



**Università di Pisa**

**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**

**Corso di Laurea Specialistica in  
Scienze Fisiopatologiche Generali**

**Tesi di Laurea**

“Valutazione della tossicità acuta sul tessuto retinico dopo  
somministrazione di *Aminoglicosidi* e *Fluorochinoloni* in un modello  
sperimentale animale su ratto albino”

**Relatore:**

**Prof. Luca Giovannini**

**Candidata:**

**Guidi Alessandra**

**Anno Accademico 2006-2007**

## **RIASSUNTO**

**Introduzione** – L'occhio è un organo sferoidale, posto nella cavità orbitaria, direttamente a contatto con l'ambiente esterno e pur essendo protetto dalle palpebre e da altri annessi oculari è soggetto all'attacco di numerosi batteri gram-positivi e gram-negativi. Le infezioni oculari più frequenti sono la congiuntivite, la cheratite e l'endofthalmitis.

La terapia ad oggi più utilizzata nelle patologie oftalmiche batteriche è costituita da due classi di antibiotici: aminoglicosidi e fluorochinoloni, in particolare da Tobramicina, Netilmicina (aminoglicosidi) e Norfloxacin (fluorochinolone).

In letteratura sono noti alcuni aspetti circa la tossicità oculare a carico di alcuni aminoglicosidi mentre mancano studi dettagliati circa la possibile tossicità oculare di fluorochinoloni.

**Scopo della ricerca** – Nel nostro studio abbiamo voluto valutare le eventuali alterazioni retiniche causate dalla Tobramicina, dalla Netilmicina e dalla Norfloxacin dopo somministrazione topica in acuto, in un modello sperimentale su ratto. Abbiamo quindi valutato l'attività elettrica della retina in risposta a particolari stimoli luminosi, il numero delle file di fotorecettori presenti nello strato nucleare esterno della retina e l'intera morfologia retinica.

**Materiali e metodi** – Sono stati utilizzati 18 ratti maschi Wistar (Harlan, Italy) adulti sani, con un peso di circa  $250\text{g} \pm 25\text{g}$  che sono stati randomizzati nei seguenti gruppi sperimentali: 1. Gruppo trattato con Norfloxacin; 2. Gruppo trattato con Tobramicina; 3. Gruppo trattato con Netilmicina. Gli animali di ciascun gruppo hanno ricevuto il rispettivo farmaco topicamente nell'occhio destro, 2 gocce applicate 6 volte al giorno per 5 giorni, mentre l'occhio sinistro, usato come controllo, è stato trattato con soluzione fisiologica con identica modalità di somministrazione.

Prima dell'inizio del trattamento, dopo la prima applicazione e a fine trattamento è stato effettuato l'ERG da flash per andare a valutare l'attività elettrica della retina.

Subito dopo l'ultima registrazione elettroretinografica gli animali sono stati anestetizzati, operati per l'asportazione di entrambi gli occhi e sacrificati: il tessuto retinico è stato isolato per l'allestimento dei preparati istologici.

Parte delle sezioni sono state colorate con ioduro di propidio per valutare la morfologia dello strato nucleare esterno di cellule nervose della retina; le rimanenti sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina in modo da valutare la morfologia dell'intero tessuto retinico.

**Risultati** – Le registrazioni elettroretinografiche prima del trattamento, dopo 2h, e dopo 5gg di somministrazione topica di Norfloxacin, di Netilmicina e di Tobramicina, non evidenziano alterazioni significative dell'ampiezza dell'*onda b*, se confrontati con il controllo.

Limitando l'osservazione al tracciato dell'occhio che ha ricevuto Tobramicina si osserva una riduzione dell'ampiezza dell'onda b. Tale riduzione è tuttavia non significativa e costituisce, al momento, solo un trend.

Dalla valutazione isto-patologica dello strato nucleare esterno della retina non si osservano diminuzioni, in numero, delle file di cellule nervose successivamente a somministrazione dei tre antibiotici; analogamente la morfologia retinica non evidenzia alterazioni patologiche.

**Conclusioni** – Dai risultati sperimentali ottenuti possiamo concludere che la somministrazione topica di Netilmicina e Norfloxacin risulta priva di effetti collaterali sulla visione, infatti non si evidenziano variazioni delle ampiezze dell'*onda b* dopo 5gg; mentre è necessario utilizzare con cautela la Tobramicina; dal momento che è stato rilevato un trend negativo nell'andamento delle ampiezze dell'onda b dopo 5gg,

Tuttavia dato che da un punto di vista morfologico, per nessuno dei tre farmaci, non sono state rilevate alterazioni, per escludere il verificarsi di degenerazione del tessuto retinico si rendono necessarie ulteriori future analisi con tempi di somministrazione più prolungati.

## **ABSTRACT**

**Introduction** - The eye is a spherical organ situated in the orbital cavity, in direct contact with the external world. Although protected by the eyelids and the ocular structures, it can easily be attacked by a wide range of gram-positive and gram-negative organisms. The most of the eye infections are conjunctivitis, keratitis, endophthalmitis.

Two different classes of antibiotics represent the most important therapy against bacterial ophthalmic pathology : Aminoglycosides (Tobramicine and Netilmicin) and Fluoroquinolons (Norfloxacin). Some aminoglycosides are known to be toxic to the eye, while nothing is written about the possible ocular toxicity of the fluoroquinolons.

**Purpose** - The aim of this study is to assess the retinal alterations caused by the mentioned chemotherapeutics after a wide topical application on rats. We then measured the retina's electric activity in response to certain light stimula, the number of photoreceptors in the external nuclear layer of the retina and its whole morphology.

**Materials and methods** – we used 18 adult and healthy Wistar male rats (Harlan, Italy) weighing  $250\text{g}\pm 25\text{g}$ , and they were randomized in the following experimental groups: 1. Norfloxacin treated group; 2. Tobramicine treated group; 3. Netilmicin treated group. Only the animals' right eye was treated with 2 drops 6 times a day, for a period of 5 days; every left eye, used as a control, was treated with isotonic sodium chloride following the same protocol. Before, during and after the beginning of the treatment we examined the retina's electric activity by fERG.

Right after the last recording, we anesthetized the animals to excise both eyes, and the animals were sacrificed.

We then isolated the retinal tissue to prepare the histological specimens. Retinae were fixed, included and cryosectioned following the standard procedures.

A part of the specimens were coloured with Propidium Iodide, to observe the outer nuclear layer morphology of the retina's nerve cells, computing the nuclei rows in the layer. The remaining specimens were coloured with hematoxylin and eosin, to observe the whole retina morphology.

**Results** – The mentioned recordings with fERG, compared to control, didn't show significative amplitude alterations of b- waves in any of the sperimental groups. A decrease in the b-wave amplitude in the eyes treated with Tobramicine can be cosider only a trend.

The nuclear layer isto-pathological rating didn't show any decrease in the number of nerve cells rows after the antibiotics administrations. Finally, the retinal morphology didn't show any pathological alterations.

**Conclusions** – Topical administrations of Netilmicine and Norfloxacin involves no secondary effects on vision: there are no b-waves alterations within 5 days. By the way, as Tobraicine showed a negative trend in the b-wave amplitude variations after 5 days, we can't be sure about its safety.

Finally, none of the chemiotherapics altered the retina morphology, but further analysis are needed to exclude retinal degeneration after a long term administration of the products.

## INDICE

### **Parte I: INTRODUZIONE**

<b>1. L'ANATOMIA DELL'OCCHIO</b>	<b>9</b>
1.1 GENERALITÀ	9
1.2 LA TONACA FIBROSA DELL'OCCHIO	10
1.3 LA TONACA VASCOLARE DELL'OCCHIO (UVEA)	11
1.4 LA RETINA	12
1.5 L'APPARATO DI PROTEZIONE DELL'OCCHIO	14
<b>2. LA VISIONE</b>	<b>15</b>
2.1 LA FOTOTRASDUZIONE	17
<b>3. LE INFEZIONI OCULARI</b>	<b>20</b>
3.1 LA CELLULITE PRESETTALE	20
3.2 L'ERISPELA OCULARE	20
3.3 LA CELLULITE ORBITALE	21
3.4 LE INFEZIONI DELL'APPARATO LACRIMALE	21
3.5 LA BLEFARITE	22
3.6 LA CONGIUNTIVITE	22
3.7 LA CHERATITE	23
3.8 L'UVEITE	23
3.9 L'ENDOFTALMITE	24
<b>4. LA TERAPIA DELLE INFEZIONI OCULARI</b>	<b>25</b>
4.1 GLI AMINOGLICOSIDI	25
4.1.1 Generalità	25
4.1.2 Indicazioni	27
4.1.3 Effetti collaterali	28
4.2 I FLUOROCHINOLONI	30
4.2.1 Generalità	30
4.2.2 Indicazioni	31
4.2.3 Effetti collaterali	32

### **Parte II: SCOPO DEL LAVORO**

<b>5. SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>34</b>
----------------------------	-----------

### **Parte III: MATERIALI E METODI**

<b>6. MATERIALI E METODI</b>	<b>36</b>
6.1 MODELLO SPERIMENTALE <i>IN VIVO</i>	36
6.2 REGISTRAZIONI ELETTROFISIOLOGICHE CON fERG	37
6.2.1 L'elettroretinogramma da flash	37
6.2.2 Le registrazioni	38
6.2.3 Il protocollo della stimolazione fERG tramite Ganfield	39
6.3 LE TECNICHE ISTOLOGICHE	41
6.3.1 Colorazione con Ioduro di Propidio	42
6.3.1.1 Il microscopio confocale a luce laser	43
6.3.2 Colorazione con Ematossilina – Eosina	44
6.3.3 Soluzioni utilizzate	45

### **Parte IV: I RISULTATI**

<b>7. I RISULTATI</b>	<b>47</b>
7.1 ELETTROFISIOLOGIA - REGISTRAZIONI fERF	48
7.2 MICROSCOPIA CONFOCALE - IODURO DI PROPIDIO	52
7.3 MICROSCOPIA OTTICA- EMATOSSILINA/EOSINA	55

### **Parte V: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

<b>8. DISCUSSIONE DEI RISULTATI</b>	<b>60</b>
<b>9. CONCLUSIONI</b>	<b>63</b>

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>
---------------------	-----------

## **ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI**

**ERG:** elettroretinogramma

**FERG:** elettroretinogramma da flash

**IVU:** infezioni delle vie urinarie

**PBS:** phosphate buffered saline

**PFA:** paraformaldeide

**PI:** ioduro di propidio

**S:** Svedberg

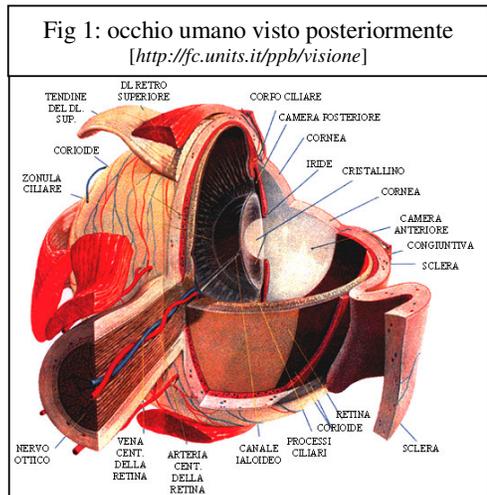
**SNC:** sistema nervoso centrale

# **Parte I: INTRODUZIONE**

# 1. ANATOMIA DELL'OCCHIO

## 1.1 GENERALITÀ

L'occhio è un organo sferoidale, posto nella cavità orbitaria, protetto dalle palpebre e da altri annessi oculari. La sua funzione è quella di captare le radiazioni luminose provenienti dal mondo esterno e di trasformarle in impulsi nervosi utilizzati a scopi percettivi e riflessi. E' costituito da tre



membrane sovrapposte e dal nucleo del bulbo oculare (Fig 1). La membrana più superficiale è la *tonaca fibrosa*, che in un piccolo segmento anteriore, circolare, è trasparente e prende il nome di cornea; nella rimanente parte è opaca e si chiama sclera o sclerotica; le due zone sono separate da un solco anulare superficiale: il solco della sclera. All'interno della tonaca fibrosa è applicata la *tonaca vascolare*, ricca di vasi sanguigni, di pigmento scuro e di elementi muscolari lisci; ed è costituita, nella parte posteriore, dalla corioide e nell'anteriore, dall'iride. La più profonda delle tre membrane, la *retina*, è di natura nervosa e da essa origina il nervo ottico. La sua faccia posteriore prende il nome di parte ottica della retina, essendo responsabile della funzione visiva; la parte anteriore, invece, non contiene cellule nervose, non partecipa alla formazione del nervo ottico e prende il nome di parte cieca della retina. All'interno del globo oculare, fra la cornea e l'iride, si trova la camera anteriore riempita di umor acqueo, un liquido trasparente, incolore, senza elementi morfologici tranne rari linfociti e secreto dall'epitelio dei processi ciliari e dell'iride. Dietro l'iride e la pupilla, è posto il cristallino un corpo trasparente e biconvesso connesso con la regione ciliare. Tra l'iride, il corpo ciliare ed il cristallino e comunicante con la camera anteriore, si trova la camera posteriore, occupata dal corpo vitreo, gelatinoso, incolore e trasparente [G. Chiarugi, 1997].

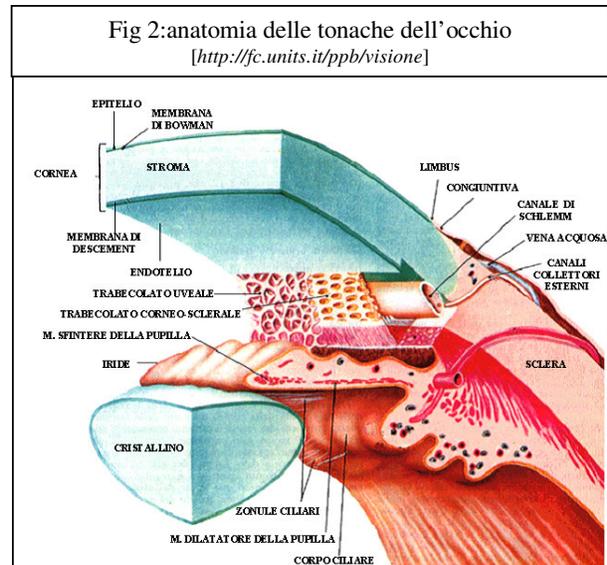
## 1.2 LA TONACA FIBROSA DELL'OCCHIO

La tonaca fibrosa dell'occhio è principalmente costituita da una parte posteriore, *la sclera* e da una anteriore, *la cornea* (Fig 2) [Pasqualino A., et al., 2002].

**La sclera.** Costituisce i cinque sesti posteriori della tonaca fibrosa, è bianca, opaca e costituita da differenti fasci di fibre:

- connettivali, che decorrono in direzione meridiana ed equatoriale;
- elastiche e tendinee, che decorrono lungo i fasci connettivali.

La superficie esterna è in rapporto con capsula di Tenone, da cui è separata (tranne che nella zona pericorneale) da una fessura attraversata da numerose



trabecole connettivali che passano da una membrana all'altra senza per questo impedire i movimenti di rotazione del bulbo rispetto alla fascia.

La superficie interna si unisce alla tonaca vascolare per mezzo di tessuto connettivo lasso pigmentato e costituito da trabecole che limitano lo spazio pericoroideo [G. Chiarugi, 1997].

**La cornea.** Appare come una calotta sferica, trasparente che riflette gli oggetti del mondo esterno (Fig 2). Presenta una superficie anteriore con estensione e curvatura alquanto minore di quella posteriore; ed è costituita da diversi strati che, in senso antero-posteriore, sono: epitelio corneale; lamina elastica anteriore; stroma corneale; lamina elastica posteriore e endotelio [Martini et al., 2003].

Fa parte dell'apparato diottrico dell'occhio con un potere convergente di 41-45 diottrie.

### 1.3 LA TONACA VASCOLARE DELL'OCCHIO (UVEA)

La tonaca vascolare dell'occhio è costituita da una parte anteriore, *l'iride*, da una porzione intermedia, *il corpo ciliare*, e da una membrana posteriore, *la corioide*(Fig 2).

**L' iride.** Appare come una lamina circolare con un foro centrale (pupilla), è posta circa 1mm dietro la cornea e si dirige trasversalmente sul piano frontale. La faccia anteriore è visibile attraverso la cornea e presenta una colorazione variabile; la faccia posteriore è applicata sul cristallino in vicinanza del margine pupillare, è scura e delimita la camera posteriore.

L'iride è formata da strati che, in senso antero-posteriore, sono: l'endotelio, lo stroma, con il muscolo sfintere della pupilla, e l'epitelio, con il muscolo dilatatore della pupilla.

I muscoli sfintere e dilatatore, rispettivamente, restringono e dilatano la pupilla: il primo è innervato da fibre parasimpatiche del nervo oculomotore, che fanno relè nel ganglio ciliare; il secondo da fibre ortosimpatiche, originate dal centro ciliospinale, che fanno relè nel ganglio cervicale superiore[Pasqualino A et al., 2002].

**Il corpo ciliare.** Fa seguito all'iride e si estende fino alla corioide, da cui è separato dall'ora serrata. Il suo spessore aumenta da dietro in avanti ed è composto da un segmento posteriore, l'orbicolo ciliare, da uno anteriore, la corona ciliare, e dal muscolo ciliare che occupa la parte antero-esterna (anello prismatico triangolare, serve per l'accomodazione) [G.Chiarugi, 1997].

**Coroide.** E' una membrana a forma di sfera cava, che si estende dall'entrata del nervo ottico all'ora serrata, in continuità col corpo ciliare. Presenta un epitelio pigmentato che assorbe i raggi luminosi che attraversano la retina, impedendone la riflessione sulla sclerotica.

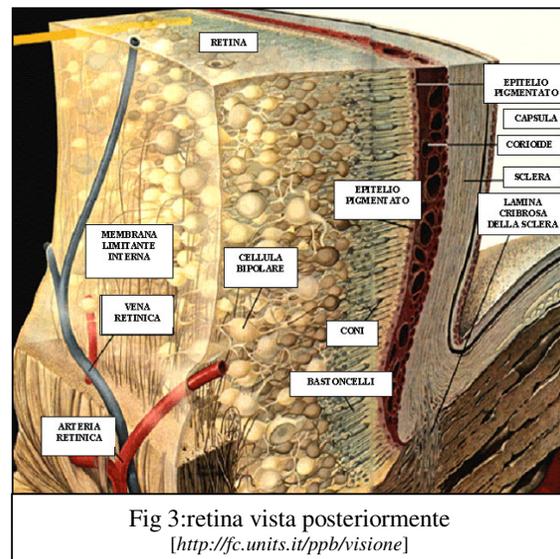
E' costituita da quattro strati: la lamina sovracoroidea; la lamina vascolare; la lamina coriocapillare; la lamina basale e lo strato sovracapillare di Smirnow [Azzali et al.,1995].

## 1.4 LA RETINA

La retina è la più interna delle membrane che formano le pareti del globo oculare e si estende dal punto di entrata del nervo ottico fino al margine pupillare dell'iride. Per la sua origine, per la struttura della sua parte principale e per le sue connessioni con il nervo ottico, deve essere considerata di natura nervosa (Fig 3). Risulta di due foglietti sovrapposti, che al margine pupillare dell'iride, si continuano l'uno nell'altro: un foglietto esterno ed un foglietto interno.

Può essere suddivisa in due parti:

1. la zona posteriore o *parte ottica*, che si estende dall'entrata del nervo ottico fino all'ora serrata e che è costituita da un foglietto interno (funzioni visive) e da un foglietto esterno (cellule epiteliali ricche di fuscina);
2. la zona anteriore o *parte cieca*, costituita dalla parte ciliare, aderente al corpo ciliare, e dalla parte iridea, aderente all'iride [Pasqualino A et al., 2002].



**Retina propriamente detta.** E' il foglietto interno della parte ottica della retina, posto sull'epitelio pigmentato in rapporto con la coroide; è un disco biancastro, insensibile alla luce. La macula lutea è una piccola regione della retina che si trova presso il polo posteriore dell'occhio, lateralmente ad esso. Ha forma leggermente ellittica, la sua parte periferica è rilevata a cercine, mentre centralmente presenta una fossetta, *la fovea centrale*, dove la retina è molto sottile. Nella fovea, lo strato delle cellule visive (fotorecettori), a causa della riduzione degli strati antistanti, è quasi allo scoperto, ed è perciò più accessibile all'azione diretta dei raggi luminosi; la fovea è la regione della visione distinta [Martini et al., 2003].

La retina è composta da strati sovrapposti che, dalla superficie esterna a quella interna, sono:

1. Strato dei cono e dei bastoncelli: elementi recettoriali deputati alla trasduzione dell'energia luminosa in potenziali elettrici. I bastoncelli sono circa 75 milioni, mentre i cono circa 3 milioni. Nel centro della fovea sono presenti solo cono ma appena ci si allontana cominciano ad intercalarsi i bastoncelli fino a divenire 20 volte più numerosi dei cono [G.Chiarugi, 1997].
2. Membrana limitante esterna: linea sottile che separa i segmenti esterni dei recettori da quelli interni ed è costituita dalle cellule di Muller [Azzali et al.,1995].
3. Strato dei granuli esterni: spesso 30-40  $\mu\text{m}$  e costituito dai corpi cellulari dei recettori con i loro nuclei (granuli) e dai loro prolungamenti [G.Chiarugi, 1997].
4. Strato plessiforme esterno: sottile e formato da fibre terminali delle cellule recettoriali e bipolari decorrenti in vario senso; dalle cellule di Muller e dalle cellule orizzontali.
5. Strato dei granuli interni: spesso, costituito da un gran numero di nuclei delle cellule orizzontali, bipolari, di Muller ed amacrine [Martini et al., 2003].
6. Strato plessiforme interno: costituito da terminazioni delle cellule bipolari, gangliari, amacrine e orizzontali, intrecciate in ogni senso [Martini et al., 2003].
7. Strato delle cellule gangliari: contenente le cellule gangliari in fila, il corpo e le espansioni di parte degli astrociti ed i prolungamenti delle cellule di Muller [G.Chiarugi, 1997].
8. Strato delle fibre nervose: inizia sottilissimo ma, per aggiunta delle fibre nervose nate dalle gangliari, ingrossa nella direzione della papilla (20  $\mu\text{m}$ ). La macula costringe le fibre dal lato temporale a compiere archi concentrici intorno ad essa. I fasci che provengono dalle parti periferiche si portano alla parte centrale della papilla, gli altri nella sua parte periferica.
9. Membrana limitante interna: formata da uno strato di cellule di Muller che si estendono in altezza e formando le membrane limitanti della retina, elementi di sostegno considerati passivi ma, in realtà, sede di fenomeni elettrici concomitanti con l'attività dei neuroni retinici (confermato dall'elettroretinogramma) [G.Chiarugi, 1997].

## 1.5 L'APPARATO DI PROTEZIONE DELL'OCCHIO

L'apparato di protezione dell'occhio comprende *le palpebre, la congiuntiva e l'apparato lacrimale* [Pasqualino A et al., 2002].

**Le palpebre.** Pieghie della pelle che ricoprono anteriormente il bulbo oculare, delimitando la rima palpebrale. Sono costituite da più strati, che in senso antero-posteriore sono: la pelle, il connettivo sottocutaneo col muscolo orbicolare dell'occhio, lo strato fibroso, ed uno strato muscolare a cellule lisce [Pasqualino A et al., 2002].

**La congiuntiva.** E' una membrana mucosa, di derivazione ed in continuazione con la cute, che riveste la faccia posteriore delle palpebre e la parte anteriore dell'occhio. Forma il sacco congiuntivale, in cui scorrono le lacrime, chiuso quando le palpebre si toccano, e comunicante con l'esterno, quando non si toccano. E' suddivisa in: tonaca congiuntivale delle palpebre; tonaca congiuntivale del bulbo; fornice congiuntivale superiore ed inferiore.

E' strutturata in diversi strati che dal più esterno al più interno sono: epitelio di rivestimento; tonaca propria della congiuntiva; tessuto sottocongiuntivale; ghiandole lacrimali accessorie, sparse nel fornice congiuntivale (ghiandole di Krause) e nella congiuntiva palpebrale (ghiandole di Ciaccio); ghiandole tubulose [G.Chiarugi, 1997].

**L'apparato lacrimale.** E' costituito da:

- ghiandola lacrimale tubulare composta, situata nella parte supero-laterale della regione orbito-palpebrale e secernente lacrime che dal sacco congiuntivale si raccolgono all'angolo mediale dell'occhio dove inizia la loro escrezione;
- vie lacrimali comprendenti i punti lacrimali, i condotti lacrimali, il sacco lacrimale e il condotto naso-lacrimale [Pasqualino A et al., 2002].

## 2. LA VISIONE

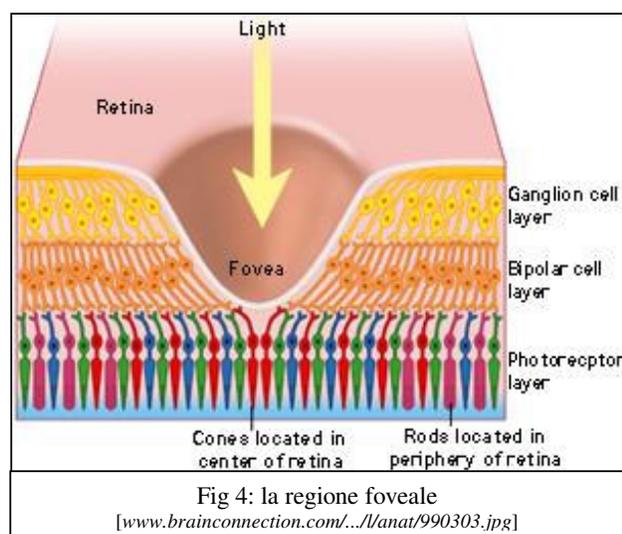
L'occhio può essere praticamente considerato come uno strumento ottico deputato a focalizzare sulla retina le immagini visive, con la minima distorsione possibile.

La luce viene focalizzata dalla cornea e dal cristallino e deve attraversare l'umor vitreo prima di venir assorbita dai fotorecettori.

La retina è in stretto rapporto con l'epitelio pigmentato, le cui cellule contengono grandi quantità di pigmento nero, melanina, che assorbe la luce che non è stata trattenuta dalla retina, impedendo che possa essere riflessa su altre parti della retina stessa, con conseguente deterioramento delle immagini visive [Kandel et al., 2003].

Data la posizione dei fotorecettori, la luce deve attraversare tutti gli altri strati della retina, prima di colpirli. I neuroni degli strati retinici superficiali, però, sono tutti privi di mielina, e perciò abbastanza trasparenti, il che permette alla luce di raggiungere i fotorecettori senza venir distorta in maniera apprezzabile.

Esiste comunque una regione della retina, la fovea (Fig 4), nella quale i corpi cellulari dei neuroni degli strati sovrastanti i recettori sono spostati lateralmente, il che permette ai fotorecettori foveali di ricevere le immagini visive nella loro forma meno distorta [Pasqualino A et al., 2002].



In posizione nasale rispetto alla fovea è localizzato il disco ottico, dove le fibre del nervo ottico lasciano la retina; in questa zona non esistono fotorecettori (macchia cieca).

I fotorecettori sono di due tipi coni e bastoncelli, le cui proprietà sono riportate nella tabella:

Sensibilità	CONI bassa: poco pigmento, poca amplificazione, specializzati per la visione diurna o fotopica	BASTONCELLI elevata: molto pigmento, molta amplificazione, specializzati per la visione notturna o scotopica
Risoluzione temporale	elevata (fino a 55 Hz)	bassa (fino a 12Hz)
Acuità visiva	elevata: particolarmente concentrati nella fovea, vie retiniche poco convergenti	bassa: assenti nella fovea, vie retiniche molto convergenti
Colori	Cromatici: tre tipi di coni, ciascuno con un diverso pigmento	Acromatici: tutti con un solo tipo di pigmento

La luce interagisce con i pigmenti visivi situati nel segmento esterno dei bastoncelli e dei coni (Fig 5). I segmenti esterni hanno un'elevata capacità di captazione della luce in quanto posseggono una elevata concentrazione di pigmenti visivi, capaci di assorbirla.

Ogni pigmento è una molecola di piccole dimensioni, capace di assorbire la luce e legata in modo covalente ad una proteina di membrana di grandi dimensioni. Come gli altri neuroni, i fotorecettori non vanno incontro a mitosi. I loro segmenti esterni vengono tuttavia rinnovati di continuo [Kandel et al., 2003].

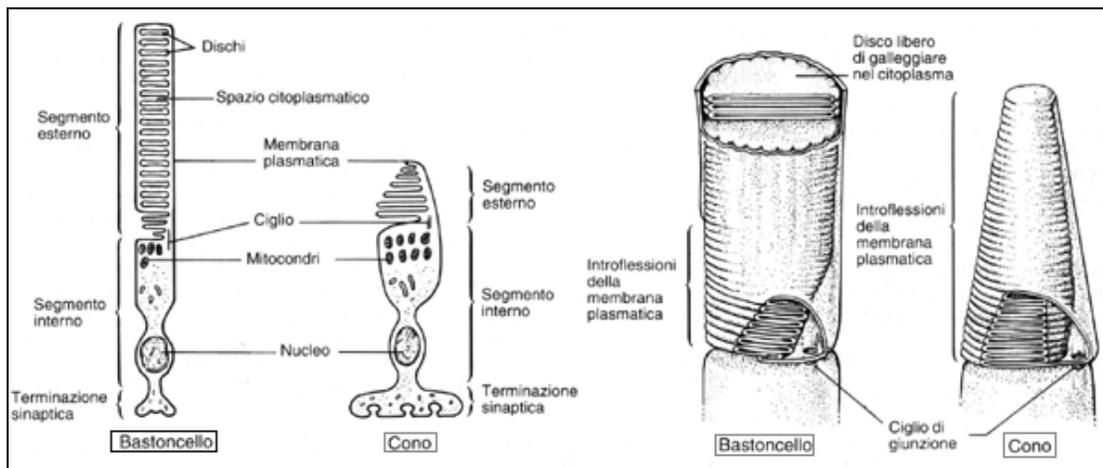
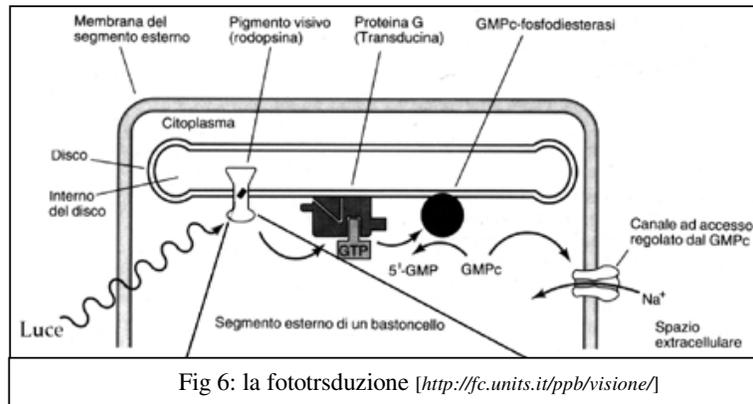


Fig 5: struttura dei coni e dei bastoncelli [<http://fc.units.it/ppb/visione/>]

## 2.1 LA FOTOTRASDUZIONE

I meccanismi della fototrasduzione comportano una serie di eventi biochimici a cascata nel segmento esterno dei fotorecettori (Fig 6). La fototrasduzione implica la chiusura di canali al  $\text{Na}^+$ , che al buio sono normalmente aperti grazie agli elevati



livelli intracellulari di GMPc. La luce, infatti, viene assorbita dalle molecole di fotopigmento (rodopsina, nei bastoncelli) che, attivate, stimolano una proteina-G (transducina, nei bastoncelli) che attiva, a sua volta, una GMPc-fosfodiesterasi. Questo enzima catalizza la degradazione del GMPc a 5'-GMP, provocando la riduzione della concentrazione intracellulare del GMPc [Yau *et al.*, 1984] e quindi la chiusura dei canali del  $\text{Na}^+$ , determinando l'iperpolarizzazione dei fotorecettori, che rappresenta quindi la risposta di questi alla stimolazione luminosa [Stayer L., 1986; McNaughton, P.A., 1990; Kandel *et al.*, 2003]. La concentrazione del GMPc nel segmento esterno dei fotorecettori [Watanabe *Et al.*, 1988; Rieke *et al.*, 1994] non è regolata soltanto dalla luce, ma anche dalla concentrazione intracellulare del calcio. La modulazione esercitata dai  $\text{Ca}^{2+}$  sui livelli di GMPc è importante per i processi di adattamento alla luce, che si verificano quando si passa da un ambiente oscuro ad uno illuminato [Panfoli *et al.*, 1994]. In questa circostanza, all'inizio la luce ha un effetto accecante, ma, dopo una decina di secondi, l'occhio si adatta alla nuova situazione. Il fenomeno dipende da una serie di fattori, come la contrazione della pupilla, ma le modifiche principali che esso comporta sono a carico dei fotorecettori. Una luce molto vivace fa chiudere tutti i canali GMPc-dipendenti, iperpolarizzando massimalmente i coni, che non sono quindi più in grado di rispondere ad ulteriori variazioni del flusso luminoso.

Lentamente, però, i coni si depolarizzano di nuovo, a parità di flusso luminoso, tornando ad essere sensibili alle sue variazioni, e l'elevata luminosità di fondo non risulta più accecante.

In tutto questo, i  $Ca^{2+}$  svolgono un ruolo importante, in quanto normalmente inibiscono la

guanilato ciclasi, l'enzima che produce il GMPc [Lolley et al., 1982; Koch et al., 1988]. Quando i canali per il  $Na^+$  sono chiusi, i  $Ca^{2+}$  che normalmente li attraversano entrando nella cellula si trovano sbarrata la via di ingresso, la loro concentrazione intracellulare si

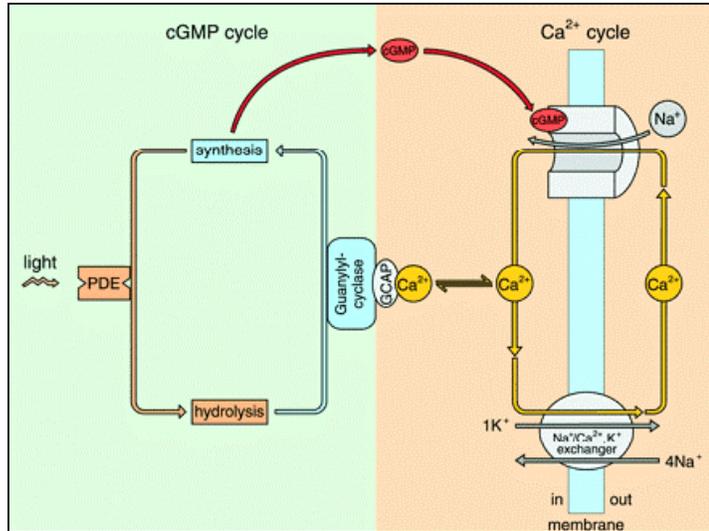


Fig 7: schema riassuntivo del processo della fototrasduzione [Kaupp e Seifert, 2002]

riduce l'inibizione che essi esercitano sulla guanilato ciclasi [Gray-Keller et al., 1994].

Viene quindi sintetizzato più GMPc ed i canali per il  $Na^+$  tornano ad aprirsi (Fig 7).

La retina modifica ed elabora i segnali evocati dalla luce nei fotorecettori prima di inviarli al sistema nervoso centrale. I neuroni d'uscita della retina sono le cellule gangliari, i cui assoni formano il nervo ottico e raggiungono il corpo genicolato laterale, il collicolo superiore ed altri nuclei del tronco dell'encefalo.

A differenza dei fotorecettori, che rispondono alla luce con modificazioni graduali del loro potenziale di membrana, le cellule gangliari trasmettono le loro informazioni sotto forma di scariche

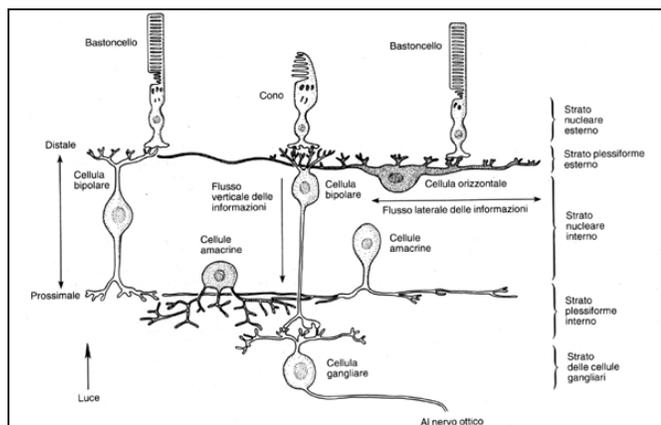


Fig 8: la codificazione visiva [http://fc.units.it/ppb/visione/]

di potenziali d'azione [Kandel et al., 2003].

I segnali dei fotorecettori vengono trasmessi alle cellule gangliari tramite tre tipi di interneuroni: le cellule bipolari, le cellule orizzontali e le cellule amacrine (Fig 8). Queste cellule sommano anche i segnali provenienti da diversi fotorecettori.

Nel tempo in cui l'informazione visiva viene trasferita dai fotorecettori alle cellule gangliari, viene anche separata in due vie parallele, dette rispettivamente via centro-on e via centro-off.

Le cellule gangliari centro-on vengono eccitate quando la luce stimola il centro dei loro campi recettivi e inibite quando ne viene stimolata la periferia; le cellule gangliari centro-off presentano risposte opposte (Fig 9). Queste

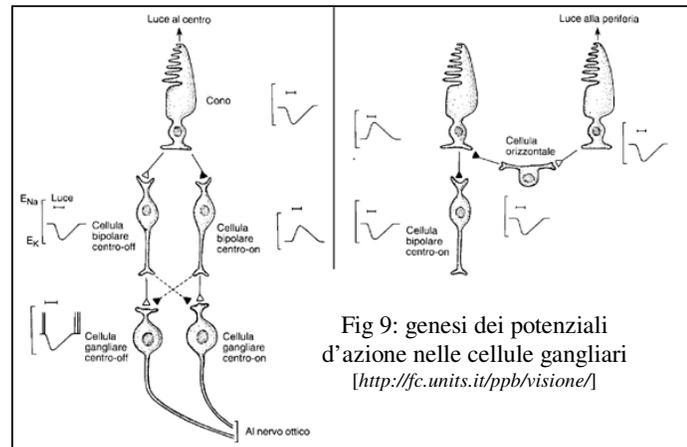


Fig 9: genesi dei potenziali d'azione nelle cellule gangliari  
[<http://fc.units.it/ppb/visione/>]

trasformazioni dell'informazione visiva fanno sì che i centri superiori possano mettere in evidenza piccole differenze e rapide variazioni di luminosità. Le diverse risposte delle cellule gangliari sono espressione dei differenti tipi di contatti sinaptici presenti nella retina.

Anche le cellule bipolari, come le cellule gangliari, si possono distinguere in centro-on e centro-off. Il neurotrasmettitore liberato dai fotorecettori eccita le cellule bipolari di un tipo ed inibisce quelle dell'altro.

Ciascun fotorecettore ha contatti sinaptici con cellule bipolari di entrambi i tipi. I recettori situati nel centro del campo recettivo di una cellula gangliare fanno sinapsi con cellule bipolari che entrano in diretto contatto con la cellula gangliare stessa [Bear, et al., 2002]

Gli stimoli provenienti dai coni nella periferia dei campi recettivi vengono invece convogliati lungo vie collaterali che passano attraverso le cellule orizzontali e le cellule amacrine [Kandel et al., 2003].

### **3. LE INFEZIONI OCULARI**

L'eziologia e l'inquadramento nosografico delle differenti infezioni dell'occhio risultano di non facile definizione e classificazione, per la molteplicità dei microrganismi cui può essere dovuta questa particolare patologia e per la variabilità legata a condizioni fisiologiche o patologiche del soggetto [*Gulletta E., 1992*]

#### **3.1 LA CELLULITE PRESETTALE**

È una lesione infiammatoria del tessuto sottocutaneo delle palpebre, solitamente, consegue ad una ferita e la sede di entrata del microrganismo infettante può essere inapparente al momento dello sviluppo della flogosi. L'elasticità della cute delle palpebre ed il distretto "relativamente chiuso" predispongono all'edema ed alla formazione dell'ascesso. I batteri più frequentemente causa dell'infezione sono: **S.aureus**, **Streptococcus gruppo A**, che talvolta produce necrosi gangrenosa. La mionecrosi del tessuto periorbitale, causata da **Clostridi** della gangrena gassosa, rappresenta una complicazione rara dei traumi periorbitali. *H.influenzae* produce edema non suppurativo delle palpebre e della congiuntiva tarsale (post-traumatica). *Ps.aeruginosa* ed altri patogeni gram-negativi causano infezioni presettali nei soggetti immunodepressi [*Gulletta E., 1992*].

#### **3.2 L'ERISPELA OCULARE**

Rara forma di cellulite acuta causata da **Streptococcus di gruppo A**. È caratterizzata da eruzioni maculari ben delimitate che tendono ad allargarsi e la cute a divenire rossa calda ed indurita. Non è solitamente visibile la lesione iniziale dell'infezione. Diversamente dalla cellulite presettale, la flogosi può interessare anche lo spazio periorbitale, causando proptosi, edema congiuntivale e gravi limitazioni della mobilità oculare [*Gulletta E., 1992*].

### 3.3 LA CELLULITE ORBITALE

Grave infezione, può portare a cecità, a trombosi del seno cavernoso e ad infezioni craniche.

CELLULITE ORBITALE ACUTA. L'agente eziologico è variabile: nei casi di insorgenza post-traumatica è principalmente **S.aureus**; nei casi associati a panoftalmite sono: **S.aureus**, **St.pneumoniae**, *Ps.aeruginosa*; nei casi associati ad infezioni dei seni paranasali sono: **S.aureus**, **Streptococcus di gruppo A**. È caratterizzata da febbre, leucocitosi, edema palpebrale, proptosi ed iperemia congiuntivale con limitazione della motilità oculare.

CELLULITE ORBITALE CRONICA. È un'infezione progressiva dei tessuti orbitali che può insorgere subdolamente dopo interventi chirurgici sulla cavità orbitale causata dai patogeni comuni della cellulite orbitale e da **Mycobacterium**, **Nocardia** [Westfall, et al., 1998].

### 3.4 LE INFEZIONI DELL'APPARATO LACRIMALE

LA DACRIOADENITE è l'infezione acuta delle ghiandole lacrimali ed è causata da **S.aureus**, **St.pneumoniae**, **Streptococcus di gruppo A**. Il microbiota colonizza la congiuntiva e, attraverso i piccoli dotti lacrimali del fornice soprattemporale o per via ematogena, raggiunge la ghiandola. La flogosi è accompagnata da secrezione congiuntivale mucopurulenta e talvolta da suppurazione. Le forme ematogene possono essere complicanze della gonorrea, parotite, mononucleosi; le forme croniche da *Chlamydia trachomatis* e le forme croniche granulomatose da *Treponema pallidum*, **M.tuberculosis**, **M.leprae**.

LA CANALICOLITE è una rara infezione della punta e del canale lacrimale che si presenta con flogosi e secrezione di essudato purulento dal canale. Nella maggior parte dei casi è sostenuta da un microbiota misto, costituito da aerobi ed anaerobi, con notevole difficoltà nell'interpretazione diagnostica, dovuta anche alla probabile contaminazione congiuntivale.

LA DACRIOCISTITE rappresenta una evoluzione delle affezioni precedenti, quando sono presenti condizioni che impediscono il deflusso del canale lacrimale [Brazier, et al., 1993].

### 3.5 LA BLEFARITE

È l'infezione dei margini palpebrali causata, quasi esclusivamente da *S. coagulasi-positivi* e *coagulasi-negativi*, talvolta da batteri gram-negativi.. Si presenta come una infiammazione acuta, fino all'ulcerazione, del margine palpebrale associata a cellulite della palpebra. La lesione può tendere a cronicizzare con la formazione di crosticine e l'ispessimento del margine palpebrale, ordeola, perdita delle ciglia edema congiuntivale e lesioni sull'epitelio corneale. Queste lesioni sono presenti anche nella blefarite angolare in cui è interessato anche il canto laterale, causata da *Moraxella lacunata* [Raskin et al., 1992; Mandel et al., 2000].

### 3.6 LA CONGIUNTIVITE

Sono le più frequenti infezioni dell'occhio, hanno incidenza variabile a seconda dell'età, della funzionalità visiva, dell'attività giornaliera prevalente e delle condizioni immunitarie del soggetto. Il contagio comunemente avviene da parte di fomites trasportati dall'aria, nello stesso soggetto per via mani-occhi, per diffusione dell'infezione dagli annessi oculari e, raramente, per via ematogena [Syed et al., 1992].

L'eziologia può variare da quella batterica, a quella micotica a quella virale.

CONGIUNTIVITE BATTERICA. Si presenta come una infezione acuta, caratterizzata da edema bilaterale, iperemia e secrezione congiuntivale e talvolta, linfadenopatia regionale.

I principali agenti eziologici di questo tipo di infezione sono: **S.aureus**, **Streptococcus di gruppo A**, **St.pneumoniae**, *H.influenzae*,

*N.gonorrhoeae* (Fig 10) [Dolter et al., 1998].; i

meno frequenti, sono le *Enterobacteriaceae* e lo *P.aeruginosa*, che provocano gravi forme nei soggetti immunocompromessi.



Fig 10: congiuntivite da *N.gonorrhoeae*  
[opt.pacificu.edu/.../13036-AS/Antibiot.html]

### 3.7 LA CHERATITE

Fattori esogeni e modificazioni del film lacrimale possono agire da concause nella patogenesi delle differenti infezioni corneali sostenute da batteri, virus e miceti. La sintomatologia, così come le lesioni più evidenti solitamente si presentano a carico di un solo occhio.

CHERATITE BATTERICA (Fig 11). È caratterizzata da dolore acuto, secrezione congiuntivale, ulcerazione dell'epitelio e, talvolta, dello stroma corneale. In caso di lesioni post-traumatiche è causata da: **S.aureus**, **St.pneumoniae**, *Ps.aeruginosa*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* [Wilkins et al., 1996]; mentre se l'epitelio corneale è integro, gli unici microrganismi in grado di invadere il tessuto e di svolgere la loro azione patogena sono: *N.gonorrhoeae*, *N.meningitidis*, **C.difteriae** [Bohigian et al., 2000].

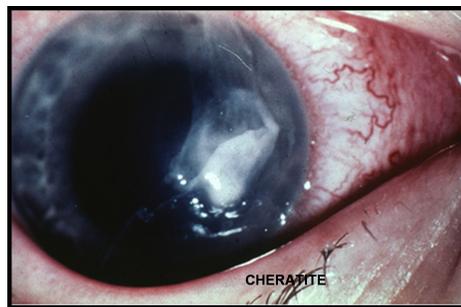


Fig 11: cheratite batterica  
[opt.pacificu.edu/.../13036-AS/Antibiot.html]

### 3.8 L'UVEITE

Si possono classificare in: (non sempre distinguibili sul piano eziopatogenetico e clinico) uveiti anteriori (iriti ed iridocicliti) infettive e allergiche; uveiti posteriori (corioretiniti).

Le uveiti infettive, consistono in lesioni flogistiche di tipo essudativo e/o granulomatoso i cui agenti eziologici sono rappresentati da virus, batteri, miceti e protozoi.

Le uveiti posteriori riconoscono quali agenti eziologici **Mycobacterium tuberculosis**, *Toxoplasma gondii*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Toxora canis*. Il processo infiammatorio progredisce velocemente, la terapia deve essere quanto più precoce e specifica possibile, al fine di evitare ulteriori complicanze oculari, quali retinite, cataratta, glaucoma e perdita dell' vista [Jett et al., 1997; Bohigian et al., 2000].

### 3.9 L'ENDOFTALMITE

È una uveite grave, acuta e diffusa e rappresenta l'infezione oculare con peggiore prognosi.

Per poter preservare la funzione visiva del malato sono richiesti non soltanto un corretto approccio clinico ma anche una diagnosi di laboratorio rapida, specifica ed affidabile.

L'infezione endoftalmica può verificarsi per via endogena e per via esogena. La prima si realizza per l'apporto ematico di microrganismi ai tessuti oculari in corso di setticemie; la seconda in seguito ad interventi chirurgici invasivi. L'eziologia risulta variabile, in relazione anche alle condizioni predisponenti ambientali e dell'ospite.

ENDOFTALMITE ESOGENA. Nei casi ad insorgenza più tipica comincia entro 72 ore da un intervento chirurgico sull'occhio o da un trauma oculare di una certa gravità. È caratterizzata da diminuzione della visione, dolore, edema palpebrale, iperemia congiuntivale ed anche, chemosi, edema corneale e grave iridociclite associata ad ipopion (Fig 12).



Fig 12:uveite esogena  
[opt.pacificu.edu/.../13036-AS/Antibiot.html]

Gli agenti eziologici più frequenti sono: nei casi postchirurgici **S.aureus.** **S.epidermidis,**

**St.pneumoniae,** *Proteus,* *Pseudomonas*; nei casi post-traumatici **bacilli sporigeni (Bacillus cereus** nel caso di endoftalmite al Policlinico Umberto I di Roma nel 1998).

ENDOFTALMITE ENDOGENA. Insorge nei soggetti con deficit immunitari o con affezioni oculari trattati in modo improprio con terapia corticosteroidica locale. L'infezione è quasi sempre bilaterale e si manifesta con diminuzione del visus ed iridociclite.

Gli agenti eziologici possono essere **S.aureus,** **St.pneumoniae,** *H.influenzae,* *N.meningitidis,* **M.fortuitum,** **Bacillus** [Gulletta E., 1992].

## 4. LA TERAPIA DELLE INFEZIONI OCULARI

Il trattamento con antibiotici deve mirare a colpire la cellula microbica con estrema selettività, senza interferire con le cellule dell'organismo ospite. Quando si sceglie una terapia antibiotica è necessario infatti, prendere in considerazione fattori relativi al batterio (specificità, sensibilità), all'ospite (funzione renale, epatica, digerente, sistema immunitario, allergie, gravidanza) e al farmaco (specificità, capacità di raggiungere il sito d'infezione, interazioni con altri farmaci, via di somministrazione, dosaggio, costo).

Gli antibiotici che oggi vengono quasi esclusivamente utilizzati, nella terapia delle infezioni oculari di origine batterica, sono gli aminoglicosidi e i fluorochinoloni [Diane P. et al., 2006], in particolare *Tobramicina* e *Netilmicina*, facenti parte della prima categoria, e *Norfloxacina* della seconda [Baum J., et al., 2000 ; Alio JL., et al., 2000; Liesegang TJ., 2001]

### 4.1 GLI AMINOGLICOSIDI

#### 4.1.1 Generalità

Sono un gruppo di farmaci battericidi usati largamente contro batteri gram-negativi, costituito da: **streptomina, neomicina, kanamicina, amikacina, gentamicina, sisomicina, tobramicina, netilmicina** (Fig 13) e altri ancora. La streptomina è il precursore; la tobramicina, la gentamicina e la amikacina sono, invece, i più recenti.

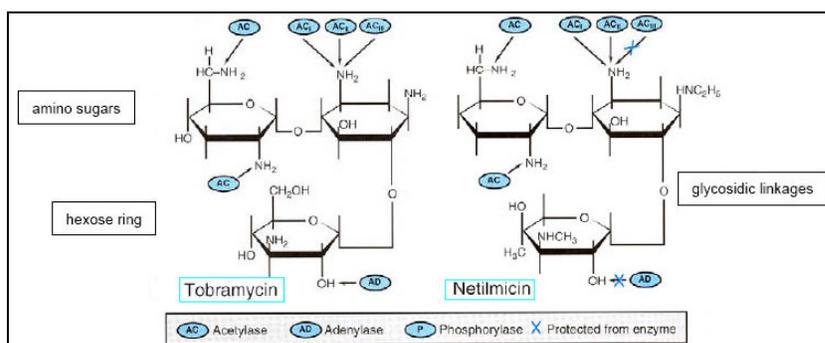


Fig 13: struttura chimica di Tobramicina e Netilmicina e siti di attacco di alcuni enzimi  
[www.med.unipi.it:8080/TESTNET/presentazioni\_ppt/bcd18/EE183/]

Gli aminoglicosidi sono inibitori irreversibili della sintesi proteica. L'evento iniziale è la diffusione passiva del farmaco attraverso le porine della membrana esterna, viene poi attivamente trasportato nel citoplasma, con un processo ossigeno dipendente, e si lega alla subunità proteica ribosomiale 30S inibendo la sintesi proteica in 3 modi [Caron *et al.*, 1994] (Fig 15):

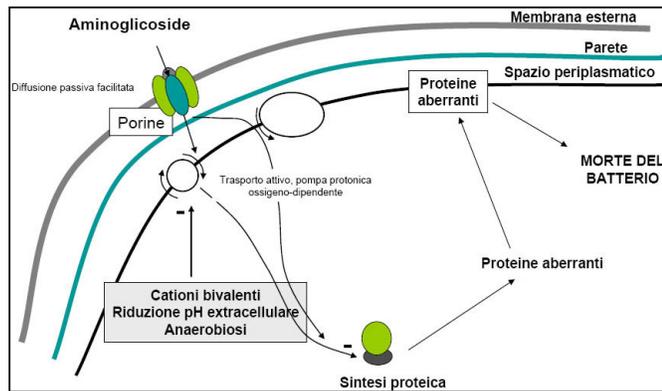


Fig 14: farmacodinamica degli aminoglicosidi  
 [www.med.unipi.it:8080/TESTNET/presentazioni\_ppt/bcd18/EE183/]

sintesi proteica in 3 modi [Caron *et al.*, 1994] (Fig 15):

1. interferiscono con il “complesso di inizio” della sintesi proteica, fissando il complesso 30S-50S al codone d’inizio (AUG) del mRNA;
2. determinano un’alterata lettura dell’mRNA causando il distacco del complesso ribosomiale e la prematura terminazione della traduzione;
3. causano l’incorporazione di aminoacidi errati producendo proteine anormali o non funzionali.

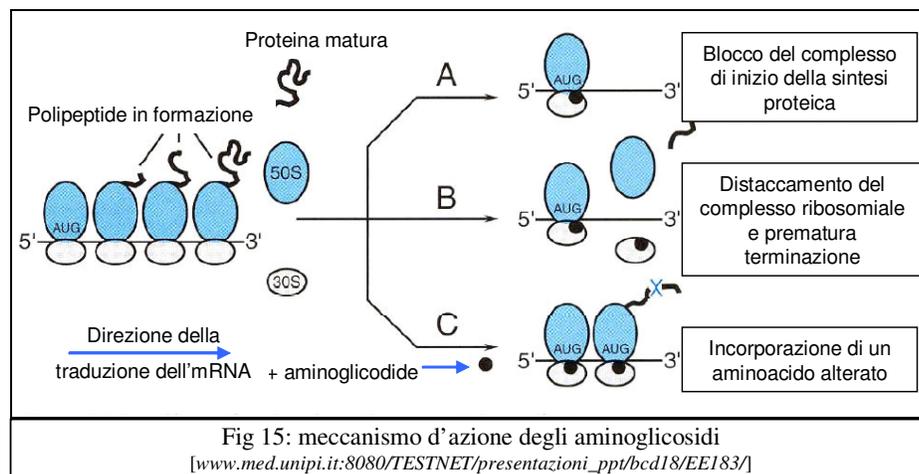


Fig 15: meccanismo d’azione degli aminoglicosidi  
 [www.med.unipi.it:8080/TESTNET/presentazioni\_ppt/bcd18/EE183/]

Il risultato è un'irreversibile azione letale sulla cellula batterica.

Sono stati stabiliti tre meccanismi di resistenza agli aminoglicosidi [Davies et al.,1991]:

1. il batterio attacca l'aminoglicoside per adenilazione, acetilazione, fosforilazione (Fig 13);
2. minor ingresso di aminoglicoside nella cellula per mutazione o delezione della porina o delle proteine implicate nel trasporto per le condizioni di crescita (anaerobiosi e acidosi);
3. il recettore sulla subunità 30S può essere alterato da una mutazione cromosomica.

Gli aminoglicosidi sono scarsamente assorbiti dal tratto gastrointestinale indenne e ben assorbiti per via parenterale, ma essendo composti altamente polari, non penetrano facilmente nelle cellule, sono pertanto esclusi dal SNC e dall'occhio. Sono eliminati per via renale in modo direttamente proporzionale alla clearance della creatinina.

#### **4.1.2 Indicazioni**

Con l'eccezione della streptomina, che possiede uno spettro antibiotico più limitato, tutti gli aminoglicosidi hanno una buona attività nei confronti dei bacilli aerobi gram-negativi ma sono inefficaci verso gli anaerobi, sono attivi contro gli stafilococchi, ma non contro gli streptococchi, pneumococchi compresi.

Gentamicina, tobramicina, amikacina e netilmicina devono essere impiegate unicamente nella terapia di gravi infezioni da bacilli gram-negativi [Milazzo et al., 1999]. Gentamicina e tobramicina hanno attività antibiotica molto simile nei confronti dei bacilli gram-negativi, con due sole differenze: la tobramicina è più efficace contro lo *P. aeruginosa* e la gentamicina è più efficace contro la *Serratia marcescens*. L'amikacina ha lo stesso spettro di attività di gentamicina e tobramicina, ma è meno sensibile all'inattivazione enzimatica. La resistenza all'amikacina significa per solito resistenza a tutti gli aminoglicosidi attualmente disponibili. La netilmicina possiede lo stesso spettro di attività della tobramicina ma è meno soggetta alle modificazioni enzimatiche [Pierre-Yves Robert et al., 2001].

### **4.1.3 Effetti collaterali**

- **GENERALE** (da somministrazione parenterale). Tutti gli aminoglicosidi sono nefrotossici e ototossici. Essi possono provocare un blocco neuromuscolare, parestesia, neuropatia periferica, reazioni di ipersensibilità e mal assorbimento ad alte dosi [*Kahlmeter, et al, 1984*].  
**Nefrotossicità.** Compare nell'8-26% dei pazienti., tuttavia è solitamente reversibile e risulta più probabile a dosaggi elevati con alte concentrazioni ematiche e nelle terapie di lunga durata in pazienti anziani con malattie renali preesistenti, o in terapia con furosemide [*Ding, 2001*]. È dovuta ad una degenerazione delle cellule tubulari prossimali. Si manifesta con lieve proteinuria, riduzione della velocità di filtrazione glomerulare, lieve aumento della concentrazione plasmatica della creatinina e ipokaliemia, ipofosfatemia e ipocalcemia [*Martínez et al 2007*]. Sebbene non sia approvata negli USA, la monosomministrazione [*Dhanireddy et al, 2005*], a differenza delle dosi multiple, sembra ridurre la frequenza della nefrotossicità [*Begg et al, 1995*]. La streptomina è scarsamente nefrotossica. La gentamicina può risultare più nefrotossica di tobramicina, amikacina e netilmicina.

**Ototossicità.** Compare soprattutto in pazienti con persistenti concentrazioni ematiche elevate di aminoglicosidi. E' reversibile solo inizialmente, diviene irreversibile per la degenerazione delle cellule ciliate [*Plogar et al, 2001*], dovuta ad una probabile alterazione del trasporto attivo (essenziale per mantenere il bilancio ionico dell'endolinfa) [*Marcotti et al., 2005*], dell'attività elettrica e della conduzione dell'impulso nervoso [*Oei, et al. 2004*].

L'ototossicità si può manifestare sia con disturbi uditivi, tinniti e perdita dell'udito per le alte frequenze; sia con disturbi vestibolari, cefalea intensa, vertigini, nausea, vomito, nistagmo e perdita dell'equilibrio, atassia.

Streptomina e gentamicina possono provocare con maggiore probabilità danno vestibolare; mentre amikacina e netilmicina provocano perdita dell'udito più che danno vestibolare. La tobramicina ha eguale influenza tanto sulla funzione vestibolare che su quella uditiva.

- **OCULARE.** In letteratura sono noti alcuni aspetti circa la tossicità oculare degli aminoglicosidi, in particolare l'infarto maculare, la degenerazione retinica e la tossicità corneale.

**Infarto maculare.** *Campochiaro e Conway (1991)* hanno segnalato 101 casi di infarto maculare dovuto a somministrazione intravitreale degli aminoglicosidi come terapia postoperatoria dell'endofitalmite. Questa tossicità della macula è stata confermata da ulteriori studi che hanno mostrato nuovi casi di infarto maculare in pazienti con endofitalmite, in cura con amikacina, somministrata con iniezioni intravitrali [*G Galloway et al., 2004*].

L'infarto maculare consiste nell'occlusione della rete capillare perifoveale, che spesso coesiste con i fenomeni essudativi, tali da raddoppiare l'estensione della zona a vascolare [*Campochiaro, et al., 1986; Judson PH, 1989*]. La zona perifoveale è l'area in cui i fotorecettori ricevono direttamente i raggi luminosi; la fovea è infatti la regione con maggior acuità visiva. Il danno dovuto all'infarto maculare comporta, quindi, offuscamento visivo e perdita subtotale del campo visivo; la pupilla risponde debolmente alla luce diretta, il fondo oculare appare pallido, opaco con una fovea color rosso.

**Degenerazione retinica:** Recenti studi effettuati, su ratto e coniglio, hanno dimostrato che alti dosaggi di gentamicina, dopo iniezione intravitreale, possono causare degenerazione dello strato nucleare interno della retina. Questo lavoro è stato confermato con registrazioni elettroretinografiche prima e dopo il trattamento con gentamicina, si è, infatti, verificata una riduzione dell'ampiezza dell'onda b con una degenerazione dei bastoncelli e dunque perdita della visione notturna [*Hancock HA et al., 2005*].

**Tossicità corneale.** Recenti studi riportati su Cornea hanno evidenziato 107 casi di cheratite associata a gentamicina e 33 associati a tobramicina dopo somministrazione topica [*F.W.Fraunfelder MD, 2006*]. Il danno è dovuto ad una degenerazione dei cheratinociti che può evolvere fino alla completa distruzione dell'epitelio corneale, rare ulcerazioni.

Recentemente uno studio pubblicato da *Marino C. et al. (2005)* ha evidenziato l'assenza di tossicità, in vitro ed in vivo, dopo somministrazione topica di Netilmicina in un modello animale di coniglio.

## 4.2 I FLUOROCHINOLONI

### 4.2.1 Generalità

Sono farmaci battericidi usati contro gram-negativi e gram-positivi: ***norfloxacin***, ***ofloxacin***, ***ciprofloxacina***, ***levofloxacina***, ***lomefloxacina***.

I fluorochinoloni agiscono inibendo le due topoisomerasi batteriche: la topoisomerasi II (DNA girasi) e la topoisomerasi IV. Quest'ultima rappresenta il principale bersaglio dei chinoloni nei batteri Gram-positivi, mentre la DNA girasi lo è per numerosi batteri Gram-negativi. I fluorochinoloni inibiscono le due topoisomerasi mediante formazione di un complesso girasi-DNA-chinolone con il risultato di impedire la risaldata dell'interruzione ad opera della subunità A e di provocare la formazione di brevi spezzoni di DNA, con conseguente attivazione di un processo di apoptosi della cellula batterica.

Le molecole di chinolone (rettangoli gialli) si legano mediante legami idrogeno con le basi non appaiate del DNA durante lo stadio di taglio di entrambi i filamenti (Fig 16). La subunità A della girasi forma un legame covalente tra la tirosina 122 e la estremità 5' del DNA; la

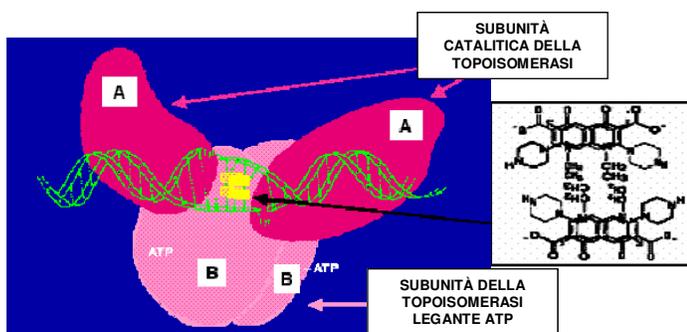


Fig 16: meccanismo d'azione dei Fluorochinoloni  
[[www.md.ucl.ac.be/infect/antiinfectieux/Assets](http://www.md.ucl.ac.be/infect/antiinfectieux/Assets)]

successiva apertura dei due filamenti di DNA lungo il taglio sfalsato di quattro basi produce una bolla di denaturazione nella quale si inseriscono le molecole autoassociate di chinolone.

Questi si legano efficacemente nel sito indotto di denaturazione, generando un complesso stabile e bloccando il completamento del superavvolgimento. Questo ostacola la normale separazione dei filamenti per la replicazione e la trascrizione, portando rapidamente alla morte della cellula batterica.

La differente struttura della girasi umana garantisce una ottima selettività per i microrganismi. Anche la topoisomerasi IV è costituita da quattro subunità. Essa separa le molecole di DNA Figlie concatenate che si producono durante la replicazione del DNA.

È stata notata resistenza, particolarmente con *P.aeruginosa* e **Staphylococcus aureus** meticillino-resistente. La resistenza a un fluorochinolone generalmente significa la resistenza a tutti i fluorochinoloni [Hooper DC et al., 1991; Domart Y et al., 1994].

La norfloxacin per via orale è scarsamente assorbita; gli altri fluorochinoloni sono, invece, disponibili solo per via orale. Dopo la somministrazione, si distribuiscono ampiamente nella maggior parte dei fluidi e dei tessuti corporei e vengono poi variamente metabolizzati nel fegato ed escreti nelle urine. Tuttavia, la norfloxacin non raggiunge concentrazioni adeguate per il trattamento di infezioni sistemiche [Pierre-Yves Robert et al.,2001].

#### **4.2.2 Indicazioni**

Tutti i chinoloni e i fluorochinoloni sono utili nelle IVU. I fluorochinoloni sono efficaci nelle prostatiti batteriche e nelle diarree batteriche a eccezione di quella causata da **Clostridium difficile**; sono efficaci inoltre nel trattamento della gonorrea e del cancroide. I fluorochinoloni, eccetto la norfloxacin, sono utili nella polmonite, nelle infezioni cutanee o dei tessuti molli e nell'osteomielite causata da batteri sensibili.

L'ofloxacin è approvata per il trattamento delle infezioni causate da *Chlamydia trachomatis*.

### **4.2.3 Effetti collaterali**

- **GENERALE** (da somministrazione orale e parenterale). Circa il 5% dei pazienti accusa nausea, vomito e anoressia. Anemia e nefrotossicità sono rare. Gli effetti collaterali nel SNC si verificano in meno del 5% dei pazienti (cefalea, insonnia, vertigini e sbalzi d'umore).

Sono sconsigliati nei pazienti con convulsioni o altre anomalie del SNC, perché potrebbero portare al riaccutizzarsi di tali fenomeni [Sandson, et al 2007]. Sono controindicati nei bambini, nelle donne in gravidanza e in allattamento, poiché questi farmaci attaccano le cartilagini e quindi potrebbero portare ad anomalie della crescita nel bambino e a teratomi [Ahmed AS, et al, 2006]. I fluorochinoloni possono causare accumulo di teofillina.

- **OCULARE**. Non sono presenti in letteratura molti studi a riguardo ma gli effetti più frequentemente riscontrati sono fotosensibilità e alterazioni corneali.

**Fotosensibilità.** Tutti i fluorochinoloni possono causare, ad elevato dosaggio, fotosensibilità, disturbo che comporta una maggiore sensibilità alla luce, in particolare la lomefloxacin, infatti, viene scarsamente utilizzato in terapie oftalmiche.

**Alterazioni corneali.** Recentemente sono stati riscontrati 35 casi di cheratite associate a ciprofloxacina e 6 associati a moxifloxacina, dopo somministrazione topica [F.W.Fraunfelder, MD, 2006]. Sembra, infatti, che questi farmaci siano in grado di provocare flogosi dell'epitelio corneale con infiltrati e precipitati [Essepian J.P et al., 1995; Eiferman et al., 2001] ed, inoltre, di ritardare la guarigione e la normale riepitelizzazione corneale dopo lesioni da terapie laser [Moreira LB et al., 1997; Patel GM et al., 2000].

Studi in vivo su *rabbit* hanno evidenziato un possibile danno citotossico nei cheratinociti dopo somministrazione topica di Ofloxacina [Pollock et al., 2003; Mah FS et al., 2006]. Le cornee mostravano alterazioni istopatologiche del tessuto stromale [Oguz H., et al, 2007] e una riduzione dello spessore dello strato epiteliale; evidenziando, quindi, perdita di cheratinociti e un conseguente danno dello stroma corneale [Mallari PL. et al., 2001].

# **Parte II: SCOPO DEL LAVORO**

## **5. SCOPO DEL LAVORO**

Dato il crescente impiego di formulazioni oftalmiche antibatteriche nel trattamento delle affezioni oculari, si rende necessario chiarire quali siano i reali rischi provenienti dall'applicazione quotidiana e prolungata di questi farmaci.

In letteratura sono noti alcuni aspetti circa la tossicità oculare in particolare a carico di alcuni aminoglicosidi; nondimeno questa classe di antibiotici, data la loro selettività, resta a tutt'oggi il trattamento di prima scelta nelle patologie oculari batteriche [*Papa V. et al., 2002*]

Più recentemente, nella pratica clinica sono stati introdotti i fluorochinoloni, antibiotici a più ampio spettro d'azione [*Smith A, et al, 2001*]; tuttavia mancano studi dettagliati circa la loro eventuale tossicità oculare [*Hwang DG., 2004*].

Sulla base delle conoscenze degli Aminoglicosidi e dei Fluorochinoloni, abbiamo allestito uno studio comparativo sugli effetti in acuto di Tobramicina, Netilmicina (aminoglicosidi) e Norfloxacin (fluorochinolone), andando a valutare le eventuali alterazioni retiniche causate dalla somministrazione topica di questi tre farmaci.

Nel dettaglio abbiamo valutato:

- l'attività elettrica della retina in risposta a particolari stimoli luminosi;
- il numero delle file di nuclei presenti nello strato nucleare esterno della retina;
- l'intera morfologia retinica.

# **Parte III: MATERIALI E METODI**

## **6. MATERIALI E METODI**

### **6.1 MODELLO SPERIMENTALE *IN VIVO***

**Animali da esperimento.** La sperimentazione è stata eseguita dopo l'allestimento di tre gruppi sperimentali 18 ratti maschi Winstar (Harlan, Italy), adulti sani, con un peso di 250g ± 25g sono stati randomizzati in tre gruppi:

1. Gruppo trattato con *Norfloxacina (Nf)* [6]
2. Gruppo trattato con *Tobramicina (Tb)* [6]
3. Gruppo trattato con *Netilmicina (Nt)* [6]

Gli animali di ciascun gruppo hanno ricevuto il rispettivo farmaco topicamente nell'occhio destro, 2 gocce applicate 6 volte al giorno per 5 giorni, mentre l'occhio sinistro, usato come controllo, è stato trattato con soluzione fisiologica con identica modalità di somministrazione. Prima dell'inizio del trattamento, dopo la prima applicazione e a fine trattamento è stato effettuato l'ERG da flash per andare a valutare l'attività elettrica della retina.

**Espianto delle retine.** Subito dopo l'ultima registrazione elettroretinografica gli animali sono stati anestetizzati con iniezione intraperitoneale di uretano (0,7ml/hg; 20% in soluzione salina) (Sigma, USA).

In seguito procediamo con l'asportazione di entrambi gli occhi, che vengono forati da parte a parte e immersi in una soluzione di fissaggio al 4% di PFA in tampone fosfato 0.1 M (Sigma, USA) per almeno 1 ora .

Tutti gli animali sono stati, quindi, sacrificati con una dose aggiuntiva di urtano.

Dopodiché procediamo togliendo cornea e cristallino da entrambi gli occhi, in modo da ottenere solo il tessuto retinico per l'allestimento dei preparati istologici.

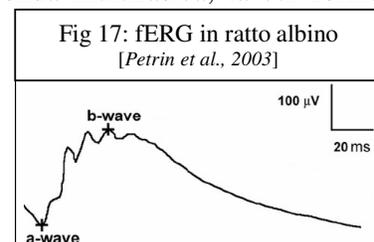
## 6.2 REGISTRAZIONI ELETTROFISIOLOGICHE CON fERG

### 6.2.1 L'elettroretinogramma da flash.

Consiste nella registrazione dell'attività elettrica della retina in risposta a particolari stimoli luminosi, permettendo di valutare in modo distinto la funzionalità dei due diversi tipi di fotorecettori, i coni ed i bastoncelli [Armington JC., 1974]. L'ERG misura la variazione del potenziale elettrico retinico indotto da uno stimolo luminoso; la membrana cellulare dei fotorecettori contiene, infatti, i pigmenti visivi sensibili alla luce, che trasformano l'energia luminosa in variazioni del potenziale di membrana [Berson EL., 1981]. Gli elettrodi, posti uno sulla cornea e l'altro sulla cute dell'orecchio o della guancia, permettono di registrare le variazioni di potenziale che dalla retina si trasmettono alla cornea. Trattandosi di voltaggi molto piccoli è necessario amplificare considerevolmente il segnale elettrico per poterlo visualizzare su un poligrafo o su di un oscilloscopio. Abitualmente si valuta l'ampiezza e le latenze di oscillazioni di potenziale dopo aver mediato più risposte evocate dallo stimolo luminoso. Questa tecnica chiamata "average" è utile per differenziare il segnale rispetto al rumore di fondo in modo da rendere evidente il tracciato fERG.

Per la stimolazione luminosa si usano flash generati elettronicamente dotati di filtri di attenuazione di diversa densità o selettivi per differenti componenti spettrali della luce al fine di stimolare selettivamente i diversi fotorecettori e le vie retiniche post-recettoriali connesse.

Il tracciato tipico dell'ERG (Fig 17) è rappresentato da un'onda multifasica, la cui forma dipende dal contributo di diversi componenti retinici; principalmente è composto da due tipi di onde: un'onda *a*, piccola, di breve durata e rivolta verso il basso, di polarità negativa, il cui fronte iniziale dipende dall'attivazione della parte prossimale dei fotorecettori; un'onda *b*, ampia e rivolta verso l'alto, di polarità positiva che segue l'onda *a* e che ha un'origine post-recettoriale nelle cellule bipolari [Bush et al., 1994; Robson et al., 2003].



## 6.2.2 Le registrazioni.

Prima di effettuare le registrazioni elettrofisiologiche è necessario mettere gli animali in adattamento al buio per 2 ore; questo per poter registrare la risposta al flash dei bastoncini.

I ratti vengono anestetizzati con iniezione intraperitoneale di avertina (250mg/kg), anestetico locale che non inibisce la risposta elettroretinografica, e alloggiati sopra un apparato stereotassico, la temperatura sarà mantenuta a 37°C e il battito cardiaco verrà, costantemente, monitorato; tutte queste operazioni e le successive vengono effettuate al buio con l'aiuto di una lampada ad infrarosso [Jacobs *et al.*, 2001]. Durante l'esperimento possono essere fornite dosi aggiuntive di anestetico.

Sull'animale immobilizzato viene montato l'apparato di registrazione, ovvero vengono inseriti gli elettrodi *di riferimento*, sottocute, a livello dell'orecchio, destro e sinistro, mentre altri due elettrodi, detti *attivi*, vengono posizionati sulle due cornee. Un ulteriore elettrodo, detto *terra*, viene inserito, sottocute, sul dorso, in prossimità della coda; necessario per completare il circuito elettrico e favorire l'uscita di corrente dall'animale.



Fig 18: Ganzfeld  
[www.biomedicamangoni.it]

Il posizionamento degli elettrodi costituisce la fase più delicata della procedura, dato che i due elettrodi *attivi* devono essere posizionati in modo simmetrico, dato che due diverse distanze retina-cornea determinerebbero due distinte differenze di potenziale; inoltre è necessario che gli elettrodi di *riferimento* siano posizionati proprio sopra l'orecchio onde evitare la presenza del cardiogramma come rumore di fondo sul tracciato ERG. Gli *attivi* appoggiati sulla cornea, registrano il segnale elettrofisiologico, generato dalla cupola Ganzfeld (Fig 18); la peculiarità di questo strumento sta nella capacità di generare elettrotonicamente flash luminosi a diversa intensità e con diversi filtri di attenuazione [Gargini *et al.*, 2004].

Verrà pertanto registrata dalla retina una risposta di massa, monitorata attraverso un apposito software, che consente di analizzare l'ampiezza e la latenza dell'*onda b*.

### 6.2.3 Il protocollo della stimolazione fERG tramite Ganfield

INTENSITA' STIMOLO (cd)	FILTRO (cd)	SFONDO (cd)	FREQ STIM (Hz)	SOMME
0,1	3	0	100	3
0,1	2,4	0	100	3
0,1	1,8	0	100	3
0,1	1,2	0	100	3
0,1	0,6	0	100	3
0,1	0	0	100	1
0,2	0	0	100	1
0,5	0	0	100	1
1	0	0	100	1
2	0	0	100	1
5	0	0	100	1
10	0	0	100	1
20	0	0	100	1
20	0	25	500	25

Le prime cinque stimolazioni vengono effettuate con una intensità luminosa costante pari a 0,1cd e con filtro di attenuazione che diminuisce ad ogni flash. Queste registrazioni, data la bassa intensità luminosa e la presenza del filtro, permettono di essere fatte in rapida successione. Il tracciato che ne risulta è ottenuto dalla media effettuata su tre somme per uno stesso stimolo.

Le successive otto stimolazioni vengono effettuate con una crescente intensità luminosa e senza filtro di attenuazione, questo comporta, quindi, un intervallo di tempo tra uno stimolo e l'altro (2 minuti), necessario a riportare gli animali nello stato di adattamento al buio, affinché i coni siano nuovamente depolarizzati, pronti ad essere attivati dalla luce per generare potenziali d'azione. Il tracciato che ne risulta è ottenuto dalla singola stimolazione.

L'ultima stimolazione è chiamata *fotopica* perché è dovuta alla risposta dei coni; infatti questa registrazione viene effettuata ad una massima intensità luminosa, 20cd, e con una luce di sfondo, quindi i bastoncelli non possono più essere attivati per generare potenziali d'azione.

Le registrazioni elettroretinografiche, effettuate secondo il protocollo, sono state eseguite su ciascun gruppo di animali, prima del trattamento, dopo 2h, e dopo 5gg di somministrazione topica di *Netilmicina*, di *Norfloxacin*a e di *Tobramicina*.

Dai tracciati ottenuti sono state estrapolate le ampiezze dell'*onda b*; le medie delle ampiezze ottenute per gli animali dello stesso gruppo ai diversi tempi di osservazione sono state espresse in funzione della *luminanza*, ovvero la misura fotometrica che descrive la quantità di luce emessa in relazione alla distanza ed alla direzione della sorgente luminosa:

$$L_v = \frac{d^2 F}{dA d\Omega \cos \theta}$$

**$L_v$**  is the luminance ( $\text{cd}/\text{m}^2$ ),

**$F$**  is the luminous flux or luminous power (lm),

**$\theta$**  is the angle between the surface normal and the specified direction,

**$A$**  is the area of the surface ( $\text{m}^2$ ), and

**$\Omega$**  is the solid angle (sr).

### 6.3 LE TECNICHE ISTOLOGICHE

Per l'analisi istologica le retine sono state fissate, incluse e criosezionate seguendo procedure standard.

**Fissazione.** La fissazione è un trattamento atto a preservare il tessuto da fenomeni degenerativi e a fissarne la struttura originaria.

Entrambi gli occhi vengono forati da parte a parte e immersi in una soluzione di fissaggio al 4% di PFA in tampone fosfato 0.1 M (Sigma, USA) per almeno 1 ora a temperatura ambiente.

**Disidratazione.** La soluzione di fissativo viene sostituita con una soluzione crioprotettiva costituita da saccarosio al 30% in tampone fosfato 0.1 M (Sigma, USA).

Le retine vengono lasciate fino a quando precipitano sul fondo del tubo (fino a 24 ore a 4°C). Questo passaggio ha la funzione di eliminare gran parte dell'acqua presente nei tessuti, disidratandoli lentamente ed impedendo la formazione di microcristalli di ghiaccio nel successivo passaggio di congelamento.

**Inclusione.** Per poter facilitare il taglio al criostato, le retine vengono poste, per 15 minuti in agitazione, in una resina a base acquosa liquida a temperatura ambiente e a basso punto di congelamento, "Tissue-Tek" (Sigma, USA). Intanto viene preparato una base di supporto con lo stesso "Tissue-Tek", fatto solidificare a -80. La retina verrà poi posizionata sul supporto e ulteriormente ricoperta di resina, il tutto viene fatto solidificare a -80°C .

I blocchetti vengono poi conservati a -80°C fino al giorno del taglio.

**Criosezioni di retine.** I blocchetti vengono tagliati utilizzando un criostato Leica CM3050s, in modo da ottenere sezioni trasversali dello spessore di 16 µm. Le sezioni sono raccolte su vetrini del tipo SuperFrost, la cui superficie è attivata elettrostaticamente per permettere una

adesione immediata delle sezioni effettuate, e mantenuti poi a -80°C fino al momento dell'uso.

Prima di procedere con i protocolli successivi, le sezioni vengono fatte asciugare per almeno un'ora a temperatura ambiente, in modo da consentire una migliore aderenza al vetrino.

### **6.3.1 Colorazione con Ioduro di Propidio.**

Lo Ioduro di Propidio è un colorante di natura fenantridinica, che quando si intercala nel DNA a doppia elica, forma un complesso sufficientemente stabile che emette una fluorescenza nello spettro del rosso (625 nm) quando eccitato (488 nm). PI si intercala in maniera stechiometrica al DNA e quindi quanto maggiore è la quantità di DNA maggiori saranno le molecole di fluoroforo intercalate e maggiore sarà la fluorescenza rilevabile

A livello retinico lo Ioduro di Propidio marca in rosso i nuclei dello strato esterno di cellule nervose della retina; ciò permette di contare le file dei fotorecettori, che in un ratto sano variano da 10 a 14. In questo modo è possibile fare una valutazione isto-patologica dello strato nucleare esterno della retina.

I vetrini con le sezioni ottenute al criostato sono stati sottoposte a tre lavaggi da 10 minuti ciascuno in PBS per eliminare le tracce di resina di inclusione.

Successivamente ogni sezione viene coperta con Ioduro di propidio (Sigma, USA) per 30 secondi, al termine dei quali si effettua la chiusura con un vetrino coprioggetti e smalto.

A questo punto i vetrini sono pronti per essere letti al microscopio confocale e le immagini potranno essere acquisite mediante il software.

### 6.3.1.1 Il microscopio confocale a luce laser

Il microscopio confocale, LEICA, utilizzato per l'analisi delle immagini è costituito da:

- un microscopio invertito a fluorescenza convenzionale (LEICA DMIRBE);
- una lampada ad alta pressione di mercurio e due diverse fonti di luce laser, una ad argon, per la luce di 488 nm, ed una ad helio-neon per la luce 543 nm e 633 nm;
- un sistema computerizzato che permette di analizzare le diverse sezioni dei campioni sia parallele sia verticali al piano focale, e dimostrarle in sequenza o di sovrapporre dando un'immagine composita a fuoco o una rappresentazione 3-D della struttura osservata. Questo sfrutta la limitata diffrazione della luce laser e permette di focalizzare sezioni ottiche dei preparati di immunofluorescenza, molto ristrette. La luce proveniente da altri piani è soppressa da un diaframma e non arriva al sistema di rilevamento, costituito dal fotomoltiplicatore.

L'innovazione della microscopia confocale rispetto alla tecnica classica della microscopia in fluorescenza è costituita dal sistema ottico che seleziona le emissioni di fluorescenza permettendo il passaggio esclusivo della radiazione emergente dal piano focale di interesse, eliminando completamente l'interferenza delle fluorescenze out-of-focus; la risoluzione ed il contrasto ottenuti sono nettamente migliori.

La produzione dell'immagine confocale si ottiene mediante l'illuminazione del campione con un fascio di luce laser che viene sequenzialmente focalizzato su ogni singolo punto del preparato; l'immagine dell'intero oggetto viene ottenuta mediante scansione rapida e ricostruita da una successiva analisi dei singoli punti scansionati. Il microscopio confocale non forma direttamente immagini, ma la scansione del preparato lungo gli assi x,y (immagini 2D) ed eventualmente z (immagini 3D) per singoli punti, permettendo la ricostruzione via software.

### **6.3.2 Colorazione con Ematossilina – Eosina.**

E' la colorazione istologica tradizionale. L'ematossilina colora i nuclei di porpora cupo, e l'eosina colora le ombre citoplasmatiche in rosa. Le strutture che si colorano con l'eosina sono dette eosinofile o acidofile, dato che l'eosina è un colorante acido; le strutture che si colorano con l'ematossilina sono dette basofile, dato che questa è un colorante basico.

Abbiamo allestito un nuovo protocollo dal momento che i preparati sono stati congelati:

1. Formalina 10% (30 min);
2. Fontis (passaggio);
3. H<sub>2</sub>O (passaggio);
4. Ematossilina +Acido Acetico 3% (3,5 min);
5. Fontis (passaggio);
6. Differenziatore Etanolo 70%+HCl 1% (2 tuffi);
7. Fontis (passaggio);
8. Ammoniaca 1% (3 tuffi);
9. Fontis (passaggio);
10. H<sub>2</sub>O (passaggio);
11. Eosina+Acido acetico 1% (3,5 min);
12. Etanolo 95° (passaggio);
13. Etanolo 95° (passaggio);
14. Etanolo assoluto (passaggio);
15. Etanolo assoluto (passaggio);
16. Xilolo;
17. Chiusura.

A questo punto i vetrini sono pronti per essere letti al microscopio ottico e le immagini potranno essere acquisite mediante il software.

### 6.3.3 Soluzioni utilizzate

➤ Avertina (conc. finale 20mg/ml)

- 2.2.2 Tribromoethanol 2.5 gm
- 2 methyl-2-butanol 5 ml
- acqua distillata 200 ml

➤ Tampone fosfato 0.1 M, pH 6.3 (1 litro)

- •  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  21,6 ml
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  78,4 ml
- $\text{H}_2\text{O}$  mQ 900 ml

➤ PBS (Phosphate buffered saline) 1x:

- NaCl 80g (conc. finale 1,37M)
- KCl 2g (conc. finale 27mM)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  11,5g (conc. finale 81mM)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,59g (conc. finale 19mM)
- portare ad un litro con  $\text{H}_2\text{O}$  distillata e controllare il pH (7.4) (PBS 10x)
- usato diluito 10 volte in acqua

➤ Ioduro di Propidio (PI) (1:1000)

- PBS 100 ml
- PI 100 mg

# **Parte IV: I RISULTATI**

## **7. I RISULTATI**

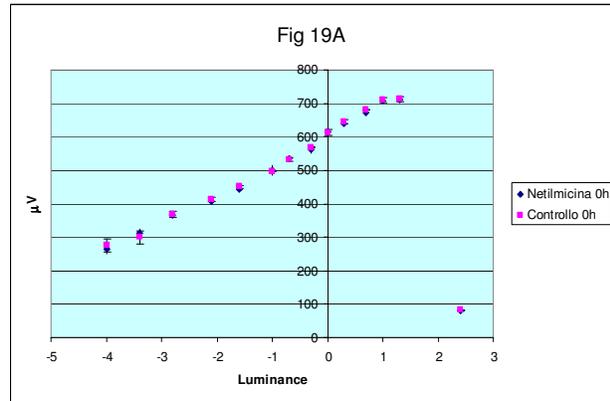
I risultati ottenuti nei nostri esperimenti vengono esposti nel seguente ordine:

- Grafici relativi alle ampiezze dell' *onda b*;
- Immagini relative alla colorazione con Ioduro di propidio dello strato nucleare esterno plessiforme di cellule nervose della retina;
- Immagini relative alla colorazione con Ematossilina-Eosina dell'intero tessuto retinico.

## 7.1 ELETTROFISIOLOGIA - REGISTRAZIONI fEEG

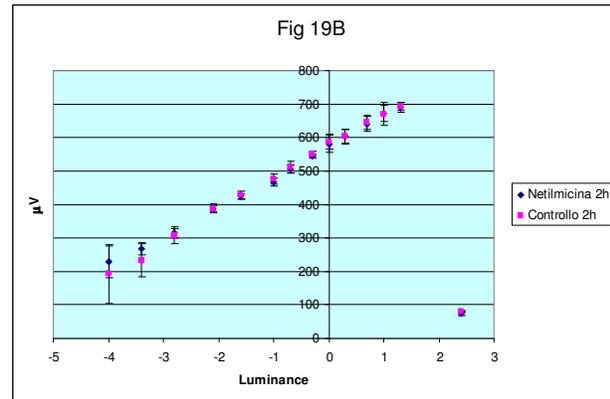
luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	265,15	275,3	14,94	19,43
-3,4	312,92	298,9	10,9	18,17
-2,8	366,22	368,8	3,964	9,363
-2,1	407,79	414,03	7,627	6,588
-1,6	443,24	450,87	7,611	5,341
-1	500	497,86	13,94	0,462
-0,7	534,77	532,9	1,026	6,132
-0,3	561,94	569,11	10,34	1,286
0	614,22	613,53	1,59	9,38
0,3	640,89	646,15	4,804	5,751
0,7	671,7	680,31	0,284	0,16
1	708,74	709,82	3,069	8,119
1,3	711,01	712,6	1,155	7,552
2,4	80,01	82,563	5,379	1,655

Tabella 19A



luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	228,07	192,81	47,41	88,12
-3,4	267,48	233,41	17,76	49,94
-2,8	314,19	307,2	13,66	24,65
-2,1	387,25	387,44	8,582	13,71
-1,6	424,26	427,18	7,457	11,55
-1	467,95	476,35	12,18	14,95
-0,7	505,19	512,17	11,3	18,54
-0,3	544,36	551,33	6,178	8,048
0	581	586,84	25,91	21,61
0,3	603,43	603,35	22,47	20,78
0,7	640,86	645,76	22,57	21,46
1	672,43	669,98	23,02	33,39
1,3	690,31	693,42	15,71	11,92
2,4	74,11	79,278	5,708	3,263

Tabella 19B



luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	248,31	247,64	38,48	47,89
-3,4	312,94	300,51	42,15	37,75
-2,8	369,78	375,79	43,53	42,27
-2,1	419,84	422,01	38,21	49,91
-1,6	460,98	457,7	34,56	37,9
-1	510,69	502,98	43,62	43,34
-0,7	550,97	544,89	47,52	46,2
-0,3	597,89	585,4	38,17	46,62
0	620,84	614,17	25	31,3
0,3	658,29	645,1	32,57	39,56
0,7	674	664,06	38,52	47,1
1	706,82	700,82	24,43	28,01
1,3	727,08	725,48	17,26	10,97
2,4	80,478	77,838	6,713	11,66

Tabella 19C

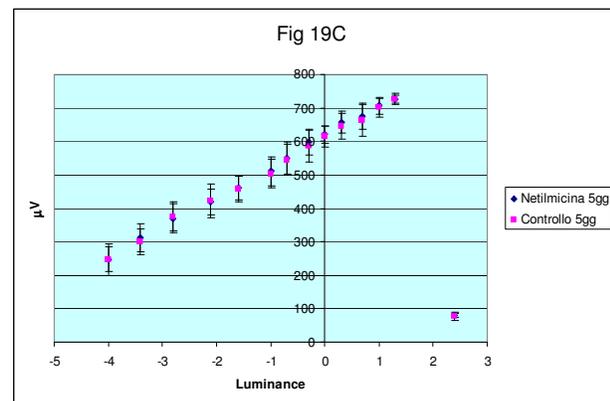
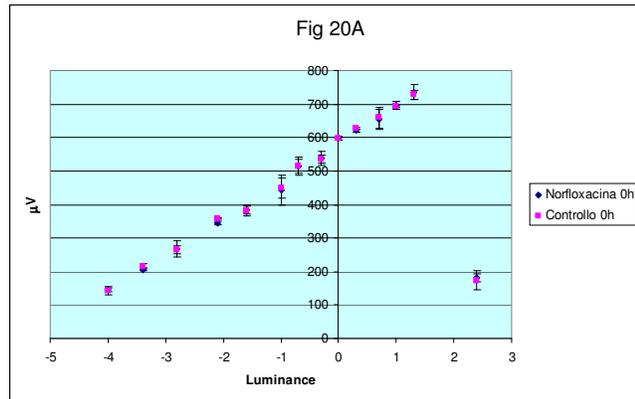


Fig 19: Registrazioni ERG prima (A) dopo 2h (B) e 5gg (C) di somministrazione topica di *Netilmicina*

Tab.19: Medie delle ampiezze dell'onde b e le rispettive deviazioni standard in relazione alla *luminance*, prima (A) dopo 2h (B) e 5gg (C) di somministrazione topica di *Netilmicina*

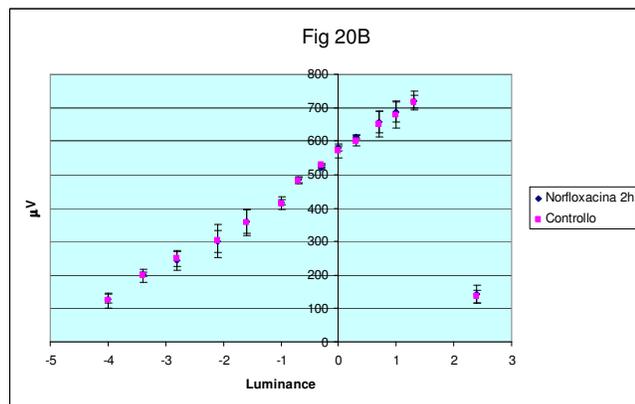
luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	144,69	142,99	6,033	10,88
-3,4	206,32	214,89	3,763	7,228
-2,8	268,65	264,43	24,28	12,06
-2,1	345,75	358,11	6,465	1,568
-1,6	384,83	380,23	14,16	15,51
-1	441,96	449,48	44,76	30,12
-0,7	513,94	514,41	20,58	25,87
-0,3	539,46	534,87	20,64	11,78
0	597,81	596,84	7,037	4,725
0,3	620,1	627,51	4,15	3,778
0,7	654,35	659,59	29,08	31,03
1	696,99	692,09	11,66	3,372
1,3	735,54	727,66	23,23	13,44
2,4	180,92	172,89	12,23	27,97

Tabella 20A



luminance	dx	sn	Dx	Sn
-4	129,19	124,01	12,54	22,98
-3,4	202,28	197,91	6,444	20,25
-2,8	243,92	248,8	30,76	21,7
-2,1	300,27	302,81	33,3	49,07
-1,6	360,37	356,81	35,68	39,46
-1	417,53	414,63	7,883	19,16
-0,7	484,49	481,22	9,384	9,674
-0,3	520,34	530,59	4,146	1,038
0	578,73	572,1	6,686	20,65
0,3	612,46	601,53	4,642	16,51
0,7	656,15	651,62	32,8	38,69
1	687,7	678,04	30,77	38,48
1,3	720,45	717,32	28,83	18,92
2,4	142,63	135,68	27,62	20,27

Tabella 20B



luminance	dx	sn	Dx	Sn
-4	181,67	187,9	26,88	32,55
-3,4	245,81	252,04	27,04	13,27
-2,8	299,05	303,2	42,69	47,26
-2,1	363,39	354,52	73,47	76,56
-1,6	425,79	426,77	82,38	72,94
-1	484,51	484,83	94,4	87,95
-0,7	556,37	547,04	106	51,8
-0,3	591,46	580,37	84,89	73,66
0	638,46	635,74	60,91	55,67
0,3	656,72	658,15	49,7	40,19
0,7	678,8	678,58	37,32	45,84
1	714,51	704,21	49,7	50,93
1,3	742,68	739,6	17,58	15,86
2,4	157,29	152,35	14,88	13

Tabella 20C

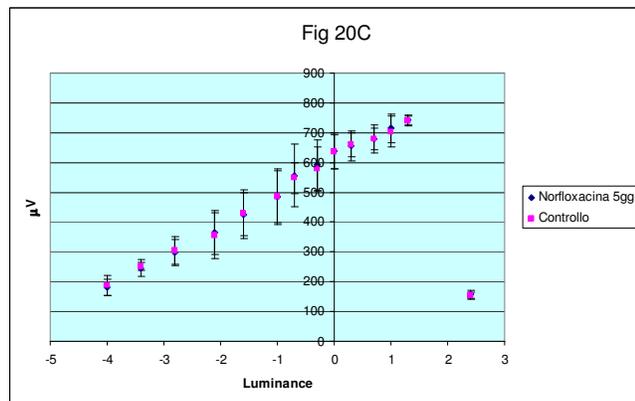
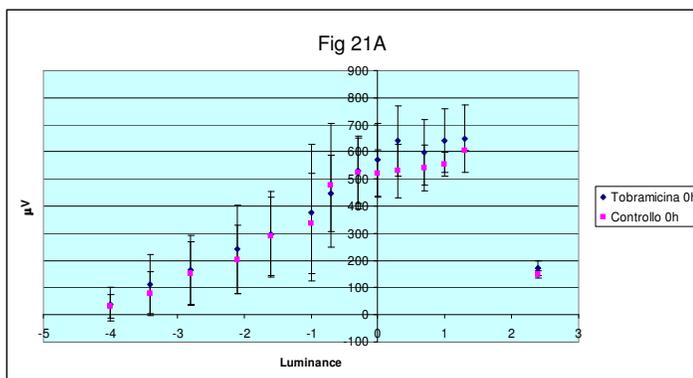


Fig 20: Regrazioni ERG prima (A) dopo 2h (B) e 5gg (C) di somministrazione topica di *Norfloxacin*

Tab.20: Medie delle ampiezze dell'onde b e le rispettive deviazioni standard in relazione alla *luminance*, prima (A) dopo 2h (B) e 5gg (C) di somministrazione topica di *Norfloxacin*

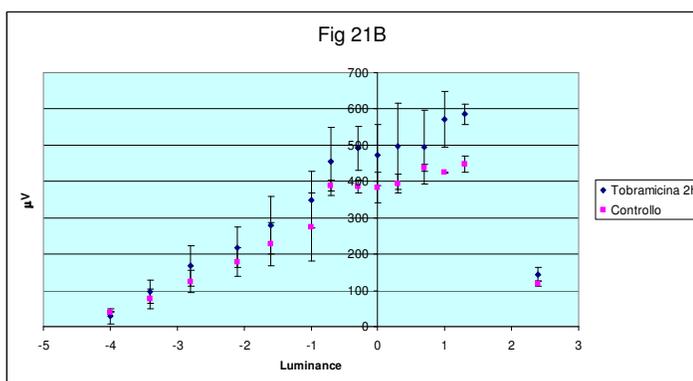
luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	37,652	32,064	62,14	43,5
-3,4	112,85	76,823	108,8	80,56
-2,8	166,45	151,86	127,7	117,2
-2,1	241,43	202,96	162,8	125,4
-1,6	295,77	289,88	157,7	143,4
-1	376,97	336,26	252,7	184,6
-0,7	447,41	477,05	140,6	227,2
-0,3	529,95	524,9	120,4	134,7
0	570,96	520,51	133,8	88,39
0,3	640,62	530,27	129,4	99,44
0,7	598,96	541,5	120,1	83,55
1	642,25	555,18	117,9	43,5
1,3	648,11	604,49	122,7	1,381
2,4	171,79	149,29	25,78	12,83

Tabella 21A



luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	28,537	40,365	21,9	1,842
-3,4	96,029	76,335	32,46	26,93
-2,8	167,86	124,67	55,93	30,84
-2,1	218,53	177,41	54,99	40,05
-1,6	279,84	227,7	78,77	59,62
-1	349,95	273,44	77,17	93,91
-0,7	455,08	388,18	93,86	14,5
-0,3	492,19	385,25	60,57	17,26
0	472,02	383,79	83,45	42,81
0,3	496,74	393,92	119,5	25,73
0,7	494,79	437,99	102,4	10,36
1	571,61	424,8	75,71	1,381
1,3	585,61	447,75	28,58	22,79
2,4	144,26	118,39	18,34	8,316

Tabella 21B



luminance	MEDIE		DEVIAZIONI STANDARD	
	dx	sn	Dx	Sn
-4	33,637	32,878	3,801	15,19
-3,4	71,615	51,758	33,57	22,56
-2,8	158,2	117,84	27,56	40,97
-2,1	221,25	192,38	50,05	40,97
-1,6	274,52	247,72	53,1	44,19
-1	361	308,59	58,84	96,67
-0,7	441,41	445,8	81,34	162,3
-0,3	435,87	424,32	119,5	185,8
0	469,08	477,05	93,92	152,6
0,3	513,02	508,79	97,02	182,3
0,7	449,87	421,88	136,4	266,5
1	492,19	479,98	180,3	147,1
1,3	461,26	484,38	189,6	35,91
2,4	109,62	131,47	45,74	20,14

Tabella 21C

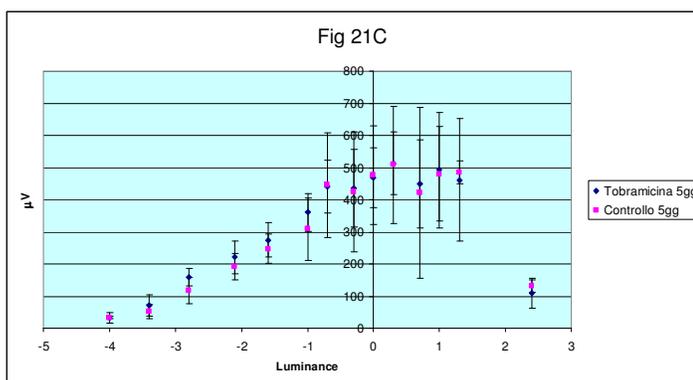


Fig 21: Regrazioni ERG prima (A) dopo 2h (B) e 5gg (C) di somministrazione topica di *Tobramicina*

Tab.21: Medie delle ampiezze dell'onde b e le rispettive deviazioni standard in relazione alla *luminance*, prima (A) dopo 2h (B) e 5gg (C) di somministrazione topica di *Tobramicina*.

La valutazione delle ampiezze dell'onda b non ha evidenziato differenze significative nei tre gruppi sperimentali ed ai diversi tempi di registrazione se confrontati con il controllo (Fig 19: *Netilmicina*; Fig 20: *Norfloxacina*; Fig 21: *Tobramicina*).

Limitando l'osservazione al tracciato dell'occhio che ha ricevuto i farmaci in esame, gli animali trattati con *Norfloxacina* e *Netilmicina* non evidenziano alterazioni, mentre il gruppo trattato con *Tobramicina* mostra una riduzione dell'ampiezza dell'onda b (Fig 21D).

La riduzione in ampiezza è tuttavia non significativa e costituisce, al momento, solo un trend.

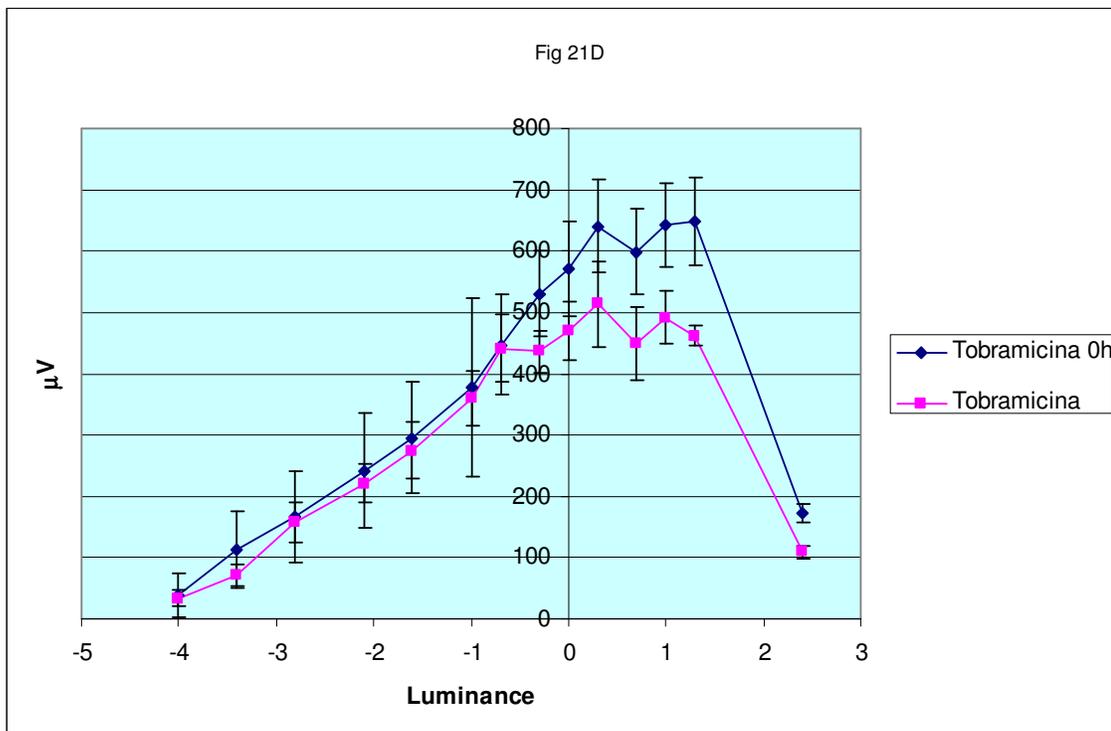


Fig 21D: Confronto tra le registrazioni ERG, relative alle ampiezze dell'onda b in funzione della luminanza, prima dopo 5gg di somministrazione topica di *Tobramicina*.

## 7.2 MICROSCOPIA CONFOCALE - IODURO DI PROPIDIO

Le immagini acquisite con il microscopio confocale (40x) mettono in evidenza i nuclei, colorati in rosso (dal PI), dello strato esterno di cellule nervose della retina; questo permette di contare le file dei fotorecettori, che in un ratto sano variano da 10 a 14.

La Figura 22 mostra le immagini acquisite dagli animali del gruppo *Netilmicina*:

l'occhio sinistro, di controllo (Fig 22A), presenta una morfologia di tipo normale, evidenziata da una media di 12 nuclei nella porzione centrale dello strato nucleare esterno, e 10 nuclei in quella periferica. Nell'occhio destro (Fig 22B), trattato col farmaco, la valutazione istopatologica del tessuto non ha evidenziato alterazioni morfologiche dopo somministrazione topica di *Netilmicina*; infatti è stata calcolata una media di 12 nuclei nella porzione di retina centrale e 11 in quella periferica.

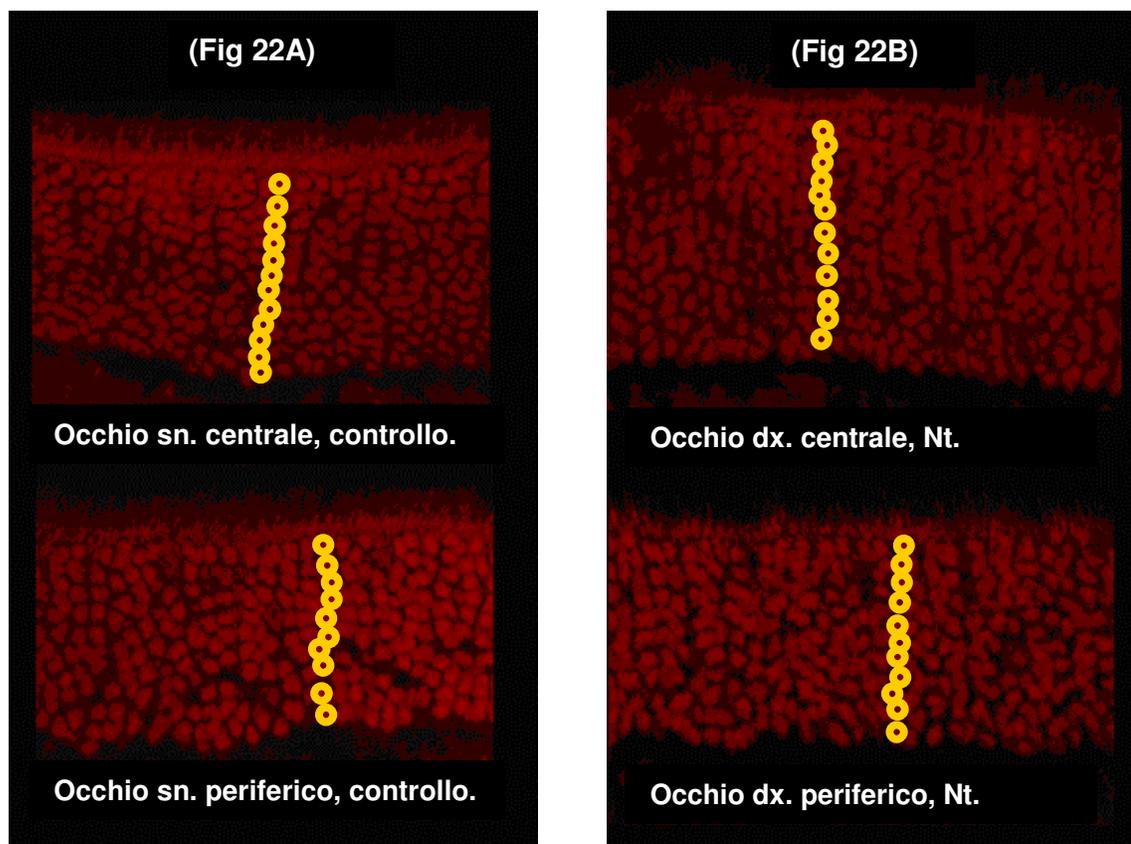


Fig 22: Porzioni (40x), centrale e periferica, dello strato nucleare esterno della retina dell'occhio sinistro di controllo (A) e dell'occhio destro trattato con *Netilmicina* (B).

La Figura 23 mostra le immagini acquisite dagli animali del gruppo *Norfloxacina*:

l'occhio sinistro, di controllo (Fig 23A), presenta una morfologia di tipo normale, evidenziata da una media di 12 nuclei nella porzione centrale dello strato nucleare esterno, e 10 nuclei in quella periferica.

Nell'occhio destro (Fig 23B), trattato col farmaco, la valutazione isto-patologica del tessuto non ha evidenziato alterazioni morfologiche dopo somministrazione topica di *Norfloxacina*; infatti è stata calcolata una media di 11 nuclei nella porzione di retina centrale e 10 in quella periferica.

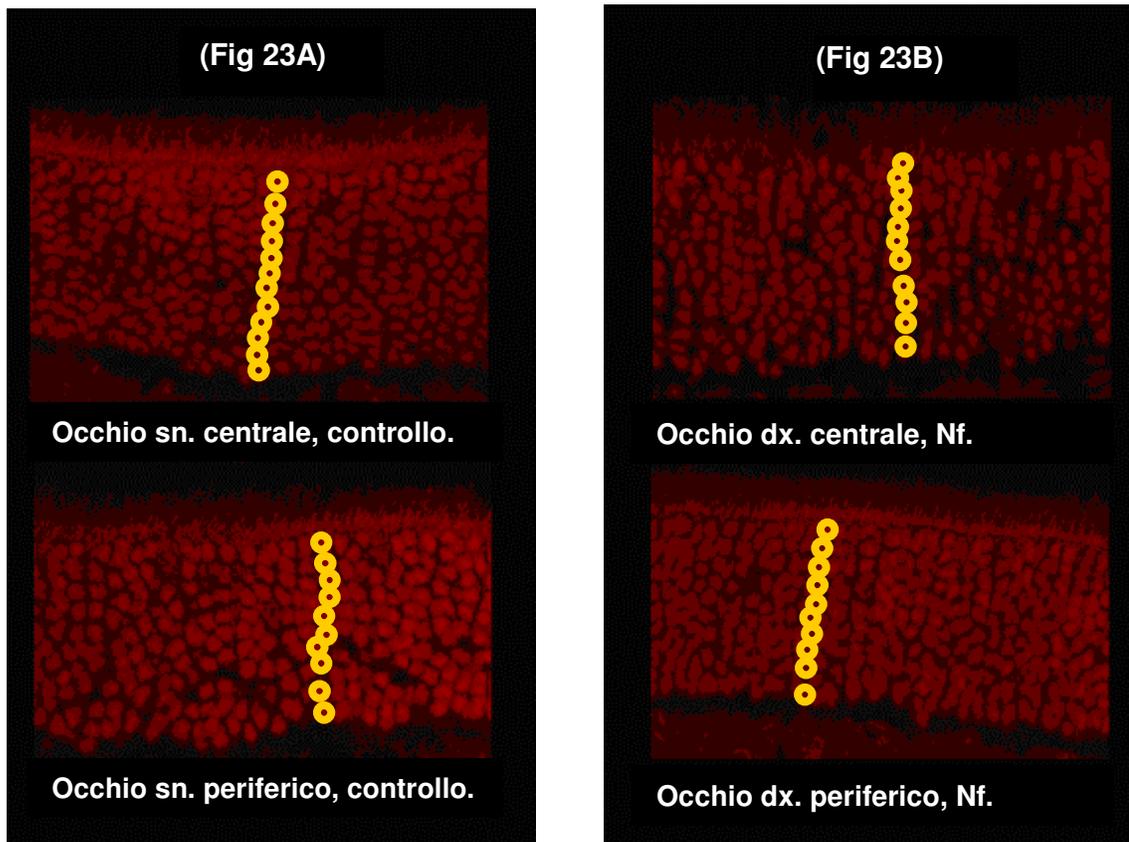


Fig 23: Porzioni (40x), centrale e periferica, dello strato nucleare esterno della retina dell'occhio sinistro di controllo (A) e dell'occhio destro trattato con (B) *Norfloxacina*.

La Figura 24 mostra le immagini acquisite dagli animali del gruppo *Tobramicina*:

l'occhio sinistro, di controllo (Fig 24A), presenta una morfologia di tipo normale, evidenziata da una media di 12 nuclei nella porzione centrale dello strato nucleare esterno, e 10 nuclei in quella periferica.

Nell'occhio destro (Fig 24B), trattato col farmaco, la valutazione isto-patologica del tessuto non ha evidenziato alterazioni morfologiche dopo somministrazione topica di *Tobramicina*; infatti è stata calcolata una media di 12 nuclei nella porzione di retina centrale e 12 in quella periferica.

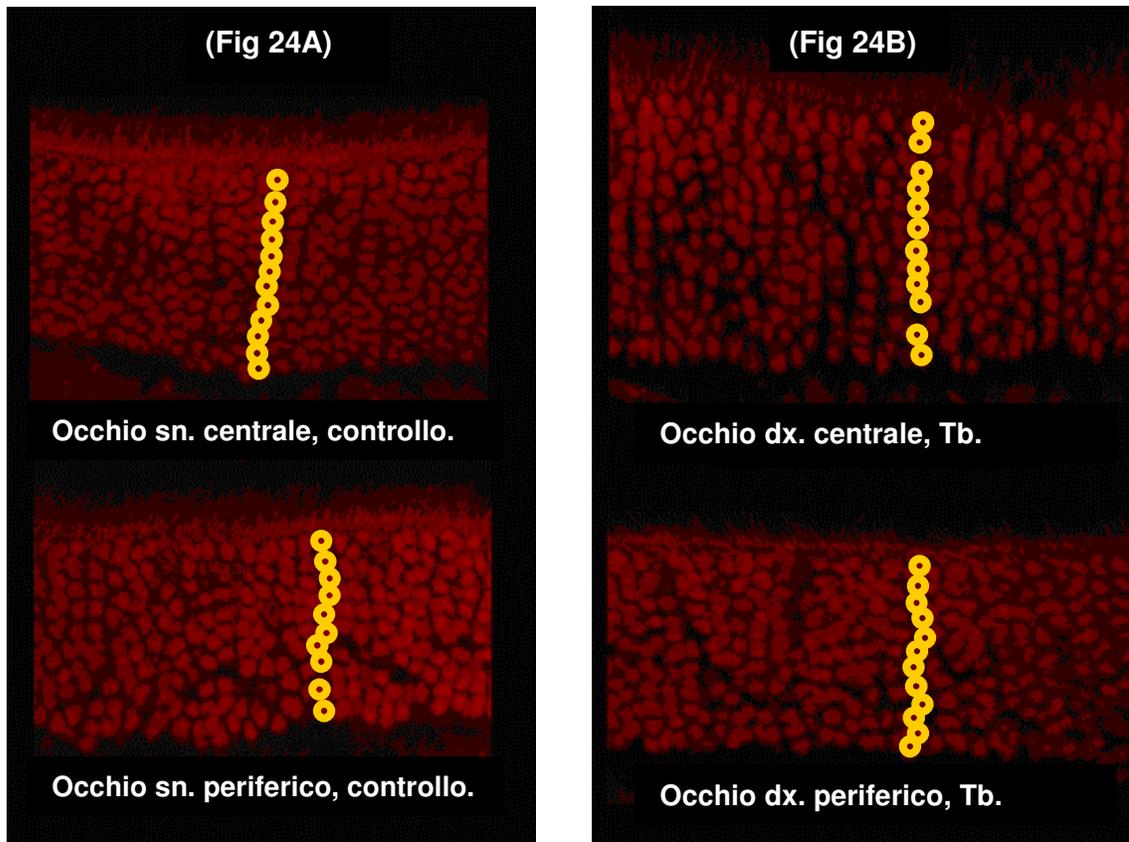


Fig 24: Porzioni (40x), centrale e periferica, dello strato nucleare esterno della retina dell'occhio sinistro di controllo (A) e dell'occhio destro trattato con (B) *Tobramicina*.

### 7.3 MICROSCOPIA OTTICA- EMATOSSILINA/EOSINA

L'utilizzo della colorazione istologica Ematossilina-Eosina permette di fare una valutazione morfologica globale del tessuto retinico ed evidenziare i principali strati cellulari nervose: lo strato di cellule gangliari (GCL), lo strato nucleare interno (INL) e lo strato nucleare esterno (ONL).

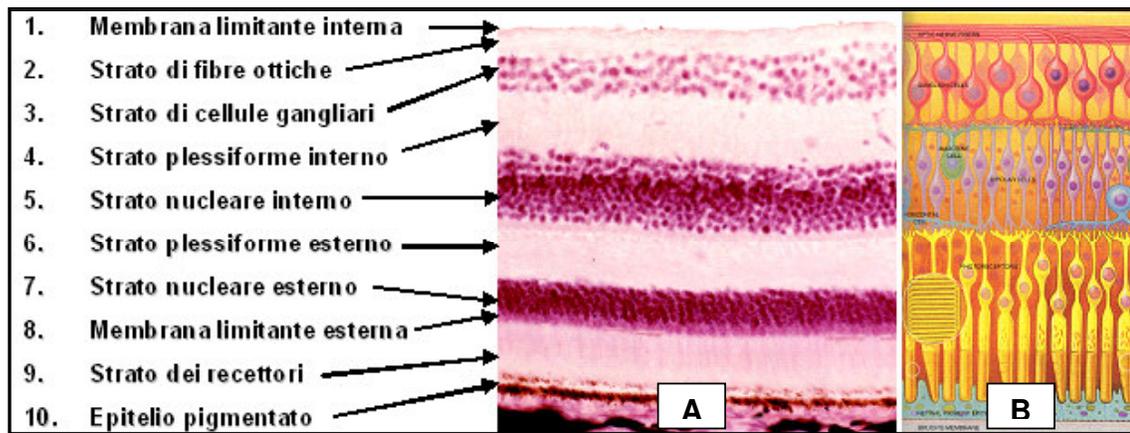


Fig 25: Rappresentazione istologica (A) e schematica (B) degli strati cellulari presenti nel tessuto retinico

[[anatomy.yonsei.ac.kr/.../Photo\\_LWT/Retina\\_s.jpg](http://anatomy.yonsei.ac.kr/.../Photo_LWT/Retina_s.jpg)].

L'analisi isto-patologica del tessuto dopo somministrazione topica di *Netilmicina* (Fig 26B) presenta un normale spessore di tutti gli strati cellulari, sia nella porzione di retina centrale che in quella periferica, per cui non sono riportate alterazioni morfologiche rispetto al controllo (Fig 26A).

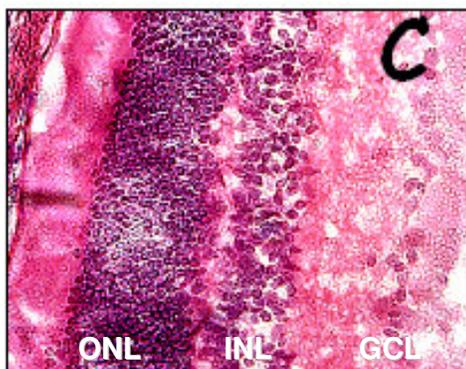


Fig 26A

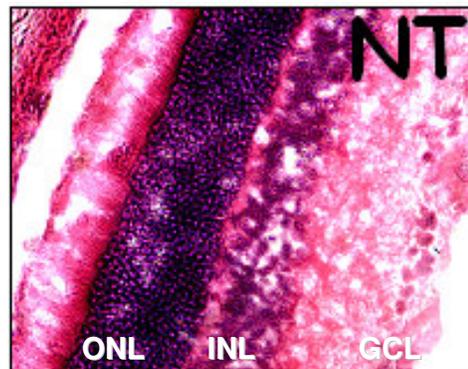


Fig 26B

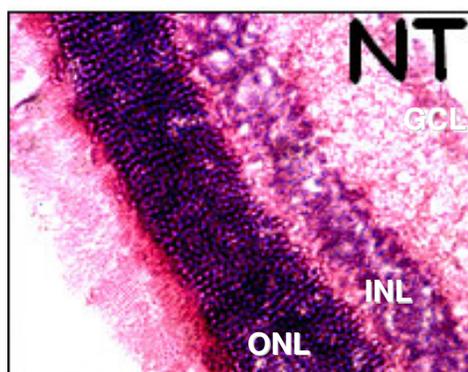
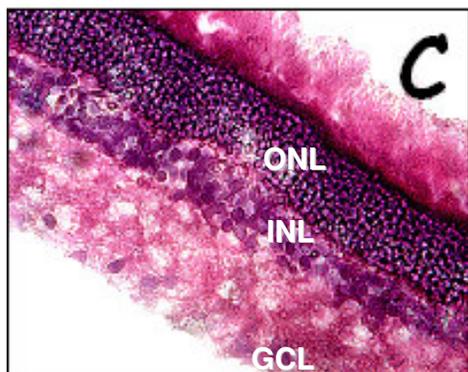


Fig 26: Porzioni di retina (25x), centrale e periferica, dell'occhio sinistro di controllo (A) e dell'occhio destro trattato con *Netilmicina* (B).

L'analisi isto-patologica del tessuto dopo somministrazione topica di *Norfloxacina* (Fig 27B) presenta un normale spessore di tutti gli strati cellulari, sia nella porzione di retina centrale che in quella periferica, per cui non sono riportate alterazioni morfologiche rispetto al controllo (Fig 27A).

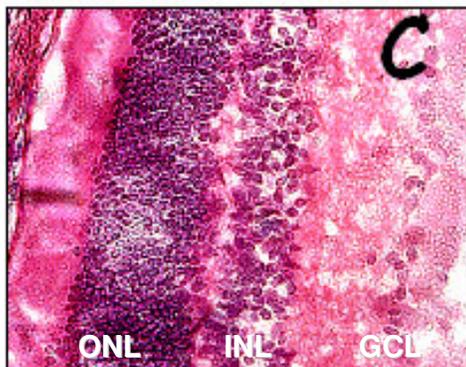


Fig 27A

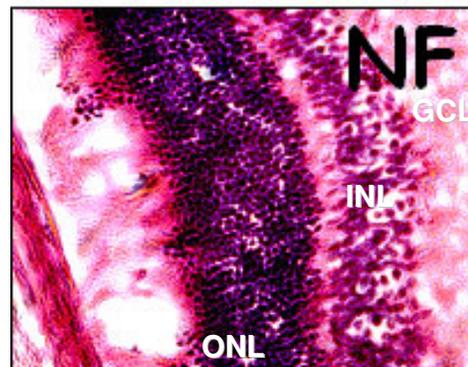


Fig 27B

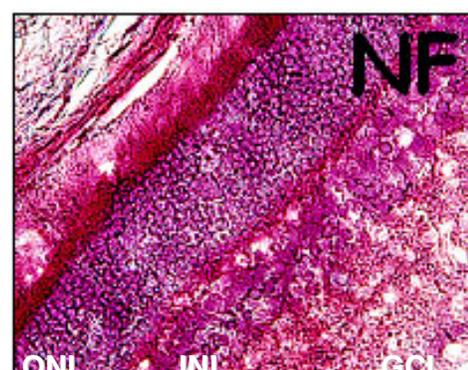
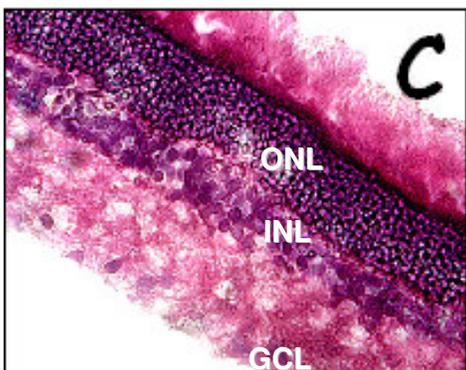


Fig 27: Porzioni di retina (25x), centrale e periferica, dell'occhio sinistro di controllo (A) e dell'occhio destro trattato con (B) *Norfloxacina*.

L'analisi isto-patologica del tessuto dopo somministrazione topica di *Tobramicina* (Fig 28B) presenta un normale spessore di tutti gli strati cellulari, sia nella porzione di retina centrale che in quella periferica, per cui non sono riportate alterazioni morfologiche rispetto al controllo (Fig 28A).

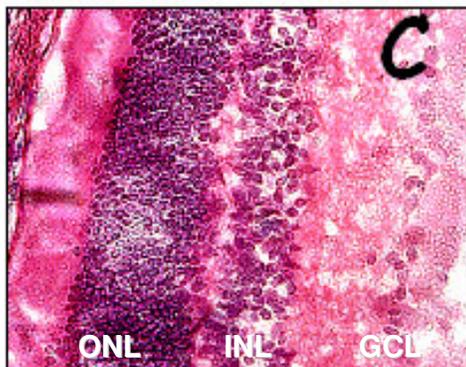


Fig 28A

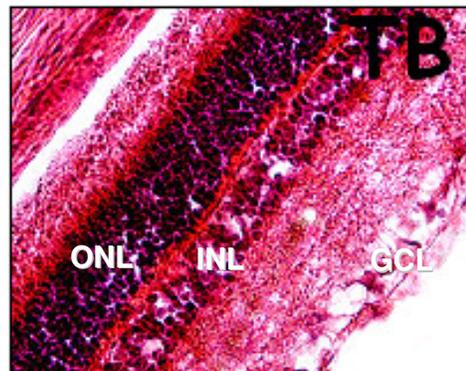


Fig 28B

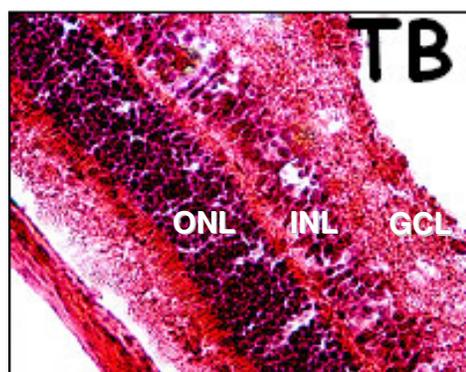
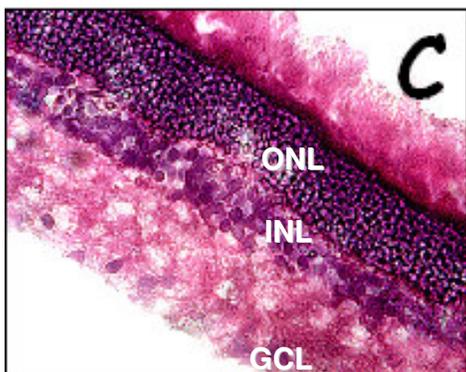


Fig 28: Porzioni di retina (40x), centrale e periferica, dell'occhio sinistro di controllo (A) e dell'occhio destro trattato con (B) *Tobramicina*.

# **Parte V: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

## **8. DISCUSSIONE DEI RISULTATI**

Questo lavoro ha cercato di valutare le eventuali alterazioni retiniche causate dalla somministrazione topica di *Tobramicina*, *Netilmicina* (aminoglicosidi) e *Norfloxacin* (fluorochinolone).

Il primo parametro che abbiamo preso in considerazione è la funzionalità retinica, che può essere studiata attraverso la registrazione dell'elettroretinogramma. L'ERG da flash è, infatti, espressione della funzionalità degli strati retinici più esterni, epitelio pigmentato e fotorecettori, ed è caratterizzato da una serie di onde a polarità alternante tra cui riconosciamo l'*onda a*, deflessione negativa che riflette l'attività dei fotorecettori, e l'*onda b*, deflessione positiva che esprime la funzione delle cellule dello strato bipolare e di Müller e costituita da due componenti distinte che riflettono l'attività fopica (coni) e quella scotopica (bastoncelli). L'ERG da flash viene effettuato anche nella pratica clinica, perché può fornire informazioni sulla funzionalità del sistema visivo anche in quei casi in cui la presenza di una opacità dei mezzi diottrici (cataratta, leucoma corneale) non permette l'osservazione diretta della retina o del nervo ottico. Questo sottolinea l'importanza di tale tecnica come primo indice di eventuali alterazioni della funzionalità elettrica della retina e della conseguente funzione visiva.

Le registrazioni elettroretinografiche che abbiamo effettuato prima del trattamento, per ciascun animale, ci sono servite per avere un riferimento iniziale sull'attività elettrica di entrambe le retine, in modo da scartare gli animali con problemi di visione. Su ciascun gruppo di animali, sono stati eseguiti gli fERG dopo 2 ore dalla prima somministrazione topica del rispettivo farmaco, allo scopo di individuare eventuali alterazioni della funzionalità retinica in acuto. Abbiamo, infine, registrato l'attività elettrica della retina, su ciascun animale dei tre gruppi, dopo 5 giorni di trattamento, per valutare possibili anomalie in seguito ad un normale ciclo di antibiotici.

La valutazione dei dati relativi alle ampiezze dell'onda *b* in funzione della *luminance*, non hanno evidenziato variazioni significative rispetto al controllo: questo indica che l'attività elettrica delle cellule nervose della retina, non risulta alterata dalle molecole in studio dopo somministrazione in acuto (dopo 2 ore), né successivamente a trattamento prolungato.

Tuttavia effettuando una valutazione dei tracciati relativi all'occhio trattato con i farmaci in esame, mentre per gli animali trattati con *Norfloxacin* e *Netilmicina* non si evidenziano alterazioni dopo 5 giorni di terapia, per il gruppo trattato con *Tobramicina* si osserva una traslazione verso il basso, ovvero una diminuzione delle ampiezze dell'onda *b* dell'occhio trattato in funzione degli stessi stimoli luminosi. Tale riduzione non risultando significativa costituisce, al momento, solo un trend, e sottolinea una tendenza all'attenuazione della risposta scotopica e/o fotopica che potrebbe evolvere in una riduzione della visione monocromatica e/o cromatica al prolungarsi della terapia.

Il secondo parametro che abbiamo preso in considerazione è la morfologia dello strato nucleare esterno della retina, quello che presenta i nuclei dei fotorecettori.

Con la colorazione PI, data la sua capacità di intercalarsi a livello del DNA e di formare un complesso che emette fluorescenza quando eccitato ad una particolare lunghezza d'onda, è possibile fare una valutazione istopatologica semiquantitativa del numero di coni e bastoncelli presenti nel tessuto retinico: una riduzione dello spessore di tale strato significa che i fotorecettori hanno subito una degenerazione e sono andati incontro ad apoptosi. Questa degenerazione apoptotica e la conseguente compromissione della trasduzione del segnale luminoso in elettrico sono infatti responsabili del deficit visivo, più o meno grave a seconda del grado di degenerazione neuronale.

Le sezioni di tessuto retinico colorate con PI ottenute da tutti gli animali dei tre gruppi sono state osservate al microscopio confocale, valutando le porzioni centrale e periferica dello strato nucleare esterno. Nessuno dei tre farmaci somministrato ha mostrato alterazioni patologiche nel numero delle file di fotorecettori, confermando quanto precedentemente riportato nell'analisi fERG.

L'ultimo parametro che abbiamo valutato è la morfologia dell'intero tessuto retinico, cioè di tutti gli strati di cellule nervose presenti nella retina.

In questo modo è stato possibile ampliare la valutazione istopatologica semiquantitativa effettuata col PI anche alle cellule bipolari e gangliari: una riduzione dello spessore dello strato nucleare interno e dello strato delle cellule gangliari si verifica per degenerazione/apoptosi delle cellule bipolari o/e gangliari, con successivo deficit della visione per compromissione dell'elaborazione del segnale elettrico ed interruzione dei fenomeni di convergenza nella retina.

Nel nostro lavoro non abbiamo riscontrato una diminuzione dello spessore dello strato nucleare interno e dello strato delle cellule gangliari della retina dopo somministrazione topica di *Tobramicina*, *Netilmicina* e *Norfloxacin*.

## 9. CONCLUSIONI

In relazione alla valutazione della tollerabilità di preparati oftalmici a base di aminoglicosidi/fluorochinoloni nel trattamento delle infezioni oculari è possibile definire i seguenti aspetti:

- Da un punto di vista morfologico non sono state rilevate alterazioni in seguito alla somministrazione di nessuno dei tre farmaci e dal momento che nel tessuto retinico “morfologia = funzione”, possiamo affermare che la terapia antibiotica con *Netilmicina*, *Norfloxacin*a e *Tobramicina* effettuata per via topica, per la durata di 5 giorni (normale durata di un ciclo antibiotico) non produce nessuna tossicità retinica.
- I trattamenti con *Norfloxacin*a e *Netilmicina* risultano privi di effetti collaterali sulla visione come evidenziato dall'ampiezza dell'onda *b*, per cui sulla base di questa prima analisi è possibile considerare *Norfloxacin*a e *Netilmicina* farmaci di prima scelta nelle infezioni oculari.
- Gli effetti del trattamento con preparazioni a base di *Tobramicina* resta da chiarire, ampliando il campione o prolungando la durata del trattamento, dato che l'analisi ERG ha evidenziato un trend negativo nell'andamento delle ampiezze dell'onda *b* dopo 5gg.

## SVILUPPI FUTURI

Ulteriori informazioni sulla eventuale tossicità oculare di questi farmaci potranno emergere ampliando il campione degli animali trattati, andando a confermare o confutare il trend della riduzione delle ampiezze dell'onda b, riguardante la *Tobramicina*.

Potremmo, inoltre aumentare la durata del trattamento, dal momento che nella comune pratica clinica alcune terapie antibiotiche vengono prolungate per l'alta carica batterica presente in determinate infezioni.

La somministrazione intravitreale di *Netilmicina*, *Norfloxacin*a e *Tobramicina* è sicuramente una valutazione indispensabile per chiarire la possibile tossicità di questi farmaci, in acuto e al prolungarsi del trattamento. Questo tipo di somministrazione è del resto utilizzata in corso di terapie post-operatorie (laser, cataratta), per cui questo studio di tossicità è di fondamentale importanza.

Infine, data l'inadeguatezza dell'ERG da flash nell'evidenziare i danni a livello maculare, sarebbe interessante, indagare la tossicità maculare dopo somministrazione topica/intravitreale dei diversi farmaci con l'ERG focale [*Parisi V., et al, 1998*], dato che in letteratura sono stati riscontrati casi clinici di infarto maculare a carico di Aminoglicosidi [*Judson PH., 1989; Galloway et al., 2002*].

## **Bibliografia**

- Ahmed AS, Khan NZ, Saha SK, Chowdhury MA, Muslima H, Law P, Islam M, Bhattacharya M, Darmstadt GL. “Ciprofloxacin treatment in preterm neonates in Bangladesh: lack of effects on growth and development”. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Dec;25(12):1137-41.
- Alió JL, Pérez-Santonja JJ, Tervo T, Tabbara KF, Vesaluoma M, Smith RJ, Maddox B, Maloney RK. “Postoperative inflammation, microbial complications, and wound healing following laser in situ keratomileusis”. *J Refract Surg.* Sep-Oct;16(5):523-38. (2000).
- Armington JC. The “Electroretinogram”. New York, Academic Press,1974
- Azzali, Lockhart, Hamilton, Fyfe. “Anatomia del corpo umano”. Cea ambrosiana 1995.
- Baum J, Barza M. “The evolution of antibiotic therapy for bacterial conjunctivitis and keratitis: 1970-2000”. *Cornea.* Sep;19(5):659-72. (2000).
- Bear M.F., B.W. Connors e M.A. Paradiso. “Neuroscienze: Esplorando il Cervello”. Masson - Seconda Ed., 2002
- Begg EJ, Barclay ML, Duffull SB. “A suggested approach to once-daily aminoglycoside dosing”. *Br. J. Clin Pharm* 39,605-609, 1995

- Berson EL. "Electrical phenomena in the retina". In: Adler's Physiology of the Eye's, edited by Moses RA Mosby, St. Louis, Mo., 1981.
- Bohigian MD; Valluri MD. "Handbook of Ocular Infections, Inflammation, and External Diseases". Fourth Edition. 2000.
- Brazier JS, Hall V. "Propionibacterium propionicum and infections of the lacrimal apparatus". Clinical Infectious Diseases 1993;17:892-3.
- Bush RA, Sieving PA. "A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave". Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 Feb;35(2):635-45.
- Campochiaro PA, Conway BP. "Aminoglycoside toxicity--a survey of retinal specialists. Implications for ocular use". Arch Ophthalmol. 1991 Jul;109(7):946-50.
- Campochiaro PA and Conway BP. "Macular infarction after endophthalmitis treated with vitrectomy and intravitreal gentamicin". Arch Ophthalmol. 1986 Mar;104(3):367-71
- Caron F, Humbert G. "Aminoglycosides". In: Carbon C, Regnier B, Saimot G, et al., editors. Médicaments anti-infectieux.Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1994: 103-21
- Chiarugi G. "Istituzioni di anatomia dell'uomo." Vallardi editore.1972.

- Davies JE. . “Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes”. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 1991: 691-713
- Dhanireddy S, Liles W, Gates G. “Vestibular toxic effects induced by once-daily aminoglycoside therapy”. Arch Otolaryngol HNS, 111, 2005, 46-48
- Diane P. Yolton, PhD, OD. “Review of Antibacterial Drugs Used For Treatment of Ocular Infections”. 2006, Pacific University College of Optometry
- Ding D, Jiang H, Jin X, McFadden S, Salvi R. “Co-administration of ethacrynic acid and various doses of gentamicin produce different models of selective cochlear damage in chinchilla”. ARO abstracts, 2001, #799
- Domart Y, Fantin B. “Quinolones”. In: Carbon C, Regnier B, Saimot G, et al., editors. Médicaments anti-infectieux.Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1994:123-46
- Dolter J, Wong J, Janda JM. “Association of Neisseria cinerea with ocular infections in paediatric patients”. J Infect 1998;36:49-52.
- Eiferman RA, Snyder JP, Nordquist RE. “Ciprofloxacin microprecipitates and macroprecipitates in the human corneal epithelium”. J Cataract Refract Surg. 2001 Oct;27(10):1701-2.

- Essepian JP, Rajpal R, O'Brien TP. "Tandem scanning confocal microscopic analysis of ciprofloxacin corneal deposits in vivo". *Cornea*. 1995 Jul;14(4):402-7.
- Fraunfelder FW. "Corneal toxicity from topical ocular and systemic medications". *Cornea*. 2006 Dec;25(10):1133-8.
- Galloway G, Ramsay A, Jordan K, Vivian A. "Macular infarction after intravitreal amikacin: mounting evidence against amikacin". *Br J Ophthalmol*. 2004 Jun;88(6):850.
- Gargini C, Bisti S, Demontis GC, Valter K, Stone J, Cervetto L. "Electroretinogram changes associated with retinal upregulation of trophic factors: observations following optic nerve section". *Neuroscience*. 2004;126(3):775-83.
- Gray-Keller M.P.,and P.B. Detwiler. "The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods". *Neuron* 13:849-861. (1994).
- Gulletta E."Microbiologia clinica dell'apparato oculare". Edizioni scientifiche Mascia Brunelli-Biolife. 1992
- Hancock HA, Guidry C, Read RW, Ready EL, Kraft TW. "Acute aminoglycoside retinal toxicity in vivo and in vitro". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Dec; 46(12):4804-8.

- Hooper DC, Wolfson JS. “The quinolones: mode of action and bacterial resistance”. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3rd ed. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 1991: 665-90
- Hwang DG. “Fluoroquinolone resistance in ophthalmology and the potential role for newer ophthalmic fluoroquinolones”. *Surv Ophthalmol* 2004;49(suppl 2):S79-S83.
- Jacobs, Gerald H.; Fenwick, John A.; Williams, Gary A. 2001. “Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights”. *Journal of Experimental Biology*. 204(14):2439-2446.
- Jett B.D., Parke D. W.,Booth M.C.and Gilmore M. S. “Host/parasite interactions in bacterial endophthalmitis”. *Int. J. Med. Microbiol, Virol., Parasitol. Inf. Dis.* 285, 341. (1997).
- Judson PH. “Aminoglycoside macular toxicity after subconjunctival injection”. *Arch Ophthalmol*. 1989 Sep;107(9):1282-3.
- Kahlmeter G, Dahlager JJ. “Aminoglycoside toxicity: a review of clinical studies published between 1975 and 1982”. *J Antimicrob Chemother*. 1984;13(suppl A)9-22
- Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. M. “Principi di neuroscienze”2003
- Kaupp, U. B., R. Seifert. “Cyclic nucleotide gated channels”. *Physiol. Rev.* 82:769-824. (2002).

- Kunimoto D.Y., Kanitkar K.D., Makar M.S. “THE WILLS EYE MANUAL. Diagnosi e Trattamento Medico e Chirurgico delle Patologie Oculari”. Maggio 2006 ISBN: 88-7620-739-2
- Koch, W.H. and L. Stryer. “Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions”. *Nature* 334:64-66. (1988).
- Liesegang TJ. “Use of antimicrobials to prevent postoperative infection in patients with cataracts”. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001 Feb;12(1):68-74.
- Lolley, R.N. and E. Racz. “Calcium modulation of cyclic GMP synthesis in rat visual cells”. *Vision Res.* 22:1481-1486. (1982).
- McNaughton,P.A. “Light response of vertebrate photoreceptors”.*Physiol. Rev.* 70,847-883 (1990)
- Mah FS, Romanowski EG, Dhaliwal DK, Yates KA, Gordon YJ. “Role of topical fluoroquinolones on the pathogenesis of diffuse lamellar keratitis in experimental in vivo studies”. *J Cataract Refract Surg.* 2006 Feb;32(2):264-8.
- Mallari PL, McCarty DJ, Daniell M, Taylor H. “Increased incidence of corneal perforation after topical fluoroquinolone treatment for microbial keratitis”. *Am J Ophthalmol.* 2001 Jan;131(1):131-3.

- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's "Principles and Practice of Infectious Diseases". Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000.
- Marcotti Walter , Sietse M. van Netten and Corné J. Kros. "The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano -electrical transducer channels". (2005). J Physiol 567, 505–521.
- Marino C, Paladino GM, Scuderi AC, Trombetta F, Mugridge K, Enea V. "In vivo toxicity of netilmicin and ofloxacin on intact and mechanically damaged eyes of rabbit". Cornea. 2005 Aug;24(6):710-6.
- Martínez-Salgado C, López-Hernández FJ, López-Novoa JM. "Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides". Toxicol Appl Pharmacol. 2007 May 21
- Martini, Timmons. "Anatomia umana". EdiSES II edizione. 2003
- Milazzo G, Papa V, Carstocca B, Chercota G, Rodica P, Gafencu O, Santocono M. "Topical netilmicin compared with tobramycin in the treatment of external ocular infection". Int J Clin Pharmacol Ther. 1999 May;37(5):243-8.
- Moreira LB, Lee RF, de Oliveira C, LaBree L, McDonnell PJ. "Effect of topical fluoroquinolones on corneal re-epithelialization after excimer laser keratectomy". J Cataract Refract Surg. 1997 Jul-Aug;23(6):845-8.

- Oguz H. “Cytotoxic effects of the fluoroquinolone ofloxacin on stromal keratocytes”. *Cornea*. 2007 Feb;26(2):241; author reply 241.
- Panfoli, I. Morelli, A. and Pepe, I.M. “ Characterization of Ca-ATPase in rod outer segment disk membranes”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204(2), 813-819. (1994).
- Papa V, Aragona P, Scuderi AC, Blanco AR, Zola P, Di BA, Santocono M, Milazzo G. “Treatment of acute bacterial conjunctivitis with topical netilmicin”. *Cornea*. 2002 Jan;21(1):43-7.
- Parisi V and Falsini B. “Electrophysiological evaluation of the macular cone system: Focal Electroretinography and VEP after photostress”. *Seminars in Ophthalmology*, 1998; 13:178-188.
- Pasqualino A., Panattoni G.L. “Anatomia Umana”. 2002 UTET
- Patel GM, Chuang AZ, Kiang E, Ramesh N, Mitra S, Yee RW. “Epithelial healing rates with topical ciprofloxacin, ofloxacin, and ofloxacin with artificial tears after photorefractive keratectomy”. *J Cataract Refract Surg.* 2000 May;26(5):690-4.
- Petrin, Adam Baker, Stuart G. Coupland, Peter Liston, Monica Narang, Karim Damji, Brian Leonard, Vince A. Chiodo, Adrian Timmers, William Hauswirth, Robert G. Korneluk, and Catherine Tsilfidis. “Structural and Functional Protection

of Photoreceptors from MNU-Induced Retinal Degeneration by the X-Linked Inhibitor of Apoptosis". IOVS, June 2003, Vol. 44, No. 6

- Oei, M. L., H. M. Segenhout, F. Dijk, et al. (2004). "Functional and anatomic alterations in the gentamicin-damaged vestibular system in the guinea pig." *Otol Neurotol*25(1): 57-64
- Pierre-Yves Robert and Jean-Paul Adenis. "Comparative Review of Topical Ophthalmic Antibacterial Preparations". *Drugs* 2001; 61 (2): 175-185
- Polgar and others. "Anatomic and morphometric changes to gerbil posterior cristas following transtympanic administration of gentamicin and streptomycin". *JARO* 02:147-158, 2001
- Pollock GA, McKelvie PA, McCarty DJ, White JF, Mallari PL, Taylor HR. "In vivo effects of fluoroquinolones on rabbit corneas". *Clin Experiment Ophthalmol.* 2005 Feb;33(1):108.
- Raskin EM, Speaker MG, Laibson PR. "Blepharitis". *Infect Dis Clin North Am* 1992;6:777-87.
- Rieke, F. and E.A. Schwartz. 1994. "A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses". *Neuron* 13:863-873.

- Robson JG, Saszik SM, Ahmed J, Frishman LJ. “Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque”. *J Physiol.* 2003 Mar 1;547(Pt 2):509-30. Epub 2003 Jan 24.
- Sandson NB, Cozza KL, Armstrong SC, Eckermann G, Fischer BA, Phillips B. “Clozapine case series”. *Psychosomatics.* 2007 Mar-Apr;48(2):170-5.
- Smith A, Pennefather PM, Kaye SB, Hart CA. “Fluoroquinolones: place in ocular therapy”. *Drugs.* 2001;61(6):747-61.
- Snell R., Michael, Lemp “Clinical Anatomy of the Eye”. 1998
- Stryer, L. “Cyclic GMP cascade of vision”. *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 87-119 (1986).
- Syed NA, Hyndiuk RA. “Infectious conjunctivitis”. *Infect Dis Clin North Am* 1992;6:789-805.
- Watanabe, S.-I. and G. Matthews. 1988. “Regional distribution of cGMP-activated ion channels in the plasma membrane of the rod photoreceptor”. *J. Neurosci.* 8:2334-2337.
- Westfall CT, Shore JW, Baker AS. “Orbital infections”. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases.* Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 1373-7.

- Wilkins J., Whitcher J. P. and Margolis T. P. “Penicillinresistant *Streptococcus pneumoniae* keratitis”. *Cornea* 15, 99. (1996).
- Yau, K.-W. and K. Nakatani. 1984. “Cation selectivity of light-sensitive conductance in retinal rods”. *Nature* 309:352-354.

▪ **RINGRAZIAMENTI**

*Vorrei ringraziare il Prof. Luca Giovannini per avermi dato l'opportunità di svolgere la tesi nel suo laboratorio, oltre l'indubbia disponibilità mostrata durante il periodo di internato.*

*Vorrei ringraziare la mia famiglia e in particolare la Ros (anche se è per colpa tua che ho fatto l'università) che mi è stata accanto e mi ha spronato ad andare avanti nei momenti più difficili (e vi assicuro che in 5 anni ce ne sono stati molti), Papi che con la sua leggerezza mi ha fatto sorridere anche quando non avrei voluto, Tato che c'è sempre stato quando avevo bisogno di lui, nonna Narcisa che penso abbia finito il rosario a forza di pregare per me e vorrei dire lo stesso di nonna Pia ma lei fino a ieri mi ha detto: "...ma perché non ti fai mettere in un posticino in comune...o alla coppe...da qualche parte ti metteno...smetti di fa questa vita!".*

*Vorrei ringraziare tutti i ragazzi del laboratorio, con cui ho condiviso momenti indimenticabili e in particolare Claudio, la persona più disponibile e allo stesso tempo capace e preparata che io conosca (ti ringrazio veramente con tutto il mio cuoricino! Spero che un giorno qualcuno ti scopra e ti porti a lavorare per Veronesi o qualcuno di simile...te lo meriti!). Dopo vorrei ringraziare: Ematossilina-Eosina, con cui ho davvero fatto delle sane risate e a cui voglio un gran bene, i Gemelli diversi con cui ho condiviso tutto il pre-laurea e sono certa che per loro non è stato facile (scusatemi ma non ci posso fare nulla sono proprio ansiogena); Chiara, che mi ha aiutato con le acquisizioni, l'abstract e non solo...; Cri, che mi trasmesso l'amore per l'istologia (non esageriamo...diciamo che mi ha insegnato); Samu, Alessia e Monica, che mi hanno conosciuto (e sopportato) già dalla tesi triennale; e poi come dimenticare Casamax, (il figo della situazione c'è da tutte le parti...); Porpettina (...misericordia, pensavi che mi fossi dimenticata di te!); Ilaria, Iron, Diva e tutti gli altri che hanno avuto anche fare con me...*

*Vorrei ringraziare i ragazzi del CNR in particolare Nicola per la sua disponibilità e saggezza, Elisa che mi ha aiutato con le registrazioni e soprattutto Andria che c'è sempre stata (anche alle 6 di mattina parlavamo di ERG, Propidio e tampone fosfato...) e che oramai è diventata un'amica...*

*Vorrei ringraziare anche Personal a cui voglio un bene dell'anima e che mi ha sempre sostenuta; Vale con cui ho condiviso molti pensieri e stati d'animo; Lady D. che soprattutto negli ultimi tempi mi è stata molto vicina (con i tuoi sms dolci...); Ally che mi ha cambiata e con cui ho passato momenti irripetibili (sapete loro del nord...sono avanti!); Maestra che mi ha fatto scaricare con la fit-box (infatti da quando è finito il corso sono più stressata); Mari che ogni volta che mi vede sa sempre cosa dirmi...vi voglio bene...*

*Grazie a tutti, sono stata davvero fortunata ad avervi conosciuti...mi avete dato tanto e resterete sempre nei miei ricordi e pensieri... spero solo di non deludervi...*