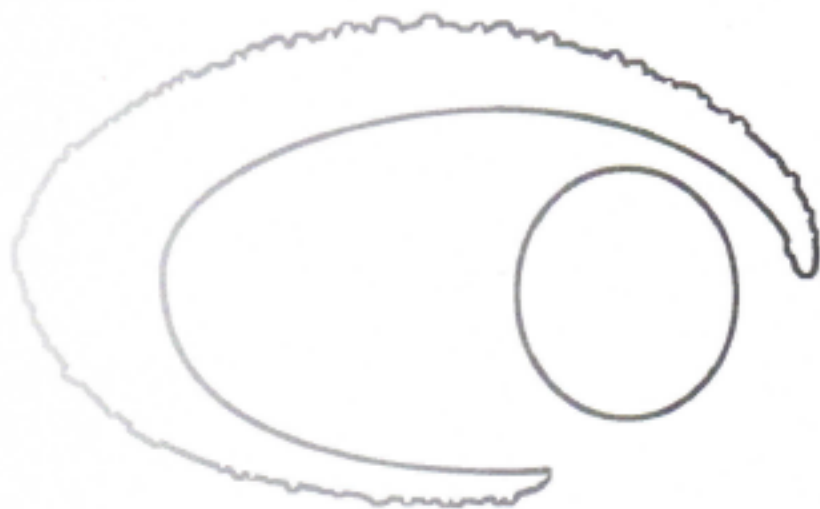


BOLLETTINO DI OCULISTICA

ITALIAN OPHTHALMOLOGICAL BULLETIN

ANNO 85 - N. 2 - 2006

DIRETTORE
Prof. José Pecori Giraldi



Leonelli Printing



IMAGING MICROSCOPICO IN VIVO DELLE CELLULE DI LANGERHANS CORNEALI

F. PELLEGRINI, R. BORGIA, F. DI CENSO, A.L. CAPPONI, C. BROGIONI, R. CALIENNO, T. LIBERALI, O. COSTANTINO

Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento
Clinica Oftalmologica
Centro Regionale di Eccellenza in Oftalmologia
Direttore: Prof. L. Mastropasqua

RIASSUNTO

Lo studio della morfologia dei diversi strati della cornea e del limbus può avvalersi della microscopia confocale in vivo (IVCM).

Lo scopo del nostro lavoro è stato valutare, la morfologia, la sede e la densità delle cellule dendritiche (DC) epiteliali nel limbus e nella cornea umana, in condizioni di normalità (gruppo 1), in uno stato di infiammazione corneale immuno-mediata (gruppo 2) ed in uno stato di cicatrizzazione attiva corneale senza alterazioni patologiche dopo PRK miopica (gruppo 3). A tale scopo è stato utilizzato il microscopio confocale corneale digitale Laser-Scanning (LSM) (HRT II Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Germany).

Nel contesto della cornea centrale, tali cellule sono state riscontrate ad una profondità compresa tra i 45 ed 65 µm nel contesto dell'epitelio e della membrana basale, in tutti gli occhi dei pazienti del gruppo 2 e solo nel 14% degli occhi dei pazienti del gruppo 1, mentre a livello del limbus sono state evidenziate in tutti gli occhi di tutti i pazienti di ciascun gruppo.

La densità media delle DC della cornea centrale nel gruppo 1 è risultata maggiore rispetto a quella del gruppo 2 ($P < 0.001$), mentre, a livello del limbus la densità è risultata nettamente maggiore negli occhi del gruppo 2 rispetto agli altri due gruppi ($P < 0.001$).

Inoltre, con l'utilizzo di tale metodica, è stato possibile evidenziare le differenti caratteristiche morfologiche e di distribuzione delle DC nell'epitelio corneale e limbare in occhi sani ed affetti da infiammazione.

Questi risultati suggeriscono che mediante IVCM è possibile la visualizzazione della migrazione di DC nella cornea centrale in corso di infiammazione immuno-mediata, consentendo numerose implicazioni di utilizzo clinico.

PAROLE CHIAVE: Microscopia confocale, cellule dendritiche, cornea, limbus, congiuntiva.

ABSTRACT

Microscopic imaging in vivo of corneal dendritic cells

F. Pellegrini, R. Borgia, F. Di Censo, A.L. Capponi, C. Brogioni, R. Calienno, T. Liberali, O. Costantino

Morphology study of corneal and limbal layers can use confocal microscopy in vivo (IVCM).

The purpose of our study is to analyze morphology, location and density of epithelial dendritic cells (DC) in healthy corneas (group 1), in immune-based inflamed corneas (group 2) and in wound-healing corneas without pathologic alterations after myopic PRK (group 3).

In our study, we used Laser-Scanning digital confocal microscopy (LSM) (HRT II Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Germany).

In the central cornea, the DC were between 45 and 65 µm within the epithelium and the basal membrane, in all patients of group 2 and in 14% of eyes of patients of group 1; whereas, in the limbus the DC were in all eyes of all patients of every group.

The mean DC density values in patients of group 2 was significantly greater than that of patients belonging to group 1 was ($P < 0.001$), whereas, in the limbus, DC density was greater in eyes of group 2 compared with the other groups ($P < 0.001$).

Using confocal microscopy, we were able to analyze DC morphology and distribution within corneal and limbal epithelium in healthy and inflamed eyes.

Our results suggest that by IVCM enables the visualization of DC recruitment in the central cornea in case of immune-based inflammation, arising several clinical implication.

KEY WORDS: Confocal microscopy, dendritic cells, cornea, limbus, conjunctiva.

Introduzione

La cornea è una struttura connettivale densa, organizzata in lamelle collagene regolari ed addensate (stroma)¹ in cui si inseriscono le componenti cellulari; tale struttura oculare è rivestita, rispettivamente a livello della superficie anteriore e posteriore, dall'epitelio e dall'endotelio. Nel contesto corneale sono rintracciabili componenti cellulari di natura epiteliale, mesenchimale, neurale, e cellule del sistema immunitario specializzato².

Queste ultime possono essere identificate con le cellule dendritiche (DC), la cui classe predominante a livello corneale è costituita dalle cellule di Langherans. Le DC mostrano un aspetto dendritico, sono di derivazione midollare (sia di linea mieloide che linfoide), appartengono alla classe delle cellule presentanti l'antigene (APC, antigen presenting cells) e regolano la risposta immunitaria in maniera altamente specifica, previa attivazione caratterizzata dall'espressione di antigeni MHC di classe II (CD11c+) sulla loro superficie³.

La distribuzione e le caratteristiche fenotipiche di tali cellule, sia nell'occhio sano che nell'occhio in cui sono attivi processi infiammatori immuno-mediati, sono state analizzate mediante studi ex vivo nell'uomo ed in diverse specie animali, mediante metodiche istologiche nell'uomo, mediante utilizzo di immunofluorescenza con anticorpi multipli in microscopia confocale ex vivo in cornee murine.

In occhi sani è stato possibile localizzare DC mature, ossia MCH di classe II+, solamente a livello della congiuntiva, del limbus e della cornea periferica, mentre nella cornea centrale sono state riscontrate solo DC immature, MCH II, e comunque in densità minore rispetto la cornea periferica ed il limbus^{3,4,5}.

Scopo del presente lavoro è di valutare, mediante tecniche di microscopia confocale in vivo (IVCM), la morfologia, la sede e la densità delle DC, nei tessuti epiteliali del limbus e della cornea, in condizioni di normalità ed in stato di infiammazione immuno-mediata.

Materiali e metodi

Lo studio è stato costruito come osservazionale, comparativo caso-controllo.

Sono stati arruolati complessivamente 74 pazienti suddivisi in 3 gruppi.

Il gruppo 1, costituito da 29 occhi di 20 pazienti (12 M, 8 F, età 42.5 ± 5.2 , range 24-70 anni), comprendeva volontari sani, i quali rispondevano ai

seguenti criteri di inclusione: assenza di patologie oculari o sistemiche in atto, assenza di pregresse patologie oculari infiammatorie o infettive virali, anamnesi negativa per interventi chirurgici sul bulbo oculare o per trauma oculare, per patologie allergiche mucosali stagionali, o per uso anche sporadico di lente a contatto.

Il gruppo 2 comprendeva 38 occhi di 34 soggetti (15 M, 19 F; età 45.1 ± 7.1 , range 29-71 anni) affetti da differenti patologie corneali caratterizzate da infiammazione immuno-mediata in fase acuta o sub-acuta: 7 occhi affetti da Cheratite da HSV stromale recidivante, 11 occhi affetti da Cheratite da Adenovirus nummulare, 22 occhi affetti da condizioni caratterizzate da attivazione immunitaria corneale con difetti epiteliali per erosioni corneali ricorrenti ($n=12$), ulcere corneali post-infettive ($n=3$), rigetti epiteliali acuti in PK ($n=3$), cheratocongiuntiviti allergiche ($n=4$).

Il gruppo 3 includeva 20 occhi di 20 pazienti sottoposti a chirurgia refrattiva con laser ad eccimeri (PRK) miopica (ES medio -4.5 ± 1.5 D), con follow-up medio di 3 settimane (range 7-90 giorni) e che avevano presentato un decorso post-operatorio regolare. Le cornee dei pazienti arruolati in questo gruppo sono state utilizzate in quanto costituivano prova di un processo di cicatrizzazione attiva in assenza di processi patologici che necessitano dell'attività APC a livello della cornea centrale.

La valutazione della cornea è stata condotta utilizzando il microscopio confocale corneale digitale Laser-Scanning (LSM) (HRT II Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Germany), che permette di valutare sia la cornea centrale che la morfologia del limbus.

Il criterio di identificazione delle DC è stato l'evidenza, in sede compresa tra lo strato basale dell'epitelio e la membrana di Bowman, di strutture cellulari nucleate di dimensioni compatibili con quelle note per le DC (tra 15 e 60 μ m) e fornite di prolungamenti citoplasmatici fusati o ramificati.

La densità media delle DC al centro della cornea e nel contesto del limbus è stata calcolata mediante identificazione manuale delle strutture cellulari utilizzando il software di calcolo di densità cellulare fornito con lo strumento; tale software consente la conta cellulare manuale all'interno di una regione di interesse selezionata (ROI) di dimensioni standard (0.06 mm²). Il valore di densità è stato considerato come media di 3 differenti misurazioni.

Le differenze di densità di DC nel limbus e nel centro corneale per ciascun gruppo, e tra i gruppi in esame sono state analizzate mediante Test-

t di Student. Le differenze nella proporzione di osservazione (espressa in %) sono state analizzate mediante test *chi-quadro*. Le analisi statistiche sono state condotte tramite computer (SPSS® for Windows, ver. 10; SPSS Sciences, Chicago, IL, USA).

Risultati

Le DC sono risultate visibili nel limbus in tutti gli occhi di tutti i pazienti di ciascun gruppo; invece, nel contesto della cornea centrale sono state riscontrate in tutti i casi dei pazienti del gruppo 2, nel 14% degli occhi dei pazienti del Gruppo 1 e in nessun caso nei pazienti appartenenti al Gruppo 3 (Tabella I).

In tutti i casi, la localizzazione delle DC era compresa tra i 45 ed 65 μ m: per quanto riguarda la cornea centrale, tali cellule sono evidenziabili nel contesto dell'epitelio basale, della lamina basale dell'epitelio o della membrana di Bowman, mentre per quanto riguarda la zona limbare, tali cellule si riscontrano nel contesto della porzione basale dell'epitelio o nel tessuto connettivale corrispondente alla membrana basale dell'epitelio e della membrana di Bowman.

Inoltre, nel limbus degli occhi del gruppo 2 è stata osservata una densità media di DC mag-

giore in maniera statisticamente significativa rispetto a quella osservata negli occhi appartenenti ai gruppi 1 e 3; così come, è risultata significativa la differenza dei valori medi di densità riscontrati al centro della cornea per i pazienti del gruppo 1 rispetto ai pazienti del gruppo 2 (Tabella II).

Dal punto di vista morfologico, le DC visualizzate al limbus in tutti i soggetti non affetti da patologie infiammatorie immuno-mediate della cornea (gruppi 1 e 3) (e nel 14% dei casi per i pazienti sani in cui sono state osservate nel centro corneale), hanno mostrato un aspetto caratterizzato da riflettività medio-lieve, presenza di processi citoplasmatici poco evidenti e dimensioni inferiori a 15 μ m. Al contrario le DC osservate al limbus e al centro della cornea in tutti i pazienti appartenenti al gruppo 2, sono apparse di riflettività più alta (medio-elevata o elevata), con evidenti processi dendritici citoplasmatici di dimensioni superiori a 15 μ m.

Discussione

Il nostro studio dimostra che, mediante esame in vivo di microscopia confocale, è possibile analizzare in cornee sane e patologiche, la presenza, la distribuzione e la densità delle DC epiteliali e subepiteliali, sia a livello della cornea centrale, che a livello del limbus. Poiché a tale livello le DC sono presenti nel 100% di cornee sane, è possibile ipotizzare che sia il tessuto limbare a contenere una quantità di DC residenti tali da consentirne il riscontro ubiquitario con una metodica che presenta una dimensione di campo di immagine inferiore ai 0,08 mm².

Un ulteriore dato importante che deriva dai risultati del nostro studio, è che, microscopicamente in vivo, è stato possibile trovare un riscontro ai dati precedentemente riportati su

Tab. I - Percentuale (%) di presenza di DC nella cornea centrale e nel limbus nei tre gruppi comprendenti tutti gli occhi dei pazienti esaminati. * $P < 0.001$.

Gruppi	Cornea DC	Limbus DC
Gruppo 1	14% (n=4) *	100%
Gruppo 2	100%	100%
Gruppo 3	0%	100%

Tab. II - Densità cellulare media di DC nella cornea centrale e nel limbus nei tre gruppi di pazienti esaminati. Per i Gruppo 2 è riportata una suddivisione in sottogruppi (n=numero di occhi compresi) corrispondenti alle tre principali categorie di patologie infiammatorie: HSV = cheratite erpetica stromale recidivante; ADV = cheratite da Adenovirus; DE = difetti epiteliali.

Gruppi	Cornea DCs	Limbus DCs
Gruppo 1	18±54 cell/mm ² (n=4) *	91±36 cell/mm ² †
Gruppo 2 (totale)	310±141 cell/mm ²	294±71 cell/mm ²
HSV (n 7)	238±158 cell/mm ²	319±105 cell/mm ²
ADV (n 11)	332±116 cell/mm ²	293±52 cell/mm ²
DE (n 22)	300±162 cell/mm ²	283±75 cell/mm ²
Gruppo 3	0	84±35 cell/mm ² †

* $P < 0.001$ rispetto ai valori medi in cornea centrale del Gruppo 2. † $P < 0.001$ rispetto ai valori medi al limbus del Gruppo 2.

modello animale relativi alla modificazione della distribuzione della densità delle DC in caso di infiammazione. Abbiamo constatato che nel gruppo di occhi affetti da infiammazione immuno-mediata della cornea, le DC sono presenti sia a livello del limbus che a livello del centro corneale nel 100% dei casi, con densità simile nei due settori e comunque maggiore rispetto a quella riscontrabile in occhi sani; questo evento non si verifica nei pazienti del gruppo di controllo sottoposti a PRK. Questi dati indicano che, per innescare il reclutamento di DC dal limbus verso il centro corneale che ne è solitamente sprovvisto, è richiesta una condizione di infiammazione immuno-mediata in cui è necessaria la funzione di APC.

In caso di infiammazione corneale, mediante la microscopia confocale è possibile evidenziare variazioni morfologiche delle DC rispetto alla visualizzazione tipica in condizioni di normalità (incremento di dimensioni, di riflettività, comparsa di processi dendritici citoplasmatici

più evidenti): è ipotizzabile che tali variazioni siano l'espressione qualitativa di fenomeni di attivazione e/o maturazione cellulare indotte dallo stato patologico.

Le osservazioni del nostro studio potrebbero portare ad implicazioni cliniche per le applicazioni diagnostiche microscopiche in vivo in numerosi processi patologici corneali: in futuro, potrebbe essere possibile definire morfologicamente uno stato di iniziale attivazione del sistema immunitario locale della superficie oculare e della cornea prima che gli elementi clinici e macroscopici dell'infiammazione propria dei processi patologici siano manifesti. Questo consentirebbe ad esempio, la diagnosi precoce di rigetto di trapianto di cornea, oppure indicherebbe, in caso di persistenza di tale quadro microscopico dopo la fase clinica, che un episodio di infiammazione mediata da meccanismi immunitari (rigetto, cheratite stromale recidivante da HSV, cheratocongiuntiviti allergiche etc.) è ancora in fase attiva.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bron A.J., Tripathi T.M., Tripathi B.J.: *Wolff's anatomy of the eye and orbit*. London: Chapman and Hall Medical, 1997.
- 2) Zhivov A., Stave J., Guthoff R.: *In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005; 243:1056-1061.
- 3) Hamrah P., Liu Y., Dana M.R.: *The corneal stroma is endo-*

wed with a significant number of resident dendritic cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003; 18: 310-313.

- 4) Hamrah P., Liu Y., Zhang Q., Dana M.R.: *Alterations in corneal stromal dendritic cell phenotype and distribution in inflammation*. Arch Ophthalmol, 2003; 121: 1132-40.

- 5) Hamrah P., Zhang Q., Liu Y., Dana M.R.: *Novel characterization of MHC classII-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002; 43: 639-646.

Autore Corrispondente

Dott. F. PELLEGRINI
Via Adriatica sud, 6
66023 FRANCAVILLA AL MARE (Chieti)