento di polimegatismo con l'utilizzo di lac, di cui poco sopra si sono citati i principali lavori sperimentali coinvolti, può essere dunque riletto alla luce del CV:

- uso giornaliero di lac in PMMA per periodi molto lunghi. Il CV aumenta tra il 31%¹¹ e l'82%¹⁷;
- uso di lac morbide da molti anni.
Il CV aumenta del 27%³⁷.

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

- uso a permanenza di lac morbide.
Aumento tra il 22%¹² e il 51%⁴².

Per polimorfismo si intende invece, un aumento della percentuale di cellule con forma diversa da quella esagonale e quindi una diminuzione della percentuale delle esagonali. Si esprime o con il coefficiente di forma o con la percentuale di cellule esagonali (esagonalità)¹⁴ (fig.7)

Il coefficiente di forma o di figura (CF) indica il grado di vicinanza tra la forma della cellula e una circonferenza, è uguale a $4\pi A/P^2$, dove A è l'area della cellula in μ^2 , e P il perimetro in μ ¹⁴. La circonferenza ha CF=1, l'esagono ha CF=0.907. L'esagonalità normale in un gruppo di soggetti non portatori è sopra il 60%¹⁶.

Rao e coll.⁴³ e Orsborn e Schoessler⁴⁴ hanno dimostrato che c'è un rapporto inversamente proporzionale tra CV e percentuale di esagoni (fig. 9); l'aumentare del polimegatismo quindi è correlato strettamente ad un aumento del polimorfismo. Questo è vero sia per le variazioni morfologiche e fisiologiche legate all'età⁴⁵, sia per le variazioni indotte dalle lac^{10,44}.

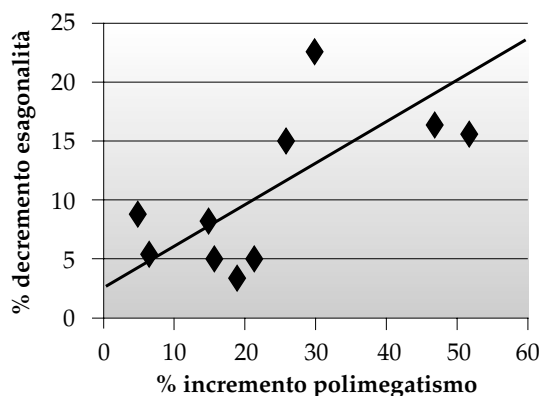


Fig. 9
Rapporto tra polimegatismo e polimorfismo
(ridisegnato da Orsborn, Schoessler, 1988³⁸)

Eziologia

Il meccanismo più probabile che causa il polimegatismo e il polimorfismo, nei portatori di lac, è il decremento di ossigeno a livello corneale^{12,46}. L'attivazione della glicolisi causata da ipossia, durante l'uso di lac, comporterebbe produzione di acido lattico e anidride carbonica con conseguente decremento del pH della cornea. Come già visto precedentemente alcuni autori ritengono responsabile dei cambiamenti morfologici transitori dell'endotelio, leggi blebs, questo shift del pH³². Il polimegatismo potrebbe rappresentare dunque

una risposta a lungo termine dello stesso processo che causa le blebs^{14,44}. La conferma di questa ipotesi viene dai risultati dei lavori che dimostrano come il polimegatismo e il polimorfismo dipendono dalla trasmissibilità di ossigeno³⁹ e dalla modalità d'uso (quotidiana, flessibile, prolungata) delle lac¹⁰.

Alimigil e coll. (1990)⁴⁷ hanno mostrato che il polimorfismo è presente in portatori di lenti morbide ma non nei portatori di lenti rigide gas-permeabili in CAB. È interessante, alla fine di questa revisione delle modificazioni morfologiche endoteliali durature, riportare i dati di una ricerca che evidenzia disparità regionali morfologiche. Infatti, MacRae e Matsuda⁴⁸ hanno individuato cambiamenti morfometrici e di densità tra zone centrali (modificazioni maggiori) e medio-periferiche dell'endotelio corneale in seguito all'uso di lac in PMMA. Nella zona centrale vi sarebbe una diminuzione di densità (16.8%), di esagonalità (20.6%) e un aumento del coefficiente di variazione (29.3%)¹⁶, in contrasto con l'omogeneità riscontrata nei non portatori⁷. MacRae e Matsuda¹⁶, ipotizzano diverse spiegazioni:

- 1) una lente rigida, nonostante i movimenti con l'ammiccamento e i movimenti oculari, copre costantemente una zona centrale di 1-3 mm⁴⁹. Si può pensare quindi che, sotto quella zona, si determini il tasso più alto di ipossia corneale con le conseguenze più gravi per l'endotelio;
- 2) le cellule endoteliali centrali potrebbero migrare verso la periferia. Tale tesi è però contraria ad un precedente studio⁵⁰;
- 3) le cellule endoteliali medio-periferiche potrebbero proliferare⁵¹, anche se, alla luce delle conoscenze attuali di fisiologia, tale possibilità sembra la più improbabile.

Sintomi soggettivi

L'accertamento della presenza di polimegatismo viene effettuata per mezzo dell'osservazione diretta con le procedure di microscopia speculare che verranno descritte più avanti; ma quali disturbi accusa un portatore di lenti a contatto con polimegatismo?

La risposta non è così semplice quanto appare. Infatti l'unica condizione che è stata posta in relazione con il polimegatismo è la "sindrome da esaurimento corneale"⁵².

Caratteristica comune ai soggetti affetti da tale sindrome, che possono manifestare una drastica riduzione della tolleranza delle lenti, fotofobia, e visione moderatamente ridotta, associata ad edema stromale, è di aver utilizzato per diversi anni lenti a contatto con un inadeguato valore di Dk/t.

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

Sebbene il polimegatismo endoteliale sia presente in tutti i soggetti con sindrome da esaurimento corneale, il legame tra le due condizioni non è stato tuttora provato.

Ridotta densità cellulare

L'endotelio umano è caratterizzato dall'assenza del fenomeno della mitosi e da una progressiva riduzione della densità con l'aumentare dell'età (fig. 3). Va sottolineato che le variazioni individuali sono comunque notevoli⁵³. Per alcuni autori il tasso di declino della densità cellulare sembra diminuire con l'età^{7,54-55}, per altri ciò non accade e la densità cellulare diminuisce in modo lineare con l'avanzare degli anni⁵⁶⁻⁵⁷. Comunque nonostante la densità cellulare si riduca con l'invecchiamento l'endotelio rimane compatto, riuscendo così a coprire interamente la membrana di Descemet e mantenere le sue normali funzioni. Ciò perché le cellule endoteliali hanno la possibilità di assottigliarsi e contemporaneamente di allargarsi. Se la densità cellulare scende al di sotto di 400-700 cell/mm² le normali funzioni di regolazione dello stato di deturgescenza dello stroma non potranno essere mantenute⁵⁸. Se l'uso di lenti a contatto può causare la riduzione della densità cellulare è problema tuttora dibattuto. Fino in tempi relativamente recenti l'uso di lac non era considerato avere alcun effetto significativo¹⁰⁻¹⁸. Comunque negli ultimi anni stanno aumentando gli studi in cui si dimostra che l'uso di lenti a contatto può contribuire al decremento della densità cellulare superiore a quella fisiologicamente legata all'età¹⁹⁻²². Anche in questo caso sia gli anni di utilizzazione, che il tipo di lac, sembrano avere un ruolo determinante. Infatti, la riduzione di densità cellulare, al di sotto dei valori fisiologici, è causata soltanto da lenti in PMMA o idrogel con basso Dk/t. Nello studio di Setala e coll.²² la media della densità cellulare tra il gruppo dei portatori di lac e quello di controllo non differiva in maniera significativa. Comunque soltanto un soggetto del gruppo di controllo aveva una densità cellulare bassa, mentre il 20% degli occhi nel gruppo dei portatori di lenti a contatto aveva una densità inferiore a 2500 cell/mm² e l'8% aveva una densità inferiore a 2000 cell/mm². Un evidente legame tra modificazioni morfologiche dell'endotelio e riduzione della densità può essere facilmente individuato se si considerano il polimegatismo ed il polimorfismo delle condizioni che precedono la morte della cellula.

Alterazioni endoteliali durature: implicazioni cliniche

A questo punto è necessario cercare di dare una risposta al perché è importante, per chi si occupa di contattologia, tenere sotto controllo l'endotelio dei suoi pazienti.

Per completare la premessa può essere conveniente sottolineare alcuni aspetti che possono avere delle rilevanti ripercussioni cliniche:

- fenomeni di alterazione morfologica endoteliale duratura appena analizzati, non sono né rapidamente, né completamente reversibili con la sospensione d'uso delle lac^{12,15,18};
- il controllo della deturgescenza corneale è peggiore in soggetti con polimegatismo⁵⁹⁻⁶⁰;
- uno strato cellulare polimegatico e polimorfico è più instabile e più suscettibile di stress⁶¹⁻⁶², tanto è vero che lo scompenso endoteliale post chirurgico, leggi cheratite bollosa, è più frequente in soggetti con alterazioni morfologiche cellulari⁶³.

Tali conclusioni sembrano sufficienti a far aprire gli occhi sul fatto che le lac, soprattutto quelle con materiali a più ridotto apporto di ossigeno, possono compromettere la morfologia endoteliale e quindi la salute della cornea stessa, anche se tale influenza risente di una notevole variabilità individuale⁶⁴. Il monitoraggio dell'endotelio è quindi fondamentale anche nella pratica contattologica. Non è sufficiente che una lac morbida abbia una posizione e un movimento adeguati, né che sia confortevole, che la visione sia eccellente, o che la lente sia del tipo a ricambio frequente o infine che essa sia facilmente manipolabile. È necessario anche e soprattutto essere lungimiranti applicando lenti a contatto che trasmettano una sufficiente quantità di ossigeno⁶⁵. Possiamo quindi applicare lac rigide, gas-permeabili che non causano reazioni endoteliali, ma anche lac morbide idrogel facendo attenzione al valore di trasmissibilità. Holden e Mertz hanno messo in rapporto la risposta fisiologica della cornea con il valore di Dk/t delle lac⁶⁶. Per prevenire l'ipossia corneale, nelle ore di veglia, la lac deve avere un Dk/t di almeno $24,1 \times 10^{-9}$ unità. Allora, se facciamo alcuni calcoli, ci rendiamo presto conto che molte lac morbide in commercio, non trasmettono abbastanza ossigeno. Ad esempio, lenti morbide molto diffuse come quelle al 38% di contenuto d'acqua e uno spessore al centro di 0.05 mm sono lenti a rischio. Infatti il Dk/t, se consideriamo una lente di potere sferico di -3.00, è soltanto di 14 unità, se viene preso in considerazione il punto della lente con minore spessore, mentre scende a 12 unità se si considera lo spessore medio della porzione centrale (4mm). È evidente che tale valore scende ancora per lac di potere negativo più elevato o lenti positive⁶⁵.

Oltre a porre attenzione al valore di Dk/t è necessario limitare, eventualmente, la modalità di uso prolungato (notte e giorno), con lac in idrogel convenzionale, al fine

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

di evitare alterazioni endoteliali tali da compromettere a lungo andare, lo stesso utilizzo delle lac, come messo in evidenza dalla Sweeney nella sindrome da esaurimento corneale⁵², o eventuali necessari interventi di chirurgia intraoculare. Meno drastico nei giudizi appare il già citato Bergmanson che afferma che nessuna prova scientifica certa, della perdita della funzione endoteliale in soggetti portatori di lac che mostravano polimegatismo, è stata prodotta, nè è possibile stabilire con certezza se lo sviluppo di polimegatismo in soggetti giovani porterà una destabilizzazione endoteliale negli stessi in età senile⁶⁷.

L'esame dell'endotelio

Per esaminare il mosaico endoteliale non solo è necessario un ingrandimento, ma poichè tali cellule sono trasparenti all'energia luminosa visibile, anche di tecniche particolari.

Le tecniche d'esame possono essere suddivise tra quelle cliniche, con cui si pratica un esame "in vivo" e quelle di laboratorio, con cui si pratica un esame "in vitro" o a carattere istologico. Le tecniche di laboratorio, che hanno lo svantaggio di essere usate per osservare un endotelio in condizioni "innaturali", permettono generalmente un'osservazione con ingrandimenti e risoluzione più elevate. Oltre alla riflessione speculare, per l'esame in vitro, possono essere usate: la microscopia ottica, la microscopia a trasmissione, la microscopia a scansione e la microscopia speculare.

Di seguito vengono analizzate soltanto le procedure in vivo d'interesse clinico.

Come si sviluppa l'osservazione dell'endotelio corneale?

Da due decenni a questa parte lo studio in vivo dell'endotelio corneale non rappresenta più un limite per il clinico che ne è interessato.

Le prime osservazioni dell'endotelio corneale sono probabilmente molto remote, favorite dallo sviluppo della lampada a fessura e dall'uso della riflessione speculare. Vogt nel 1921, nel suo "Atlas des Spaltlampenkoroskopie des Lebender Auges", disegna l'endotelio corneale così come appare all'osservazione in lampada a fessura⁵.

Maurice⁶⁸ è il primo nel 1968 a pubblicare la foto ad alta risoluzione dell'endotelio corneale di coniglio ottenuta con un microscopio speculare a contatto, ed è Laing⁶⁹ a svilupparne la prima versione clinica. Da quel momento, per i microscopi a contatto, è un susseguirsi di innovazioni tecnologiche tese soprattutto ad aumen-

tarne il campo di osservazione e la risoluzione (coni di appianazione alla fluorite⁷⁰, specchio oscillante⁷¹). Parallelamente allo sviluppo dei microscopi speculari a contatto, ottimi risultati nell'osservazione e nella fotografia dell'endotelio corneale si sono ottenuti anche modificando le convenzionali lampade a fessura, o, come nella particolare tecnica messa a punto da Holden e Zantos, utilizzando un adattatore per macchina fotografica su di un oculare ad alti ingrandimenti⁷² (fig.10), oppure aggiungendo, direttamente al gruppo ottico della lampada a fessura, un microscopio speculare non a contatto⁷³ (fig. 11).



Fig. 10
Lampada a fessura Nikon FS-1 equipaggiata per la tecnica Holden-Zantos. (Per gentile concessione di Holden/Zantos, IACLE Slide Collection)



Fig. 11
Lampada a fessura Nikon FS-3 con microscopio endoteliale senza contatto applicato al posto dell'obiettivo del biomicroscopio.

Principio ottico e procedura pratica della microscopia endoteliale

La visualizzazione dell'endotelio effettuata da Vogt con

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

le prime lampade a fessura avveniva utilizzando la tecnica della riflessione speculare. Tale tecnica si realizza quando l'angolo d'incidenza del fascio di luce che proviene dalla lampada, è uguale all'angolo di osservazione del biomicroscopio (fig. 12).



Fig. 12
Riflessione speculare con lampada a fessura a bassi ingrandimenti. Solo quando l'angolo incidente è uguale a quello di osservazione apparirà un riflesso intenso della superficie lacrimale dietro il quale è possibile intravedere la sezione stromale diffusa e successivamente, più luminoso, l'endotelio.

In tal modo si va a "catturare" quella componente del raggio di luce incidente che, nel colpire una superficie di divisione tra due mezzi con indice di rifrazione n_1 e n_2 , viene riflessa.

Tale riflessione è speculare solo se la superficie d'incidenza è liscia e regolare, altrimenti la riflessione sarà diffusa.

A livello corneale le superfici che si prestano bene ad una riflessione speculare sono la superficie corneale esterna (cioè film lacrimale-aria nel caso dei microscopi speculari non a contatto, o epitelio-cono appianante del microscopio a contatto) e la superficie corneale interna, cioè l'interfaccia endotelio-acqueo. Ciò è dovuto sia alla regolarità della superficie che al salto netto di indice tra i mezzi divisi da queste superfici ($n_{\text{aria}}=1.000$, $n_{\text{cornea}}=1.376$, $n_{\text{acqueo e film lacrimale}}=1.336$, $n_{\text{vetro microscopio}}=1.517$)⁷⁰.

Le superfici stromali esterna ed interna danno origine ad una riflessione estremamente diffusa, mentre quelle di divisione tra epitelio e Bowman e tra Descemet ed endotelio non presentano invece dei fenomeni di riflessione consistenti e comunque la quantità di luce riflessa non è neanche calcolabile, perché non sono mai stati indicati i valori d'indice di rifrazione dei 2 strati⁷⁰.

Quando il microscopio speculare si allinea sull'angolo di riflessione sono visibili varie zone.

Secondo Laing è possibile individuarne 4⁷⁴ (fig.13):

- zona 1: molto luminosa, è la riflessione speculare sulla superficie aria-film lacrimale nella microscopia senza contatto o cono-film lacrimale nella microscopia speculare a contatto;
- zona 2: banda nettamente meno luminosa della prima, è la zona di diffusione stromale;
- zona 3: banda discretamente luminosa in cui è possibile individuare il mosaico endoteliale;
- zona 4: banda scura è la zona in cui la luce incidente si "spegne" nell'acqueo.

Questa immagine a 4 bande, tipica della riflessione di una fessura di luce sulla cornea, comporta però nella visualizzazione dell'endotelio diversi problemi:

- il riflesso epiteliale (sarebbe più giusto chiamarlo riflesso lacrimale): la notevole intensità del riflesso della prima superficie corneale (zona 1) offusca il riflesso endoteliale (zona 3)⁷⁵ (vedi fig.12);
- piccolo campo di visualizzazione endoteliale (vedi fig.13);
- la zona stromale crea diffusione della luce peggiorando la qualità del riflesso endoteliale (vedi fig.13).



Fig. 13
Gli strati di Laing appaiono quando si aggiunge il microscopio endoteliale alla lampada a fessura. In questa immagine e nelle successive se ne individuano solo 3, perché la quarta banda scura si perde nel buio della camera anteriore. Sul terzo strato è visibile il mosaico endoteliale.

L'ampiezza e la nitidezza della banda endoteliale sono migliorabili agendo su alcuni fattori, quali l'ampiezza della fessura della luce incidente (fig.14), l'angolo tra il fascio di luce incidente e il fascio di luce riflessa (fig.15), lo spessore corneale artificiale (fig.16), l'indice di refra-

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

zione del mezzo che si trova prima del film lacrimale. L'azione su questi singoli fattori va effettuata con attenzione perché se da una parte è possibile ottenere un miglior risultato, dall'altra, se si superano certi limiti, si può peggiorarlo in un'altra direzione. Quello che va raggiunto è dunque il giusto equilibrio tra luminosità, ampiezza e nitidezza dell'endotelio.

Ampiezza della fessura di luce (fig.14)

Aumentando l'ampiezza della fessura della luce incidente (aumenta l'ampiezza delle zone 1 e 3 si restringe la 2; tale incremento è funzione dello spessore corneale e dell'angolo d'incidenza) aumenta l'ampiezza della banda endoteliale visualizzata.

All'aumento del campo endoteliale corrispondono però l'aumento della zona 1, quindi maggiore riflesso epiteliale e ad un aumento della zona di stroma interferente che disperdendo la luce peggiora la qualità dell'immagine endoteliale^{70,75-77}. La dispersione di luce stromale, può essere parzialmente ridotta con l'utilizzo di un filtro arancio⁷⁸.



Fig. 14
Per effetto dell'aumento dell'ampiezza della fessura, rispetto alla fig.13, aumenta l'ampiezza delle zone 1 e 3 si restringe la zona 2.

Angolo tra il fascio di luce incidente e il fascio di luce riflessa (fig.15)

L'aumento dell'angolo tra parte illuminante e parte osservante della lampada a fessura, ottenibile ovviamente solo nella microscopia senza contatto, ci consente l'attenuazione del riflesso epiteliale, che è più problematico proprio con questi tipi di microscopi, perché la riflessione sulla superficie aria-film lacrimale è di gran lunga superiore a quella riflessa dalla superficie cono-film lacrimale

nella microscopia speculare a contatto^{70,75,79}.

Un altro vantaggio che ci deriva dall'allargamento dell'angolo d'incidenza della luce, a parità di ampiezza della fessura, è l'aumento dell'ampiezza della banda endoteliale visualizzata^{70,75}. L'aumento dell'angolo d'incidenza comporta anche alcuni svantaggi:

- il piano dell'endotelio sarà sempre meno parallelo al piano ottico del microscopio. Tale distorsione prospettica causerà una sovrastima di un eventuale conta cellulare con microscopio speculare senza contatto⁷⁹. Olsen ha calcolato un fattore di correzione di 0.959 che permette di correggere i valori originari⁷⁹. Ricci e coll. hanno indicato la possibilità di un sistema di ripresa decentrabile su di una fessura fotografica, per rendere parallelo il piano del film fotografico a quello endoteliale⁷⁰;
- non tutta la zona endoteliale sarà a fuoco nello stesso modo perché ci saranno distanze diverse tra zone endoteliali diverse e microscopio, che la scarsa profondità di fuoco di un'ottica di forti ingrandimenti non può compensare⁷⁰;



Fig. 15
Aumento dell'ampiezza della zona endoteliale. Ottenuto in questo caso aumentando l'angolo d'incidenza del fascio di luce, rispetto alla posizione con cui è stata ottenuta la fig. 13. Notare la diminuzione dell'intensità del riflesso della prima zona. Utilizzando tale procedura, però, la zona endoteliale sarà sempre meno parallela al piano ottico del microscopio, causando una distorsione prospettica e una diversa messa a fuoco della zona endoteliale.

Spessore corneale (fig.16)

Aumentando artificialmente lo spessore corneale, con l'applicazione di una lac morbida, è possibile spostare il riflesso epiteliale analizzando zone endoteliali più ampie⁷⁰.

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

Svantaggi di tale metodica sono:

- aumentando la fessura di luce utilizzabile senza che zona 1 e 3 si tocchino, grazie ad uno spessore corneale maggiore, aumenta anche la zona di stroma che diffondendo la luce peggiora la nitidezza dell'immagine endoteliale⁷⁶;
- possibile reazione transitoria endoteliale da lac, (blebs), che falsa il quadro clinico del soggetto⁷⁰.



Fig. 16
Microscopia endoteliale effettuata dopo avere applicato una lente a contatto morbida sf+4.50 (la seconda banda dell'immagine), che determinerà un allontanamento delle membrane limitanti della cornea. In tal modo è possibile aumentare la fessura di luce utilizzabile senza che le zone 1 e 3 si tocchino. Tale artificio però aumenta anche la zona centrale di dispersione che contribuirà a deteriorare la nitidezza dell'immagine endoteliale.

Indice di rifrazione del mezzo pre-film lacrimale

Diminuendo la differenza tra indice di rifrazione del mezzo che viene prima del film lacrimale e l'indice stesso delle lacrime possiamo diminuire l'entità del riflesso epiteliale.

Tale possibilità è ovviamente possibile solo nella microscopia a contatto, dove sono stati introdotti dei coni di appianazione wide field alla fluorite, in possesso di un indice di rifrazione più simile a quello del film lacrimale⁷⁰.

Microscopi speculari a contatto, senza contatto, e computerizzati: differenze cliniche

Molto è stato detto fin qui sulla microscopia speculare, è però il caso di aggiungere ancora qualcosa sulle differenze tra i vari tipi di microscopi, soprattutto dal punto di vista clinico.

Microscopi a contatto

I microscopi speculari a contatto sono delle apparecchiature caratterizzate da un'autonomia funzionale completa e non vengono utilizzati insieme ad una lampada a fessura, come vedremo essere invece quelli senza contatto. Sono di solito collegati ad una macchina fotografica o ad una telecamera, che collegata ad una scheda video permette l'acquisizione di un'immagine digitale, successivamente elaborabile con un apposito software⁸⁰. Funzionano sempre sul principio della riflessione speculare, quindi sono in grado di separare la luce incidente da quella riflessa. L'esame prevede una preventiva anestesia topica della cornea. Grazie all'appianazione corneale, l'angolo di riflessione speculare utilizzato è molto piccolo, circa 15°, mentre il campo d'osservazione è molto ampio. L'ingrandimento di questo tipo di microscopi è solitamente molto alto. Le prime osservazioni di Maurice furono fatte a 400x, le prime foto in vivo di Lang a 200x. L'ingrandimento usato determina la grandezza del campo osservato. Una particolare soluzione per visualizzare l'endotelio con i vantaggi di un microscopio speculare a contatto, senza però esserlo, è la lente a contatto di Eisner: una lente a contatto che determina un'appianazione corneale e che va usata con una comune lampada a fessura. Con una lente da 2.2x si trasforma l'ingrandimento di una fessura di 25x in 55x⁷⁸.

Microscopi senza contatto

Dopo le prime osservazioni di Vogt con lampada a fessura, la strada di una visualizzazione endoteliale riprende all'inizio degli anni '70 con procedure prevalentemente a contatto. Solo con qualche anno di ritardo si riapre la strada della microscopia senza contatto con ottimi risultati.

Per microscopio senza contatto si intende oggi, prevalentemente un accessorio per lampada a fessura in grado di fornire un ingrandimento maggiore. Si aggiunge solitamente sulla parte ottica rimuovendo la lente frontale dell'obiettivo^{73,77,81} (fig.11). Questa possibilità di essere aggiunti ad una convenzionale lampada a fessura, ovviamente predisposta, li rende decisamente economici e versatili per un utilizzo di sola osservazione o anche di fotografia, se utilizzati con una fessura fotografica^{73,77}.

L'implicazione clinica, certamente principale, di questi strumenti è che consentono la visualizzazione dell'endotelio senza necessità di appianare la cornea, e quindi di ricorrere ad un anestetico superficiale, eliminando anche i rischi di possibili infezioni crociate o di danno su cornee appena operate (cheratoplastica perforante,

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

estrazione cataratta, cheratotomia radiale), o affette da patologie che ne aumentano la fragilità (cheratocono, degenerazione marginale pellucida)⁷⁰. L'angolo di lavoro tra fessura incidente e microscopio è più ampio che nella microscopia a contatto e può variare per migliorare, entro certi limiti già esposti sopra, la qualità dell'immagine endoteliale. L'entità dell'angolo indicata da vari autori varia tra i 45° e i 60°^{70,76,79}. L'ingrandimento disponibile con questi accessori è più basso che con i microscopi a contatto e può arrivare ad un massimo di circa 240x in osservazione e 32x in fotografia (dati del microscopio endoteliale Nikon per fessura FS-3).

Ovviamente per le caratteristiche ottiche della riflessione speculare non è possibile un'osservazione binoculare dell'endotelio, l'accessorio sarà in corrispondenza quindi di un solo oculare. Va ricordato, come già detto prima, che l'utilizzo di questi strumenti comporta, rispetto a quelli a contatto, una distorsione prospettica in grado di modificare eventuali stime di densità cellulare⁷⁹. L'aspetto più problematico dell'utilizzo di un microscopio endoteliale non a contatto è la notevole difficoltà di esecuzione della tecnica che richiede tempi relativamente lunghi di apprendimento e di perfezionamento.

Microscopi speculari computerizzati

I microscopi speculari computerizzati o automatici sono l'ultimo sviluppo nella visualizzazione dell'endotelio corneale. Sono in genere apparecchi "non contact", sfruttano cioè la riflessione speculare senza ricorrere ad una applanazione. Permettono la visualizzazione di diverse zone corneali, di solito una centrale e quattro periferiche con una buona attendibilità nel visualizzare le stesse zone in successivi controlli. Sono estremamente veloci nel catturare l'immagine e facili da utilizzare, dispongono infatti di un sistema autofocus, questo a tutto vantaggio dell'operatore e del paziente, che non viene abbagliato da una lunga osservazione. Sono automaticamente interfacciati a programmi semi automatici di analisi dell'immagine, che viene prima visualizzata su di un display. Attualmente vengono prodotti e distribuiti sul mercato due microscopi computerizzati, l'SP-1000 della Topcon (fig. 17) e il Noncon Robo sp-8000 della Konan (fig. 18 a-b). Lo svantaggio maggiore di tali apparecchi è nel costo estremamente alto. Landesz e coll.⁸² hanno messo in relazione i dati ottenuti da tre microscopi speculari, ognuno appartenente ad una delle tipologie sopra evidenziate.

Gli autori hanno trovato, tra gli strumenti, differenze significative nella determinazione della media dell'area



Fig. 17
Microscopio speculare computerizzato Topcon Sp-1000.
(Per gentile concessione della Topcon, Italia)



Fig. 18 a
Microscopio speculare computerizzato Konan Sp-8000
(Per gentile concessione della New Tech, Italia)

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto



Fig. 18 b
Display del microscopio.
(Per gentile concessione della New Tech, Italia)

cellulare ma nessuna differenza significativa nei risultati di CV e di esagonalità. Il dato più importante, a nostro avviso, è che ogni strumento mostra un'alta riproducibilità. Comunque gli autori consigliano di non usare in maniera intercambiabile i tre strumenti, specie per finalità di ricerca.

Foto e Video dell'endotelio

Appare chiaro alla luce di quanto detto finora, che una semplice osservazione dell'endotelio corneale non può permetterci una precisa valutazione né qualitativa né tantomeno quantitativa. Tali valutazioni morfologiche richiedono la possibilità di lavorare su di un'immagine statica magari ulteriormente ingrandibile. Ecco perché parallelamente all'osservazione, si sviluppa la fotografia e l'acquisizione video dell'immagine endoteliale, fondamento di tutte le ricerche cliniche viste sopra. La prima versione clinica di Lang del microscopio speculare a contatto è anche fotografica⁶⁹. I microscopi speculari a contatto sono tutti collegati ad una macchina fotografica o ad un video. Per quelli senza contatto si può avere una completa possibilità di documentazione se vengono utilizzati in presenza di una lampada a fessura con partitore ottico. I computerizzati dispongono solo di una acquisizione video. Nello specifico della fotografia endoteliale riportiamo due possibilità realizzate partendo da una comune lampada a fessura:

- la prima, conosciuta come "Tecnica di Holden-Zantos" dal nome dei due ricercatori che l'hanno ideata⁷², consiste nell'utilizzo di una lampada a fessura, in cui la macchina fotografica è connessa all'oculare (fig. 10). L'ingrandimento totale della foto viene portato al livello minimo di visualizzazione delle cellule endoteliali, utilizzando oculari ad alto

ingrandimento (20x). La foto così ottenuta può essere poi ulteriormente ingrandita se fotografata di nuovo con un ingranditore. L'inconveniente della sottoposizione, problema della fotografia in lampada a fessura specie se effettuata dall'oculare, non rappresenta un problema per la tecnica Holden Zantos



Fig. 19
Riflessione speculare dell'endotelio ottenuta utilizzando un duplicatore di focale inserito prima della macchina fotografica.

perché la riflessione speculare produce un'immagine estremamente luminosa⁷⁵.

Holden e Zantos⁷² consigliano pellicole per diapositive Kodachrome 64; alcuni autori riportano l'utilizzo di pellicole ad alta velocità (dia da 400 asa) o pellicole bianco e nero^{77,81}.

- Un'altra possibilità per la fotografia in lampada a fessura è quella di utilizzare un duplicatore di focale inserito prima della macchina fotografica (fig. 19). Tale possibilità è stata usata come ulteriore incremento d'ingrandimento da Holden-Zantos, ma può essere anche utilizzata con una normale fessura fotografica anche se il livello d'ingrandimento ottenuto è certamente più basso.

Analisi quantitativa e qualitativa dell'endotelio

La densità, il CV e il CF sono gli aspetti quantitativi che è possibile estrarre dalle immagini dell'endotelio.

Aspetti qualitativi possono essere considerati invece la presenza di strutture acellulari eterogenee (guttae, blebs, depositi di pigmento), la conformazione cellulare, le caratteristiche della linea di confine scuro⁷⁴. Come visto in precedenza, la letteratura sembra concordare sul fatto che solo le variazioni morfologiche quantitative quali il polimegatismo e polimorfismo sarebbero indotte dall'utilizzo delle lac. Sulla variazione di densità c'è minore uniformità di giudizi, ma comunque è un dato che sarebbe bene poter valutare

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

se non altro come fattore di base su cui vanno poi a sovrapporsi le variazioni indotte dall'uso di lac. L'analisi quantitativa dell'endotelio può essere effettuata attraverso varie tecniche:

- confronto con griglie di riferimento: sono disponibili dei reticoli esagonali di riferimento con cui è possibile confrontare il mosaico endoteliale. Tali dispositivi sono appositamente realizzati per oculare (griglia di McIntyre, Mosaic Matcher) o per il dispositivo di registrazione (le case costruttrici di microscopi endoteliali per lampade a fessura fotografiche forniscono griglie che si utilizzano sulla reflex)⁷⁸. Ad un indicato ingrandimento forniscono valori esclusivamente di densità (fig. 20/21/22);

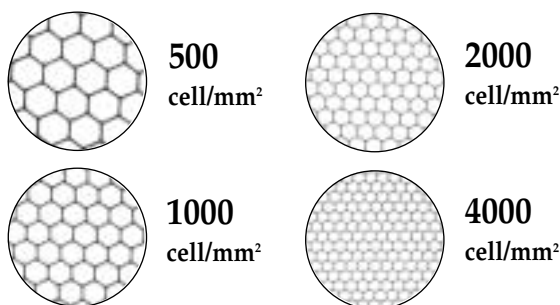


Fig. 20
Mosaic Matcher, costituito da 4 griglie di riferimento di densità endoteliale specificata. Il confronto tra esse e l'endotelio visualizzato permette di assegnare un valore di densità con una certa approssimazione.



Fig. 21
Griglia di McIntyre. Applicata direttamente nell'apparecchio fotografico prima della pellicola. È fondamentale utilizzare l'ingrandimento segnalato dall'azienda produttrice, solo in quel caso infatti i pattern di densità saranno affidabili. Notare che le dimensioni della griglia rimangono le stesse anche se l'immagine è stata ottenuta con ingrandimento inadeguato. In tal caso la griglia di McIntyre non fornisce utili informazioni.



Fig. 22
Griglia di McIntyre utilizzata al giusto livello d'ingrandimento. La densità è superiore a 2500 cell/mm².

- conta con reticolo fisso: si utilizzano per una stima della densità, contando le cellule comprese all'interno di un reticolo rettangolare (utilizzabile su oculare o su reflex) ad un dato ingrandimento forniscono una stima della densità. Dividendo l'area analizzata per il numero delle cellule è anche possibile stimare l'area cellulare media⁸³;
- Analisi Cellulare Singola (ACS): è certamente la metodica più accurata anche se estremamente laboriosa, per ottenere valori di coefficiente di variazione e forma⁸³. Attraverso dunque una procedura passo dopo passo semplificata da computer muniti di un apposito software, si riesce ad effettuare un'analisi morfometrica accurata arrivando a indici quantitativi attendibili. Di seguito ci soffermiamo sui passaggi fondamentali dell'analisi morfologica effettuata partendo dalla microscopia speculare senza contatto (fig. 23/24/25). Innanzi tutto si dovrebbe dividere l'endotelio in almeno 5 zone, una centrale e quattro periferiche, e per ognuna delle quali catturare un'immagine. Le dimensioni del campione cellulare dovrebbero essere consistenti. Doughty e coll.⁸⁴ hanno dimostrato come in caso di polimegatismo esaminando 100 cellule si ha un errore nell'attendibilità del CV del +/- 4%. L'immagine acquisita dell'endotelio, o tramite sistema fotografico o video, andrà innanzitutto digitalizzata attraverso uno scanner o una scheda di acquisizione video⁶⁸ (fig.24). Digitalizzare l'immagine significa poi poterla manipolare attraverso opportuni software per migliorarne la qualità (eliminare le ombreggiature, ricostruire i margini poco precisi ecc.), evidenziare i bordi di ogni singola cellula del

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

campione (fig. 25), per poi calcolare l'area.

Del campione scelto sarà a questo punto disponibile una distribuzione di frequenza dell'area cellulare (fig. 26), con media e deviazione standard note, da cui il calcolo del CV⁸⁰.

Negli strumenti in cui la visualizzazione è automaticamente interfacciata ad un programma di elaborazione (microscopi speculari a contatto, microscopi speculari computerizzati), gli indici quantitativi vengono calcolati immediatamente mediante ACS.

È utile usare la microscopia speculare nella pratica contattologica?

Nella rassegna effettuata si è cercato di sottolineare innanzi tutto il perchè l'endotelio dovrebbe interessare chi si occupa di contattologia clinica, in seconda analisi sono state fornite una serie di procedure in grado di permettere la sua osservazione.

Oltre che importante è possibile effettuare la microscopia speculare, ovviamente considerando alcuni aspetti limitativi come:

- l'impossibilità per una parte degli operatori che esercita nel campo della contattologia di effettuare una anestesia topica della cornea che esclude di fatto tutti gli strumenti a contatto; anche se l'applicazione di una lac consigliata nella microscopia a contatto per migliorare l'immagine dell'endotelio⁷⁰ potrebbe evitare l'anestesia;
- l'alto costo di strumenti come il microscopio a contatto e il microscopio speculare computerizzato.

Il compromesso che coniuga meglio i buoni risultati con i costi accessibili appare quello di iniziare con una comune lampada a fessura foto o video.

La semplice biomicroscopia può, per i limiti d'ingrandimento (massimo ingrandimento di una normale fessura circa 16-40x), mostrare solo la presenza più o meno precisa del mosaico ed eventuali grosse sue irregolarità⁸⁵ (fig. 27 e 28), è ovvio dunque che ai fini di una più attenta valutazione morfologica bisogna sviluppare una serie di strategie che consentano di aumentare l'ingrandimento sia in visualizzazione che in registrazione dell'immagine.

Tali possibilità, già analizzate, si concretizzano nel microscopio speculare senza contatto, nel duplicatore di focale, negli oculari a più alto ingrandimento.

Le immagini ottenute, ed eventualmente ingrandite di nuovo (fig. 23), potranno poi essere digitalizzate ed elaborate con un opportuno software.



Fig. 23
Ingrandimento fotografico (2.5x) della figura n. 6. Tale procedura è stata utilizzata da Holden e Zantos per aumentare l'ingrandimento della prima immagine fotografica ottenuta. Se l'immagine endoteliale è troppo piccola per la risoluzione di uno scanner la si può ingrandire fotograficamente per ottenere una migliore digitalizzazione.

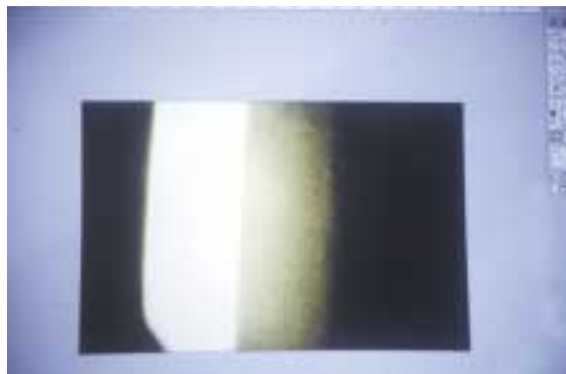


Fig. 24
Schermata video della figura n. 21 ormai digitalizzata



Fig. 25
Alcune cellule della figura n. 22 vengono evidenziate. Il computer, infatti, consente di esaltare i bordi cellulari con programmi automatici o semi-automatici in maniera poi da poter calcolare l'area di ogni singola cellula del campione selezionato(ACS).

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

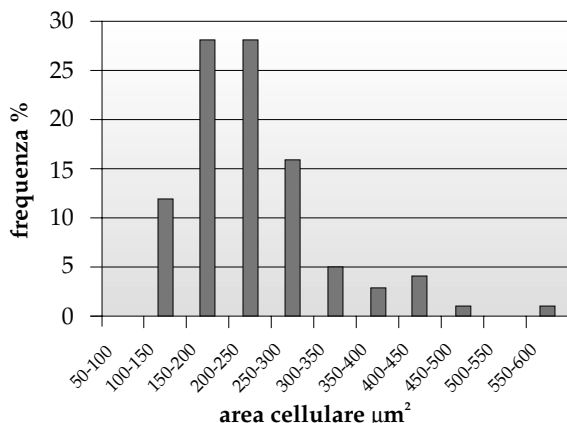


Fig. 26
Esempio di distribuzione di frequenza dell'area cellulare ottenuto mediante ACS, da cui estrarre media e deviazione standard per il calcolo del CV.



Fig. 27 a-b
Differenza di risoluzione lampada a fessura con e senza microscopio. Nelle immagini a e b viene paragonato il grado di risoluzione su un caso di guttata corneale, senza microscopio endotheliale (a) e con microscopio (b). È evidente che la semplice biomicroscopia può, per i limiti d'ingrandimento, mostrare solo la presenza più o meno precisa del mosaico ed eventuali grosse sue irregolarità.

Conclusione

L'uso delle lac può essere causa non solo di alterazioni transitorie del mosaico endotheliale, che sono di natura edematosa, ma anche di alterazioni durature come polimegatismo, polimorfismo e, probabilmente, riduzione della densità cellulare. La causa di tali alterazioni è stata attribuita al decremento di ossigeno che l'applicazione delle lac può indurre. Infatti la riduzione dell'apporto di ossigeno proveniente dall'atmosfera, ad occhio aperto, e dai vasi della congiuntiva tarsale superiore, ad occhio chiuso, favorisce la produzione di acido lattico e di anidride carbonica con conseguente acidificazione dell'ambiente in cui si trovano le cellule endotheliali.

È necessario quindi applicare lenti a contatto che trasmettano una sufficiente quantità di ossigeno; quindi lac rigide gas-permeabili che non causino reazioni endotheliali, ma anche lac morbide idrogel, facendo attenzione al valore di trasmissibilità che dovrà essere, nelle ore di veglia, superiore a $24,1 \times 10^{-9}$ unità.

Quindi in conclusione se non vogliamo soffocare lentamente i portatori di lac, abbiamo, con lenti morbide in idrogel due possibilità:

- applicare lac a basso contenuto d'acqua, soltanto se lo spessore al centro è inferiore a 0,05 mm e il potere è inferiore a sf-4.00D;
- applicare lac ad alto contenuto d'acqua sempre e necessariamente se abbiamo bisogno di un potere e/o uno spessore più elevato, nel caso che il potere diottrico sia positivo e anche con lac toriche prismatiche.

Il monitoraggio dell'endotelio, effettuato sia prima dell'applicazione che durante, soprattutto nei casi in cui è inevitabile applicare lenti che non rientrano nei casi appena indicati, è quindi fondamentale. Ciò può essere effettuato con una comune lampada a fessura con biomicroscopio ad alto ingrandimento (es. 40x) e collegamento foto o video.

La semplice biomicroscopia permette di evidenziare un mosaico endotheliale caratterizzato da cellule grandi o irregolari.

È ovvio, dunque, che ai fini di una più attenta valutazione morfologica, bisogna sviluppare una serie di strategie che consentano di aumentare l'ingrandimento sia in visualizzazione che in registrazione dell'immagine. Tali possibilità, già analizzate, si concretizzano nel microscopio speculare senza contatto, nel duplicatore di focale, negli oculari a più alto ingrandimento. Le immagini ottenute, ed eventualmente ingrandite di nuovo, potranno poi essere digitalizzate ed elaborate con un opportuno software.

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

Summary

The response of the corneal endothelium to contact lens wear

Contact lenses can induce transient (blebs) and long-term (polymegathism, pleomorphism and reduction of cellular density) changes in endothelial appearance and morphology. The contact lens practitioner should pay special attention to the long-term changes, because this could compromise the functional reserve of the endothelium. However, it is evident that these opinions on the seriousness of that reaction are still contrasting. For example, some consider polymegathism a simple phenomenon of a volumetric adaptation and, besides, the opinions on the role that the contact lens use plays on the reduction of the cellular density are contrasting too. During the work, the main principles of technical clinic specular microscopy, which allows the analysis of the morphology of the endothelial mosaic, are examined in addition to the main contact specular microscopes, non contact (computerized) microscopes and to the quantitative evaluation criteria of the endothelium through the morphometric analysis. Stronger emphasis will be given on procedures of simpler execution; they can be used on day to day contact lens practice.

Key words

corneal endothelium, blebs, polymegathism, pleomorphism, specular microscopy

Bibliografia

- Harris JE, Nordquist LT. The hydration of the cornea. Transport of water from the cornea. Am J Ophthalmol. 1955; 40: 100-105
- Davson H. The hydration of the cornea. Biochem J. 1955; 59: 24
- Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. J Physiol. 1972; 221: 43-54
- Hodson S, Miller F. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of the rabbit cornea. J of Physiol. 1976; 264: 563-577
- Larke J. The Eye in The Contact Lens Wear. London, Butterworths, 1985.
- Fatt I., Weissman BA. Physiology of the Eye. Stoneham USA, Butterworths-Heinemann 1992.
- Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauer HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. Curr Eye Res 1985; 4: 671-678
- Laing RA., Sandstrom M, Berrospi A, Leibowitz HM. Changes in the corneal endothelium as a function of age. Exp Eye Res 1976; 22: 587-594
- Marani E, Casalboni F. Variazione della densità cellulare dell'endotelio corneale con l'età e ripercussioni nell'applicazione delle lenti a contatto. L'Oroptero 1991; 6 (1):25-30
- Schoessler JP, Woloschak MJ. Corneal endothelium in veteran PMMA contact lens wearers. Int Contact Lenc Clin 1981; 8 (6): 19-25
- Hirst LW, Auer C, Cohn J, Tseng SCG, Khodadoust AA. Specular microscopy of hard contact lens wearers. Ophthalmol. 1984; 91: 1147-1153
- Holden BA, Sweeney DF, Vannas D, Nilsson KT, Efron N. Effect of long-term extended contact lens wear on the human cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985; 26: 1489-1501
- Lupelli L, Fletcher R, Rossi A. Contattologia. Una Guida Clinica. Palermo, Medical Books, 1998
- Mandell RB. Contact Lens Practice. Springfield, C Thomas Publisher, 1988
- Holden BA, Williams L, Sweeney DF, Swarbrick HA. The endothelial response to contact lens wear. CLAO J. 1986; 12: 150-152
- Mac Rae S., Matsuda M., Shellans S. Corneal endothelial changes in association with contact lens wear. CLAO J. 1989; 15: 82-87
- Stocker EG, Schoessler JP. Corneal endothelial polymegathism induced by pmma contact lens wear. Inv Ophthalmol Vis Sci 1985; 26: 857-863
- Mac Rae S, Matsuda M, Shellans S, Rich LF. The effect of hard and soft contact lens on the endothelium. Am J Ophthalmol 1986; 102: 50-57
- Caldwell DR., Kastl PR., Dabezies OH e coll. The effect of long-term hard lens wear on corneal endothelium. Contact Intraocular Lens Med J. 1982; 8: 87-91
- McMahon TT, Polse KA, McNamara N, Viana MAG. Recovery from induced corneal edema and endothelial morphology after long term pmma contact lens wear. Optom Vis Sci 1996; 73: 184-188
- McRae SM, Matsuda M, Phillips DS. The long term effects of polymethylmetacrylate contact lens wear on the corneal endothelium. Ophthalmology . 1994; 101: 365-370
- Setala K, Vasara K, Vesti E, Ruusuvaara P. Effects of long-term contact lens wear on the corneal endothelium. Acta Ophthalmol Scand 1998; 76: 299-303
- Zantos SG., Holden BA. Guttate endothelial changes with anterior eye inflammation. Br J Ophthalmol. 1981; 65: 101-103
- Lupelli L. Reazioni dell'endotelio corneale all'uso di lac. L'Inserto 1987; 7 (2): 1-2
- McMonnies CW, Zantos SG. Endothelial bedewing of the cornea in association with contact lens wear. Br J Ophthalmol 1979; 63: 478-481
- Zantos SG, Holden BA. Transient endothelial changes soon after wearing soft contact lenses. Am J Optom Physiol Opt. 1977; 54: 856-858
- Williams L, Holden BA. The blebs response of the endothelium decreases with extended wear of contact lenses. Clin Exp Optom. 1986; 69: 90-92
- Vannas A, Makitie J, Sulonen J, Ahonen R, Jarvinen E. Contact lens induced transient changes in corneal endothelium. Acta Ophthalmol 1981; 59: 552-559
- Vannas A, Makitie J, Holden B. The ultrastructure of contact lens induced changes. Acta Ophthalmol 1984; 62: 320-333
- Schoessler JP, Woloschak MJ, Mauger TF. Transient endothelial changes produced by hydrophilic contact lenses. Am J Optom Physiol Opt. 1982; 59: 764-765
- Holden BA, Zantos SG. The corneal endothelium: transient changes with atmospheric anoxia. In: The Cornea in Health and Disease. Proceedings of the VI Congress of the European Society of Ophthalmology. London, Royal Soc Med Series. 1981; 40: 79-83
- Holden BA, Williams L, Zantos SG. The aetiology of transient endothelial changes in the human cornea. Inv Ophthalmol Vis Sci. 1985; 26: 1354-1359
- Lamalle D, Maréchal Ch. Réponse de l'endothélium cornéen a la pose de lentilles de contact souples. Contactologia 1988; 10F: 109-114
- Khodadoust AA, Hirst LW. Diurnal variations in corneal endothelial morphology. Ophthalmology 1984; 91: 1125-1128
- Bonanno JA, Polse Ka. Corneal acidosis during contact lens wear:

La risposta dell'endotelio corneale all'uso delle lenti a contatto

- effects of hypoxia and CO₂. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1987;28: 1514-1520
36. Mac Rae S, Matsuda M, Yee R. The effect of long-term hard contact lens wear on the corneal endothelium. CLAO J. 1985; 11: 322-326
37. Mac Rae S, Matsuda M, Yee R, e coll. The effect of contact lens on the corneal endothelium. ARVO Abstracts, Inv Ophthalmol Vis Sci 1985; 26 (Suppl): 275
38. Schoessler JP. Corneal endothelial polymegathism associated with extended wear. Int Cont Lens Clin 1983; 10: 148-155
39. Schoessler JP, Barr JT, Fresen DR. Corneal endothelial observations of silicone elastomer contact lens wearers. Int Contact Lens Clin 1984; 11: 337-340
40. Efron N, Tarrant T. Grading scales designed for clinicians. Optician 1997; 213 (5583): 29
41. Bergmanson JPG. Histopatological analysis of corneal endothelial polymegathism. Cornea 1992; 11: 133-136
42. Matsuda M, Inaba M, Suda T, MacRae SM. Corneal endothelial changes associated with aphakic extended contact lens wear. Arch Ophthalmol 1998; 106: 70-72
43. Rao GN, Lohman LE, Acquavella JV. Cell size-shape relationship in corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1982; 22: 271-272
44. Orbson GN, Schoessler JP. Corneal endothelial polymegathism after the extended wear of RGP contact lenses. Am J Optom Physiol Opt 1988; 65: 84-90
45. Suda T. Mosaic pattern changes in human corneal endothelium with age. Jpn J Ophthalmol. 1984; 28: 331-338
46. Schoessler JP, Orbson GN A. Theory of corneal endothelial polymegathism and aging. Curr Eye Res. 1987; 6: 301-306.
47. Alimgil ML, Erda N, Erda S, Aydinli J. Modifications de l'endothélium cornéen sous les lentilles de contact. Contactologia 1990; 12F: 127-129.
48. Mac Rae S, Matsuda M. Central and peripheral specular microscopy in contact lens wearers. ARVO Abstracts, May, 1987
49. Mandell RB. Do RGP lens pump tears during sleep? Contact Lens Spectrum, 1986; July, 29-33
50. Matsuda M e coll. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. Inv Ophthalmol Vis Sci. 1985; 26: 443
51. Laing RA, Neubauer L., Oak SS., Kayne HL, Leibowitz HM. Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. Ophthalmology 1984; 91: 1129-1134
52. Sweeney DF. Corneal exhaustion syndrome with long-term wear of contact lens. Optom Vis Sci 69, 601-608, 1992
53. Speedwell L e coll. The infant corneal endothelium. Arch Ophthalmol 1988; 106: 771-775
54. Bigar F. Specular microscopy of the corneal endothelium optical solutions and clinical results. Dev Ophthalmol. 1982; 6: 1-94
55. Wilson RS, Roper-Hall MJ. Effect of age on the endothelium cell count in the normal eye. Br J Ophthalmol 1982; 66: 513-515
56. Bourne WM, Kaufman HE. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. Am J Ophthalmol 1976; 81: 319-323
57. Murrpy C e coll. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984; 25: 312-322
58. Klyce SD, Beuerman RW. Structure and function of the cornea. In Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB e coll. The Cornea. 1988 New York, Churchill Livingstone.
59. Sweeney DF, Holden BA, Vannas A. e coll. The clinical significance of corneal endothelial polymegathism. ARVO Abstracts, Invest Ophthalmol Vis Sci 1985; 26 (Suppl): 53
60. O'Neal MR, Polse KA. Decreased rate of corneal hydration recovery with aging-reduced endothelial function. ARVO Abstracts, Invest Ophthalmol Vis Sci. 1985; 26 (Suppl): 53
61. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M. e coll. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function and morphology in wound repair. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1985; 25: 1101
62. Honda H. Geometric models for cells in tissue. Int Rev Cytol. 1983; 81: 191-194.
63. Rao GN, Acquavella JV, Goldberg SH, Berk ML. Pseudophakic bullous keratopathy. Relationship to preoperative corneal endothelial status. Ophthalmology. 1984; 91: 1135-1140
64. Fatt I. Person-to-person variability of corneal response to a contact lens. Contact Lens J. 1989; 17: 297-302
65. Lupelli L. Primo comandamento: non soffocare Riv It Optom 1994; 18: 87
66. Holden BA., Mertz GW. Critical oxygen levels to avoid oedema for both daily and extended wear contact lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984; 25: 1161-1167
67. Bergmanson JPG., Weissman BA. The effects of contact lens wear on the corneal endothelium. Practical Optom 1992; 3: 108-119
68. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium in the intact eye. Experientia 1968; 24: 1094-1095
69. Laing RA, Sandstrom M, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. Arch Ophthalmol. 1975; 93: 143-145
70. Ricci F, Corsi A, Nucci C, Missiroli F, Sabatini L. Microscopia speculare endoteliale: principi ottici, tecniche di esecuzione, significato dei parametri morfometrici. Boll Ocul. 1997;76: 168-182
71. Koester CJ., Campbell CJ., Donn. Ophthalmic optical instruments: two recent developments. Jap J Ophthalmol. 1980; 24: 1-4
72. Holden BA, Zantos SG, Jacobs KJ. La tecnica Holden-Zantos per fotografia endoteliale ad alto ingrandimento con lampada a fessura. NY USA, Bausch&Lomb, 1978.
73. Zeri F. Foto-videodocumentazione in contattologia clinica. Riv It Optom. 1997; 20: 57-69
74. Laing RA. Specular microscopy of the cornea. Curr Topics in Eye Res. 1980; 3: 157-159
75. Henson DB. Optometric Instrumentation. London, Butterworths, 1983
76. Lohman LE, Rao GN, Acquavella JA. Optics and clinical applications of wide field specular microscopy. Am J Ophthalmol. 1981; 92: 48-52
77. Coppinger JM e coll. Fotografia Oftalmica. Roma, Verducci, 1981
78. Stone J. Special types of contact lenses and their uses. In Phillips A e Stone J. Contact Lenses. Oxford, Butterworths, 1989
79. Olsen T. Optical principles for estimation of endothelial cell density with the non contact specular microscope. Acta Ophthalmol. 1979; 57: 860-868
80. Lester JM, Mc Farland JL, Bursell SE e coll. Automated morphometric analysis of corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981; 20: 407-410
81. Holm O. High-magnification photography of anterior segment of human eye. Acta Ophthalmol. 1978; 56: 475-476
82. Landesz M, Siertsema JV, Van Rij G. Comparative study of three semiautomated specular microscopes. J Cataract and Refract Surg. 1995; 21: 409-11
83. Ricci F, Rufini W, Masi F, Missiroli F, Missiroli A. Analisi morfometrica computerizzata dell'endotelio corneale. Boll Ocul. 1997; 76: 617-33
84. Doughty MJ, Fonn D, Nguyen KT. Assessment of the reliability of calculations of the coefficients of variations for normal and polymegathous human corneal endothelium. Optom Vis Sci. 1993; 70: 759-770
85. Sheridan M. Keratometry and slit lamp biomicroscopy. In Phillips e Stone Contact Lenses. Oxford, Butterworths, 1989

Autore corrispondente: Fabrizio Zeri, Istituto Superiore di Scienze Optometriche, via Galvani 6, 00153 Roma, e-mail: f.zeri@flashnet.it