

# L'ACIDO IALURONICO E LE SUE APPLICAZIONI IN CONTATTOLOGIA

Matteo Fagnola, Marco Paolo Pagani, Silvio Maffioletti, Silvia Tavazzi\*, Antonio Papagni\*

\*Dipartimento di Scienza dei Materiali, Università degli Studi di Milano Bicocca

## PAROLE CHIAVE

Acido ialuronico, occhio secco marginale

## Sommario

L'acido ialuronico (HA) è una delle molecole più igroscopiche presenti in natura e, idratato, può contenere una quantità di acqua mille volte superiore al proprio peso. In contattologia, questa eccezionale capacità di ritenzione idrica viene sfruttata per migliorare l'idratazione dell'area precorneale. L'acido ialuronico è infatti uno dei principi attivi più impiegati nei numerosi sostituti lacrimali in commercio e nel trattamento delle varie forme di occhio secco (da quelle più gravi a quelle marginali). In questo articolo illustriamo le principali caratteristiche e applicazioni dell'HA.

## L'occhio secco

Lo stile di vita del portatore di lenti a contatto (lac) è radicalmente cambiato negli ultimi due decenni. Il computer è divenuto un indispensabile strumento di lavoro comune per quasi tutte le professioni, la maggioranza degli uffici e dei locali commerciali è dotata di aria condizionata,

la giornata lavorativa implica, generalmente, la necessità di rimanere fuori casa per più di 10 ore. Tutto ciò incide negativamente sul comfort delle lac.

Oggi la priorità dell'applicatore è quella di permettere al portatore un uso confortevole delle lac per l'intera giornata. Il tasso complessivo di drop out dei portatori di lac si colloca oggi tra il 26% ed il 40%. Tra coloro che rinunciano a utilizzare le proprie lac, il 51% lo fa perché le ritiene poco confortevoli e lamenta una sintomatologia riconducibile alla condizione di occhio secco marginale<sup>1</sup>.

La Figura 1 presenta la classificazione delle sindromi da occhio secco secondo la Commissione Internazionale del National Eye Institute (Study Group on Dry Eye). È una classificazione che prevede due sottocategorie: la cheratocongiuntivite secca derivante da ipolacrimie e quella derivante da iperevaporazione.

La tipologia di occhio secco "marginale" è la più comune e consegue a specifiche condizioni organiche e/o ambientali; la tipologia di occhio secco "patologico" è meno diffusa ed è associata a patologie sistemiche che coinvolgono, secondariamente, la salute oculare.

Le cause dell'occhio secco marginale sono da ricercare in uno squilibrio dell'intero sistema lacrimale che compren-

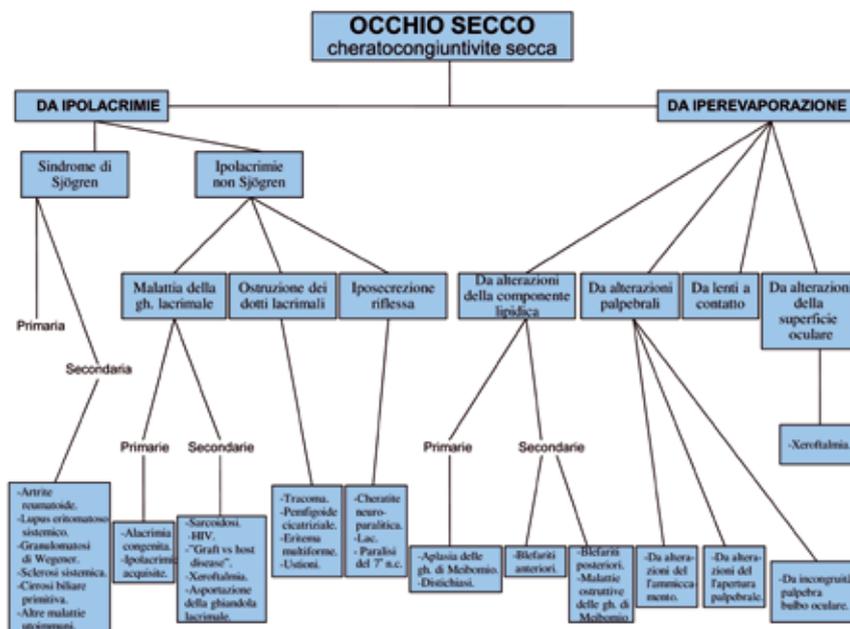


Figura 1

Classificazione completa delle sindromi da occhio secco secondo la Commissione Internazionale del National Eye Institute (Study Group on Dry Eye).

## L'acido ialuronico e le sue applicazioni in contattologia

de, oltre alle ghiandole lacrimali, la superficie corneale, la congiuntiva bulbare, le palpebre, l'ammiccamento. In presenza di occhio secco marginale si osserva sempre un aumento dell'osmolarità lacrimale, che può portare a una perdita dell'integrità epiteliale e a una riduzione delle cellule mucipare caliciformi, avviando così il circolo vizioso che costituisce l'essenza del problema<sup>2</sup>.

Qualunque lente a contatto interferisce con la stabilità del film lacrimale; pertanto persone in una condizione "borderline" ma normalmente asintomatiche, possono sviluppare la specifica sintomatologia da occhio secco durante il porto di lac. Infatti le lenti a contatto interagiscono sia con il film lacrimale (destabilizzandolo) che con la superficie dell'epitelio corneale (causando perdita di integrità e riduzione dei microvilli).

Oltre che dalle lac, la manifestazione di una sintomatologia riconducibile ad una condizione di occhio secco marginale può essere indotta anche da numerosi fattori ambientali; i più comuni sono la ridotta umidità ambientale, l'uso di aria condizionata o di termoconvettori per la regolazione della temperatura, il fumo, la polvere, il vento, l'uso del computer (che causa riduzione della frequenza degli ammiccamenti). Ognuno di questi elementi, singolarmente oppure combinati, può rappresentare il meccanismo di innesco per lo sviluppo di una condizione di occhio secco marginale.

Un ruolo chiave è relativo alla riduzione della frequenza degli ammiccamenti e all'aumento della velocità di evaporazione del film lacrimale; esiste un valore predittivo, definito "indice di protezione oculare", che esprime normalità oppure problematicità: viene calcolato mediante il rapporto tra il tempo di rottura del film lacrimale (BUT) e l'intervallo di tempo che trascorre tra un ammiccamento e l'altro (IBI). Quando tale rapporto (BUT/IBI) è minore di 1 è probabile che il portatore sviluppi i sintomi tipici ed evidenzii i segni caratteristici della condizione di occhio secco marginale<sup>3</sup>. Altre caratteristiche che influiscono sul comfort del portatore di lac sono la bagnabilità, il modulo di elasticità e la levigatezza delle superfici delle lac. Ai portatori di lac che manifestano condizioni di occhio secco marginale è opportuno applicare lac con un elevato bilanciamento idrico, oppure utilizzare materiali capaci di rilasciare molecole bioattive che contrastino la condizione di secchezza.

La terapia della sindrome da occhio secco marginale prevede l'utilizzo di sostituti lacrimali e di prodotti lubrificanti. I sostituti lacrimali contengono acqua, sali, sistema tampone, conservanti, addensanti e altri ingredienti che sono finalizzati a integrare la componente mucinica o la componente lipidica del film lacrimale, a rendere la superficie oculare idrofila, a ridurre la tensione superficiale e a garantire al film lacrimale una densità che gli permetta di rimanere disteso sulla superficie corneale per un intervallo di tempo adeguato<sup>4</sup>. I principali polimeri utilizzati per i sostituti lacrimali includono derivati della cellulosa

(hydroxypropylmethyl cellulose, carboxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose), polyvinyl alcohol (PVA), carbomer, polyvinyl pyrrolidone, polyethylene glycol e destrano. Sono prodotti generalmente ben tollerati nelle concentrazioni in uso, ma talvolta le formulazioni maggiormente viscoso divengono poco confortevoli e causano visione sfuocata, adesività e formazione di residui. Alcuni di questi polimeri, che sono definiti Newtoniani, non riducono la propria densità al momento dell'ammiccamento limitando così la possibilità di distribuirsi sulla superficie oculare e riducendo quindi la propria efficacia<sup>5</sup>. Per alleviare il discomfort e superare tali limitazioni, è recentemente cresciuta l'attenzione verso gli integratori lacrimali che esibiscono un comportamento non Newtoniano, in particolare verso i polimeri pseudoplastici come l'acido ialuronico<sup>6</sup>.

### L'acido ialuronico

L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride lineare formato da unità di disaccaridi contenenti N-acetyl-d-glucosamine e acido glucuronico (Figura 2). Possiede una massa molecolare nell'ordine dei milioni di Dalton ed è dotato di interessanti proprietà viscoelastiche e reologiche, che sono l'espressione delle sue caratteristiche polimeriche e di polielettrolita. L'HA è presente in numerosi fluidi e tessuti biologici, nei quali gioca un ruolo fondamentale. In clinica medica è utilizzato come marker diagnostico per varie patologie tra cui il cancro, l'artrite reumatoide e alcune malattie epatiche. È utilizzato anche come principio attivo, ad esempio per sopperire alle insufficienze di liquido sinoviale nei pazienti artrosici mediante iniezioni intra-articolari. Inoltre viene utilizzato nella chirurgia oftalmica, nella chirurgia otorinica e nella chirurgia estetica per rigenerare e ricostruire i tessuti molli.

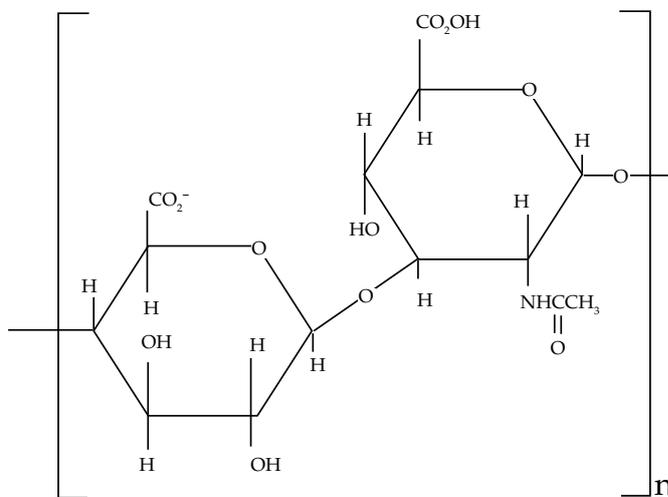


Figura 2  
Struttura dell'unità di disaccaride che si ripete nell'acido ialuronico.

## L'acido ialuronico e le sue applicazioni in contattologia

Dal 1980 numerosi studi scientifici e industriali hanno permesso una miglior comprensione delle proprietà e delle funzioni dell'HA, che ormai è utilizzato in molteplici applicazioni di svariate aree biomediche anche se, ancor oggi, è considerato un principio attivo di nuova generazione<sup>7-11</sup>.

L'HA appartiene ad un gruppo di sostanze conosciute come glicosaminoglicani (GAGs) e, tra queste, è il polimero strutturalmente più semplice perché è l'unico che non si presenta associato o legato a proteine, che non è sintetizzato nell'apparato di Golgi e che non ha gruppi solfato. L'HA è largamente diffuso nel corpo umano e in quello degli altri vertebrati, ma la sua maggiore presenza si riscontra nella matrice extracellulare dei tessuti connettivi lassi<sup>12</sup>. Si stima che in un essere umano adulto del peso di circa 70 Kg, vi siano 15 g di HA; di questi, più della metà (56%) è contenuta nella pelle<sup>13</sup>.

Nella cresta del gallo si trova un'elevata quantità di HA il quale, oltre che nei vertebrati, è presente in alcune specie batteriche e in alcuni tipi di streptococchi mentre è totalmente assente in funghi, piante e insetti. Recentemente è stato pubblicato un ampio studio sulle fonti da cui può essere isolato l'HA e sull'eventuale presenza di potenziali impurità<sup>14</sup>. Un breve elenco della quantità di HA reperibile nei differenti tessuti animali è riportato nella *Figura 3*<sup>15</sup>.

### L'acido ialuronico negli organismi viventi

Negli organismi viventi l'HA si concentra principalmente nella matrice extracellulare e nella matrice pericellulare, ma è stato recentemente dimostrato che è presente anche nello spazio intracellulare<sup>16</sup>. Nel corpo umano, la maggior concentrazione di HA è nel fluido sinoviale, nel cordone ombelicale e nell'umore vitreo. Quasi la metà

dell'HA presente nel corpo umano si trova a livello dermico, localizzato nello spazio intracellulare dove può raggiungere una concentrazione di 2.5 g/l. Il contenuto di HA è relativamente scarso nella cartilagine, anche se ne rappresenta un importante elemento strutturale.

L'HA svolge la funzione di matrice in cui le cellule sono alloggiate, oltre a giocare un importante ruolo in svariati processi a livello dermico. È in grado di trattenere acqua nei tessuti e, di conseguenza, può variare il volume e la compressibilità della pelle. Può influenzare la proliferazione cellulare, la differenziazione cellulare e i processi di riparazione del tessuto. Inoltre l'HA si occupa di smaltire i radicali liberi generati dall'azione dei raggi ultravioletti solari della pelle (ovvero il più grande organo del corpo umano e la prima barriera protettiva tra tessuti sottostanti e ambiente esterno): la componente ultravioletta della luce esercita infatti un forte stress ossidativo sulle cellule, rischiando di danneggiarne il materiale genetico e causarne degenerazione e morte.

Cambiamenti nell'HA si osservano con l'invecchiamento, nel corso di processi cicatriziali e nelle malattie degenerative, soprattutto se coinvolgono la pelle<sup>17</sup>.

Nel fluido sinoviale, l'alta concentrazione di HA ad elevata massa molare provvede alla necessaria lubrificazione dell'articolazione, assorbe efficacemente gli shock meccanici, riduce la frizione tra le ossa in movimento e previene l'usura delle articolazioni. Durante i processi infiammatori causati dalle patologie artritiche (osteoartriti o artriti reumatoidi), l'alta massa molare dell'HA viene degradata ad opera di forme reattive di ossigeno, che riducono la sua viscosità e deteriorano le sue caratteristiche lubrificanti provocando così dolore articolare e difficoltà di movimento<sup>18</sup>.

TESSUTO O FLUIDO CORPORE	CONCENTRAZIONE µg/ml	NOTE
Cresta di gallo	7500	Il tessuto animale col maggior contenuto di HA
Cordone ombelicale umano	4100	Contiene principalmente HA con peso molecolare relativamente elevato
Articolazione umana (fluido sinoviale)	1400-3600	Il volume del liquido sinoviale aumenta in condizione di infiammazione; ciò determina una riduzione della concentrazione di HA
Cartilagine nasale bovina	1200	Spesso usato come modello per gli studi sperimentali sulla cartilagine
Corpo vitreo umano	140-340	La concentrazione di HA aumenta con la maturazione del tessuto
Derma umano	200-500	Proposto come agente di "ringiovanimento" in dermatologia cosmetica
Epidermide umana	100	La concentrazione di HA è maggiore in prossimità delle cellule che lo producono
Cervello di coniglio	65	Si suppone che l'HA riduca la probabilità di tumore al cervello
Cuore di coniglio	27	L'HA è il maggior costituente della matrice patologica causa di occlusione dell'arteria in caso di restenosi coronarica
Linfa toracica umana	0.2-50	Il basso peso molecolare di questo HA è spiegato dall'assorbimento preferenziale, da parte delle cellule endoteliali epatiche, per le grandi molecole
Urina umana	0.1-0.3	L'urina è anche un importante fonte di ialuronidasi
Siero umano	0.01-0.1	La concentrazione di HA aumenta nel siero dei soggetti anziani così come nei pazienti con artrite reumatoide o cirrosi epatica

*Figura 3*  
Presenza e concentrazione di HA in vari tessuti animali 28.

Sebbene in passato si fosse attribuito all'HA semplicemente il ruolo di molecola inerte con funzioni di riempimento del tessuto connettivo, studi successivi hanno identificato siti di legami proteici e specifici recettori che evidenziano il ruolo di attiva mediazione dell'HA in numerose attività fisiologiche<sup>19</sup>. Recentemente è stato infatti attribuito all'HA un importante ruolo nell'embriogenesi, nella trasduzione dei segnali, nella motilità cellulare, nell'invasività delle cellule cancerogene e nella formazione delle metastasi<sup>20</sup>.

Pur presentando una semplice e uniforme struttura primaria, il polimero di HA può raggiungere grandi dimensioni e, proprio in funzione della dimensione raggiunta, può svolgere un ruolo biologico diversificato. I polimeri di grandi dimensioni, oltre che svolgere funzioni di riempimento, hanno una funzione anti-angiogenica e immunosoppressiva. I polimeri di medie dimensione (20-50 disaccaridi) si caratterizzano come agenti infiammatori, immunostimolatori e altamente angiogenici. I polimeri di piccole dimensioni si comportano come antiapoptotici e stimolano la produzione di proteine implicate nello shock termico<sup>21</sup>. Una recente pubblicazione<sup>22</sup> fornisce un accurato studio sull'ampio range di dimensioni che il polimero di HA può assumere e sulle sue specifiche funzioni.

L'HA presente nel corpo umano è sintetizzato per mezzo di enzimi chiamati Hyaluronic-Acid-Synthase (HAS); la sua sintesi è normalmente bilanciata dal contemporaneo catabolismo, pertanto la sua concentrazione nei tessuti rimane costante. I cheratinociti dell'epidermide sono un esempio di cellule che attivamente sintetizzano e catabolizzano ialuronati; in questo caso l'emivita delle molecole di ialuronato è incredibilmente breve ovvero meno di un giorno. Esistono però anche cellule che sintetizzano più HA di quello che catabolizzano, così come esistono cellule che catabolizzano più HA di quello che sintetizzano<sup>13</sup>.

### Le applicazioni dell'acido ialuronico in farmacologia

Le aree di applicazione clinica dell'HA e dei suoi derivati sono state classificate da Balazs nel 2004<sup>23</sup> nel seguente modo, in relazione alle loro finalità:

- (1) Protezione di tessuti delicati e fornitura di spazio durante interventi chirurgici
- (2) Aumento della viscosità, riempimento e aumento di volume di un tessuto (come la pelle), di un muscolo sfintere o di un tessuto della faringe
- (3) Separazione di tessuti connettivi con superfici traumatizzate a causa di procedure chirurgiche o di traumi, prevenzione di adesioni o di eccessive formazioni cicatriziali
- (4) Rimpiazzo o implementazione di fluidi tissutali (ad esempio rimpiazzo del fluido sinoviale nei soggetti affetti da artrite per alleviarne la sintomatologia)
- (5) Protezione di tessuti sani, feriti o offesi da secchezza o da agenti nocivi ambientali, promozione della guarigione di determinate superfici

In farmacologia i gruppi carbossilati di HA sono utilizzati per produrre idrogel cross-linked in grado di intrappolare e poi liberare molecole bioattive. L'HA viene anche usato per preparare microcapsule che migliorano la somministrazione di alcuni farmaci<sup>24</sup> e per migliorare la biocompatibilità delle microsfele di chitosan usate come vettori di farmaci<sup>25</sup>. Microsfele di HA sono inoltre utilizzate per trasportare plasmidi di DNA e anticorpi monoclonali nel trasferimento genico e verso specifici siti bersaglio<sup>26</sup>.

### Le applicazioni dell'acido ialuronico in oftalmologia

Sono ampie le possibili applicazioni dell'HA in Ortopedia, Reumatologia, Otorinolaringoiatria, Dermatologia e Chirurgia Plastica. Nella terapia delle ferite, l'elevato peso molecolare dei preparati a base di HA (applicati a livello topico) promuove e favorisce la guarigione delle ferite a livello cutaneo, la guarigione delle ulcere venose (specie a livello delle gambe) e la terapia delle lesioni croniche<sup>27</sup>. L'HA, grazie alle sue proprietà antiossidanti, è utile anche come componente antinfiammatorio nelle ferite profonde con perdita di materiale.

L'HA è il maggior componente del corpo vitreo ed è una macromolecola assai importante anche in oftalmologia. Grazie alle sue proprietà viscoelastiche è utilizzato in numerosi interventi chirurgici in campo oftalmologico, sia per proteggere i tessuti oculari più delicati che per procurare spazi durante la manipolazione chirurgica. Il suo maggior utilizzo consiste però nella sostituzione o nell'integrazione del corpo vitreo perso durante varie manovre chirurgiche, la più frequente delle quali è l'impianto di IOL.

Le soluzioni a base di HA sono anche utilizzate come protettori viscoelastici dell'endotelio corneale durante gli interventi di trapianto corneale. Attualmente in oftalmologia sono disponibili numerosi preparati caratterizzati dalla presenza di catene di HA (di diverse dimensioni molecolari)<sup>28</sup>.

### Le applicazioni dell'acido ialuronico in contattologia

L'HA è una delle molecole più igroscopiche presenti in natura e, idratato, può contenere una quantità di acqua mille volte superiore al proprio peso<sup>29</sup>. In contattologia, questa eccezionale capacità di ritenzione idrica viene sfruttata per migliorare l'idratazione dell'area precorneale<sup>30</sup>; l'HA è infatti uno dei principi attivi più impiegati nei numerosi sostituti lacrimali in commercio e nel trattamento delle varie forme di occhio secco (da quelle più gravi a quelle marginali)<sup>31,32</sup>.

L'HA, grazie alla sua alta viscosità e alla sua elevata capacità di legare acqua<sup>33</sup>, viene impiegato come principio attivo in numerosi colliri in quanto protegge e lubrifica la superficie oculare e migliora la sintomatologia correlata alle sindromi da occhio secco<sup>34,35</sup>. Viene spesso anche inserito nelle formulazioni delle soluzioni per la manuten-

## L'acido ialuronico e le sue applicazioni in contattologia

zione delle lenti a contatto, in quanto provvede a migliorare e prolungare il comfort dei portatori aumentando la bagnabilità della lente e inducendo così una riduzione della frequenza degli ammiccamenti<sup>36,37</sup>. L'HA può anche fungere da eccipiente quando viene utilizzato insieme ai farmaci, aumentando il loro tempo di permanenza nell'area precorneale e quindi migliorando la biodisponibilità dei farmaci stessi<sup>38,39</sup>. È stato dimostrato che l'applicazione topica di HA (0.1% W/V) riduce la sintomatologia soggettiva e i segni clinici nei soggetti con sindrome da occhio secco<sup>40,41</sup>. Altre ricerche hanno dimostrato che l'HA può efficacemente proteggere l'epitelio corneale<sup>42</sup> e migliorare la stabilità del film precorneale<sup>43</sup>.

L'utilizzo di HA è in grado di ripristinare la secrezione di lattoferrina e difensine B, grazie alla sua elevata mucoadesività e alla sua capacità di ritenzione idrica nell'area precorneale; ciò velocizza e favorisce il ripristino della condizione fisiologica ottimale, agevolando i meccanismi di ripitelizzazione corneo-congiuntivali. È stato dimostrato che, quando instillato nell'area precorneale, l'HA promuove e favorisce la guarigione fisiologica, stimolando la migrazione e la proliferazione dei cheratociti<sup>44,45</sup>.

Le soluzioni a base di HA hanno un comportamento non Newtoniano: sono soluzioni ad alta viscosità quando sono sottoposte a forze di taglio poco intense (occhio aperto), sono a bassa viscosità quando sono sottoposte a forze di taglio più intense (ammiccamento); tale comportamento permette un'adeguata distribuzione e un'ottimale lubrificazione della superficie oculare<sup>46,47</sup>. Un'altra rilevante caratteristica dell'HA è la muco-adesività, che gli permette di formare un rivestimento duraturo e di fornire una stabile protezione alla superficie corneale<sup>48-50</sup>.

Le caratteristiche biologiche dell'acido ialuronico determinano una modificazione della popolazione microbica aerobica ed anaerobica presente nel segmento anteriore dell'occhio, ripristinando i batteri saprofiti della superficie oculare. Utilizzandolo, si osserva infatti una riduzione dello *Pseudomonas* e dello *Staphylococcus aureus* a favore dello *Stafilococco epidermidis*; ciò avviene probabilmente grazie al ripristino della secrezione di lattoferrina e di difensine B prodotte dalle cellule epiteliali congiuntivali, che sono debilitate nei soggetti con occhio secco marginale. L'HA può infatti evitare una situazione infiammatoria cheratocongiuntivale da iposecrezione, può risolvere l'iposecrezione relativa ed inoltre può diminuire l'incidenza delle mucin-balls, talvolta associate all'uso prolungato di lenti a contatto in silicone idrogel<sup>51</sup>.

L'HA presente nell'area pre-corneale funge infine da tampone osmotico, aiutando a mantenere l'idratazione del tessuto. Nel complesso, in sua presenza si riscontra una maggior funzionalità dell'attività di barriera dell'epitelio corneale<sup>15,52</sup>.

Sempre più produttori di lac inseriscono nella matrice polimerica e/o nel blister della lac dei polimeri capaci di mi-

gliorare la bagnabilità superficiale o la capacità di mantenere l'idratazione costante; l'acido ialuronico rappresenta un'alternativa ai più noti agenti umettanti impiegati sino ad ora e si differenzia da questi perché è un polimero naturale, presente nel corpo umano ed a livello oculare. In questi anni, sono state introdotte sul mercato lac contenenti HA nella loro matrice polimerica e nella soluzione contenuta nel blister; tali lac sfruttano le ben note proprietà dell'HA per migliorare il comfort durante le ore di porto.

A conferma delle prospettive di impiego dell'HA in contattologia, che presentano interessanti margini di crescita, alcuni produttori di lac ed alcuni organi di controllo hanno richiesto la messa a punto di tecniche, relativamente semplici, per quantificare l'HA presente in soluzione, nelle condizioni e nelle concentrazioni tipiche di questi prodotti. Da un'analisi della letteratura relativa alle tecniche analitiche riportate, risulta che le bande di assorbimento ottico mostrate a lunghezze d'onda intorno a 200 nm o inferiori sono poco utilizzabili, in quanto queste sono coperte dalle bande di assorbimento della matrice polimerica o della soluzione nella quale l'acido ialuronico è disperso. La maggior parte dell'ampio ventaglio di tecniche analitiche riportate in letteratura consentono l'analisi di soluzioni contenenti HA a concentrazioni più elevate di quelle utilizzate in contattologia; inoltre si tratta di tecniche analitiche spesso realizzate per operare in contesti profondamente differenti o che richiedono minor sensibilità.

Recentemente sono state sviluppate due tecniche per la determinazione di HA in soluzione. La prima è un metodo indiretto che si basa sullo studio della variazione del tipico picco di assorbimento del colorante libero Alcian Blu in funzione della concentrazione di HA. L'intensità di tale picco decresce all'aumentare dei complessi HA/colorante. La sensibilità della tecnica con Alcian Blu, che può essere utilizzata sia con soluzioni di acqua deionizzata che con soluzioni saline, permette di rilevare la presenza di 2.5 µg/ml di HA; la dipendenza tra il valore di assorbanza misurata a 550 nm e la concentrazione di HA risulta lineare nell'intervallo compreso tra 2.5 e 20 µg/ml (Figura 4).

La seconda tecnica, in cui si utilizza il colorante Stain All, si basa sull'osservazione di due picchi di assorbimento: uno a 520 nm, che è attribuito al colorante libero e che decresce all'aumentare della concentrazione di HA; uno a 640 nm, che è attribuito al complesso HA/colorante e la cui intensità cresce all'aumentare della concentrazione di HA. Considerando il picco a 520 nm, la sensibilità della tecnica con Stain All è risultata migliore in quanto raggiunge 0.25 µg/ml, ma è influenzata dall'eventuale presenza di altri anioni (come tipicamente accade in soluzione salina). Al contrario, quando si considera il picco a 640 nm, la sensibilità è la stessa che caratterizza il protocollo basato sull'Alcian Blue (Figura 5)<sup>53</sup>.

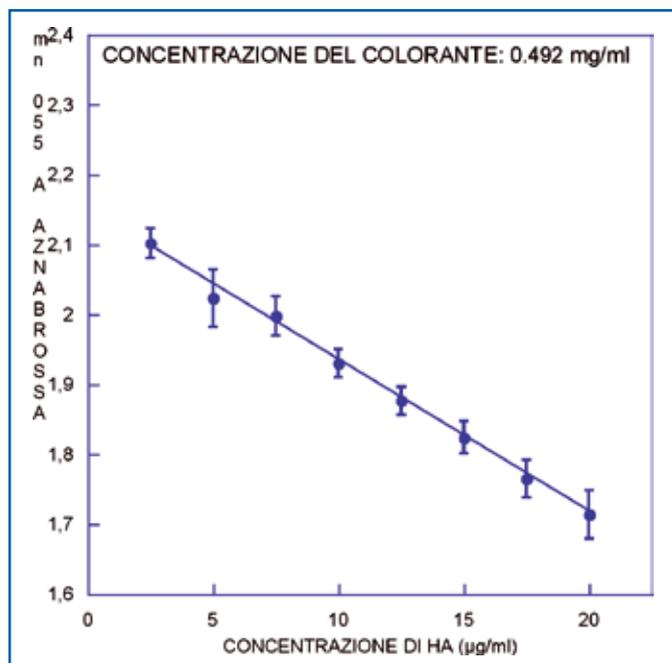


Figura 4  
Assorbanza di soluzioni contenenti HA e Alcian Blu in soluzione salina. I pallini indicano l'assorbanza media misurata in diverse soluzioni preparate con le stesse concentrazioni nominali, la barra dell'errore indica la corrispondente deviazione standard e la linea indica il fit lineare dei dati sperimentali tra 2.5 e 20 µg/ml 53.

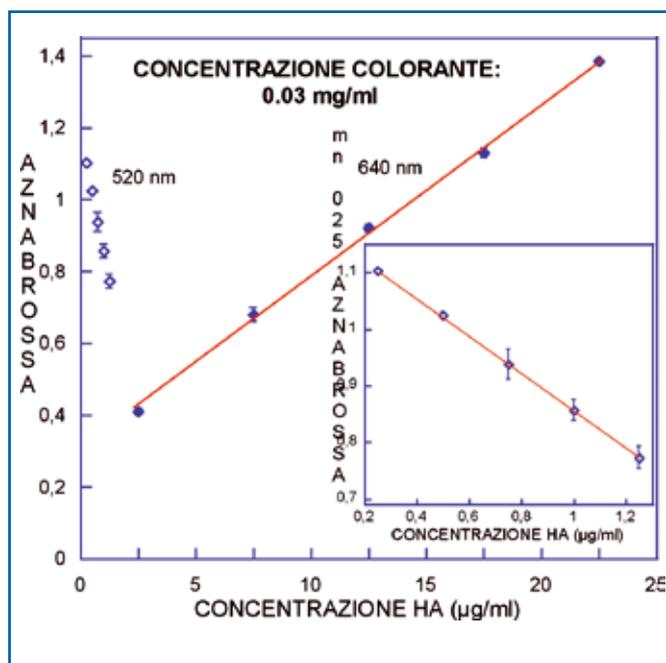


Figura 5  
Assorbanza misurata a 520 nm (rombi vuoti) e a 640 nm (rombi pieni) di soluzioni contenenti Stain All (0.03 mg/ml) e HA (varie concentrazioni) in acqua deionizzata e metanolo. I rombi indicano l'assorbanza media misurata in diverse soluzioni con le stesse concentrazioni nominali e la barra dell'errore indica la relativa deviazione standard; le linee indicano i fits lineari dei dati sperimentali nei corrispondenti intervalli di concentrazione 53.

### Fonti biologiche dell'acido ialuronico

L'indotto economico legato all'HA è enorme e si stima sia superiore al bilione di dollari<sup>54,55</sup>; ciò perché l'HA ricopre un ruolo essenziale dal punto di vista funzionale per numerosi tessuti dei vertebrati. Vari tessuti animali (come la cresta del gallo, la pelle dello squalo e il globo oculare del bovino) ne contengono elevate quantità e rappresentano preziose fonti di approvvigionamento di HA (Figura 3) ma, poiché l'HA nei tessuti biologici è generalmente legato anche ad altri biopolimeri, debbono essere adottate specifiche procedure per renderlo puro. In funzione della sempre migliore efficienza del processo di "purificazione", è oggi possibile ottenere preparati di HA di dimensioni comprese tra alcune centinaia di migliaia di Dalton fino a circa 2.5 MDa così che, attualmente, la domanda di HA per applicazioni mediche è ampiamente soddisfatta dall'HA ad alta massa molecolare ricavato dalla cresta di gallo. In passato l'HA è sempre stato ricavato da tessuti animali (specialmente dalla cresta di gallo) e l'FDA approva tale fonte di approvvigionamento per l'uso medico (come, per esempio, accade con l'Healon in chirurgia oftalmica). Negli ultimi tempi, diverse compagnie hanno però iniziato a proporre HA prodotto per fermentazione, che viene secreto da microorganismi come lo *Streptococcus zooepidemicus* e lo *Streptococcus equi*

utilizzando diversi ceppi attenuati di streptococchi (s-HA)<sup>56,57</sup>. Lo s-HA risponde ai requisiti di massa molecolare, raggiungendo diversi milioni di Dalton<sup>58</sup>. Se l'HA di origine animale ha l'indubbio vantaggio di poter raggiungere pesi molecolari anche superiori ai 5 MDa, ha però lo svantaggio di poter contenere varie proteine e di poter causare reazioni allergiche. L'acido ialuronico prodotto per fermentazione non provoca invece reazioni allergiche e può raggiungere pesi molecolari compresi tra 0.5 e 2.5 MDa; può però contenere endotossine. Recentemente, per produrre su scala industriale HA (b-HA) è stato proposto un nuovo processo di fermentazione basato sul *Bacillus subtilis*; questo nuovo tipo di HA non contiene endotossine, ma non esistono ancora studi clinici riguardanti il suo utilizzo in forma iniettabile<sup>59</sup>.

Le prime due tecniche descritte portano alla produzione di HA ad alto peso molecolare (>1 MDa), mentre la produzione basata sul *Bacillus subtilis* fornisce HA di peso molecolare compreso tra 0.6 e 1 MDa. Le soluzioni preparate con HA ad alto peso molecolare sono viscosissime alle concentrazioni utilizzate nei colliri (0.1-0.3% W/V)<sup>60</sup>; è importante che siano dotate di una certa viscosità, affinché non vengano immediatamente drenate dalla superficie oculare e possano così garantire un lungo tempo di permanenza nel segmento anteriore dell'occhio; ciò permet-

## L'acido ialuronico e le sue applicazioni in contattologia

terà loro di essere efficaci. Non devono peraltro essere eccessivamente viscosi in quanto causerebbero visione sfuocata o fluttuante. Ogni anno sono prodotte e vendute varie tonnellate di HA prodotto per fermentazione. È presente il rischio che il ceppo batterico subisca mutazioni e associ la produzione di HA con quella di tossine, pirogeni o immunogeni; ciò ostacola, nelle applicazioni cliniche, un'ampia diffusione dell'HA prodotto per fermentazione. Per questo motivo i campioni di HA derivati dalla cresta di gallo sono tutt'oggi i preferiti per i trattamenti medici, specialmente nei casi in cui il prodotto è destinato ad essere iniettato, nonostante che anche questo tipo di HA non sia esente da difetti: è infatti controindicato nei soggetti che presentano allergie ai prodotti aviari ed è proprio per questo motivo che le aziende del settore continuano a ricercare e testare nuove fonti possibili di HA<sup>28</sup>.

### Conclusioni

Le soluzioni oftalmiche ad uso topico contenenti HA sono sempre più conosciute ed apprezzate grazie alle caratteristiche di questo interessante polimero naturale, che spesso è utilizzato come agente umettante ed integratore lacrimale. I recenti sviluppi nel campo delle biotecnologie consentono oggi di optare per l'HA con il peso molecolare più adeguato all'uso, scegliendo tra un ampio ventaglio; vengono proposti HA ad alto (>1 MDa) e medio peso molecolare (0.6-1.0 MDa) mentre le soluzioni oftalmiche che fanno uso di HA presentano generalmente concentrazioni di HA comprese tra 0.1 e 0.3% W/V. Numerosi studi stanno analizzando come e quanto il peso molecolare che caratterizza l'HA possa influenzare la sua capacità di legare molecole d'acqua, il suo profilo reologico, il tempo di permanenza nell'area precorneale e la tollerabilità della soluzione oftalmica. Tali studi potranno chiarire se esiste un HA con un peso molecolare ottimale, da preferire quindi a tutti gli altri, oppure se è necessario variare il suo peso molecolare in relazione alle diverse problematiche.

### Bibliografia

- Young G., Veys J., Pritchard N., Coleman S. A multi-centre study of lapsed contact lens wearers. *Ophthalmol. Physiol. Opt.* 2002; 22:516-527.
- Lemp M.A., Foulks G.N. The definition & classification of dry eye disease. Guidelines from the 2007 international dry eye workshop.
- Ousler G.W. 3rd, Hagberg K.W., Schindelar M., Welch D., Abelson M.B. The ocular protection index. *Cornea* 2008; 27(5): 509-513.
- Bonci E., Altimari S., Mascaro T., Lorenzatti M., Leopardi S., Misiroli A. The use of a new-generation lacrimal substitute in dry eye syndrome. *Italian Ophthalmological bulletin* 2004;4:1-11.
- Snibson GR, Greaves JL, Soper NDW, Tiffany JM, Wilson CG, Bron AJ. Ocular surface residence times of artificial tear solutions. *Cornea* 1992;11:288-293.]] Ludwig A, Van Ooteghem M. Evaluation of sodium hyaluronate as viscous vehicle for eye drops. *J Pharm Belg* 1989;44:391-397.
- Camber O, Edman P, Gurny R. Influence of sodium hyaluronate on the miotic effect of pilocarpine in rabbits. *Curr Eye Res* 1987;6:779-784.
- McDonald CC, Kaye SB, Figueiredo FC, Macintosh G, Lockett C. A randomised, crossover, multicentre study to compare the performance of 0.1% (w/v) sodium hyaluronate with 1.4% (w/v) polyvinyl alcohol in the alleviation of symptoms associated with dry eye syndrome. *Eye* 2002;16:601-607.
- Szczotka-Flynn LB. Chemical properties of contact lens rewetters. A review on hyaluronic acid as a contemporary ingredient in contact lens rewetters. *Contact Lens Spectrum* April 2006;40-45.
- Aragona P, Di Stefano G, Ferreri F, Spinella R, Stilo A. Sodium hyaluronate eye drops of different osmolarity for the treatment of dry eye in Sjogren's syndrome patients. *Br J Ophthalmol* 2002;86:879-884.
- Papa V, Aragona P, Russo S, Di Bella A, Russo P, Milazzo G. Comparison of hypotonic and isotonic solutions containing sodium hyaluronate on the symptomatic treatment of dry eye patients. *Ophthalmologica* 2001;215:124-127.
- Condon PI, McEwen CG, Wright M, Mackintosh G, Prescott RJ, McDonald C. Double blind, randomised, placebo controlled, crossover, multicentre study to determine the efficacy of a 0.1% (w/v) sodium hyaluronate solution (Fermavisc) in the treatment of dry eye syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1121-1124.
- Laurent T.C., Robert J., Fraser E. Hyaluronan. *FASEB J.* (1992) 6:2397-2404.
- Laeschke K. Everything you wanted to know about hyaluronic acid. [Http://www.cristalfillers.com/docs/Everything\\_About\\_HA.pdf](http://www.cristalfillers.com/docs/Everything_About_HA.pdf).
- Juhlin L (1997) Hyaluronan in skin. *J Intern Med* 242:61-66.
- Shiedlin A, Bighelow R, Christophe W, Arbabi S, Yang L, Maier RV, Wainwright N, Childs A, Miller RJ (2004) Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules* 5:2122-2127.
- Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M, Arnold J (2006) Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules* 7:659-668.
- Tammi MI, Day AJ, Turley EA (2002) Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 277:4581-4784.
- Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen L (2005) *Microbiol Biotechnol* 66:341-351.
- Mendichi R, Schieron AG (2002) Fractionation and characterization of ultra-high molar mass hyaluronan: 2. On-line size exclusion chromatography methods. *Polymer* 43:6115-6121.
- Holly FJ, ed. Preocular tear film in health diseases and contact lens wear. Lubbock, TX: Dry Eye Institute, 1986:64-80.
- Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem* (2002) 277:17308-17314.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85:699 715.
- Edmonds ME, Foster AV Diabetic foot ulcer. *Brit Med J* (2006) 332:407-410.
- Ky W, Scherick K and Stenson S. Clinical survey of lens care in contact lens patients. *CLAO J*, 1998;24:4 216-9.

- 25 European Federation of National Associations and International Companies of Contact Lens Manufactures, 2003.
- 26 Tomlinso A. Complication of contact lens wear. London: Mosby-Year Book, 1992:195-218.
- 27 Vasiliu S, Popa M, Rinaudo M, (2005) Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *Eur Polym J* 41:923-932.
- 28 Grigorij Kogan, Ladislav Soltes, Robert Stern, Peter Gemeiner. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* (2007) 29:17-25
- 29 Laurent TC, Fraser JRE. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6:2397-2404.
- 30 Nakamura M, Hikida M; Nakano T, Ito S, Hamano T, Kinoshita S. Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* 1993;12:433-436.
- 31 Dumbleton K, Jones L, Chalmers R et al. Clinical characterization of spherical post-lens debris associated with lotrafilcon high-DK silicone lenses. *CLAO J*, 2000. 26:4 186-92.
- 32 Mengher LS, Pandher KS, Bron AJ, et al. Effects of sodium hyaluronate (0.1 per cent) on break-up time (nibut) in patients with dry eyes. *Br J Ophthalmol*, 1986;70:422-7.
- 33 Felt O, Einmahl S, Furrer P, Baeyens V, Gurny R. Polymeric System for Ophthalmic Drug Delivery. In: Dumitriu S, editor. *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker; 2002. p 377-421.
- 34 Bron AJ, Mangat H, Quinlan M, Foley-Nolan A, Eustace P, Fsadni M, Sunder Raj P. Polyacrylic acid gel in patients with dry eyes: a randomised comparison with polyvinyl alcohol. *Eur J Ophthalmol* 1998;8:81-89.
- 35 McDonald CC, Kaye SB, Figueiredo FC, Macintosh G, Lockett C. A randomised, crossover, multicentre study to compare the performance of 0.1% (w/v) sodium hyaluronate with 1.4% (w/v) polyvinyl alcohol in the alleviation of symptoms associated with dry eye syndrome. *Eye* 2002;16:601-607.
- 36 Acosta MC, Gallar J, Belmonte C. The influence of eye solutions on blinking and ocular comfort at rest and during work at video display terminals. *Exp Eye Res* 1999;68:663-669.
- 37 Sclafani LA. Lubricant eye drops for contact lens wearers. *Rev Cornea Contact Lens* March 2005;1-4.
- 38 Bernatchez SF, Tabatabay C, Gurny R. Sodium hyaluronate 0.25% used as a vehicle increases the bioavailability of topically administered gentamicin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:157-161.
- 39 Saettone MF, Giannaccini B, Ravecca S, La Marca P, Tota G. Polymer effects on ocular bioavailability-the influence of different liquid vehicles on the mydriatic response of tropicamide in humans and in rabbits. *Int J Pharm* 1984;20:187-202.
- 40 DeLuise VP, Peterson WS. The use of topical sodium hyaluronate (Healon) in the management of refractory dry eye syndrome. *Ann Ophthalmol* 1984; 16: 823-824.
- 41 Stuart JC, Lim JG. Dilute sodium hyaluronate (Healon) in the treatment of ocular surface disorders. *Ann Ophthalmol* 1985; 17: 190-19.
- 42 Wysenbeek WS, Loya N, Sira BL et al. The effect of Eye sodium hyaluronate on the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 194-199.
- 43 Hamano T, Horimoto K, Lee M, Komemushi S. Sodium hyaluronate eye drops enhance tear film stability. *Jpn J Ophthalmol* 1996;40:62-65.
- 44 Tani E, Katakami C, Negi A. Effects of various eye drops on corneal wound healing after superficial keratectomy in rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 2002;46:488-495.
- 45 Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 1991;53:753-758.
- 46 Ludwig A, Van Ooteghem M. Evaluation of sodium hyaluronate as viscous vehicle for eye drops. *J Pharm Belg* 1989;44:391-397.
- 47 Berriaud N, Milas M, Rinaudo M. Characterization and properties of hyaluronic acid (hyaluronan). In: Dumitriu S, editor. *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility*. New York: Marcel Dekker Inc; 1998. p 313-334.
- 48 Saettone MF, Monti D, Torracca MT, Chetoni P. Mucoadhesive ophthalmic vehicles: evaluation of polymeric low-viscosity formulations. *J Ocul Pharmacol* 1994;10:83-92.
- 49 Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Adv Drug Delivery Rev* 1993;11:349-383.
- 50 Saettone MF, Chetoni P, Torracca MT, Buralgassi S, Giannaccini B. Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid. *Int J Pharm* 1989;51:203-212.
- 51 Hamano T, Horimoto K, Lee M et al. Sodium hyaluronate eye-drops enhance tear film stability. *Jpn J Ophthalmol*, 1996;40:60-5.
- 52 Evanko S, Wight T 2001 Intracellular hyaluronan. In: *Hyaluronan: synthesis, function, catabolism*. Available at [www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html). Cited 30 Jul 2001.
- 53 Fagnola M, Pagani MP, Maffioletti S, Tavazzi S, Papagni A. Hyaluronic acid in hydrophilic contact lenses: Spectroscopic investigation of the content and release in solution. *Contact Lens Anterior Eye* (2009) 32:108-112.
- 54 Balzas EA (2004) Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: Garg HG, Hales CA (eds) *Chemistry and biology of hyaluronan*. Elsevier, Amsterdam, p 415.
- 55 Widner B., Behr R., Von Dollen S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* (2005) 71:3747-3752.
- 56 Chong BF, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66:341-351.
- 57 Balzas EA. Ultra pure, high molecular wt. hyaluronic acid - is non-antigenic and used as synthetic aq. humour and synovial fluid, as nerve tissue and wound protector and drug carrier. 1979;US patent 4,141,973.
- 58 Maltese A, Borzacchiello A, Mayol L, Bucolo C, Maugeri F, Nicolais L, Ambrosio L, (2006) Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: rheological characterization. *Biomaterials* 27:5134-5142.
- 59 Widner W, Sloma A, Thomas M, Tang M. Producing a hyaluronic acid, by cultivating *Bacillus* cell comprising a nucleic acid construct comprising a variant amyL promoter, a consensus promoter, and a cryIIIA promoter, and isolating hyaluronic acid from the cultivation medium. 2005;WO patent application 2005098016-A2.
- 59 Esposito E, Menegatti E, Cortesi R (2005) Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *Int J Pharm* 288:35-49.
- 60 Bothner H, Waaler T, Wik O. Rheological characterization of tear substitutes. *Drug Dev Ind Pharm* 1990;16:755-768.