



SIMPOSIO S.I.C.S.S.O. in S.O.I.

Roma, 28 Novembre 2003

**LE USTIOCAUSTICAZIONI
CORNEOCONGIUNTIVALI DA AGENTI CHIMICI.
*CLINICA E TRATTAMENTO***

Editore



I.N.C. Innovation-News-Communication

SIMPOSIO S.I.C.S.S.O. in S.O.I.

Roma, 28 Novembre 2003

**LE USTIOCAUSTICAZIONI
CORNEOCONGIUNTIVALI DA AGENTI CHIMICI.
*CLINICA E TRATTAMENTO***

V. Sarnicola, L. Conti

Con la collaborazione di:

D. Ballerini, A. Burroni, S. De Robertis, R. Mele

© Copyright 2003

I.N.C. Innovation- News-Communication®

Via Troilo il Grande, 11 - 00131 Roma

Tel. 0641405454 - Fax 0641405453

E-mail: inc-innov@mclink.it - Web: inc-innov.com

ISBN 88-86193-44-0

Progetto Grafico - Editing - Impaginazione

I.N.C. Innovation-News-Communication®

Fotolito

M&C Graphipoint

P.zza T. De Cristoforis, 4F - 00159 Roma

Stampa

SO.GRA.RO. Società Grafica Romana

Via Ignazio Pettinengo, 39 - 00159 Roma

Finito di stampare nel mese di Novembre 2003

Tutti i diritti sono riservati, in particolare il diritto di duplicazione e di diffusione, nonché il diritto di traduzione. Nessuna parte dell'Opera può essere riprodotta in alcuna forma, per fotocopia, microfilm, CD-Rom o altri procedimenti elettronici, senza il consenso scritto dell'Editore e degli Autori. Dati, figure, opinioni e affermazioni qui pubblicati impegnano esclusivamente la responsabilità degli Autori e non dell'Editore. Ogni prodotto menzionato deve essere usato in accordo con la scheda tecnica fornita dalla ditta produttrice.



CONSIGLIO DIRETTIVO



PRESIDENTE

Prof. Vincenzo Sarnicola - Grosseto



VICEPRESIDENTE

Dott. Ferdinando Trimarchi - Pavia



SEGRETARIO

Dott. Diego Ponzin - Mestre



TESORIERE

Dott. Luigi Conti - Grosseto

CONSIGLIERI

Dott. Alberto Montericcio - Trapani

Dott. Vittorio Fossombroni - Firenze

Dott. Maurizio Bartolozzi - Grosseto

Le ustiocausticazioni corneocongiuntivali da agenti chimici. Clinica e trattamento

V. Sarnicola, L. Conti

Con la collaborazione di: D. Ballerini, A. Burrini, S. De Robertis, R. Mele

INTRODUZIONE

Le lesioni chimiche dell'occhio possono determinare un danno esteso alle strutture della superficie oculare, agli strati corneali ed all'intero segmento anteriore.

L'ischemia tessutale, la necrosi cellulare e la denaturazione delle proteine (specialmente del collagene), provocano una reazione infiammatoria che potrebbe esitare in un'alterazione dell'integrità oculare con deficit uni- o bilaterale della visione.

Una grande varietà di agenti chimici e tossici possono danneggiare la superficie oculare, ma se non penetrano profondamente spesso il trauma è reversibile.

Gli acidi deboli tendono a rimanere confinati alla superficie oculare determinando la precipitazione delle proteine dell'epitelio, perdendo rapidamente la loro forza di penetrazione e formando una barriera parziale che impedisce all'acido residuo di penetrare più in profondità. Gli acidi forti, al pari degli alcali, possono penetrare assai velocemente nell'occhio determinando lesioni più severe.

Gli alcali saponificano le membrane cellulari, denaturano il collagene, penetrano profondamente e rapidamente nell'occhio

danneggiando la superficie oculare ed il segmento anteriore.

Ricerche cliniche e di laboratorio hanno contribuito alla comprensione dei processi fisiopatologici ed hanno facilitato lo sviluppo di strategie mediche e chirurgiche per una terapia di successo.

EPIDEMIOLOGIA

La frequenza e la distribuzione delle lesioni chimiche dell'occhio variano da nazione a nazione. La maggior parte delle vittime sono giovani ed in molti casi l'esposizione all'agente chimico avviene in ambiente industriale, in quello domestico ed in occasione di azioni criminali. Le lesioni da alcali sono molto più frequenti di quelle da acidi a causa della loro presenza nei detersivi domestici e nei materiali da costruzione. Recenti studi riferiscono che l'incidenza delle causticazioni oculari varia dal 7,7% al 18% di tutti i traumi oculari.

Ci sono profonde ripercussioni psicologiche, sociali ed economiche in seguito alla causticazione oculare. Il trauma chimico anche di un solo occhio determina costi sanitari, spesso perdita del lavoro, conflitti in-

terpersonali ed isolamento almeno per il periodo di tempo necessario a stabilizzare l'occhio colpito. La cecità conseguente alle causticazioni bilaterali solitamente restringe le opportunità di lavoro ed economiche.

ALCALI E ACIDI (Tab. I)

Si definisce classicamente acido quella sostanza chimica che in soluzione acquosa si dissocia dando uno o più ioni idrogeno ed alcalina quella che in soluzione acquosa dà uno o più ioni idrossido.

Gli acidi più comuni sono l'acido solforico H_2SO_4 , l'acido solforoso H_2SO_3 , l'acido fluoridrico HF, l'acido acetico CH_3COOH , l'acido cromico Cr_2O_3 , l'acido cloridrico HCl.

Le lesioni più severe sono provocate dall'acido fluoridrico. Lo ione fluoruro, per il suo basso peso molecolare e la piccola taglia, penetra rapidamente nello stroma, producendo danni corneali e del segmento anteriore.

L'acido solforico è la più frequente causa di lesioni da acidi. L'acido solforico reagisce con l'acqua del film lacrimale precorneale producendo calore che causa carbonizzazione dell'epitelio corneale e congiuntivale. Produce raramente lesioni di grave entità se non associato ad un danno termico o ad un'alta velocità di penetrazione di un corpo estraneo nell'occhio, come avviene nello scoppio della batteria dell'automobile.

Le sostanze alcaline più comunemente causa di causticazione sono l'ammoniaca NH_3 , la soda caustica $Na(OH)$, la potassa $K(OH)$, l'idrossido di magnesio $Mg(OH)_2$, la calce $Ca(OH)_2$.

Le lesioni più severe sono causate dall'am-

moniaca presente nei detersivi per la casa e dalla soda caustica soprattutto presente nei prodotti per la pulizia degli scarichi. Entrambe le sostanze penetrano immediatamente nell'occhio e potenzialmente possono produrre severi danni al segmento anteriore.

L'idrossido di magnesio è presente nei fuochi d'artificio e determina lesioni devastanti perché al danno chimico si associa quello termico.

La lesione oculare da alcali più comune è, però, quella da calce. La calce $Ca(OH)_2$, particolarmente nella forma di gesso, dopo aver attraversato la membrana delle cellule epiteliali, forma saponi di calcio che precipitando limitano un'ulteriore penetrazione, provocando pertanto lesioni di minor gravità rispetto agli altri alcali. Le particelle di calce rimaste nei fornic, però, costituiscono una continua sorgente di ioni OH^- che, se non sono identificate e rimosse prontamente, possono determinare un danno maggiore.

ANATOMIA, FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA DELLA SUPERFICIE OCULARE

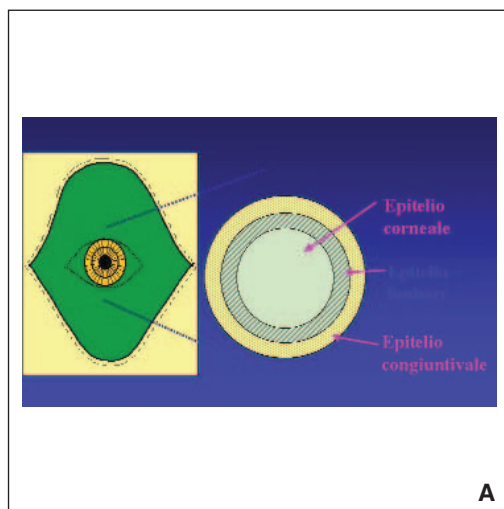
Indipendentemente dalla sostanza responsabile della lesione chimica, i principi che guidano la valutazione di una causticazione oculare richiedono la conoscenza dell'anatomia e fisiologia della superficie oculare e delle complesse interazioni tra l'epitelio superficiale, la riparazione e la degradazione della matrice stromale e l'infiltrazione infiammatoria della cornea.

La superficie oculare è composta dagli epitelii della congiuntiva, della cornea, del limbus e dal film lacrimale.

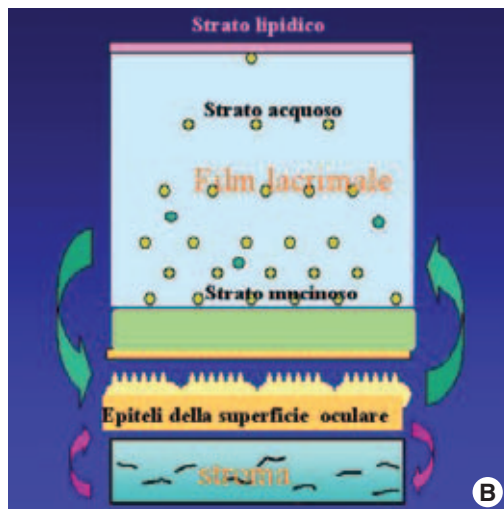
TABELLA I

CAUSE COMUNI DI DANNO CHIMICO

CLASSE	COMPOSTO	SORGENTE / USO	COMMENTI
Alcali	Ammoniaca (NH ₃)	- Fertilizzanti - Refrigeranti - Agenti detergenti (soluzioni al 7%)	- Si combina con l'acqua per formare vapori di NH ₄ OH - Ha una penetrazione particolarmente rapida
	Soda [Na(OH)]	- Detergenti per gli scarichi	- Penetra rapidamente come l'ammoniaca
	Idrossido di potassio [K(OH)]	- Potassa caustica	- Similare alla soda
	Idrossido di magnesio [Mg(OH) ₂]	- Fuochi d'artificio	- Produce un danno termico e caustico
	Calce [Ca(OH) ₂]	- Calcina - Malta - Cemento - Vernice	- Una delle cause più frequenti di danno chimico sul posto di lavoro - Scarsa penetrazione - Aumentata tossicità da particelle di materiale particolato
Acidi	Acido solforico (H ₂ SO ₄)	- Detergenti industriali - Acido della batteria	- Si combina con l'acqua per produrre danno termico corneale - Può essere associato con un corpo estraneo od una lacerazione dovuta allo scoppio della batteria
	Acido solforoso (H ₂ SO ₃)	- Formato dallo ione solforoso in combinazione con l'acqua corneale - Conservanti della frutta e dei vegetali - Candeggina - Refrigeranti	- Penetra più facilmente degli altri acidi
	Acido fluoridrico (HF)	- Detergenti del vetro - Smerigliatura del vetro - Raffinazione dei minerali - Alchilazione del petrolio	- Penetra facilmente - Produce gravi danni
	Acido acetico (CH ₃ COOH)	- Aceto di vino (4-10%) - Essenza di aceto di vino 80% - Acido acetico ghiacciato 90%	- Danno lieve con meno del 10% di contaminazione - Danno grave con concentrazioni maggiori
	Acido cromico (Cr ₂ O ₃)	- Usato nelle industrie di cromatura	- Un'esposizione cronica produce congiuntiviti croniche con una colorazione marrone della zona esposta
	Acido cloridrico (HCl)	- Usato come soluzione al 31-38%	- Danni gravi solamente con concentrazioni elevate e tempi prolungati di esposizione



A



B

Fig. 1

A: la superficie oculare è composta dagli epiteli della congiuntiva, del limbus e della cornea. B: gli epiteli della superficie oculare costituiscono con il film lacrimale e con lo stroma corneale un'unità funzionale.

Essa fisiopatologicamente va considerata come un'unità funzionale (Fig. 1).

La congiuntiva è una membrana mucosa composta da un epitelio cilindrico pluristratificato.

Essa ricopre completamente il sacco congiuntivale, distinguendosi in porzione marginale (fino a 2 mm dal bordo palpebrale), in porzione tarsale, in quella dei fornici ed in porzione bulbare. L'epitelio congiuntivale nella regione bulbare presenta dai 6 ai 9 strati cellulari e diviene più sottile man mano che si passa alla regione marginale (3 strati cellulari). Le cellule basali epiteliali si attaccano ad una membrana basale discontinua mediante degli emidesmosomi. Aspetto peculiare dell'epitelio congiuntivale è la presenza delle cellule globose o mucipare. Esse rappresentano circa il 7% della popolazione delle cellule basali epiteliali. Topograficamente, le cellule mucipare si presentano localizzate in numero maggiore nelle zone di minor traumatismo

congiuntivale, cioè a livello della plica semilunare e della caruncola, mentre a livello della regione marginale la loro densità è minore. Negli strati epiteliali soprabasali sono presenti linfociti, melanociti, cellule di Langerhans.

Lo stroma congiuntivale è costituito da tessuto connettivale lasso, in cui sono evidenti vasi linfatici ed ematici, un numero variabile di linfociti, mastociti, plasmacellule e neutrofil.

Il limbus rappresenta una barriera cellulare caratterizzata da un epitelio di 10-12 strati, contenente melanociti, cellule di Langerhans ed una rete di vasi ematici. A differenza dell'epitelio congiuntivale, il limbus è privo di cellule globose. Lo stroma limbare è organizzato in digitazioni fibrovascolari, chiamate «palizzate di Vogt». Esse si alternano a digitazioni epiteliali, in cui la densità delle cellule basali epiteliali è massima. Le palizzate di Vogt sono più evidenti nei settori superiori e inferiore

corneali. La microscopia elettronica ha rilevato in queste regioni una popolazione cellulare eterogenea con cellule in diversi stadi di differenziazione. Le cellule meno differenziate sono piccole e rotonde con scarso citoplasma e ricordano morfologicamente le cellule staminali degli altri tessuti autorigeneranti. La regione limbare rappresenta la sede delle cellule staminali dell'epitelio corneale.

La cornea è formata da un epitelio squamoso non cheratinizzato di circa 50 µm di spessore, organizzato in 5-7 strati cellulari regolari.

La superficie corneale rappresenta certamente la più specializzata superficie dell'intero corpo umano. Lo strato basale è costituito da cellule colonnari tenacemente adese alla membrana basale, mediante emidesmosomi. La membrana basale ha uno spessore di circa 50 µm. È composta da collagene di tipo IV, laminina, eparina, fibronectina e fibrina. Il collagene costituisce approssimativamente l'80% dei costituenti organici dello stroma corneale. Il collagene fibrillare (in prevalenza di tipo I) è responsabile della resistenza tensile della cornea, mentre il collagene fibrillare I, III, IV assicura una uniforme distribuzione della resistenza tensile, radialmente in tutte le direzioni, contribuendo alla trasparenza corneale.

Il film lacrimale è composto dai secreti delle ghiandole lacrimali principali e accessorie, delle ghiandole palpebrali, delle cellule mucipare o globose della congiuntiva e dagli epitelii non ghiandolari della cornea e della congiuntiva. Il film lacrimale consta di tre strati: uno strato lipidico esterno, uno strato intermedio acquoso ed uno strato interno mucoso.

La componente lipidica è prodotta dalle ghiandole di Meibomio e, in misura mino-

re, dalle ghiandole di Zeis e di Moll. Le ghiandole di Meibomio sono ghiandole tarsali, i cui dotti terminano al margine palpebrale. La loro porzione distale è circondata da fasci muscolari derivanti dal muscolo orbicolare delle palpebre (muscolo di Riolano). Il loro numero è di circa 25 nella palpebra superiore e di circa 20 in quella inferiore. Le ghiandole di Moll sono considerate come ghiandole sudoripare specializzate ed i loro dotti sbucano nei follicoli delle ciglia. Le ghiandole di Zeis si trovano nella porzione distale della palpebra, nei pressi del margine palpebrale.

La componente acquosa è prodotta dalla ghiandola lacrimale ed in parte minore dalle ghiandole lacrimali accessorie di Krause, di Wolfring e di Ciaccio. La ghiandola lacrimale è una ghiandola tubuloalveolare composta. Le ghiandole lacrimali accessorie si trovano nella congiuntiva. Le ghiandole di Krause sono situate in profondità nel tessuto connettivo. Le ghiandole di Wolfring e di Ciaccio sono in gran parte site nel bordo superiore o nello spessore del tarso.

La componente mucosa è prodotta dalle cellule mucipare della congiuntiva. Gli epitelii della superficie oculare, inoltre, sono in grado di contribuire alla formazione del film lacrimale mediante il trasporto di acqua ed elettroliti.

La superficie oculare, così composta, è quella parte dell'organismo umano esposta all'ambiente esterno asciutto, capace di prevenire l'evaporazione delle lacrime, responsabile dell'essiccamento oculare, ed è una difesa contro gli agenti patogeni. Inoltre, essa contribuisce alla visione rendendo levigata e chiara la superficie rifrattiva. La superficie oculare e gli annessi esterni (palpebre e ghiandola lacrimale) costituiscono un meccanismo protettivo che ga-

rantisce l'umidità corneale mediante il mantenimento di un film lacrimale stabile in condizioni di apertura degli occhi.

Il film lacrimale assolve a 6 compiti fondamentali: protegge la cornea e la congiuntiva dall'essiccazione; funge da superficie rifrattiva anteriore contribuendo al potere rifrattivo oculare; rappresenta una difesa contro agenti patogeni contenendo sostanze immunologicamente attive quali le immunoglobuline e sostanze con potere antibatterico come il lisozima, le lattoferrine e le β -lisine; fornisce l'ossigenazione alla cornea e sostiene la disidratazione della cornea per mezzo della sua iperosmolarità, rendendola trasparente; si comporta come una matrice extracellulare per il trasporto di informazioni biochimiche alle cellule epiteliali.

L'intero film lacrimale è di circa 8 μm di spessore. Wolf ha descritto questa struttura come composta di tre strati: uno strato lipidico esterno (0,1 μm di spessore), prodotto principalmente dalle ghiandole di Meibomio, uno strato intermedio acquoso (7 μm di spessore), fornito dalla ghiandola lacrimale e dalle ghiandole lacrimali accessorie ed uno strato interno mucoso (0,02-0,05 μm di spessore), secreto dalle cellule mucipare della congiuntiva. Studi recenti hanno evidenziato che il film lacrimale non è costituito da tre strati distinti e separati: in realtà la componente mucinosa è presente in tutto lo spessore del film lacrimale e la componente acquosa non è da considerarsi pura. Non è ancora chiaro in che modo le varie componenti interagiscono tra loro.

La componente lipidica contribuisce alla stabilità del *pool* lacrimale ritardando l'evaporazione del film, evitandone la contaminazione con lipidi polari prodotti dalle ghiandole sebacee delle palpebre; abbassandone la tensione superficiale per diffu-

sione dei lipidi durante la fase di apertura palpebrale dopo l'ammiccamento, richiamando in tal modo la componente acquosa delle lacrime, che si ispessiscono. La secrezione dei lipidi avviene in modo olocrino per contrazione delle cellule mioepiteliali che avvolgono i dotti ghiandolari nella fase di ammiccamento palpebrale.

La componente acquosa contiene in forma disciolta sali inorganici, glucosio, urea, proteine come le IgA secretorie, la lattoferrina, il lisozima, le glicoproteine. Il flusso delle lacrime acquose ha origine dall'apertura dei canalicoli ghiandolari nel fornice superiore. La direzione del flusso acquoso è da temporale a mediale; questo flusso direzionato è guidato dalla contrazione del muscolo orbicolare ed il fluido viene attirato immediatamente verso i due puntini lacrimali nella fase di rilassamento successiva all'ammiccamento. L'apertura e la chiusura delle palpebre determinano l'area esposta della superficie oculare ed influiscono sull'evaporazione del fluido. Un completo e frequente ammiccamento è necessario a ridurre l'area di esposizione oculare ed a ridurre il tempo di esposizione. L'ammiccamento palpebrale è responsabile del deflusso delle lacrime e della loro *clearance* dalla superficie oculare. La contrazione dell'orbicolare è innescata da stimoli corneali (variazione di temperatura corneale per iniziale instabilità del film lacrimale) che si servono della prima branca del trigemino per stimolare la componente motoria del nervo facciale. Un altro arco riflesso, che si serve della componente parasimpatica del VII nervo cranico, regola la secrezione della componente acquosa del film lacrimale. La ghiandola lacrimale è stimolata a produrre la componente acquosa mediante il ramo parasimpatico del

VII nervo cranico attivata da stimoli sensitivi raccolti dalla prima branca del trigemino. L'integrità anatomica degli archi riflessi è fondamentale per l'integrità della superficie oculare, per il trofismo ed il *turnover* cellulare e ne rappresenta il principale meccanismo di difesa funzionale (Fig. 2). La componente mucinosa costituisce lo strato più interno del film lacrimale. E' costituita principalmente da glicoproteine associate ad una miscela di elettroliti proteici e di materiale cellulare. Le fonti dello strato di mucine sono le cellule caliciformi della congiuntiva, le ghiandole lacrimali e le cellule epiteliali della cornea e della congiuntiva. Holly e Lemp hanno suggerito che lo strato mucinoso formi un rivestimento temporaneo assorbente sullo strato lipidico idrofobo della cornea fornendo una nuova superficie, umidificata dallo

strato acquoso superiore.

La congiuntiva con la sua superficie levigata permette alle palpebre di muoversi in modo non traumatico sul bulbo oculare ed in particolar modo sulla cornea, facilitando la loro azione di protezione bulbare, la loro azione di distribuzione del film lacrimale, la loro capacità di eliminare corpi estranei. Le pieghe congiuntivali flessibili sono essenziali per il movimento del globo oculare e per il mantenimento dei normali rapporti tra palpebre e bulbo.

CELLULE STAMINALI CORNEALI LIMBARI

Gli epitelii della superficie oculare sono sempre in rinnovamento. Sono tessuti autorigeneranti, caratterizzati dalla presenza di cellule staminali, localizzate nel fornice congiuntivale e probabilmente su tutta la superficie congiuntivale (epitelio congiuntivale) e nel limbus (epitelio corneale).

Le cellule epiteliali della cornea sono soggette ad un rapido e continuo *turnover*; le cellule differenziate hanno un breve ciclo vitale e sono sostituite da altre cellule che originano dalla proliferazione di una subpopolazione cellulare ben distinta, le cellule staminali. La cellula staminale viene definita come quella cellula indifferenziata capace di proliferare, di automantenersi, di produrre un gran numero di cellule figlie differenziate e funzionali, di rigenerare un tessuto dopo un'ingiuria e di essere flessibile nell'uso delle sue funzioni.

Le cellule staminali sono responsabili del rifornimento cellulare e della rigenerazione tessutale. La cellula staminale limbare è unipotente, cioè capace di dare origine solo ad epitelio corneale. Una cellula stami-

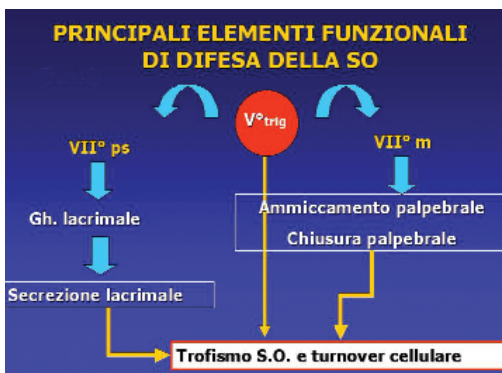


Fig. 2

Lo stato degli epitelii della superficie oculare ed il film lacrimale sono integrati da due archi riflessi. Lo stimolo sensitivo corneale è raccolto dalla I branca del trigemino che, attraverso la stimolazione del VII nervo cranico, determina la secrezione della ghiandola lacrimale con la sua componente parasimpatica e la contrazione dell'orbicolare mediante la sua componente motoria. L'integrità anatomica degli archi riflessi è fondamentale per l'integrità della superficie oculare, per il trofismo ed il turnover cellulare e ne rappresenta il principale meccanismo di difesa funzionale.

nale è scarsamente differenziata. Il citoplasma contiene pochi prodotti differenziati. Esse hanno una grande capacità di autorinnovarsi con un potenziale elevato di proliferazione e di divisione cellulare senza errore. La proliferazione senza errore è essenziale perché un errore genetico a questo livello sarebbe continuamente e permanentemente passato al clone di cellule che originano dalla cellula staminale con il risultato di una differenziazione abnormale e di una disfunzione cellulare. Le cellule staminali hanno un ciclo vitale lungo che potrebbe essere pari a quello dell'organismo in cui sono locate. Esse hanno un lento ciclo di divisione che indica una bassa attività mitotica. In condizioni normali, esse mostrano bassa percentuale di proliferazione. L'epitelio corneale esiste in uno stato di dinamico equilibrio, in cui le cellule superficiali differenziate e programmate per morire (apoptosi) sono costantemente desquamate nel film lacrimale. L'epitelio corneale può essere diviso in tre compartimenti:

limbus, cornea periferica e cornea centrale. Al fine di mantenere indenne la superficie oculare, i cheratinociti basali limbari proliferano, migrano, si stratificano e si differenziano (Fig. 3).

Il normale processo di proliferazione cellulare epiteliale è così schematizzato: la cellula staminale posta nel limbus si divide dando origine ad una cellula figlia che è alla condizione di staminale come la sua progenitrice e serve a rifornire il *pool* di cellule staminali, mentre l'altra cellula figlia è destinata a dividersi ed a differenziarsi. Questa cellula è chiamata cellula amplificante di transizione ed è meno primitiva della sua genitrice. Queste cellule sono poste nella cornea periferica e centrale. L'epitelio limbare contiene sia le cellule staminali che le cellule amplificanti di transizione. Esiste una gerarchia di cellule amplificanti di transizione, per cui le cellule più giovani hanno multipla capacità di divisione e sono preferenzialmente localizzate nella cornea periferica, mentre le cellule più mature (cellule postmitotiche) hanno una piccola riserva proliferativa e risiedono nella cornea centrale e si possono dividere solo una volta prima di diventare cellule definitivamente differenziate. In condizioni fisiologiche, non tutte le cellule amplificanti di transizione utilizzerebbero la loro piena capacità riproduttiva per diventare cellule definitivamente differenziate. In seguito ad uno stimolo, il tessuto epiteliale adotta tre strategie per espandere la sua popolazione cellulare. Più cellule staminali sono reclutate per dividersi con un più rapido ciclo cellulare. In tal modo sono prodotte più cellule amplificanti di transizione. Le giovani cellule amplificanti di transizione in periferia corneale esprimono il loro pieno potenziale di replicazione ac-

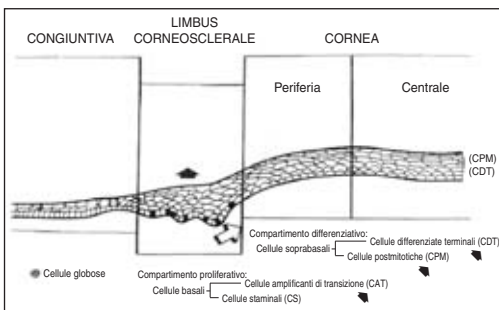


Fig. 3

Le cellule degli epiteli della superficie oculare sono in costante turnover. Le cellule staminali corneali (CS) sono site negli strati basali del limbus da cui proliferano, migrano, si differenziano in cellule amplificanti di transizione (CAT), in cellule postmitotiche (CPM) ed infine desquamano nel film lacrimale (ipotesi X, Y, Z di Thoft) come cellule differenziate terminali (CDT).

Da: Sarnicola V. La patologia della superficie oculare. Ed. I.N.C., 2000.

corciando il loro ciclo cellulare e generando più cellule mature postmitotiche. Questo modello rappresenta un caso ideale dove tutte le cellule amplificanti di transizione esprimono pienamente il loro potenziale replicativo e dove da una cellula staminale si producono 16 cellule epiteliali differenziate (Fig. 4).

Il ciclo vitale delle cellule amplificanti di transizione varia da 18 a 60 ore e dipende dalla richiesta tessutale di cellule. In condizioni fisiologiche le cellule amplificanti di transizione hanno un ciclo vitale di circa

60 ore. Questo può diventare più breve, fino a 18 ore, in condizioni di stimolo. Inoltre, le cellule amplificanti di transizione hanno la capacità di modulare il loro numero di replicazione a seconda delle esigenze tessutali. L'aumento della capacità proliferativa delle cellule amplificanti di transizione offre i seguenti vantaggi: amplificazione della divisione di ciascuna delle cellule staminali e riduzione della necessità di proliferazione delle cellule staminali; riduzione della possibilità di introduzione di un errore genetico verificatosi a livello delle cellule staminali; l'approvvigionamento di nuove cellule che sono in uno stato di differenziazione più vicino alle cellule differenziate definitivamente che formano il compartimento funzionale epiteliale come le cellule che ricoprono la cornea centrale.

La superficie oculare è in un costante stato di rifornimento cellulare. Le cellule squamose della cornea sono continuamente desquamate nel *pool* lacrimale e contemporaneamente sostituite da cellule che si muovono centripetamente dal limbus ed anteriormente dagli strati basali dell'epitelio. Thoft ha schematizzato questo processo nella teoria X,Y, Z, in cui X rappresenta la proliferazione dello strato basale, Y la proliferazione e migrazione centripeta delle cellule limbari e Z la perdita delle cellule epiteliali dalla superficie oculare.

RIPARAZIONE CORNEALE

I difetti epiteliali centrali che riparano dall'epitelio adiacente si chiudono ad una velocità di 0,69-1,46 mm²/ora. Le lesioni corneali che interessano una larga area della cornea riparano molto più velocemente di

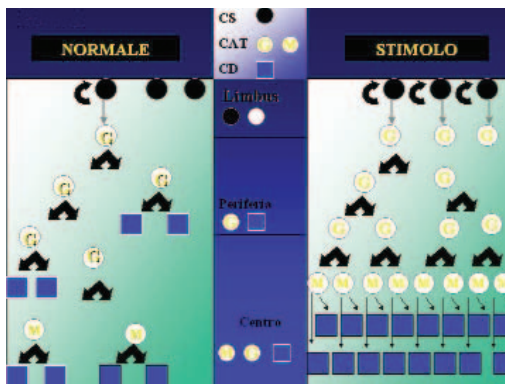


Fig. 4

Rappresentazione diagrammatica della proliferazione e differenziazione cellulare in condizione normale o dopo uno stimolo. Normalmente, la cellula staminale negli strati basali del limbus si duplica formando una nuova cellula staminale che arricchisce il pool di cellule staminali e genera una cellula amplificante di transizione giovane, a sua volta capace di generare altre cellule amplificanti di transizione giovani che possono dare vita ad altre cellule amplificanti mature o cellule terminali differenziate, modulando il loro potenziale e la loro velocità proliferativa. In caso di stimolo, più cellule staminali vengono reclutate e genereranno più cellule staminali e cellule amplificanti di transizione giovani. Queste ultime daranno vita ad altre cellule amplificanti di transizione che più rapidamente si divideranno sfruttando tutto il loro potenziale replicativo fino a creare cellule più mature e differenziate in grado di dare cellule terminali differenziate.

quelle centrali più piccole, forse per un'attività mitotica più alta, sebbene il tempo assoluto di riparazione sia più lungo.

Se oltre al danno epiteliale corneale c'è una completa perdita delle cellule staminali limbari, la congiuntiva è l'unica sorgente di riparazione epiteliale e la velocità di riparazione completa può essere notevolmente diminuita.

La percentuale di migrazione dopo una lesione può essere rallentata dalla persistenza dell'infiammazione, dalla presenza di un danno alla membrana basale, dalla degradazione della fibronectina della membrana basale e da parte dell'attivatore del plasminogeno.

La migrazione epiteliale può essere aumentata da un'opportuna lubrificazione oculare, dalla riduzione dell'infiammazione, dall'EGF (che promuove la mitosi epiteliale), dalla fibronectina (che facilita l'adesione). I cortisonici non hanno effetto sulla migrazione epiteliale.

L'epitelio corneale integro inibisce la collagenasi cheratocitica di tipo I impedendo l'inappropriata distruzione del collagene quando l'epitelio è integro. Il TGF- β , l'IL-1 sono chiamati in causa per la regolazione dei meccanismi omeostatici della riparazione epiteliale.

A dispetto della sorgente dell'epitelio rigenerante, un epitelio intatto può effettivamente prevenire lo sviluppo di una ulcerazione corneale sterile o non sterile. L'ulcerazione sterile non è stata mai osservata in presenza di un epitelio intatto. Per di più la progressione di un'ulcerazione sterile è prontamente interrotta quando è completata la riepitelizzazione. Studi su colture cellulari hanno indicato che il TGF- β_2 è il maggior inibitore della sintesi di collagenasi da parte dei cheratociti stromali ed in caso di

danno epiteliale la sua funzione inibitoria verso le collagenasi può essere persa.

Il processo di cicatrizzazione può essere schematizzato in tre fasi:

- La migrazione cellulare.
- La proliferazione cellulare.
- L'adesione cellulare.

Il contributo al processo di cicatrizzazione di ogni singolo componente è in relazione alla grandezza ed alla profondità della ferita ed alla natura della causa.

Nell'intervallo di tempo compreso tra 4-6 ore dopo un difetto epiteliale non si apprezza nessuna diminuzione delle dimensioni della ferita corneale. La ferita successivamente diventa più larga per perdita delle cellule necrotiche e per la retrazione e la definizione dei margini della ferita. La sintesi intracellulare delle proteine strutturali è aumentata ed i filamenti di actina sono polimerizzati e riorganizzati dalla regione apicale a quella basale delle cellule. Le cellule dello strato basale e squamoso in prossimità della ferita presentano ispessimento e separazione. Dopo 3 ore dalla ferita sono visibili i polimorfonucleati, principalmente provenienti dal film lacrimale. I margini della ferita divengono sottili per la desquamazione cellulare e per la perdita dell'architettura colonnare delle cellule basali. I margini sono ridotti a 2-3 strati cellulari fino ad 1 in prossimità del bordo. Queste cellule epiteliali appiattite mostrano alterazioni nella forma: in prossimità dei loro margini liberi la membrana plasmatica presenta pieghe ed increspature in modo da formare digitazione strette (filopodia) e processi larghi come un corallo (lamellipodia), che si estendono sulla faccia della ferita. I cambiamenti avvengono anche nei costituenti non cellulari dell'epitelio. Concentrazioni di fibronectina, fibri-

nogeno, fibrina aumentano in 1-8 ore.

Le cellule epiteliali si appiattiscono, migrano e si muovono verso il difetto fino a ricoprirlo del tutto. Questo processo richiede enorme consumo di energia. La formazione di lamellopodii e di filopodi indica l'inizio della migrazione cellulare.

Il processo di proliferazione è complementare a quello di migrazione cellulare durante la riepitelizzazione. In seguito ad una ferita, si assiste ad una pausa del normale processo di esfoliazione cellulare e le cellule vicine alla ferita non si dividono per almeno un giorno mentre quelle più periferiche e distanti aumentano la loro percentuale di divisione cellulare. Questo processo inizia in periferia ed interessa tutte le cellule continuando fino a quando la ferita è cicatrizzata ed il normale spessore dell'epitelio è riformato. Il processo di cicatrizzazione non è completo fin quando l'epitelio rigenerato non è ancorato saldamente allo stroma. L'ancoraggio permanente avviene solo quando il difetto epiteliale è completamente guarito, mentre unità transitorie di ancoraggio si formano regolarmente durante il processo di riparazione cellulare. Le cellule che migrano sviluppano contatti focali con le macromolecole del substrato (placche adesive).

Le ferite corneali epiteliali stimolano una risposta proliferativa della congiuntiva perilimbare, ma in condizioni normali il limbus si comporta come una barriera capace di prevenire la congiuntivalizzazione corneale. Quando è alterato il limbus, quest'azione viene a mancare e la congiuntiva colonizza la cornea. Questo fenomeno è caratterizzato dalla comparsa di cellule globose e di neovasi sulla cornea. Dua e Forrester hanno studiato la guarigione di ferite corneali che coinvolgono la congiuntiva, il

limbus e l'epitelio corneale. Essi hanno notato due fronti epiteliali a forma di lingua, che prendono origine dal termine della ferita limbare e coprono il limbus in modo circumferenziale fino ad unirsi. In alcuni pazienti hanno notato una migrazione centripeta di un panno di epitelio congiuntivale, che supera e migra oltre il limbus, precedendo la migrazione circumferenziale dei fronti epiteliali limbari in modo tale che essi non si uniscano. Alcune aree corneali sono così coperte dall'epitelio congiuntivale, che risulta più sottile, neovascolarizzato, evidenziabile con la fluoresceina e soggetto ad erosioni epiteliali ricorrenti (Fig. 5). È interessante che sottili digitazioni dell'epitelio corneale sano pro-

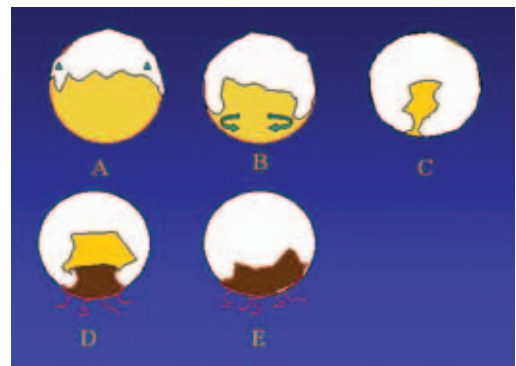


Fig. 5

Rappresentazione diagrammatica secondo Dua del processo di riepitelizzazione della superficie corneale quando è interessato il limbus: A: formazione di due lingue epiteliali (in bianco) che originano dall'epitelio sano adiacente ad entrambi i margini del difetto limbare (in giallo). B: migrazione circumferenziale lungo il limbus delle due lingue epiteliali. C: la riepitelizzazione del limbus avviene sempre prima della riepitelizzazione centrale. D: l'epitelio congiuntivale (in nero) può estendersi al di sopra del limbus ed inibire la migrazione delle cellule epiteliali corneali (E). L'area ricoperta dall'epitelio congiuntivale è demarcata dal normale epitelio corneale adiacente, è sottile, irregolare e presenta neovasi.

trudono in quello congiuntivale lungo le linee di contatto dei due epiteli. Essi danno l'impressione che il normale epitelio corneale voglia sostituire l'epitelio congiuntivale spingendolo oltre il limbus. Per tale motivo, gli Autori sopra menzionati, hanno suggerito di effettuare uno *scraping* dell'epitelio congiuntivale da ripetere anche più di una volta in quei casi in cui è necessario, cioè quando è coinvolto il centro ottico o quando è presente sintomatologia. Altrimenti, i due epiteli possono coesistere pacificamente. Si è visto che dopo lo *scraping* dell'epitelio congiuntivale, l'epitelio corneale tende a proliferare più rapidamente rispetto a quello congiuntivale, in modo da ristabilire la funzione di barriera del limbus.

La rigenerazione ed il mantenimento dell'epitelio corneale in seguito ad una parziale o totale rimozione delle cellule staminali corneali situate nel limbus è stata studiata da Tseng et al. in una serie di esperimenti. In presenza delle cellule staminali corneali contenute nell'epitelio limbare intatto, l'epitelio corneale rigenera nonostante ripetute piccole ferite.

Quando vengono a mancare le cellule staminali corneali, asportando due terzi dell'epitelio limbare, le rimanenti cellule staminali e amplificanti di transizione sono in grado di mantenere l'epitelio corneale in condizioni fisiologiche. Parliamo di insufficienza limbare parziale. Dopo rimozione dell'epitelio corneale centrale negli occhi con un'insufficienza limbare parziale, è stata osservata una pronta guarigione nel 75% degli occhi anche dopo due ferite consecutive. Questo indica una funzione non solo di mantenimento, ma anche rigenerativa delle cellule amplificanti transitorie nella maggior parte dei casi. D'altra parte il 25% de-

gli occhi con due terzi dell'epitelio limbare mancante ha sviluppato vascolarizzazione e guarigione ritardata, il che significa che sono questi gli occhi a rischio di problemi di riepitelizzazione in seguito ad un'ulteriore perdita delle cellule amplificanti transitorie centrali. Quando è stata asportata la maggior parte delle cellule amplificanti transitorie, producendo ampi difetti epiteliali negli occhi con un'insufficienza limbare parziale, tutti gli occhi studiati hanno sviluppato ritardi nella cicatrizzazione, vascolarizzazione ed espressione del fenotipo congiuntivale. Questi risultati indicano che le residue cellule staminali non sono in grado di generare le cellule amplificanti transitorie sufficienti per la ricostruzione della superficie corneale e suggeriscono la perdita di una barriera contro l'invasione dell'epitelio congiuntivale sulla superficie corneale. Sono risultati che confermano inoltre l'importanza delle cellule amplificanti transitorie per il mantenimento dell'epitelio corneale. Specialmente le cellule amplificanti transitorie precoci, quelle che esprimono le caratteristiche delle cellule staminali e che si trovano sia nell'epitelio limbare che corneale, mantengono e rigenerano l'epitelio corneale anche in assenza delle grandi porzioni del tessuto limbare.

Dopo la rimozione chirurgica totale delle cellule staminali limbari, che porta all'insufficienza limbare totale, le rimanenti cellule amplificanti transitorie mantenevano l'epitelio corneale in condizioni fisiologiche in 2/3 degli animali, mentre il resto sviluppava una lieve vascolarizzazione. Dopo due disepitelizzazioni centroperiferiche corneali il 75% delle cornee mostrava vascolarizzazione e invasione dell'epitelio congiuntivale. Questo evidenzia ulteriormente l'importanza delle cellule staminali limbari,

ma indica anche la possibilità della ricostruzione dell'epitelio corneale in assenza completa delle cellule staminali essendo presente un numero sufficiente di cellule amplificanti transitorie. Quando le cellule amplificanti transitorie vengono perse simultaneamente alla rimozione chirurgica delle cellule staminali corneali il 96% degli occhi mostra vascolarizzazione corneale ed espressione del fenotipo congiuntivale sull'epitelio che ricopre la superficie corneale; ciò conferma che l'assenza di entrambi i tipi cellulari, cioè delle cellule staminali e delle cellule amplificanti di transizione, non permette di ristabilire una superficie epiteliale sana a causa della completa perdita della riserva proliferativa. In assenza della barriera proliferativa limbare, l'epitelio congiuntivale cresce sopra la cornea esprimendo il proprio fenotipo in presenza di una veloce neovascolarizzazione.

Riassumendo i risultati di questa sperimentazione sull'animale, è evidente l'importanza delle cellule staminali e delle cellule amplificanti transitorie per il mantenimento e la rigenerazione dell'epitelio corneale. Se presenti entrambe, le popolazioni cellulari limbari possono facilmente mantenere e rigenerare i difetti corneali centrali, mentre in caso di parziali o totali perdite delle cellule staminali del limbus è possibile la compensazione solo se vi sono ancora presenti nel tessuto limbare cellule amplificanti transitorie precoci in quantità sufficienti. Tradotto in numeri, sembra che la perdita fino al 50% dell'epitelio limbare non è seguita dall'accrescimento congiuntivale e dalla vascolarizzazione in presenza delle cellule amplificanti transitorie rimanenti.

Vi sono conferme di questi risultati sperimentali anche nei pazienti umani nei quali la cicatrizzazione dell'epitelio corneale di-

pende analogamente dall'integrità del limbus. Studi clinici vedono una rapida guarigione senza complicazioni nei pazienti nei quali le causticazioni chimiche si sono limitate a danneggiare la cornea centrale e periferica. Se il danno corneale si estende al limbus sclerocorneale, i piccoli difetti nella circonferenza limbare vengono riparati per slittamento dell'epitelio limbare adiacente. Se vengono distrutte porzioni più ampie della circonferenza limbare (180 μm o più) la mancanza delle cellule staminali e delle cellule amplificanti transitorie porta all'accrescimento congiuntivale e alla neovascolarizzazione settoriale. Studi sull'animale suggeriscono l'esistenza di questo tipo di difetto della barriera limbare anche nei casi di completa deplezione dell'epitelio corneale e quando viene rimosso l'epitelio limbare soprabasale.

Non è ancora conosciuto cosa mantiene lo stato staminale di una cellula. In aggiunta alle caratteristiche delle cellule staminali, fattori estrinseci del microambiente limbare giocano un ruolo fondamentale. Gli studi sulle colture cellulari possono essere usati di supporto e di argomento contro l'ipotesi che le cellule staminali sono sostenute solamente dalle loro proprietà intrinseche poiché in coltura la cellula staminale si fa vecchia perdendo le sue caratteristiche. Le colture di cellule staminali possono essere trapiantate, risultando in un tessuto che apparentemente sembra normale, suggerendo che le cellule staminali sono presenti in coltura. Ciò, però, potrebbe significare la persistenza di cellule amplificanti di transizione piuttosto che di cellule staminali e *follow-up* a lungo termine sono necessari per determinare la durata della normale apparenza del tessuto trapiantato. Schofield suggerisce che le cellule staminali vivono in un ottimo

microambiente che promuove il loro stato di cellule indifferenziate. Una differenza importante tra la regione limbare e la cornea centrale è la presenza di vasi sanguigni al limbus. Questi vasi derivano dalle palizzate di Vogt e supportano il limbus epiteliale con nutrienti e maggiormente con l'apporto di citochine. Un maggior numero di proteine sono state identificate negli strati basali limbari piuttosto che in quelli della cornea centrale (citocromo ossidasi, Na^+ - K^+ ATPasi e l'anidrasi carbonica). Non è però conosciuto se queste proteine sono coinvolte nel mantenimento e nella regolazione delle cellule staminali. Vari fattori di regolazione come l'acido retinoico hanno una diversa concentrazione e distribuzione regionale nella cornea. Le cellule indifferenziate del limbus contengono i più elevati livelli di EGFR (*epithelial growth factor receptor*). Le cellule esprimono più bassi livelli di EGFR con la maturazione. Zieske e Wasson hanno suggerito che gli alti livelli di EGFR inibiranno la differenziazione segnalando alle cellule di mantenere il loro potenziale stato proliferativo. E' stata anche dimostrata un'aumentata concentrazione di alfa enolasi a livello del limbus. In aggiunta, sono state identificate al limbus la vimentina e la cheratina 19 coinvolte nel mantenimento dell'architettura cellulare. Non è conosciuto se queste proteine sono coinvolte nell'ancoraggio delle cellule staminali al loro microambiente. Le comunicazioni intercellulari tramite le *gap junctions* sono correlate alla regolazione della crescita, dello sviluppo e della differenziazione cellulare. Due proteine del tipo *gap junction* sono state identificate nell'epitelio corneale. Le cellule staminali limbari sono sprovviste di queste connessioni. Questa caratteristica indica la necessità di queste cellule di mantenere una

loro distinta ed indipendente struttura intracellulare. La membrana basale del limbus è differente da quella della cornea centrale. Essa è modificata al fine di accrescere l'adesione cellulare. E' composta da abbondante tessuto collagene di tipo IV, che è assente nella cornea centrale e possiede fibrille di ancoraggio ed una superficie rugosa e ondulata tale da aumentare l'adesione cellulare. Invece, a livello della cornea centrale, è stata identificata nella membrana basale una proteina marcata con l'anticorpo AE27 ed associata con cellule che esprimono cheratina 3. Per tale motivo si è ipotizzato che la membrana basale può anche influenzare la differenziazione delle cellule staminali in aree che contengono alti livelli di collagene di tipo IV e bassi livelli di antigeni marcati dall'anticorpo AE27.

Il mantenimento e la rigenerazione dello stroma corneale è funzione primaria dei cheratociti.

I cheratociti sono cellule pluripotenti di origine neuroectodermica, sono stabili e inattivi metabolicamente senza un'apprezzabile sintesi di collagene o di collagenasi. Dopo la riparazione che segue ad una lesione dello stroma, esse sono capaci di tutta una varietà di funzionalità fibroblastiche che includono la fagocitosi del collagene, la secrezione delle fibrille collagene, la secrezione di glicosamminoglicani, e la secrezione di inibitori della collagenasi.

L'azione dei cheratociti è influenzata dalle citochine epiteliali, dalle cellule infiammatorie e da altri cheratociti.

Dopo una lesione corneale, i cheratociti sono mobilitati dalle regioni adiacenti per ripopolare l'area della lesione, la migrazione inizia dal lato endoteliale. Nelle lesioni lievi come le lacerazioni corneali il collagene di tipo I può essere ritrovato al bordo dell'area

lesionata circa un giorno dopo la lesione. Nelle lesioni moderatamente severe la completa riparazione può essere ritardata fino a circa 7-14 giorni. Nelle lesioni gravi con una completa distruzione dei cheratociti la ripopolazione può essere assente, sebbene qualche Autore suggerisce la trasformazione monocitica in cellule funzionalmente simili ai fibroblasti. Dopo una lesione da sostanze chimiche la sintesi del collagene di tipo I è massima tra 7 e 56 giorni con un picco al 21° giorno. Per controbilanciare la degradazione delle fibrille collagene da parte dei processi collagenolitici è essenziale una sintesi del collagene per una riparazione efficace e per la prevenzione dell'ulcerazione corneale e della perforazione.

La produzione di collagene da parte dei cheratociti può essere notevolmente influenzata dai livelli di ascorbato presenti nell'acqueo. L'ascorbato è un cofattore dell'idrossilazione di prolina e lisina, determinanti nella sintesi ribosomiale del collagene.

La deficienza sistemica di ascorbato si traduce in un'instabilità della struttura a tripla elica del collagene fibrillare extracellulare. La deficienza dei livelli di ascorbato in camera anteriore si traduce in anomalie morfologiche dei fibroblasti sintetizzanti il collagene con ulcerazione e perforazione corneale.

La collagenasi è l'enzima responsabile del clivaggio della molecola del collagene. E' ora associato che una famiglia di enzimi correlata alle collagenasi, le Metalloproteinasi (MMP), è responsabile del clivaggio iniziale delle molecole del collagene.

Sono state ben caratterizzate tre MMP corneali: la collagenasi di tipo I (MMP-1), la Stromalisina (MMP-3), le Gelatinasi.

Questi tre enzimi hanno caratteristiche comuni: sequenze aminoacidiche omologhe,

un'ottima attività a pH neutro, lo Zinco come cofattore, la necessità di ioni Ca^{++} per la stabilità, la secrezione di uno zimogeno inattivo o proenzima.

La collagenasi di tipo I (MMP-1) non è rintracciabile in cornee normali. La sua presenza è stata dimostrata nelle cornee in riparazione dopo lesioni meccaniche, nel cheratocono e nelle cornee con ulcere attive. L'importanza dell'attività della MMP-1 in relazione alla riparazione corneale è confermata dalla sua presenza nelle cornee dopo 9 mesi da una lesione meccanica. La collagenasi di tipo I spezza il collagene fibrillare di tipo I, II, III. E' l'unico enzima che può distruggere l'elica nativa del collagene di tipo I a pH neutro dello spazio extracellulare. E' stato dimostrato che la collagenasi corneale di tipo I è prodotta dai cheratociti. I PMN producono un tipo di collagenasi di tipo I (MMP-8).

La Stromalisina (MMP-3) digerisce il collagene di tipo IV, la caseina, i proteoglicani, la fibronectina, la laminina, l'elastina, la gelatina (collagene denaturato), l'inibitore dell' α -1-proteinasi.

Le Gelatinasi si dividono in collagenasi di tipo IV e V. Hanno una marcata specificità per la gelatina, per il collagene di tipo IV, V, VII e per la fibronectina. La collagenasi di tipo IV è conosciuta come MMP-2, è secreta in prevalenza dai cheratociti in una forma di proenzima insieme ad una proteina capace di inibire la sua attività. A differenza della collagenasi di tipo I può essere presente in cornee normali ed è l'unica collagenasi che è espressa nelle colture cellulari primarie di cheratociti. I suoi livelli sono aumentati nel cheratocono. Matsubara ha ipotizzato che questa collagenasi nella cornea normale catalizza la degradazione delle molecole di collagene che oc-

casionalmente si danneggiano. Sia la MMP-2 che la MMP-1 sono implicate nei processi di riparazione e rimodellamento della superficie corneale. La collagenasi di tipo V (MMP-9) è invece prodotta dalle cellule epiteliali e, in minor quantità, dai monociti, dai cheratociti stromali e dai PMN. Agisce sul collagene di tipo IV, VII e sulla gelatina. L'epitelio corneale secreta un inibitore di questa collagenasi. Non è rintracciabile in cornee normali. Questa collagenasi è presumibilmente coinvolta nella riparazione e nel rimodellamento della membrana basale. L'attivazione della MMP-9 e la degradazione della membrana basale è un passo cruciale che di solito precede l'ulcerazione sterile della cornea.

La collagenasi di tipo I è l'unico enzima che può realizzare il clivaggio iniziale della molecola di collagene di tipo I. La produzione, l'attivazione ed l'inattivazione di questo enzima è di fondamentale importanza nei processi di riparazione corneale. L'ulcerazione corneale stromale richiede l'assenza dell'epitelio corneale e la degradazione della membrana basale da parte della MMP-9. La collagenasi di tipo I può essere trovata circa 9 ore dopo la lesione, ma anche in concentrazioni sufficienti fino a 14-21 giorni dopo, in corrispondenza della massima produzione e riparazione del collagene. L'attivazione della collagenasi di tipo I è inibita da citochine epiteliali.

In condizioni sperimentali i cheratociti possono essere stimolati a secernere la collagenasi di tipo I in risposta a citochine epiteliali, a citochine mononucleari, alla plasmina, suggerendo un possibile meccanismo di regolazione in vivo. La collagenasi di tipo I può essere attivata dall'attivatore tissutale del sistema plasmina-plasminogeno. La collagenasi di tipo I può essere

inattivata dagli inibitori tissutali delle metalloproteinasi, elaborati da tutte le cellule ad eccezione dei PMN.

Un numero di fattori sierici (α 1-macroglobulina, α 2-macroglobulina, β 1-macroglobulina, gli inibitori derivati dalle piastrine) provenienti dalla vascolarizzazione limbare e dalla neovascolarizzazione corneale possono inibire la collagenasi di tipo I.

La componente finale che influenza la riparazione corneale è l'infiammazione. L'infiltrazione di cellule infiammatorie nel tessuto lesionato è una caratteristica della riparazione della lesione. E' ormai assodato che c'è un'associazione tra l'infiltrazione di PMN, l'ulcerazione sterile e il termine della progressione dell'ulcerazione in seguito alla scomparsa delle cellule infiammatorie dalla cornea.

Entro 24 ore dall'insulto chimico si ha l'infiltrazione della cornea periferica da parte dei PMN e dei leucociti mononucleari che provengono dai vasi lesionati della congiuntiva, dell'uvea e dal tessuto necrotico della congiuntiva bulbare e tarsale.

Queste cellule sono attratte chemiotatticamente dai prodotti dell'epitelio e dai prodotti di degradazione dello stroma lesionato. L'adesione allo stroma è facilitata da molecole di adesione (ICAM-1).

I PMN rilasciano gli enzimi digestivi tra i quali la collagenasi di tipo I e l'attivatore del plasminogeno. Se il danno chimico è di grave entità, segue alla prima onda di infiammazione, una seconda ondata di cellule infiammatorie al 7° giorno che raggiunge il picco durante il periodo in cui i fenomeni di riparazione e di degradazione tessutale sono massimi (14-21 gg).

L'infiammazione corneale stromale persiste fino a che è presente il difetto epiteliale e fino a quando rimangono residui necrotici della

congiuntiva, che costituiscono dei focolai di infiltrazione di cellule infiammatorie.

Il ritardo nella riparazione epiteliale dovuta alla persistente infiammazione, i prodotti enzimatici derivanti dalla degranolazione dei PMN e la stimolazione delle collagenasi cheratocitaria da parte delle citochine mononucleari, determinano la digestione enzimatica sterile dello stroma corneale durante la seconda e la terza settimana dopo la lesione chimica.

La straordinaria reazione infiammatoria è il fattore determinante nella comparsa della maggior parte delle complicazioni. Le strategie terapeutiche mirano all'esclusione dei PMN e dei leucociti mononucleati dallo stroma corneale per prevenire od arrestare l'ulcerazione dello stroma.

Una precoce rimozione del tessuto necrotico bulbare e tarsale congiuntivale elimina una sorgente di infiammazione persistente con il rilascio di enzimi proteolitici.

I PMN che infiltrano lo stroma corneale durante la prima fase dell'infiammazione possono essere determinanti per la recrudescenza nella seconda onda.

Il trattamento della prima onda di infiammazione è di fondamentale importanza per evitare lo sviluppo della seconda onda di infiammazione e ridurre l'ulcerazione corneale in situazioni sperimentali. Per tale motivo, è necessario aggredire l'occhio causticato con agenti terapeutici che riducono l'infiammazione, come i cortisonici, come ad es. clobetasone (Visucloben), i cortisonici progestinici, i FANS, le tetracicline ed il citrato.

PATOGENESI

La severità del danno oculare dipende dalla concentrazione dell'anione o del catione,

dal volume, dalla durata del contatto e dalla tossicità intrinseca della sostanza chimica. L'estensione del trauma congiuntivale, la presenza e il grado di causticazione cutanea e la relativa alterazione della funzione delle palpebre possono influenzare notevolmente la prognosi. In generale la penetrazione nelle strutture oculari è alta per gli alcali, a causa della saponificazione delle membrane cellulari ed è scarsa per gli acidi, per la precipitazione delle proteine cellulari che formano una parziale barriera; la capacità di tamponamento oculare è buona per gli acidi ed è scarsa per gli alcali.

Il danno oculare è dovuto alla distruzione delle componenti cellulari, all'idrolisi cellulare alcalina o acida per rilascio dei mediatori infiammatori, alla denaturazione e degradazione del collagene e all'ischemia tessutale.

Il danno da alcali è dovuto allo ione OH^- che saponifica gli acidi grassi che compongono la membrana cellulare determinandone la morte e la distruzione, mentre il catione è responsabile della sua penetrazione. Il catione reagisce con i gruppi carbossilici (COOH) del collagene stromale e con i glicosamminoglicani determinandone l'idratazione.

Gli acidi danneggiano le strutture oculari in quanto liberano ioni H^+ , fenomeno della dissociazione. Un acido è tanto più forte quanto più ha tendenza a dissociare, che è bassa per l'acido carbonico, acetico, ed alta per l'acido solforico, cloridrico e fluoridrico. Le lesioni oculari da acidi sono dovute alle alterazioni del pH provocate dal rilascio degli ioni H^+ ed alla precipitazione e denaturazione delle proteine dell'epitelio corneale e dello stroma superficiale indotte dall'anione. La coagulazione delle proteine dell'epitelio corneale determina il caratteristico

aspetto a vetro smerigliato dell'epitelio e funziona come un ostacolo ad una progressiva penetrazione dell'acido, limitando ulteriori lesioni. Spesso lo stroma è sorprendentemente trasparente dopo asportazione dell'epitelio necrotico.

Se c'è una penetrazione nello stroma si possono verificare le stesse lesioni degli alcali. L'agente chimico acido od alcalino che entra nell'occhio, istantaneamente, determina forte dolore, lacrimazione e blefarospasmo per diretta stimolazione delle terminazioni nervose della cornea, della congiuntiva e della cute.

In base alla profondità di penetrazione ci può essere un danno all'epitelio corneale, limbare e congiuntivale, alla membrana basale, ai cheratociti stromali, alle terminazioni nervose stromali, all'endotelio, all'epitelio della lente, all'endotelio vascolare della congiuntiva, all'episclera, all'iride ed al corpo ciliare.

Il trauma chimico causa **necrosi ed ischemia tessutale** distruggendo le cellule, la matrice extracellulare e i vasi sanguigni.

L'alterazione dei glicosamminoglicani porta alla perdita della trasparenza stromale, mentre l'idratazione delle fibrille collagene determina la coartazione dell'intera struttura connettivale del bulbo, in particolare con distorsione della struttura trabecolare, per l'ispessimento delle fibre ed il loro accorciamento, ed il rilascio di prostaglandine. Tutto ciò determina l'elevazione della pressione intraoculare che si manifesta precocemente dopo l'insulto chimico.

Lo stroma corneale e la congiuntiva perilimbare immediatamente possono apparire di aspetto biancastro. La penetrazione in camera anteriore varia da sostanza a sostanza: per l'ammoniaca può essere immediata, mentre per la soda avviene nei primi 3-5

minuti. La capacità tamponante dell'occhio permette di riportare i livelli di pH alla normalità dai 30 ai 100 minuti. Essa risulta più valida per gli acidi che per gli alcali e dipende dalla quantità di sostanza penetrata.

Dopo alcuni giorni, la necrosi tessutale determina il richiamo di leucociti, in particolare modo dei polimorfonucleati, con liberazione di prostaglandine, leucotrieni, istamina ed il rilascio di alcuni enzimi proteolitici, di collagenasi e di radicali liberi tossici. In seguito al danno tessutale, inoltre, si verifica un deficit di ascorbato con compromissione della produzione del collagene da parte dei cheratociti corneali e quindi della riparazione dello stroma. Tutto ciò può esitare drammaticamente in ulcera e perforazione corneale.

L'ischemia tessutale causa una risposta esudativo-fibrinosa dei tessuti oculari coinvolti.

La congiuntiva ed il tessuto sottocongiuntivale appaiono chemotici e in parte necrotici. La distruzione della congiuntiva in associazione con l'intensa infiammazione causa un'adesione fibrinosa che deve essere aperta periodicamente dopo instillazione di anestetico locale. Quando avviene un danno esteso della congiuntiva, si verifica una proliferazione fibrosa del tessuto sottocongiuntivale che può esitare nella formazione di symblepharon e nei casi più grave di ankyloblepharon.

Il corpo ciliare diventa ischemico con rottura della barriera ematoculare che determina il fenomeno di Tyndall. Se il coinvolgimento ciliare è esteso, si può avere ipotonia fino alla ftisi bulbare. Il danno irideo si manifesta con la tendenza dell'iride ad apparire «grigiastria» e comparsa di *ectropion uveae*. Può residuare midriasi. Il cristallino può diventare rapidamente opaco.

Il danno alla membrana basale corneale ed allo stroma anteriore determina difetti epiteliali ricorrenti. Il danno limbare può coinvolgere il compartimento staminale con un deficit limbare parziale o totale con difetti epiteliali persistenti e congiuntivizzazione della cornea.

La lesione alle fibre nervose corneali può determinare una cheratopatia neurotrofica secondaria, con alterazione della secrezione lacrimale e riduzione dell'ammiccamento palpebrale.

Il danno endoteliale, in caso di lesioni severe, determina edema ed ispessimento corneale. Nei traumi lievi o moderati la penetrazione della sostanza è minima e probabilmente avviene la morte solo di alcuni endotelioцити che non interferisce con il meccanismo di pompa.

Il grado di disfunzione palpebrale dipende solitamente dalla severità del trauma della cute orbitaria e periorbitaria e della congiuntiva. Immediatamente dopo il trauma, per alcuni giorni, l'edema palpebrale rende l'osservazione dell'occhio difficile. La posizione delle palpebre e l'ammiccamento sono di solito alterati anche nelle lesioni moderate.

Il blefarospasmo e la fotofobia, spesso, sono intense soprattutto nelle lesioni più severe e possono durare anche per anni.

Il coinvolgimento congiuntivale con perdita delle cellule globose, la disfunzione delle ghiandole di Meibomio, la cheratopatia neurotrofica e l'alterazione anatomico-funzionale delle palpebre sono alla base di un quadro severo di occhio secco che può esitare dopo il trauma.

CLASSIFICAZIONE

Al fine di correlare il quadro clinico iniziale alla prognosi finale ed instaurare l'opportuna terapia, risulta utile la classificazione di Hughes, modificata in seguito da Ballen e da Roper-Hall che correla la perdita di trasparenza corneale e il grado di ischemia del limbus con la prognosi finale (*Tab. II*):

- *Grado 1*: assenza di opacità corneale e di ischemia limbare; prognosi eccellente.
- *Grado 2*: cornea opaca che permette la visualizzazione dei dettagli iridei, ischemia di meno di 1/3 del limbus; prognosi buona.

TABELLA II

CLASSIFICAZIONE DELLE CAUSTICAZIONI DELLA SUPERFICIE OCULARE SECONDO ROPER-HALL

GRADO	PROGNOSI	CORNEA	CONGIUNTIVA / LIMBUS
I	Ottima	Danno dell'epitelio corneale	Ischemia limbare assente
II	Buona	Haze corneale, iride visibile	Ischemia limbare <1/3
III	Incerta	Perdita totale dell'epitelio, haze stromale, iride non visibile	Ischemia limbare 1/3-1/2
IV	Scarsa	Cornea opaca, iride e pupilla non visibile	Ischemia limbare >1/2

- *Grado 3*: haze stromale importante che non permette la visualizzazione dei dettagli iridei, ischemia da 1/3 a 1/2 del limbus; prognosi incerta.
- *Grado 4*: cornea completamente opaca, che non permette la visualizzazione dell'iride, ischemia di più della metà del limbus, necrosi ischemica della congiuntiva prossimale e della sclera; prognosi infausta.

La classificazione di Hughes modificata valuta il grado di lesione in base all'osservazione del grado di ischemia limbare codificando che l'ischemia del limbus è un fattore prognostico indiretto importantissimo per quantificare il danno delle cellule staminali.

L'ischemia limbare è un fattore presuntivo di danno staminale.

Nella lesione di grado 1 può essere presente una piccola perdita di cellule staminali; nel grado 2 una perdita maggiore; nel grado 3 una perdita subtotale di cellule staminali; nel grado 4 perdita totale di cellule staminali.

Quando l'ischemia è di piccola entità oppure è assente presumibilmente abbiamo una lesione di grado 1, quando meno della metà del limbus è ischemico presumibilmente abbiamo una lesione di grado 2, quando più della metà del limbus è ischemico abbiamo una lesione di grado 3. Il quadro clinico di un'ischemia completa con perdita dell'epitelio congiuntivale prossimale associato all'evidenza di un danno significativo all'intera superficie del globo oculare ed al segmento anteriore si configura come una lesione di grado 4.

Questa classificazione è diventata il punto di riferimento più comunemente usato fin dall'introduzione nel 1965.

In seguito alle acquisizioni dei nuovi con-

getti e conoscenze dei meccanismi di riparazione della superficie oculare, l'approccio terapeutico, in particolar modo chirurgico, delle causticazioni della superficie oculare è radicalmente cambiato. La conoscenza e l'applicazione clinica del concetto di cellule staminali limbari dell'epitelio corneale e di cellule staminali del fornice dell'epitelio congiuntivale ha significativamente migliorato la riuscita del trattamento. In realtà, in letteratura sono descritti da vari Autori risultati discordanti in termini di successo e di fallimento dell'uso di queste procedure in casi di causticazione classificate con lo stesso grado di Roper-Hall. Questa differenza è in gran parte dovuta all'inadeguatezza del presente sistema di classificazione, più che all'uso delle diverse modalità tecniche di trapianto limbare. Questo è particolarmente evidente per il IV grado delle causticazioni. Nella classificazione di Roper-Hall, il IV grado implica un'ischemia limbare compresa tra il 50-100% e corrisponde ad una prognosi scarsa. In realtà, un occhio con il 50% o addirittura con il 75% di ischemia limbare può aspettarsi di certo un esito migliore di un occhio con un'ischemia del 100%. Però, in occhi con perdita totale di epitelio limbare (e corneale), la presenza di un po' di epitelio congiuntivale indenne, rappresenta un indicatore prognostico favorevole rispetto ad occhi in cui si è verificata la perdita totale di epitelio corneale, limbare e congiuntivale. Ciò vuol significare che l'estensione del coinvolgimento dell'epitelio congiuntivale è un'altra variabile di significato prognostico considerevole.

In letteratura sono descritti numerosi successi terapeutici con l'utilizzo di tecniche di ricostruzione della superficie oculare anche in causticazioni del IV grado della

classificazione di Roper-Hall.

Brodovsky e altri hanno preso 11 anni di recensioni retrospettive di 177 occhi con causticazioni da alcali ed hanno riportato che «*la classificazione in base alla severità della lesione, in particolare la valutazione clinica dell'ischemia limbare, è poco precisa e varia tra diversi clinici*».

Dua et al., in seguito a queste considerazioni, propongono una significativa modificazione alla classificazione di Roper-Hall che tiene conto dell'estensione del coinvolgimento limbare in base alle ore dell'orologio e della percentuale di coinvolgimento congiuntivale.

Le ore dell'orologio del limbus vengono determinate dividendo il limbus nelle 12 ore del quadrante dell'orologio. Il termine «coinvolgimento limbare» viene preferito al termine di «ischemia limbare», perché ha un significato più ampio e perché non esclude aree di limbus in cui vi è una completa o totale perdita di spessore dell'epitelio limbare senza un significativo grado di ischemia. Può verificarsi, infatti, una totale perdita di epitelio limbare (che include le cellule staminali) in presenza di scarsa ischemia, potenzialmente con le stesse conseguenze.

Sebbene l'ischemia limbare in genere si associa alla perdita delle cellule staminali limbari, questa evenienza non sempre si verifica. L'ischemia transitoria, o quella che si presenta subito dopo la lesione, ma che scompare nei giorni seguenti, permette alle cellule staminali limbari di sopravvivere, ripristinare e ripopolare il settore colpito. Analogamente, si può verificare un «coinvolgimento limbare» superficiale su 360° della superficie con sopravvivenza di cellule staminali in profondità.

Poiché è clinicamente impossibile valutare

questa situazione immediatamente, si propone che l'estensione del coinvolgimento limbare al momento della lesione sia basato sulle ore dell'orologio della colorazione limbare che si osserva. L'estensione del coinvolgimento limbare dovrebbe essere controllata frequentemente (giornalmente o al massimo ogni due giorni), e la classificazione dovrebbe essere variata nel periodo di *follow-up*. In alcune circostanze si verifica che un settore del limbus, che sembrava essere sopravvissuto al momento iniziale, presenta lesioni nei giorni seguenti.

La classificazione proposta è, quindi, abbastanza flessibile nel garantire una precisa documentazione di questi cambiamenti, a differenza di quella usata correntemente.

Il coinvolgimento congiuntivale viene considerato suddividendo la congiuntiva bulbare e dei fornici in quadranti e determinando l'area coinvolta. In questa classificazione (*Tab. III*) i gradi 1 e 2 sono molto simili alla classificazione di Roper-Hall con l'inclusione del coinvolgimento congiuntivale.

Secondo la classificazione di Roper-Hall, i gradi 4, 5 e 6 dovrebbero essere inclusi nel grado 4 con prognosi scarsa.

Questa classificazione può essere presentata con scala analoga, cioè rappresentando il coinvolgimento limbare (in ore di orologio) e la percentuale di interessamento congiuntivale bulbare e dei fornici. Per esempio, 3/55 dovrebbe rappresentare il coinvolgimento limbare di 3 ore e quello congiuntivale del 55%.

Mentre ancora rimane semplice e facile l'uso della classificazione originale, il nuovo sistema potrebbe definire con più decisione l'estensione del danno alla superficie oculare, permetterebbe di progettare le strategie di gestione, di predire il risultato della lesione e di garantire confronti più

TABELLA III

**CLASSIFICAZIONE DELLE CAUSTICAZIONI DELLA SUPERFICIE OCULARE
SECONDO DUA et al.**

GRADO	PROGNOSI	COINVOLGIMENTO LIMBARE	COINVOLGIMENTO CONGIUNTIVALE	SCALA ANALOGA*
I	Molto buona	0 ore di interessamento limbare	0%	0/0%
II	Buona	≤3 ore di interessamento limbare	≤30%	1-3/1-29.9%
III	Buona	>3-6 ore di interessamento limbare	>30-50%	3.1-6/31.50%
IV	Buona-riservata	>6-9 ore di interessamento limbare	>50-75%	6.1-9/51-75%
V	Riservata-scarsa	>9-<12 ore di interessamento limbare	>75-<100%	9.1-11.9/75.1-99.9%
VI	Molto scarsa	12 ore di interessamento limbare	100% congiuntiva	12/100%

*La scala analogica riproduce accuratamente il coinvolgimento limbare (in ore di orologio) e la percentuale di interessamento congiuntivale bulbare e dei fornici.

uniformi fra i risultati pubblicati per la gestione del trauma (Figg. 6-9).

può essere distinto in tre fasi distinte: fase immediata, fase acuta (0-7 giorni), fase di riparazione.

DECORSO CLINICO

Il decorso clinico delle lesioni chimiche

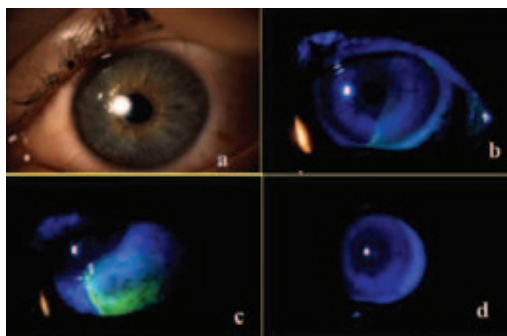


Fig. 6

A: causticazione chimica da calce di grado 1 secondo la classificazione di Roper-Hall e di grado 2 secondo la classificazione di Dua. La prognosi è eccellente. B: il limbus è interessato per 1 ora ed il coinvolgimento congiuntivale è scarso, senza necrosi né ischemia (C). La riepitelizzazione corneale è completa già dopo 4 giorni, senza alcuna sequela (D).

FASE IMMEDIATA

Le caratteristiche cliniche dipendono dall'area coinvolta, dalla profondità di penetrazione e dalla tossicità della sostanza. L'area di interessamento corneale si valuta

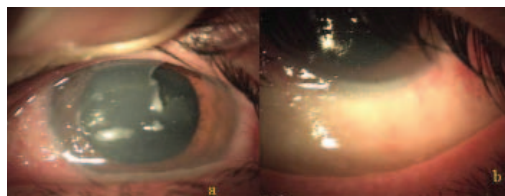


Fig. 7

A: causticazione chimica da acidi di grado 2 secondo la classificazione di Roper-Hall e di grado 3 secondo la classificazione di Dua. La prognosi è buona. La cornea è in gran parte disepitelizzata con un haze stromale che permette la visione dell'iride. B: il limbus è interessato per 3 ore ed il coinvolgimento congiuntivale è superiore al 30% con evidente ischemia.

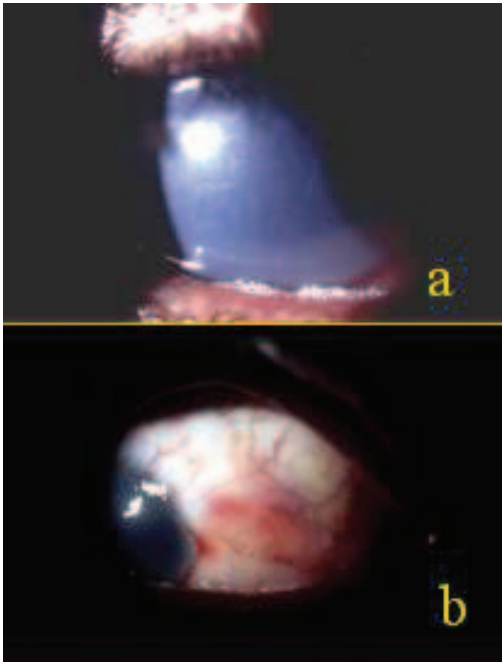


Fig. 8

Causticazione chimica da alcali di grado 3 secondo la classificazione di Roper-Hall. A: la cornea è totalmente disepitelizzata con un haze stromale che non permette la visione dell'iride nei dettagli. B: l'interessamento limbare è totale, mentre il coinvolgimento congiuntivale è pari al 40% (settori superiori). La prognosi è riservata.

mediante l'esame con fluoresceina alla lampada a fessura, mentre la profondità di interessamento stromale mediante la perdita di trasparenza. La profondità della penetrazione congiuntivale si valuta dall'osservazione diretta dell'ischemia regionale o della necrosi della congiuntiva bulbare e limbare. L'angiografia a fluorescenza del segmento anteriore può essere utile per studiare la penetrazione congiuntivale ed intraoculare mediante la documentazione dell'ischemia del segmento anteriore.

Il paziente lamenta dolore, fotofobia e blefarospasmo in seguito alla stimolazione di

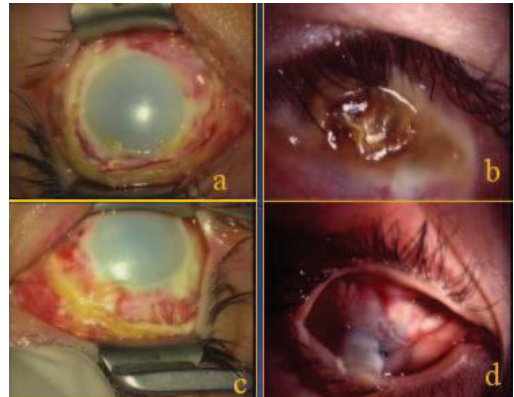


Fig. 9

Causticazione chimica da alcali bilaterale di grado 4 secondo la classificazione di Roper-Hall. A, C: l'interessamento limbare è totale, mentre il coinvolgimento congiuntivale è superiore al 75%. La prognosi è scarsa. La cornea è totalmente disepitelizzata con un haze stromale che non permette la visione dell'iride. E' presente necrosi congiuntivale. B, D: esiti a distanza di un anno. Evidente cheratinizzazione in ambo gli occhi e perforazione corneale in OD. E' presente simblepharon superiore ed inferiore, entropion in ambo gli occhi.

retta delle terminazioni nervose corneali. Spesso è necessario l'uso di anestetico locale per vincere la resistenza palpebrale e ridurre il dolore, al fine di poter effettuare l'esame obiettivo. Il quadro clinico può essere variabile.

La cornea può essere del tutto trasparente o presentare differenti gradi di opacizzazione, che possono anche impedire la visione dell'iride e del cristallino. L'epitelio corneale può essere distrutto in parte o interamente con coinvolgimento della regione limbare. La congiuntiva può essere in parte o totalmente coinvolta. Lo stato infiammatorio, quindi, può essere variabile. A causa della contrazione dell'involucro collagene del bulbo e del trabecolato e per il rilascio di mediatori dell'infiammazione (prostaglandine), spesso, si verifica un in-

nalzamento della pressione endobulbare. E' importante considerare sia il danno a livello dell'epitelio congiuntivale che quello a livello dell'epitelio corneale, con particolare attenzione alla regione del limbus. La profondità della penetrazione può essere stimata valutando la trasparenza corneale, la presenza di infiammazione endoculare, il tono oculare e la trasparenza del cristallino. Sebbene una reazione flogistica in camera anteriore possa far seguito ad una lesione della superficie oculare, un ipertono o un'opacizzazione del cristallino che insorgono a breve distanza di tempo dal trauma sono reperti indicativi di una significativa penetrazione. L'esame iniziale fornisce valide informazioni sulla gravità del trauma, suggerisce la prognosi e determina l'aggressività della condotta terapeutica.

FASE ACUTA

Può essere evidente l'ischemia del limbus e dell'intero segmento anteriore, spesso osservata quando la causticazione si è estesa oltre la cornea ed ha distrutto gli adiacenti tessuti vascolarizzati. L'ischemia può interessare la congiuntiva, l'episclera, il tarso, i bordi palpebrali, la sclera anteriore, la cornea ed il limbus. E' presente chemosi, la colonna di sangue nei vasi congiuntivali scompare e non è presente nessun movimento del sangue. La congiuntiva necrotica spesso si stacca e diviene visibile la sclera bianca che può essere priva di vasi. La congiuntiva adiacente può apparire intensamente infiammata. Nel caso in cui sia danneggiato il corpo ciliare può essere presente il fenomeno di tyndall per rottura della barriera oculoematica. Se l'iride è danneggiato appare di colore grigiastro. Il cristalli-

no potrebbe apparire rapidamente opaco. La riepitelizzazione corneale avviene già in questa fase per le lesioni in cui non c'è stato coinvolgimento limbare. Le lesioni in cui il limbus è interessato al massimo per 6 ore vanno incontro ad una riepitelizzazione precoce e ad un lento recupero della trasparenza dello stroma. Nelle lesioni limbare più estese la riepitelizzazione manca, è presente una precoce proliferazione cheratocitica ed iniziano le fasi del primo picco di infiammazione; la produzione di collagenasi è scarsa o assente; la cornea non presenta neovascolarizzazione.

FASE DI RIPARAZIONE

Gli esiti delle lesioni cliniche sono determinati dal grado e dall'estensione del danno limbare e dal grado e dall'estensione del danno congiuntivale e palpebrale. In questa fase inizia la proliferazione cheratocitaria con la produzione di collagene e di collagenasi e, in assenza di una precoce ed aggressiva terapia antinfiammatoria, inizia il secondo picco d'infiltrazione di cellule infiammatorie.

La situazione clinica è più grave nelle lesioni in cui c'è esteso coinvolgimento congiuntivale con necrosi tessutale, quando non si rimuove al più presto il tessuto necrotico poiché si ha una sorgente addizionale di richiamo ed accumulo di leucociti e di rilascio di enzimi proteolitici.

La combinazione di un'infiammazione addizionale, l'ischemia limbare, la mancanza di inibitori della collagenasi di origine vascolare, possono esitare in una necrosi del segmento anteriore e nell'ulcerazione sterile della cornea anche agli stadi precoci delle lesioni maggiori.

La riparazione epiteliale avviene a partire dalle zone limbari indenni in cui possono essere presenti cellule staminali limbari superstiti.

Nelle lesioni in cui il danno limbare è minimo o moderato, la riepitelizzazione è completa. L'epitelio corneale sarà clinicamente e fenotipicamente normale.

Nelle lesioni in cui si verifica un deficit parziale delle cellule staminali limbari, la riepitelizzazione corneale può essere ritardata, non completa, con presenza di difetti epiteliali persistenti e congiuntivalizzazione parziale della cornea, se la congiuntiva non è estesamente compromessa.

Nelle lesioni in cui si è verificato un danno totale delle cellule staminali limbari, la riepitelizzazione corneale è assente. La cornea viene aggredita completamente dalla congiuntiva residua con la possibile formazione di un *pannus* fibrovascolare. La congiuntivalizzazione corneale con neovascularizzazione previene l'ulcerazione corneale sterile e la successiva perforazione, a causa dell'apporto ematico degli inibitori delle collagenasi. Se il danno congiuntivale è esteso, la cornea può andare incontro ad una progressiva ulcerazione a causa della digestione enzimatica, già iniziata nella fase precoce di riparazione. In seguito alla risposta infiammatoria tessutale di tipo esudativo-fibrinoso, si può avere la formazione di symblefaron, di entropion cicatriziale e di trichiasi.

La congiuntiva bulbare e tarsale può essere coinvolta più o meno estesamente con proporzionale perdita di cellule mucipare. A seconda dell'entità del danno delle cellule mucipare, si può configurare un quadro di occhio secco più o meno severo, sostenuto anche da un danno neurotrofico corneale, con trasformazione dell'epitelio congiunti-

vale e corneale da non cheratinizzato in cheratinizzato (metaplasia squamosa).

Se il danno alle cellule mucipare è lieve la condizione di secchezza oculare può essere transitoria e determinare un'abnorme secrezione mucosa con anomalità del film lacrimale.

In questi casi, poiché tutto il segmento anteriore è stato gravemente lesionato, possono essere presenti membrane retrocorneali, sinechie anteriori periferiche, cataratta, glaucoma, ipotonia e tisi del bulbo.

TERAPIA

Alla luce delle recenti acquisizioni fisiopatologiche e delle nuove metodiche chirurgiche di ricostruzione della superficie oculare con trapianto limbare, la terapia delle causticazioni chimiche permette oggi di ottenere risultati clinici eccezionali. I fattori determinanti per il successo terapeutico sono la tempestività del primo intervento, il controllo dell'ipertono e dell'infiammazione oculare, l'entità del coinvolgimento limbare e congiuntivale.

Schematicamente la terapia può essere suddivisa in terapia dell'emergenza, della fase acuta, della fase della riparazione e degli esiti.

La terapia, medica e chirurgica, deve mirare a controllare l'infiammazione, a minimizzare l'ulcerazione e a favorire la riparazione tessutale e la riepitelizzazione corneale.

TERAPIA D'EMERGENZA (Tab. IV)

I traumi chimici oculari rappresentano una vera emergenza in campo oftalmologico.

Il trattamento immediato mira ad allontanare la sostanza chimica dalla superficie

TABELLA IV

TERAPIA D'EMERGENZA

- Irrigazione continua (1-2 ore)
- Ev. paracentesi CA
- Rimozione detriti e parti necrotiche
- Controllo pH
- Controllo tono oculare

oculare. La gravità del danno, infatti, è principalmente determinata dalla durata del contatto della sostanza con l'occhio. Esso consiste nell'irrigazione immediata dell'occhio, nell'allontanamento dei residui di sostanze dalla superficie oculare, come nel caso della calce, nella rimozione di tessuto necrotico, fonte di infiammazione ed eventualmente nella paracentesi e nel lavaggio della camera anteriore.

IRRIGAZIONE

L'irrigazione immediata è di fondamentale importanza. L'irrigazione deve essere effettuata su tutta la superficie oculare, invitando il paziente a guardare in tutte le direzioni. L'instillazione di una goccia di anestetico locale riduce il dolore e facilita l'irrigazione. Sono necessari almeno 500-1000 ml di fluido irrigante. L'irrigazione deve essere continua per almeno 15 minuti fino a 2-4 ore, con soluzioni anfoteriche o tamponanti che possono normalizzare il pH della camera anteriore. Particelle residue di sostanza possono essere intrappolate nel fornice o sotto la palpebra superiore. E' obbligatorio, perciò, estrapizzare le palpebre e procedere ad una pulizia intensa del *cul de sac* congiuntivale. Sostanze che contengono ossido di calcio,

come la calce o il cemento, reagiscono avidamente con l'acqua producendo una soluzione di idrossido di calcio che determina un pH alcalino di 12,4. In questi casi, il *cul de sac* congiuntivale può essere pulito con un cotton fioc imbevuto di EDTA 1%. L'irrigazione continua permette inoltre di rimuovere sostanze infiammatorie dalla superficie oculare. L'irrigazione ha un'influenza decisiva sul decorso clinico e sulla prognosi. Studi recenti hanno dimostrato che si hanno differenze altamente significative, con risultati migliori in termini di acuità visiva e di numero di interventi chirurgici, nei pazienti sottoposti immediatamente a irrigazione dopo il trauma rispetto a quelli non trattati.

L'acqua è comunemente usata e raccomandata come fluido irrigante. Essa è reperibile in tutti i luoghi ed un'abbondante quantità di acqua ha sicuramente un effetto diluente. L'acqua, però, è ipotonica rispetto allo stroma corneale e all'umor acqueo. In seguito alla causticazione, la cornea perde l'epitelio corneale e lo stroma denudato trattiene le sostanze causticanti aumentando la sua osmolarità. In tal modo, durante l'irrigazione con l'acqua, lo stroma corneale richiama, a causa della sua iperosmolarità, il fluido con conseguente diffusione di agenti corrosivi negli strati profondi stromali. Per tale motivo è raccomandabile l'irrigazione con fluidi a più alta osmolarità al fine di prevenire l'ingresso dell'acqua e delle sostanze tossiche nel bulbo e per rimuovere gli agenti corrosivi al di fuori dei tessuti causticati. La soluzione salina ha anch'essa un'osmolarità inferiore alle lacrime e non è in grado di normalizzare il pH della camera anteriore dopo prolungata irrigazione. Studi sperimentali hanno dimostrato che il buffer fosfato, largamente usato come agente irrigante, reagisce con il calcio endogeno rilasciato dalla lisi

cellulare producendo complessi calcio-fosfato e precipitando. I migliori fluidi irriganti sono rappresentati da quelli che hanno un'osmolarità simile allo stroma corneale (420 mOsm/L). Attualmente il Ringer's lattato e la soluzione salina bilanciata (BSS) sono i fluidi più idonei all'irrigazione. Il ringer lattato è una soluzione tamponata più efficace della soluzione salina normale. L'osmolarità del BSS è simile a quella dell'umor acqueo. Il pH è neutro. Il BSS contiene sodio acetato e citrato. Come evidenziato da Pfister, il buffer citrato isotonico forma complessi chelanti e si lega a ioni metallo aspecifici prodotti dall'agente chimico. La soluzione salina ha la proprietà di aumentare la sua capacità tamponante e sperimentalmente l'imbibizione corneale, preservando l'endotelio corneale. Una nuova sostanza anfoterica utile per l'irrigazione è la Difoterina, ha un pH di 7,4 ed un'osmolarità di 820 mOsm/L. Il pH nel *cul de sac* congiuntivale e nello stroma corneale si riduce rapidamente dopo irrigazione con una sostanza tamponante.

Alcuni Autori (Kuckelkorn) raccomandano l'uso di un'infusione intravenosa di almeno 500-1000 ml di soluzione irrigante. L'efficacia dell'irrigazione può essere valutata con un indicatore universale di pH. L'irrigazione deve essere continuata fino a quando il pH torna alla normalità. Se una prolungata irrigazione non normalizza il pH, bisogna considerare la possibilità che siano ancora presenti particelle di sostanze nel *cul de sac* congiuntivale e/o sotto la palpebra superiore.

RIMOZIONE DI TESSUTO NECROTICO

La rimozione di epitelio corneale necrotico è necessaria per favorire una pronta riepi-

telizzazione. Nelle causticazioni più severe è fondamentale rimuovere il tessuto necrotico congiuntivale e sottocongiuntivale, cioè rimuovere la sede dei polimorfonucleati e dei leucociti, al fine di ridurre l'infiammazione e di impedire il rilascio degli enzimi proteolitici.

Il beneficio della paracentesi e dell'irrigazione della camera anteriore è incerto.

TERAPIA DELLA FASE ACUTA (Tab. V)

Il passo terapeutico successivo è dipendente dalla severità della lesione clinica. Di solito, quando le lesioni sono lievi e moderate, cioè in assenza o presenza di lesione limbare fino a 3 ore e alterazione congiuntivale inferiore al 30% con danno dell'epitelio corneale, la riepitelizzazione avviene in pochi giorni, senza alcun danno permanente all'occhio. In questi casi, è sufficiente una terapia medica con colliri antibiotici per evitare la possibilità di cheratite batterica e steroidei per ridurre e controllare l'infiammazione: ofloxacina (Exocin®); cloramfenicolo-tetraciclina

TABELLA V

TERAPIA DELLA FASE ACUTA

- Antibiotici topici
- Steroidi locali
- Cicloplegici
- Controllo tono oculare
- Controllo motilità
- Umettanti, acetilcisteina
- Citrato
- Tetracicline
- Corticosteroidi (non più di 10 giorni)
- Membrana amniotica
- Autosiero

(Colbiocin); netilmicina (Nettacin® coll.), betametason-bekanamidina (Visumetazone antibiotico), tobramicina-desametazone (Tobradex®); prednisolone-neomicina: (Solprene, Bio Delta Cortilen), con un collirio cicloplegico: tropicamide, fenilefrina (Visumidriatic fenilefrina), cicloptolato (Ciclotolux, Atropina Solfato Atropina) e sostituti lacrimali: acido ialuronico (Bluyal®, Dropstar TG, Hyalistil®); povidone (Clarover®), destrano-idrossipropilmetilcellulosa (Dacrisol® Monodose). E' utile il bendaggio dell'occhio o l'uso di una lente a contatto terapeutica che possono facilitare la migrazione epiteliale e la rigenerazione della membrana basale proteggendo l'occhio dall'azione lesiva (effetto tergitristallo) dell'ammiccamento palpebrale. Possono essere utili gocce di vitamina C, di citrato e di acetilcisteina (Brunac, Tirocular®) e di autosiero.

Nei casi in cui il coinvolgimento limbare (1-6 ore) e congiuntivale (fino al 50%) sono maggiori, la terapia sostanzialmente è la stessa, ma è necessario un monitoraggio attento per controllare la migrazione epiteliale.

In presenza di danni limbari e congiuntivali più estesi, la terapia ha come scopo principale quello di prevenire il *melting* e la perforazione corneale, a causa del rilascio degli enzimi proteolitici, delle collagenasi e di tutte le altre matrice-metalloproteinasi da parte dei leucociti specifici. Il cardine del trattamento è la riduzione dell'infiammazione. Per tale motivo, è necessaria la precoce ed intensa applicazione di steroidi topici. I cortisonici riducono l'infiltrazione infiammatoria cellulare e stabilizzano il citoplasma dei leucociti polimorfonucleati e le membrane dei lisosomi. L'uso degli steroidi deve avvenire nei primi 7-10 giorni. Dopo questo periodo, la terapia con i corticosteroidi va sospesa per il fatto che vengo-

no rallentati fino all'inibizione i fenomeni di cicatrizzazione stromale (migrazione cheratocitaria e sintesi di collagene) che, invece, in questa fase risultano più vantaggiosi della soppressione dell'infiammazione per la riparazione tissutale. E' sperimentalmente provato che nella prima settimana dopo una grave causticazione chimica il rischio di ulcerazione sterile della cornea è modesto anche in caso in cui vengono utilizzati i cortisonici. Gli effetti collaterali deleteri dei cortisonici si esplicano solo quando iniziano i processi riparativi corneali (10-15 giorni dal trauma), fino a quando c'è equilibrio tra sintesi del collagene e attività proteolitica. Per un uso senza complicanze l'applicazione dei cortisonici non dovrebbe andare oltre i primi 7-10 giorni quando il rapporto rischio beneficio è favorevole. La terapia può essere modificata riducendo i cortisonici e sostituendoli con i progestinici: Medrossiprogesterone (preparazione galenica) o con i FANS: diclofenac (Voltaren® Ofta); pranoprofene (Oftalar, Pranoflog®); ketorolac (Acular). Gli steroidi progestinici hanno un minor effetto antinfiammatorio rispetto ai cortisonici con minimo effetto sulla riparazione stromale e sulla sintesi del collagene da parte dei cheratociti.

Sono risultati utili nella riduzione dell'ulcerazione corneale in studi sperimentali. Possono sostituire i cortisonici al 10° o 14° giorno quando è richiesta la soppressione dell'infiammazione ma non è desiderabile l'interferenza con i processi riparativi dello stroma. Il Medrossiprogesterone per via topica, sottocongiuntivale, o per via sistemica, ha una potente azione anticollagenolitica in modelli animali sperimentali. Ha una azione inibitoria sulla neovascolarizzazione.

I FANS, inibitori sperimentali della lipos-

sigenasi e della ciclossigenasi riducono l'infiammazione inibendo i PMN, inibendo la cascata infiammatoria correlata alla lipossigenasi. L'effetto dei FANS sulla riparazione stromale, sulla sintesi del collagene, sull'attività collagenolitica, sull'inibizione della neovascolarizzazione, non è stata ancora interpretata correttamente. I FANS potrebbero essere farmaci additivi o sostitutivi dei cortisonici e dei progestinici. In aggiunta alla terapia antinfiammatoria, è utile l'utilizzo di sostanze che supportano la riparazione tissutale e minimizzano l'ulcerazione, come le tetracicline: doxiciclina iclato (Bassado®), il citrato, l'acetilcisteina e l'autosiero.

Le tetracicline riducono nettamente l'attività delle collagenasi. L'effetto è indipendente dalla loro attività antimicrobica ed è probabilmente dovuto alla chelazione dello ione zinco nel sito attivo dell'enzima. La doxiciclina è il miglior inibitore della collagenasi *in vitro*, perché lega più zinco rispetto alla tetraciclina e alla minociclina. Le tetracicline inibiscono inoltre, l'attività dei PMN e prevengono l'attivazione della procollagenasi in collagenasi attiva. È stato dimostrato che possono facilitare la ripitelizzazione in danni chimici sperimentali.

Il citrato è un chelante del calcio. Esso riduce i livelli del calcio intracellulare e di membrana dei PMN. Ciò si traduce in una diminuzione della chemiotassi, della fagocitosi, dell'aderenza e del rilascio di enzimi lisosomiali. Ha un effetto comparabile a quello dell'acetilcisteina nella riduzione dell'attività collagenolitica. In studi sperimentali, la precoce somministrazione di citrato, riduce la fase precoce e la fase tardiva di infiltrazione di PMN rispettivamente del 63% e del 92% e riduce significativamente l'incidenza di ulcerazione cornea-

le. La somministrazione topica deve essere superiore a quella sistemica. L'effetto è reversibile mediante l'utilizzo del calcio.

L'acetilcisteina e gli altri inibitori delle collagenasi come la cisteina, EDTA sodico e calcico, la penicillamina hanno dimostrato di essere efficaci in studi clinici e sperimentali. Purtroppo solamente l'acetilcisteina è utilizzabile per un uso clinico. Essa deve essere refrigerata, è instabile, deve essere sostituita settimanalmente, penetra scarsamente nello stroma corneale, deve essere somministrata molte volte ed è relativamente tossica. Recenti studi sperimentali non dimostrano alcun effetto benefico della somministrazione di acetilcisteina nelle severe lesioni sperimentali da alcali. Il suo effetto è comparabile a quello del citrato, ma marcatamente inferiore a quello delle tetracicline e dei nuovi inibitori sintetici delle collagenasi.

La recente scoperta che i derivati delle tetracicline e i nuovi inibitori sintetici (Tiolo e il Carbossil peptide) hanno un potente effetto inibitore sulle collagenasi ha destato notevole interesse al loro utilizzo. Gli inibitori sintetici delle collagenasi sono dieci volte più potenti dell'acetilcisteina, sono di grande utilità nella riduzione dell'incidenza dell'assottigliamento corneale, dell'ulcerazione e della perforazione. Gli inibitori tessutali ricombinanti delle Metalloproteinasasi (TIMP) hanno simili proprietà anticollagenolitiche e riducono *in vitro* l'ulcerazione corneale similmente al Tiolo.

L'autosiero contiene sostanze in grado di stimolare la proliferazione e la differenziazione dell'epitelio corneale, di facilitare la migrazione e l'adesione cellulare. Studi recenti sulle colture cellulari hanno dimostrato che i fattori sierici sono in grado di favorire la proliferazione delle cellule limbari e

differenziazione in epitelio corneale. Ciò è reso possibile dalla presenza di recettori specifici sulla membrana delle cellule epiteliali limbari e corneali. I fattori che favoriscono la proliferazione e la differenziazione cellulare sono l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), l'acido retinoico, il *Nerve Growth Factor* (NGF), il *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β). I fattori che favoriscono la migrazione cellulare e l'adesione cellulare sono la Fibronectina, la sostanza P ed il fattore di crescita «*insuline-like*» (IGF-1).

Nelle lesioni in cui l'ischemia limbare e della congiuntiva perilimbare è pressoché totale, il rischio immediato più grave è la necrosi del segmento anteriore per la perdita dell'apporto ematico. Il precoce ripristino della vascolarizzazione limbare può ridurre drasticamente il rischio di perforazione corneale, necrosi del segmento anteriore. Al fine di ripristinare un adeguato apporto ematico limbare è possibile effettuare una tenoplastica. Come descritto da Teping e Reim, tutto il tessuto necrotico congiuntivale ed episclerale deve essere rimosso, isolando la capsula di Tenone. La capsula di Tenone viene avanzata in regione limbare e suturata aderentemente alla sclera.

Negli ultimi anni, sono stati riportati in letteratura casi clinici di causticazione acuta in cui è stata utilizzata la membrana amniotica al fine di favorire la riepitelizzazione, di ridurre l'infiammazione, la cicatrizzazione. Nelle causticazioni medie o moderate, la membrana amniotica da sola riesce rapidamente a ripristinare sia la superficie corneale sia la superficie congiuntivale. Invece nelle causticazioni severe, essa riesce a riformare la superficie congiuntivale senza invalidanti symblepharon e riduce l'infiammazione stromale del limbus, ma non previene il deficit delle cellule limbari staminali.

In caso sia presente ipertono oculare è necessario usare uno o più farmaci topici antiglaucomatosi, in associazione o meno ad inibitori dell'anidraasi carbonica per via generale o ad iniezione intravenosa con mannitolo.

TERAPIA DELLA RIPARAZIONE (Tab. VI)

In questa fase, l'obiettivo terapeutico è quello di minimizzare l'ulcerazione e di impedire il *melting* e la perforazione corneale. E' opportuno sostituire i corticosteroidi con gli steroidi progestinici ed i FANS, come precedentemente descritto. E' utile continuare la terapia con i farmaci inibitori delle collagenasi, con l'autosiero e con i sostituti lacrimali. In presenza di difetti epiteliali persistenti e di ulcera è possibile favorire il processo di riparazione tessutale mediante la chiusura dei punti lacrimali con *plug* temporanei o permanenti, o mediante cauterizzazione. Ciò consente una migliore lubrificazione della superficie oculare e l'apporto

TABELLA VI

TERAPIA DELLA RIPARAZIONE

- Umettanti senza conservanti
- Autosiero
- Tetraciline
- Steroidi progestinici
- Fans
- Acetilcisteina
- Controllo tono oculare
- Controllo motilità
- Controllo difetti epiteliali, ulcere, perforazioni (bendaggio, LAC, tarsorrafia, membrana amniotica, occlusione punti lacrimali, collanti acrilici, cheratoplastica perforante/lamellare, ricoprimento congiuntivale)

di sostanze nutritive lacrimali. Una tarsorrafia temporanea può essere utile per migliorare la protezione della superficie oculare.

Il trattamento dell'ulcerazione e della perforazione corneale include diverse metodiche: uso di adesivi tessutali, cheratoplastiche lamellari o perforanti, lente a contatto, ricoprimento congiuntivale, innesto di membrana amniotica.

L'uso di adesivi tessutali come il cianoacrilato può risultare utile nelle piccole perforazioni del diametro di 1 mm o meno insieme all'utilizzo di una lente a contatto terapeutica che impedirebbe alla colla di debordare dai limiti dell'ulcera. La colla può essere lasciata in sede fino a che non si perde spontaneamente con la riepitelizzazione. Può essere rimossa con pinze da gioielliere dopo 6 o 7 settimane quando la neovascolarizzazione dell'area ha scongiurato il rischio di una ulcerazione ricorrente. La colla induce una cicatrice fibrovascolare ed elimina dal sito i PMN. I limiti nell'uso della colla sono rappresentati dall'estensione della perforazione, dalla progressione del processo infiammatorio con relativa distruzione tessutale e dalla dislocazione della colla stessa.

L'innesto di membrana amniotica rappresenta un'alternativa terapeutica per le ulcere e le piccole perforazioni. L'effetto terapeutico è duplice e sinergico: soppressione dell'infiammazione e promozione dell'epitelizzazione. La matrice stromale della membrana amniotica sembra inibire l'espressione di citochine coinvolte nel processo infiammatorio e prodotte dalle cellule epiteliali come interleuchina-1 α e interleuchina-1 β , interleuchina-2 e interleuchina-8, interferone- γ , e tumor necrosis factor- α ; contiene inoltre inibitori delle proteasi ed induce apoptosi delle cellule infiammatorie. La soppressione dell'infiammazione è cruciale

nel prevenire ulteriore progressione del danno tessutale. Per questo motivo l'innesto di membrana amniotica può essere usato nelle causticazioni chimiche acute.

La membrana amniotica inoltre promuove una rapida epitelizzazione sulla sua membrana basale. Viene infatti utilizzata come supporto per le colture cellulari limbari ed *in vivo* permette la differenziazione delle cellule congiuntivali e limbari. È stata anche dimostrata la presenza di un alto contenuto di *nerve growth factor* nella membrana amniotica e l'induzione da parte di quest'ultima nelle cellule epiteliali corneali di recettori TrkA ad alta affinità per il *nerve growth factor*. Il *nerve growth factor* sembra promuovere la guarigione dell'ulcera corneale neurotrofica.

Nel caso in cui la perforazione è di grosse dimensioni è necessario ricorrere ad una cheratoplastica perforante o lamellare a scopo tettonico. Sfortunatamente la cheratoplastica è associata ad un considerevole numero di complicazioni: sinechie, uveiti e rigetto a causa dell'intensa infiammazione. Alcuni Autori descrivono un trapianto corneale da bianco a bianco in cui oltre allo scopo tettonico l'obiettivo è quello di trasferire una quantità considerevole di cellule staminali. In questo caso il rischio di rigetto è elevato.

TERAPIA DEGLI ESITI (Tab. VII)

Nelle lesioni più gravi da trauma chimico la superficie oculare è completamente alterata. Spesso a causa del deficit limbare la cornea è congiuntivalizzata in modo parziale o in modo totale. La congiuntiva può andare incontro ad un processo fibrotico che esita in un pannus, in symblefaron od in anchiloblefaron. Le palpebre possono

TABELLA VII

ESITI

- Symblepharon, distichiasi, entropion, fibrosi subepiteliale cong.
- Occhio secco
- Cheratopatia neurotrofica
- Deficit limbare
- Glaucoma
- Cataratta
- Deficit visivo

presentare un entropion cicatriziale con trichiasi e distichiasi. In relazione all'estensione del coinvolgimento congiuntivale e delle cellule mucipare può residuare un quadro di occhio secco secondario.

Clinicamente, la deficienza limbare si manifesta con congiuntivalizzazione della cornea per perdita della funzione limbare di barriera, instabilità dell'epitelio corneale con difetti epiteliali ricorrenti e/o persistenti, ulcerazioni, perforazioni, neovascolarizzazioni profonde, opacità stromali, calcificazioni e cheratinizzazioni corneali. I pazienti presentano uno stato infiammatorio cronico, dolore, fotofobia e calo del visus. In queste situazioni patologiche è necessario verificare e quantizzare il deficit limbare al fine di pianificare una corretta strategia terapeutica. In presenza di un deficit limbare parziale, in altre parole di una quantità di cellule staminali sopravvissute al trauma, può essere sufficiente la rimozione del tessuto congiuntivale aggressore mediante la cheratectomia superficiale e l'innesto di membrana amniotica in modo da riformare lo stroma anteriore e la membrana basale (Fig. 10). Ciò potrebbe favorire il ripristino dell'epitelio corneale mediante la proliferazione delle cellule

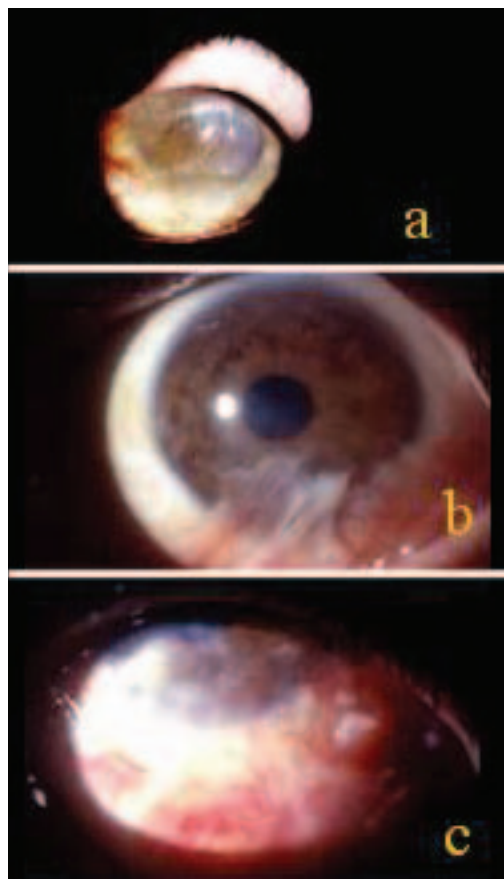


Fig. 10

Esiti di causticazione da calce. A: la cornea appare completamente congiuntivalizzata. B: dopo cheratectomia superficiale, residua un symblepharon inferiore con congiuntivalizzazione parziale corneale inferiore per deficit staminale parziale. Il coinvolgimento limbare dopo il trauma è stato superficiale con sopravvivenza di cellule staminali che hanno ripopolato la superficie corneale dopo l'asportazione della congiuntivalizzazione. C: ricostruzione del fornice con innesto di membrana amniotica e mitomicina C. Le cellule staminali limbari sane hanno permesso di colmare il deficit inferiore. Follow-up di 16 mesi. Visus corretto di 10/10.

staminali limbari presenti (Fig. 11). In caso in cui la popolazione limbare è assente o non sufficiente a ripristinare l'epitelio corneale è necessario reintegrare la super-

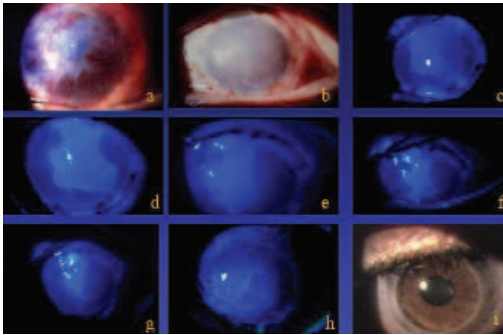


Fig. 11

Esiti di causticazione da calce. A: completa congiuntivalizzazione corneale. B: dopo cheratectomia superficiale, sono visibili zone limbari integre. C-H: crescita epiteliale dopo cheratectomia, ad indicare la presenza di cellule staminali residue capaci di dare una nuova superficie corneale. I: dopo 3 mesi è stato possibile effettuare una cheratoplastica perforante per la riabilitazione visiva, senza ricorrere ad innesti limbari. Follow-up di 36 mesi. Visus corretto di 10/10.

ficie oculare con cellule limbari, altrimenti l'eventuale cheratoplastica perforante è destinata inevitabilmente a fallire a causa della persistente deficienza limbare. E' quindi imperativo fornire alla superficie oculare una nuova fonte di cellule epiteliali corneali, il limbus. Esso può essere ottenuto dall'occhio adelfo sano nel caso in cui il trauma sia unilaterale, autotrapianto limbare (Fig. 12), o da donatore cadavere o vivente se la patologia è bilaterale, allotrapianto limbare (Figg. 13, 14). Recentemente, nuove possibilità terapeutiche si sono aperte con gli innesti di cellule staminali in coltura. Numerosi studi sono rivolti alla valutazione dei risultati clinici del loro utilizzo, il cui limite è rappresentato principalmente dalle difficoltà tecniche di isolamento delle cellule staminali epiteliali corneali. Nel caso che sia necessaria una riabilitazione visiva a causa delle opacità profonde corneali, verrà effettuata succes-

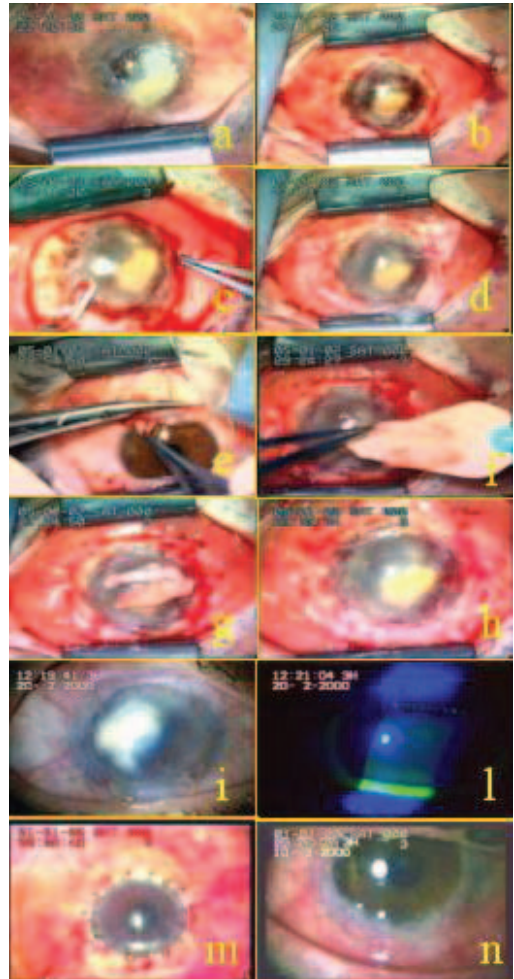


Fig. 12

Esiti di causticazione da calce. A: congiuntivalizzazione corneale per deficit staminale totale. B-H: il paziente viene sottoposto ad autotrapianto limbare con innesto di membrana amniotica. I-N: cheratoplastica perforante 6 mesi dopo la ricostruzione della superficie oculare. Follow-up di 40 mesi. Visus corretto di 7/10.

sivamente la cheratoplastica perforante o lamellare.

Spesso gli occhi con perdita di superficie oculare presentano metaplasia squamosa e neovascolarizzazione. Alla luce di nuovi concetti di fisiopatologia prima di effettuare

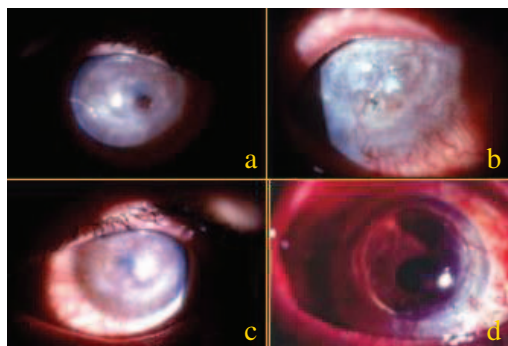


Fig. 13

Esiti di causticazione da calce. A: neovascolarizzazione corneale con perforazione. B: il paziente viene sottoposto ad innesto di membrana amniotica. C: dopo 2 mesi si effettua il trapianto di limbus da donatore vivente per deficit limbare. D: cheratoplastica perforante dopo 3 mesi dall'innesto limbare. Follow-up di 12 mesi, visus corretto di 6/10.

la chirurgia di ricostruzione della superficie oculare, è necessario ripristinare le sue difese al fine del successo terapeutico. Infatti alla base di un insuccesso terapeutico ci sono problemi lacrimali (ipolacrimia, alterazione qualitativa delle lacrime) e problemi palpebrali di tipo meccanico che aumentano la richiesta di lavoro delle cellule staminali trapiantate (entropion, trichiasi, fibrosi subepiteliali, metaplasia squamosa). E' necessario, quindi, prima di effettuare la ricostruzione della superficie oculare individuare e correggere queste condizioni. La difesa della superficie oculare è garantita dalla stabilità del film lacrimale. La composizione in lipidi, acqua, mucina delle lacrime (fattori composizionali) insieme con l'ammiccamento e la chiusura palpebrale (fattori meccanici) contribuiscono a mantenere il film lacrimale stabile. Questi meccanismi di difesa della superficie oculare sono integrati neuroanatomicamente dalla prima branca del nervo trigemino che controlla due im-

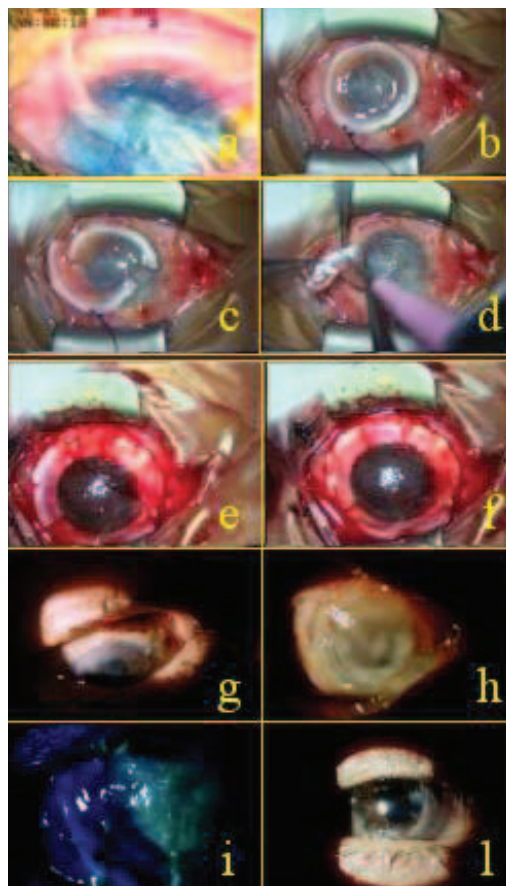


Fig. 14

Esiti di causticazione da calce. A: congiuntivalizzazione corneale con formazione di un pannus e symblepharon superiore ed inferiore per deficit staminale totale. B-F: il paziente viene sottoposto a cheratoalotrapianto limbare. G-L: cheratoplastica perforante 4 mesi dopo la ricostruzione della superficie oculare. Follow-up di 40 mesi. Visus corretto di 3/10.

portanti riflessi: il primo effettuato dalla componente parasimpatica del nervo faciale che controlla gli elementi composizionali del film lacrimale, il secondo attraverso la branca motoria del settimo nervo che controlla l'ammiccamento e la chiusura palpebrale. Le strategie terapeutiche devono mirare a correggere i fattori composizionali e

idrodinamici. Innanzitutto deve essere riconosciuta e corretta la perdita del riflesso di lacrimazione, la cheratopatia neurotrofica, e valutato l'ammiccamento il cui aumento compensa la deficienza delle componenti lacrimali che in presenza di anormalità delle palpebre, delle ciglia e delle ghiandole di Meibomio determina microtraumi per la superficie oculare e per l'eventuale trapianto. In caso di deficienza della componente acquosa delle lacrime è necessario effettuare la chiusura precoce dei punti lacrimali ed utilizzare lubrificanti ed autosiero. In caso in cui è presente deficienza della componente lipidica è necessario ripristinare il flusso delle ghiandole di Meibomio rimuovendo l'ostruzione degli orifizi ghiandolari da parte della metaplasia squamosa, ridurre l'infiammazione con cortisonici e tetracicline. In presenza di microtraumi, palpebrali bisogna considerare la chirurgia plastica e l'uso di lenti a contatto sclerali per proteggere la superficie. La chirurgia palpebrale è necessaria anche in presenza di lassità palpebrale, di estropion e di malposizione palpebrale.

La chirurgia limbare va effettuata solo dopo aver ristabilito le difese della superficie oculare e dopo aver risolto lo stato infiammatorio. Il successo della ricostruzione della superficie oculare va valutato in termini di stabilità. La riabilitazione visiva si ottiene nella stragrande maggioranza, con la successiva cheratoplastica lamellare o perforante.

Nell'ultimo decennio le prospettive del recupero visivo nei traumi chimici sono notevolmente aumentate in considerazione delle nuove acquisizioni fisiopatologiche e dei nuovi concetti terapeutici della superficie oculare. Il successo della cheratoplastica è garantito solo se la cornea è rivestita da epitelio di fenotipo corneale, in presen-

za di un normale ammiccamento, in assenza di esposizione corneale, in condizioni di sufficiente lacrima, in assenza di infiammazione, di ulcerazioni ricorrenti e di glaucoma incontrollato.

Se è presente la cataratta di solito essa viene rimossa al tempo della chirurgia corneale.

Il glaucoma deve essere controllato farmacologicamente o chirurgicamente. Il controllo del tono oculare è una condizione indispensabile per il successo terapeutico. A causa dei danni congiuntivali, spesso, è impossibile effettuare interventi di trabeculectomia *ab externo*, per cui è necessario ricorrere ad impianti valvolari o a ciclo crio/fotocoagulazione.

Nel caso in cui non è stata possibile la ricostruzione della superficie oculare, a causa delle drammatiche condizioni di cheratinizzazione, va presa in considerazione la possibilità di una riabilitazione visiva mediante cheratoprotesi.

TERAPIE SPERIMENTALI

Attualmente sono oggetto di studi sperimentali nuove modalità di trattamento con l'acido ascorbico, la fibronectina e l'*epidermal growth factor* (EGF), l'acido retinoico. L'ascorbato è una vitamina idrosolubile essenziale e deve essere introdotta giornalmente per mantenere gli accumuli corporei. I livelli di acido ascorbico sono ridotti di un terzo del normale in modelli di animali sperimentali dopo grave causticazione da alcali. L'acido ascorbico è necessario ai fibroblasti per sintetizzare collagene. Pfister et al. hanno dimostrato i benefici della supplementazione con ascorbato per riequilibrare i livelli nell'umore acqueo e ridurre l'incidenza di assottigliamento cor-

neale e ulcerazione dopo lesioni da alcali sperimentali. La somministrazione topica e sistemica di ascorbato non ha effetto sul processo ulcerativo già iniziato, per cui è necessaria una precoce supplementazione. I risultati delle sperimentazioni non sono ancora disponibili.

La fibronectina è una glicoproteina multimerica presente nella matrice extracellulare che favorisce l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice, ma non ha effetto sulla mitosi cellulare o sulla migrazione epiteliale. E' prodotta dalle cellule epiteliali e dai cheratociti ed è riscontrabile entro 8 ore dalla lesione corneale. E' distribuita a livello della membrana basale al davanti e sotto l'epitelio che avanza e persiste fino a che la riepitelizzazione non è completa. Il plasminogeno prodotto dalle cellule epiteliali basali dopo lesione chimica può degradare la fibrina e la fibronectina, interferendo così

con l'adesione dell'epitelio migrante.

L'EGF è un polipeptide isolato dalle ghiandole submandibolari del ratto. Stimola la sintesi di DNA, RNA e proteine da parte dell'epitelio corneale. Esso aumenta la percentuale di migrazione epiteliale inducendo iperplasia. Non promuove l'adesione dell'epitelio alla membrana basale danneggiata.

L'acido retinico stimola la conversione delle cellule staminali in cellule amplificanti transitorie, favorisce la transdifferenziazione dell'epitelio congiuntivale in epitelio corneale dopo un grave insulto chimico. E' stata dimostrata un'azione promettente nel trattamento dei disordini della superficie oculare associati con disfunzione delle *Goblet cells* e abnorme cheratinizzazione. In teoria può essere utile nel promuovere il ripristino delle *Goblet cells*, la stabilizzazione del film lacrimale e l'incremento della lacrimazione.

Bibliografia

1. Abel RJR, Binder PS, Polack FM, Kaufman HE. The results of penetrating keratoplasty after chemical burns. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1975;79:OP 584-95.
2. Alldredge OC, Krachmer JH. Clinical types of corneal transplant rejection; their manifestations, frequency, pre-operative correlates, and treatment. *Arch Ophthalmol* 1981;99:599-604.
3. Allam B, Insler MS. The use of fibronectin in the healing of persistent epithelial defects in the rabbit cornea. *J Ocul Ther Surg* 1985;4:89-92.
4. Allen TD, Potten CS. Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. *J Cell Sci* 1974;15:291-319.
5. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999;83:399-402.
6. Awan KJ. Delayed cataract formation after alkali burn. *Can J Ophthalmol* 1975;10:423-426.
7. Ballen PH. Mucous membrane grafts in chemical (lye) burns. *Am J Ophthalmol* 1963;55:302-312.
8. Barlati S, Marchina E, Quaranta CA, et al. Analy-

- sis of fibronectin, plasminogen activators and plasminogen in tear fluid as markers of corneal damage and repair. *Exp Eye Res* 1990;51:1-9.
9. Barnes MJ. Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1975;258:264-277.
10. Basu PK, Avaria M, Jankie R. Effect of hydrocortisone on the mobilisation of leucocytes in corneal wounds. *Br J Ophthalmol* 1981;65:694-698.
11. Beams R, Linabery L, Grayson M. Effect of topical corticosteroids on corneal wound strength. *Am Ophthalmol* 1968;66:1131-1133.
12. Beare JD. Eye injuries from assault with chemicals. *Br J Ophthalmol* 1990;74:514-518.
13. Bennett TO, Peyman GA, Rutgard J. Intracorneal phosphate buffer in alkali burns. *Can J Ophthalmol* 1978;13:93-95.
14. Berman MB. Regulation of corneal fibroblast MMP-1 collagenase secretion by plasmin. *Cornea* 1993;12:420-432.
15. Berman MB. The pathogenesis of corneal epithelial defects. *Acta Ophthalmol* 1989;67(Suppl 192):55-64.
16. Berman MB. Collagenase and corneal ulceration. In: Wooley DE, Evanson IE, Eds. Collagenase

- in Normal and Pathological Connective Tissues. New York, John Wiley, 1982;141-174.
17. Berman MB, Dohlman CH, Davison PF, et al. Characterization of collagenolytic activity in the ulcerating cornea. *Exp Eye Res* 1971;11:225-227.
 18. Berman MB, Barber JC, Talamo RC, Langley CE. Corneal ulceration and the serum antiproteases. I. alpha-1-antitrypsin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12:759-770.
 19. Berman MB, Kenyon KR, Havashi K, L'Hernault N. The pathogenesis of epithelial defects and stromal ulceration. In: Cavanag HD, Ed. The Cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III. New York, Raven Press, 1988;35-43.
 20. Berman MB, Manabe R. Corneal collagenase: evidence for zinc metalloenzyme. *Ann Ophthalmol* 1973;5:1193-1209.
 21. Berman MB, Hayashi K, Young E, et al. Urokinase-like plasminogen activator, corneal epithelial migration, and defect formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(Suppl):2.
 22. Berman MB, Leary R, Gage J. Evidence for a role of the plasminogen activator-plasmin system in corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19:1204-1221.
 23. Berman MB, Manseau E, Law M, et al. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1358-1366.
 24. Bickenbach JR, McCutcheon, MacKenzie JC. Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Kinet* 1986;19:325-333.
 25. Birk DE, Fitch IM, Babiarz JP, Linsenmayer TE. Collagen type 1 and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 1988;106:999-1008.
 26. Brazzell RK, Stern ME, Aquavella JV, et al. Human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:336-340.
 27. Brinckerhoff CE, Fini ME. Molecular cloning of collagenase and activator/stromelysin: Members of a coordinately regulated gene family of metalloproteinases is important in the modulation of connective tissue metabolism. In: Olsen B, Nimmi ME, Eds. Collagen, Vol 4. Boca Raton, CRC Press, 1989;65-84.
 28. Brion M, Lambs L, Berthon G. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 5. Formation of zinc complexes with tetracycline and some of its derivatives and assessment of their biological significance. *Agents Actions* 1985;17:229-242.
 29. Brodovsky SC, Mccarty CA, Snibson G, et al. Management of alkali burns. An 11 year retrospective review. *Ophthalmology* 2000;107:1829-1835.
 30. Bron AJ. Vortex patterns of the corneal epithelium. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1973;93:455-472.
 31. Bron AJ, Goldberg MF. Clinical features of human limbus. In: Trevor-Roper PD, Ed. The Cornea in Health and Disease: VI Congress of the European Society of Ophthalmology. London, Grune and Stratton, 1981;15-20.
 32. Brown D, Chwa M, Escobar M, Kenney MC. Characterization of the major matrix degrading metalloproteinase of human corneal stroma. Evidence for an enzyme/inhibitor complex. *Exp Eye Res* 1991;52:5-16.
 33. Brown SI, Akiya S, Weller CA. Prevention of the ulcers of the alkali-burned cornea: preliminary studies with collagenase inhibitors. *Arch Ophthalmol* 1969;82:95-97.
 34. Brown SI, Bloomfield SE, Pearce DB. A follow-up report on transplantation of the alkali-burned cornea. *Am J Ophthalmol* 1974;77:538-542.
 35. Brown SI, Hook CW. Isolation of stromal collagenase in corneal inflammation. *Am J Ophthalmol* 1971;72:1139-1142.
 36. Brown SI, Hook CW. Treatment of corneal destruction with collagenase inhibitors. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1971;75:1199-1207.
 37. Brown SI, Tragakis MP, Pearce DB. Treatment of the alkali-burned cornea. *Am J Ophthalmol* 1972;74:316-320.
 38. Brown SI, Tragakis MP, Pearce DB. Corneal transplantation for severe alkali burns. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1972;76:1266-1274.
 39. Brown SI, Wassermann HE, Dunn MW. Alkali burns of the cornea. *Arch Ophthalmol* 1969;82:91-94.
 40. Brown SI, Weller CA. Cell origin of collagenase in normal and wounded corneas. *Arch Ophthalmol* 1970;83:74-77.
 41. Brown SI, Weller CA. Collagenase inhibitors in prevention of ulcers of alkali-burned cornea. *Arch Ophthalmol* 1970;83:352-353.
 42. Brown SI, Weller CA. The pathogenesis and treatment of collagenase-induced diseases of the cornea. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1970;74:375-383.
 43. Brown SI, Weller CA, Akiya S. Pathogenesis of ulcers of the alkali-burned cornea. *Arch Ophthalmol* 1970;83:205-208.

44. Brown SI, Weller CA, Vidrich AM. Effect of corticosteroids on corneal collagenase of rabbits. *Am J Ophthalmol* 1970;70:744-747.
45. Brown SI, Weller CA, Wassermann HE. Collagenolytic activity of alkali-burned corneas. *Arch Ophthalmol* 1969;81:370-373.
46. Buck RC. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:767-784.
47. Buck RC. Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:1296-1299.
48. Burnett JM, Smith LE, Prauss JV, et al. Acute inflammatory cells and collagenase in tears of human melting corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20(Suppl):173.
49. Burns FR, Gray RD, Paterson CA. Inhibition of alkali-induced corneal ulceration and perforation by a thiol peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:107-114.
50. Burns FR, Stack MS, Gray RD, Paterson CA. Inhibition of a purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1569-1575.
51. Burns RP, Hikes CE. Irrigation of the anterior chamber for the treatment of alkali burns. *Am J Ophthalmol* 1979;88:119-120.
52. Cairnie AB, Laila PK, Osmond DG, Eds. Stem Cells of Renewing Cell Populations. New York, Academic Press, 1976.
53. Cardona H, DeVoe AG. Prosthokeratoplasty. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1977;83:271-280.
54. Catalono RA. Eye injuries and prevention. *Pediatr Clin North Am* 1993;40:827-839.
55. Cavanagh HD, Pihlaja D, Thoft RA, Dohlman CH. The pathogenesis and treatment of persistent epithelial defects. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1976;81:754-769.
56. Chang MS, Chiou GC. Prevention of lens protein-induced ocular inflammation with cyclooxygenase and lipooxygenase inhibitors. *J Ocul Pharmacol* 1989;5:353-360.
57. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1301-1314.
58. Chiang TS, Moorman LR, Thomas RP. Ocular hypertensive response following acid and alkali burns in rabbits. *Inv Ophthalmology* 1971;10:270-273.
59. Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue degrading metalloendopeptidase secreted by rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985;260:12367-12376.
60. Cho BJ, Djalilian AR, Obritsch WF, et al. Conjunctival epithelial cells cultured on human amniotic membrane fail to transdifferentiate into corneal epithelial type cells. *Cornea* 1999;18:216-224.
61. Choi YS, Kim JY, Lee JH. Effect of application of human amniotic membrane in rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998;17:389-395.
62. Chung JH. Healing of rabbit corneal alkali wounds in vitro. *Cornea* 1990;9:36-40.
63. Chung JH, Fagerholm P. Stromal reaction and repair after corneal alkali wound in the rabbit: a quantitative micro-radiographic study. *Exp Eye Res* 1987;45:227-237.
64. Cintron C, Hassinger LC, Kublin CL, et al. Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J Ultrastruct Res* 1978;65:13-22.
65. Cintron C, Hong BS. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29: 760-766.
66. Cintron C, Hong BS, Covington HI, Kublin CL. Quantitative analysis of collagen from normal developing corneas and corneal scars. *Curr Eye Res* 1981;1:1-8.
67. Cintron C, Hong BS, Covington HI, Macarak EJ. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:767-775.
68. Cionni RJ, Katakami C, Lavrich JB, Kao WWY. Collagen metabolism following corneal laceration in rabbits. *Curr Eye Res* 1986;5:549-558.
69. Cobo M, Ortiz JR, Safran G. Sclerokeratoplasty with maintenance of the angle. *Am J Ophthalmol* 1992;113:533-537.
70. Collier IE, Smith J, Kronberger A, et al. The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. *J Biol Chem* 1988;263:10711-10713.
71. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, et al. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-6587.
72. Colvin RB, Phan TM, Boruchoff SA. Fibronectin therapy of persistent corneal epithelial defects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26(Suppl):92.
73. Cooper TW, Eisen AZ, Stricklin GP, Welgus HG. Platelet derived collagenase inhibitor: character-

rization and subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2779-2783.

74. Cotsarellis G, Cheng SZ, Dong G, et al. Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.

75. Cotsarellis G, Dong G, Sun TT, Lavker RW. Differential response of limbal and corneal epithelia to phorbol myristate acetate (TPA). *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1987;28(Suppl):1.

76. CybuIsky MI, Chan MKW, Movat HZ. Neutrophil emigration quantitation, kinetics and role of mediators. In: Poste G, Crooke ST, Eds. *Cellular and Molecular Aspects of Inflammation*. New York, Plenum Press, 1988;41-56.

77. Daniele S, Frati L, Fiore C, et al. The effect of epidermal growth factor (EGF) on the corneal epithelium in humans. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1979;210:159-165.

78. Danjo S, Friend J, Thoft RA. Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1445-1459.

79. Darlak K, Miller RB, Stack MS, et al. Thiol-based inhibitors of mammalian collagenase. *J Biol Chem* 1990;265:5199-5205.

80. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229:560-561.

81. Davis AR, Ali QH, Aclimandos WA, Hunter PA. Topical steroid use in the treatment of ocular alkali burns. *Br J Ophthalmol* 1997;81:732-734.

82. Dohlman CH, Schneider HA, Doane MG. Prosthokeratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1974;77:694-700.

83. Donshik PC, Berman MB, Dohlman CH, et al. Effect of topical corticosteroids on ulceration in alkali-burned corneas. *Arch Ophthalmol* 1978;96:2117-2120.

84. Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1990;110: 646-656.

85. Dua HS, Gomes JA, Sing A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994;78:401-408.

86. Dua HS, King AJ, Joseph A. A new classification of ocular surface burns. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1379-1383.

87. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44: 415-425.

88. Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell

deficiency. *Br J Ophthalmol* 2000;84: 273-278.

89. Dua HS, Azuara-Blanco A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 1999;83:414-419.

90. Dua HS, Azuara-Blanco A. Discussion on amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:990.

91. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1407-1411.

92. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28: 1450-1456.

93. Eisen AZ, Jeffrey JJ, Gross J. Human skin collagenase: isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim Biophys Acta* 1968;151:637-645.

94. Fini ME, Cui TY, Mouldovan A, et al. An inhibitor of the matrix metalloproteinase synthesized by rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2997-3001.

95. Fini ME, Girard MT. Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1779-1788.

96. Fini ME, Girard MT. The pattern of metalloproteinase expression by corneal fibroblasts is altered by passage in cell culture. *J Cell Sci* 1990;97:373-383.

97. Fini ME, Girard MT, Matsubara M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl* 1992;202:26-33.

98. Fini ME, Plucinska IM, Mayer AS, et al. A gene for rabbit synovial cell collagenase: member of a family of metalloproteinases that degrade connective tissue matrix. *Biochemistry* 1987;26:6156-6165.

99. Fini ME, Strissel KJ, Girard MT, Mays JW, Rinehart WB. Interleukin 1 alpha mediates collagenase synthesis stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 1994;269:11291-11298.

100. Fini ME, Yue BY, Sugar J. Collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases in normal and keratocornus corneas. *Curr Eye Res* 1992;11:849-862.

101. Flach AJ, Graham J, Kruger LP, et al. Quantitative assessment of postsurgical breakdown of the blood-aqueous barrier following administration of 0.5% ketorolac tromethamine solution. A double-masked, paired comparison with vehicle-placebo solution study. *Arch Ophthalmol* 1988;106:344-347.

102. Flach AJ, Jaffe NS, Akers WA. The effect of ketorolac tromethamine in reducing postoperative inflammation: double-mask parallel comparison with

- dexamethasone. *Ann Ophthalmol* 1989;21:407-411.
103. Flach AJ, Kraff MC, Sanders DR, Tanenbaum L. The quantitative effect of 0.5% ketorolac tromethamine solution and 0.1% dexamethasone sodium phosphate solution on postsurgical blood-aqueous barrier. *Arch Ophthalmol* 1988;106:480-483.
104. Flach AJ, Lavelle CJ, Olander KW, et al. The effect of ketorolac tromethamine 0.5% in reducing postoperative inflammation after cataract extraction and intraocular lens implantation. *Ophthalmology* 1988;95:1279-1284.
105. Flach AJ, Stegman RC, Graham J, Kruger LP. Prophylaxis of aphakic cystoid macular edema without corticosteroids. A paired-comparison, placebo-controlled, double masked study. *Ophthalmology* 1990;97:1253-1258.
106. Fogle JA, Kenyon KR, Foster CS. Tissue adhesive arrests stromal melting in the human cornea. *Am J Ophthalmol* 1980;89:795-802.
107. Fogle JA, Kenyon KR, Stark WJ. Damage to epithelial basement membrane by thermokeratoplasmy. *Am J Ophthalmol* 1977;83:392-4011.
108. Foster CS. Cicatricial pemphigoid. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1986;84:527-663.
109. Foster CS, Wilson LA, Ekins MB. Immunosuppressive therapy in ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1982;89:340-353.
110. Foster CS, Zelt R, Kenyon KR, et al. Ascorbate therapy for experimental chemical burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(Suppl):227.
111. Foster CS, Zelt RP, Mai-Phan T, Kenyon KR. Immunosuppression and selective inflammatory cell depletion: studies on a guinea pig model of corneal ulceration after ocular alkali burning. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1820-1824.
112. Francois J, Cambie E, Feber J, Van Den Eeckhour E. Collagenase inhibitors (penicillamine). *Ann Ophthalmol* 1973;5:391-410.
113. Francois J, Feber J. Studies with the polarization microscope of the fibroblastic activity of the regenerating rabbit's cornea under the influence of corticosteroids. *Exp Eye Res* 1973;15:471-483.
114. Frati L, Cenci G, Sharaglia G, et al. Levels of epidermal growth factor in mice tissues measured by a specific radioreceptor assay. *Life Sci* 1976;18:905-912.
115. Frati L, Daniele S, Delogu A, Covelli I. Selective binding of epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells in the cornea. *Exp Eye Res* 1972;14:135-141.
116. Fredj-Reygrobellet D, Plouet J, Delayre T, et al. Effects of α FGF and β FGF on wound healing in rabbit corneas. *Curr Eye Res* 1987;6:1205-1209.
117. Friedenwald JS. Growth pressure and metaplasia of conjunctival and corneal epithelium. *Doc Ophthalmol* 1951;5-6:184-192.
118. Friedenwald JS, Buschke W. Some factors concerned in the mitotic and wound-healing activities of the corneal epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1944;42:371-383.
119. Friedenwald JS, Hughes WF, Hermann H. Acid burns of the eye. *Arch Ophthalmol* 1946;35:98-108.
120. Friend J, Thoft RA. Functional competence of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17:134-139.
121. Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, et al. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest* 1982;45:1120-1129.
122. Fujisawa K, Katakami C, Yamamoto M. Effect of epidermal growth factor on epithelial cells and keratocytes during wound healing of alkali-burned cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31 (Suppl):225.
123. Fujisawa K, Katakami C, Yamamoto M. Keratocyte activity during wound healing of alkali-burned cornea. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1991;95:59-66.
124. Gabler WL, Creamer HR. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *J Periodont Res* 1991;26:52-58.
125. Garbisa S, Ballin M, Daga-Giordini D, et al. Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase by human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1986;261:2369-2375.
126. Gartaganis SP, Margaritis LH, Koliopoulous JX. The corneal epithelium basement membrane complexes after alkali burns: an ultrastructural study. *Ann Ophthalmol* 1987;19:263-268.
127. Gasset AR, Lorenzetti DW, Ellison EM, Kaufman HE. Quantitative corticosteroid effect on corneal wound healing. *Arch Ophthalmol* 1969;81:589-591.
128. Geanon J, Tripathi B, Tripathi R. The localization of tissue plasminogen activator by a monoclonal antibody in human and monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28(Suppl):108.
129. Geanon J, Tripathi B, Tripathi R, Barlow G. Tissue plasminogen activator in avascular tissues of the eye: a quantitative study of its activity in the cornea, lens, and aqueous and vitreous humors of dog, calf, and monkey. *Exp Eye Res* 1987;44:55-63.
130. Geggel HS, Thoft RA, Friend J. Histology of human conjunctival transplantation. *Cornea*

- 1984;3:11-15.
131. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale AS. Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *De Biol* 1988;126:253-262.
132. Cipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Keogh M. Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:423-434.
133. Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor-beta and interleukin-I modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2441-2454.
134. Girard MT, Matsubara M, Kublin C, et al. Stromal fibroblasts, synthesize collagenase and stromelysin during long term tissue remodeling. *J Cell Sci* 1993;104:1001-1011.
135. Gnadinger MC, Itoi M, Slansky HH, Dohlman CH. The role of collagenase in the alkali-burned cornea. *Am J Ophthalmol* 1969;68:478-483.
136. Goldberg GL, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ. Human 72 Kilodalton type IV collagenase forms a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;86:8207-8211.
137. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Ophthalmol Soc* 1982;80:155-171.
138. Golub LM, Lee HM, Lehrer G, et al. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes: preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodont Res* 1983;18:516-526.
139. Golub LM, McNamara TF, D'Angelo G, Greenwald RA. A non antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* 1987;66:1310-1314.
140. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity: a new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodont Res* 1984;19:651-655.
141. Golub LM, Wolff M, Lee HM, et al. Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodont Res* 1985;20:12-23.
142. Gordon JM, Bauer EA, Eisen AZ. Collagenase in the human cornea: immunologic localization. *Arch Ophthalmol* 1980;98:341-345.
143. Gospodarowicz D, Mescher AL, Brown K, Birdwell C. The role of fibroblast growth factor and epidermal growth factor in the proliferative response of corneal and lens epithelium. *Exp Eye Res* 1977;25:631-649.
144. Granelli-Piperno A, Vassalli JD, Reich E. Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1977;146:1693-1706.
145. Grant WM. Toxicology of the Eye. Drugs, Chemicals, Plants, Venoms. Springfield, Charles C. Thomas, ed.2, 1974;5-22.
146. Grant WM. Experimental investigation of paracentesis in the treatment of ocular ammonia burns. *Arch Ophthalmol* 1950;44:399-404.
147. Grant WM. Ocular injury due to sulfur dioxide: II. Experimental study and comparison with ocular effects of freezing. *Arch Ophthalmol* 1947;38:762-774.
148. Grant WM, Kern HL. Action of alkalis on the corneal stroma. *Arch Ophthalmol* 1955;54:931-934.
149. Gray RD, Miller RB, Spatola AF. Inhibition of mammalian collagenase by thiol-containing peptides. *J Cell Biochem* 1986;32:71-77.
150. Gray RD, Saneii HH, Spatola AF. Metal binding peptide inhibitors of vertebrate collagenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;101:1251-1258.
151. Greenwald RA, Golub LM, Laviates B, et al. Tetracyclines inhibit human synovial collagenase in vivo and in vitro. *J Rheumatol* 1987;14:28-32.
152. Greiner JV, Covington HI, Allansmith MR. The human limbus. A scanning electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 1979;97:1159-1165.
153. Gross J. An essay on biological degradation of collagen. In: Hay ED, Ed. Cell Biology of the Extracellular Matrix. New York, Plenum, 1982;217-258.
154. Gross J, Azizkhan RG, Biswas C, et al. Inhibition of tumor growth, vascularization, and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1176-1180.
155. Gundersen T. Conjunctival flaps in the treatment of corneal disease, with reference to a new technique of application. *Arch Ophthalmol* 1958;60:880-888.
156. Haddox JL, Pfister RR, Sommers CI. A visual assay for quantitating neutrophil chemotaxis in a collagen gel matrix. A novel chemotactic chamber. *J Immunol Methods* 1991;141:41-52.
157. Haddox JL, Pfister RR, Yuille-Barr D. The efficacy of topical citrate after alkali injury is dependent on the period of time it is administered. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1062-1068.
158. Haddox JL, Pfister RR, Slaughter SE. An excess of topical calcium and magnesium reverses the therapeutic effect of citrate on the development of corneal ulcers after alkali injury. *Cornea* 1996;15: 191-195.
159. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation

- and maintenance of cellular activity. *Development* 1989;106:619-633.
160. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 1961;65:695-698.
161. Hanna C, O'Brien JE. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol* 1960;64:536-539.
162. Harris ED Jr, Welgus HG, Krane SM. Regulation of mammalian collagenases. *Coll Relat Res* 1984;4:493-512.
163. Harris LH, Cohn K, Galin MA. Alkali injury from fireworks. *Ann Ophthalmol* 1971;3:849-851.
164. Harris TM, Berry ER, Pakurar AS, Sheppard LB. Biochemical transformation of bulbar conjunctiva into corneal epithelium: an electrophoretic analysis. *Exp Eye Res* 1985;41:597-606.
165. Hay ED. Development of the vertebrate cornea. In: Bourne GH, Danielli JF, Eds. *International Review of Cytology*. New York, Academic Press, 1980;263-322.
166. Hayashi K, Berman M, Smith D, et al. Pathogenesis of corneal epithelial defects: role of plasminogen activator. *Curr Eye Res* 1991;10:381-398.
167. Hayashi K, Sueishi K. Fibrinolytic activity, and species of plasminogen activator in human tears. *Exp Eye Res* 1988;46: 131-137.
168. Hembry RM, Ehrlich HP. Immunolocalization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol* 1986;115:409-420.
169. Henriquez AS, Pihlaja DJ, Dohlman CH. Surface ultrastructure in alkali-burned rabbit corneas. *Am J Ophthalmol* 1976;81:324-331.
170. Herman WK, Doughman DJ, Lindstrom RL. Conjunctival autograft transplantation for unilateral ocular surface diseases. *Ophthalmology* 1983;90: 1121-1126.
171. Herr RD, White GL Jr, Bernhisel K, et al. Clinical comparison of ocular irrigation fluids following chemical injury. *Am J Emerg Med* 1991;9:228-231.
172. Hersh PS, Rice BA, Baer JC, et al. Topical non-steroidal agents and corneal wound healing. *Arch Ophthalmol* 1990;108:577-583.
173. Hesterberg TW, Maness SC, Iglehart JD, et al. Subpopulations of human bronchial epithelial cells in culture respond heterogeneously to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and other modulators of differentiation. *Carcinogenesis* 1987;8:1511-1515.
174. Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, et al. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1985;260:2493-2500.
175. Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1987;80:1644-1650.
176. Hirst LW, Fogle JA, Kenyon KR, Stark WJ. Corneal epithelial regeneration and adhesion following acid burns in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:764-773.
177. Hirst LW, Lee GA. Corneoscleral transplantation for and stage corneal disease. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1276-1279.
178. Ho PC, Davis WH, Elliott JH, Cohen S. Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1974; 13:804-809.
179. Ho PC, Elliott JH. Kinetics of corneal epithelial regeneration. II. Epithelial growth factor and topical corticosteroids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1975;14:630-633.
180. Holland EJ, Schwartz GS. Devolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea* 1996;15(6):549-556.
181. Holland EJ. Epithelial Transplantation for the management of severe ocular disease. *Tr Am Ophthalm Soc* 1996;Vol XCIV:677-743.
182. Hook CW, Brown SI, Iwanij W, Nakanishi I. Characterization and inhibition of corneal collagenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1971;10:496-503.
183. Hook RM, Hook CW, Brown SI. Fibroblast collagenase: partial purification and characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12:771-776.
184. Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T, Stetler-Stevenson W, et al. Monoclonal antibodies to type IV collagenase recognize a protein with limited sequence homology to interstitial collagenase and stromelysin. *FEBS Lett* 1988;233:109-113.
185. Huang AJW, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:96-105.
186. Huang AJW, Tseng SCG. Development of monoclonal antibodies to rabbit ocular mucin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1483-1491.
187. Huang AJW, Tseng SCG, Farazdaghi M, Kenyon KR. Modulation of paracellular permeability during corneal epithelial wound healing. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1986;27(Suppl):54.

188. Huang AJW, Watson BD, Hernandez E, Tseng SCG. Induction of conjunctival transdifferentiation on vascularized corneas by photothrombotic occlusion of corneal vascularization. *Ophthalmology* 1988;95:228-235.
189. Hughes WF. Alkali burns of the cornea. II. Clinical and pathologic course. *Arch Ophthalmol* 1946;36:189-214.
190. Hughes WF. Alkali burns of the cornea. II. Review of the literature and summary of present knowledge. *Arch Ophthalmol* 1946;35:423-426.
191. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 1990;265:11077-11082.
192. Ibsen KH, Ruist MR. The biochemistry and physiology of the tetracyclines. *Clin Orthop* 1964;32:143-169.
193. Ihalainen A, Salo T, Forsius H, Peltonen L. Increase in type I and type IV collagenolytic activity in primary cultures of keratoconus cornea. *Eur J Clin Invest* 1986;16:78-84.
194. Ishizaki M, Zhu G, Haseba T, et al. Expression of collagen I, smooth muscle alpha-actin, and vimentin during the healing, of alkali-burned and lacerated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3320-3328.
195. Itoi NI, Gnadinger MC, Slansky HH, et al. Collagenase in the cornea. *Exp Eye Res* 1969;8:368-373.
196. Johnson WH, Robert NA, Borkakoti N. Collagenase inhibitors: their design and potential therapeutic use. *J Enzym Inhib* 1987;2:1-22.
197. Johnson-Muller B, Gross J. Regulation of corneal collagenase production: epithelial-stromal cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:4417-4421.
198. Johnson-Wint B. Autocrine regulation of collagenase production by passaged corneal stromal cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28(Suppl):230.
199. Johnson-Wint B. Regulation of stromal cell collagenase production in adult rabbit cornea: in vitro stimulation and inhibition by epithelial cell products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5531-5535.
200. Johnson-Wint B, Bauer EA. Stimulation of collagenase synthesis by a 20,000-dalton epithelial cytokine. *J Biol Chem* 1985;260:2080-2085.
201. Johnson-Wint B, Gross J. Regulation of connective tissue collagenase production: stimulation from adult and fetal epidermal cells. *J Cell Biol* 1984;98:90-96.
202. Johnson MC, Noden DM, Hazelton RD, et al. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 1979;29:27-43.
203. Jumblatt MM, Neufeld AH. A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:8-13.
204. Kandarakis A, Page C, Kauffman H. The effect of epidermal growth factor on epithelial healing after penetrating keratoplasty in human eyes. *Am J Ophthalmol* 1976;98:411-415.
205. Kao WWY, Ebert J, Kao CWC, et al. Development of monoclonal antibodies recognizing collagenase from rabbit PMN: the presence of this enzyme in ulcerating corneas. *Curr Eye Res* 1986;5:801-805.
206. Kao WWY, Verges JP, Ebert J, et al. Increased collagenase and gelatinase activity in keratoconus. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:929-936.
207. Katakami C, Fujisawa K, Sahori A, et al. Localization of collagen (1) and collagenase mRNA by in situ hybridization during corneal wound healing after epikeratophakia or alkali-burn. *Jpn J Ophthalmol* 1992;36:10-22.
208. Katakami C, Hung JT, Cardell RR, et al. Synthesis of collagen by lacerated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27(Suppl):209.
209. Katakami C, Perkins T, Dorfman N, et al. Polymorphonuclear leukocytes inhibit proliferation of epithelial cells in rabbit cornea. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1988;92:798-805.
210. Katakami C, Sahori A, Razusa R, et al. Keratocyte activity during wound healing following epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1837-1845.
211. Kaufman HE. Surgical approaches to corneal wound healing. *Acta Ophthalmol* 1997;202 (Suppl):84-87.
212. Kaye DB. Epithelial response in penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1980;89:381-387.
213. Kenyon KR. Decision making in the therapy of external eye disease: noninfected corneal ulcers. *Ophthalmology* 1982;89:44-51.
214. Kenyon KR. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1985;83:610-663.
215. Kenyon KR, Rapoza PA. Limbal allograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102 (Suppl):101-102.
216. Kenyon KR, Berman M, Rose J, Gage J. Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:570-587.

217. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-722.
218. Kenyon KR, Wagoner MD. Advances in the therapy of recurrent erosion and persistent epithelial defects of the corneal epithelium. Focal Points: Clinical Modules for Ophthalmologists. *Am Acad Ophthalmol, San Francisco* 1991;Vol. 9:9.
219. Kenyon KR, Wagoner MD, Hettlinger ME. Conjunctival autograft transplantation for advanced and recurrent pterygium. *Ophthalmology* 1985;92:1461-1470.
220. Kinoshita S, Friend J, Kiorpes TC, Thoft RA. Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:577-581.
221. Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunctival to corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1008-1014.
222. Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:434-441.
223. Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA. Limbal epithelium in ocular surface wound healing. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:73-80.
224. Kinoshita S, Manaba S. Chemical burns. In: Brightbill FS, Ed. *Corneal Surgery*. St Louis, CV Mosby, 1986;370-379.
225. Kinoshita S, Ohashi Y, Ohji M, Manabe R. Long-term results of keratoepithelioplasty, in Mooren's ulcer. *Ophthalmology* 1991;98:438-445.
226. Klein R, Lobes LA Jr. Ocular alkali burns in a large urban area. *Ann Ophthalmol* 1976;8:1185-1189.
227. Klein-Szanto AJP, Slaga TJ. Numerical variations of dark cells in normal and chemically induced hyperplastic epidermis with age of animal and efficiency of tumor promoter. *Cancer Res* 1981;41:4437-4440.
228. Koob TF, Jeffrey JJ, Eisen ZZ. Regulation of human skin collagenase activity by hydrocortisone and dexamethasone in organ culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1083-1088.
229. Kozarsky AM, Knight SH, Waring, GO. Clinical results, with a ceramic keratoprosthesis placed through the eyelid. *Ophthalmology* 1987;94:904-911.
230. Kramer SG. Late numerical grading of alkali burns to determine Keratoplasty prognosis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1983;81:97-106.
231. Kruse FE, Tseng SCG. Retinoic acid regulates clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2405-2420.
232. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 1994;8:170-183.
233. Kuckelkorn R, Becker J, Reim M. Tarsoconjunctival advancement-a surgical procedure in cicatricial entropion with marginal tarsus deformation. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1993;202:102-109.
234. Kuckelkorn R, Kottek A, Reim M. Intraocular complications after severe chemical burns-incidence and surgical treatment. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1994;205:86-92.
235. Kuckelkorn R, Luft I, Kottek AA, et al. Chemical and thermal eye burns in the residential area of RWTH Aachen. Analysis of accidents in 1 year using a new automated documentation of findings. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1993;203:34-42.
236. Kuckelkorn R, Makropoulos W, Kotteck A, Reim M. Retrospective study of severe alkali burns of the eyes. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1993;203:397-402.
237. Kuckelkorn R, Redbrake C, Schrage NF, Reim M. Keratoplasty with 11-12 mm diameter for management of severely chemically-burned eyes. *Ophthalmologie* 1993;90:683-687.
238. Kuckelkorn R, Schrage N, Reim M. Treatment of severe eye burns by tenoplasty (letter). *Lancet* 1995;345:657-658.
239. Kuckelkorn R, Wenzel M, Lamprecht J, et al. Autologous transplantation of nasal mucosa after severe chemical and thermal eye burns. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1994;204:155-161.
240. Kuckelkorn R, Redbrake C, Reim M. Tenoplasty: a new surgical approach for the treatment of severe eye burns. *Ophthalmic Surg Lasers* 1997;28:105-110.
241. Kuckelkorn R, Schrage N, Keller G, Redbrake C. Emergency treatment of chemical and thermal eye burns. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:4-10.
242. Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG. Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Inv Ophthalmol* 1976;15:4-14.
243. Kuter I, Johnson-Wint B, Beupre N, Gross J. Collagenase secretion accompanying changes in cell shape occurs only in the presence of a biologically active cytokine. *J Cell Sci* 1989;92:473-485.
244. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S, et al. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102:1020-1025.
245. Lande MA, Birk DE, Nagpal ML, Rader RL.

- Phagocytic properties of human keratocyte cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20:481-489.
246. Lass JH, Campbell RC, Rose J, et al. Medroxyprogesterone on corneal ulceration: its effects after alkali burns on rabbits. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:673-676.
247. Lauhio A, Sorsa T, Lindy O, et al. The anticollagenolytic potential of lymecycline in the long-term treatment of reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:195-198.
248. Lavker RM, Dong G, Cotsarelis G, Sun TT. Limbal basal epithelial cells display characteristics consistent with stem cells from various stratifying epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(Suppl):191.
249. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells. *J Invest Dermatol* 1983;81(Suppl.1):121s-127s.
250. Lavker RM, Sun TT. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes. Morphological functional correlations. *Science* 1982;25:1239-1241.
251. Lazarus GS, Brown RS, Daniels JR, et al. Human granulocyte collagenase. *Science* 1968;159: 1483-1485.
252. Lazarus GS, Daniels JR, Brown RS, et al. Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. *J Clin Invest* 1968;47:2622-2629.
253. Leblond CP. The life history of cells in renewing systems. *Am J Anat* 1981;160:114-158.
254. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-312.
255. Leibowitz HM. Management of inflammation in the cornea and conjunctiva. *Ophthalmology* 1980;87:753-758.
256. Levinson RA, Paterson CA, Pfister RR. Ascorbic acid prevents corneal ulceration and perforation following experimental alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1976;15:986-993.
257. Lewallen S. A randomized trial of conjunctival autografting for pterygium in the tropics. *Ophthalmology* 1989;96:1612-1614.
258. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, et al. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2672-2679.
259. Lindy O, Sorsa T, Saari H, et al. Doxycycline inhibits the serpinase activity of human neutrophil collagenase (abstract). The International Congress on Inflammation. Biennial Forum for Basic and Clinical Research. Rome;1991;October 6-11.
260. Macartney A, Tschesche H. Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases. *J Biochem* 1983;130:71-78.
261. MacKenzie IC. Relationship between mitosis and ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature* 1970;226:653-655.
262. MacKenzie IC. Ordered structure of the stratum corneum of mammalian skin. *Nature* 1969;222:881-882.
263. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology* 1994;101:1536-1547.
264. Matrisian LM, Hogan BL. Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol* 1990;24:219-259.
265. Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea. *Dev Biol* 1991;147:425-439.
266. Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:3221-3237.
267. Matsuda H, Smelser GK. Endothelial cells in alkali-burned corneas: ultrastructural alterations. *Arch Ophthalmol* 1973;89:402-409.
268. Matsuda H, Smelser GK. Epithelium and stroma in alkali-burned corneas. *Arch Ophthalmol* 1973;89:396-401.
269. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:897-900.
270. Maumenee AE. Repair in cornea. *Adv Biol Skin* 1964;5:208-215.
271. McCulley JP. Ocular hydrofluoric acid burns: animal model, mechanism of injury and therapy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990;88:649-684.
272. McCulley JP. Chemical injuries. In: Smolin G, Thoft RA, Eds. *The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice*. Boston, Little, Brown and Co, 1987;ed.2:527-542.
273. McCulley JP, Pettit M, Lauber S. Treatment of experimental ocular hydrofluoric acid burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(Suppl):228.
274. McCulley JP, Slansky HH, Pavan-Langston D, Dohlman CH. Collagenolytic activity in experimental herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol* 1970;84:516-519.
275. Meller D, Pires RT, Mack RJ, et al. Amniotic

- membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:980-989.
276. Meller D, Tseng SCG. Rekonstruktion der konjunktivalen und kornealen oberfläche. Transplantation von amnionmembran. *Ophthalmologie* 1998;95:805-813.
277. Meller D, Tseng SCG. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:878-886.
278. Meller D, Pires RTF, Mack RJS, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:980-990.
279. Milstone LM, LaVigne JF. Heterogeneity of basal keratinocytes: non-random distribution of the thymidine-labeled basal cells in confluent cultures is not a technical artifact. *J Invest Dermatol* 1985;84:504-507.
280. Mishima H, Yasumoto K, Nishida T, Otari T. Fibronectin enhances the phagocytic activity of cultured rabbit keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1521-1526.
281. Mishima S, Hedbys BO. The permeability of the corneal epithelium and endothelium to water. *Exp Eye Res* 1967;6:1032.
282. Mondino BJ, Brown SI. Ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1981;88:95-100.
283. Mondino BJ, Brown SI, Lempert S, Jenkins MS. The acute manifestations of ocular cicatricial pemphigoid: diagnosis and treatment. *Ophthalmology* 1979;86:543-552.
284. Morgan SJ. Chemical burns of the eye: causes and management. *Br J Ophthalmol* 1987;71:854-857.
285. Morgan S, Murray A. Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. *Eye* 1996;10:349-354.
286. Morioka S, Lazarus J, Baird L, Jensen P. Migrating keratinocytes express urokinase-type plasminogen activator. *J Invest Dermatol* 1987;88:418-423.
287. Morris RJ, Fischer SM, Slaga TJ. Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations. *J Invest Dermatol* 1985;84:277-281.
288. Moses RA, Parkison C, Schuchardt R. A standard large wound of the corneal epithelium in the rabbit. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:103-106.
289. Muller D, Quantine B, Gensel MC, et al. The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem J* 1988;253:187-192.
290. Muraine M, Salessy P, Watt L, Retout A, Brasseur G. Limbal autograft transplantation, eight consecutive cases. *J Fr Ophthalmol* 2000 Feb;23(2):141-150.
291. Murphy G. The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors. In: Ackerman NR, Bonney RJ, Welton AF, Eds. *Progress in Inflammation Research and Therapy*, Basel, Birkhauser Verlag, 1991;69-76.
292. Murphy G, Hembry RM, McGarrity AM, et al. Gelatinase (type IV collagenase) immunolocalization in cells and tissues: use of an antiserum to rabbit bone gelatinase that identifies high and low Mr forms. *J Cell Sci* 1989;92:487-495.
293. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, et al. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 1991;30:8097-8102.
294. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase from human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 1982;203:209-221.
295. Murphy G, Ward R, Hembry RM, et al. Characterization of gelatinase from pig polyimorphonuclear leukocytes: A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem J* 1989;259:463-472.
296. Naumann GOH, Lang GK, Rummelt V, Wiggand ME. Autologous nasal mucosa transplantation in severe bilateral conjunctival. mucus deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1990;97:1011-1017.
297. Newsome DA, Foidart JM, Hassell JR, et al. Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20:738-750.
298. Newsome DA, Gross JA. Regulation of corneal collagenase production: stimulation of serially-passaged stromal cells by blood mononuclear cells. *Cell* 1979;16:895-900.
299. Newsome DA, Gross JA. Prevention by medroxyprogesterone of perforation of the alkali-burned rabbit cornea: inhibition of collagenolytic activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:21-31.
300. Nishida T, Nakagawa S, Nishibiyashi C, et al. Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo. *Arch Ophthalmol* 1984;102:455-456.
301. Nishida T, Nakagawa S, Watanabe K, et al. A peptide from fibronectin cell-binding domain inhibits attachment of epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1820-1825.
302. Ogloblina OG, Platonova LV, Pashkina TS, et al. On the identity of the kininogenase and plasminogen activators of human granulocytes. *Biokhimiya* 1984;49:302-309.
303. Olsen BR, McCarthv MT. Molecular structure

- of the sclera, cornea, and vitreous body. In: Albert DM, Jakobiec FA, Eds. Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences. Philadelphia, WB Saunders, 1994;38-63.
304. Overall CM, Wrana JL, Sodden J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression by human fibroblasts by transforming growth factor B. *J Biol Chem* 1989;264:1860-1869.
305. Panda A. Lamellolamellar sclerokeratoplasty. Where do we stand today. *Eye* 1999;13:21-25.
306. Park J, Tripathi B, Tripathi R. Distribution of urokinase-like plasminogen activator in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(Suppl):207.
307. Paterson CA, Eakins KE, Paterson RM, et al. The ocular hypertensive response following experimental acid burns in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;67-74.
308. Paterson CA, Pfister RR. Intraocular pressure changes after alkali burns. *Arch Ophthalmol* 1974;91:211-218.
309. Paterson CA, Pfister RR, Levinson RA. Aqueous humor pH changes after experimental alkali burns. *Am J Ophthalmol* 1975;79:414-419.
310. Paterson CA, Wells JG, Koklitis PA, et al. Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type-1 suppresses alkali-burn-induced corneal ulceration in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:677-684.
311. Paterson CA, Williams RN. Sodium citrate inhibits PMN accumulation in aqueous humor and iris-ciliary body following endotoxin-induced inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24(Suppl):199.
312. Paterson CA, Williams RN, Parker AW. Characteristics of polymorphonuclear leukocyte infiltration into the alkali-burned eye and influence of sodium citrate. *Exp Eye Res* 1984;39:701-708.
313. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surface with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-993.
314. Perry HD, Golub LM. Systemic tetracyclines in the treatment of noninfected corneal ulcers. A case report and proposed new mechanism of action. *Ann Ophthalmol* 1985;17:742-744.
315. Perry HD, Hodes LW, Seedor JA, et al. Effect of doxycycline hyclate on corneal epithelial wound healing in the rabbit alkali-burn model. Preliminary observations. *Cornea* 1993;12:379-382.
316. Petrone WF, McCord JM, English DK, Wong K: Free radicals and inflammation. Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1159-1163.
317. Petroustos G, Courty J, Guimaraes R, et al. Comparison of the effects of EGF, pFGE and EDGF on corneal epithelium wound healing. *Curr Eye Res* 1984;3:593-598.
318. Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells. *CLAO J* 1994;20:64-72.
319. Pfister RR. Chemical corneal burns. *Int Ophthalmol Clin* 1984;24:157-168.
320. Pfister RR. Chemical injuries of the eye. *Ophthalmology* 1983;90:619-633.
321. Pfister RR. The effects of chemical injury on the ocular surface. *Ophthalmology* 1983;90:601-609.
323. Pfister RR, Burstein N. The alkali-burned cornea. I. Epithelial and stromal repair. *Exp Eye Res* 1976;23:519-535.
324. Pfister RR, Burstein N. The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservations on corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1976;15:246-259.
325. Pfister RR, Friend J, Dohlman CH. The anterior segments of rabbits after alkali burns. *Arch Ophthalmol* 1971;86:189-193.
326. Pfister RR, Haddox JL, Dodson RW, et al. The effect of citrate and other components on polymorphonuclear leukocytes incubated in vitro: further studies on the site and mechanism of action of citrate. *Cornea* 1984/1985;3:240-249.
327. Pfister RR, Haddox JL, Dodson RW, Deshazo WF. Polymorphonuclear leukocyte inhibition by citrate, other heavy metal chelators, and trifluoperazine: evidence to support calcium binding protein involvement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:955-970.
328. Pfister RR, Haddox JL, Dodson RW, Harkins LE. Alkali-burned collagen produces a locomotory and metabolic stimulant to neutrophils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:295-304.
329. Pfister RR, Haddox JL, Dodson RW, Harkins LE. Alkali burned collagen produces a factor stimulatory to PMN. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(Suppl):6.
330. Pfister RR, Haddox JL, Harkins LE, Dodson RW. The effects of citrate on fMLP-induced polymorphonuclear leukocyte stimulation and locomotion. *Cornea* 1984/1985;3:183-188.
331. Pfister RR, Haddox JL, Lam KW, Lank KM. Preliminary characterization of a polymorphonuclear leukocyte stimulant isolated from alkali-treated collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:955-962.

332. Pfister RR, Haddox JL, Lank KM. Citrate or ascorbate-citrate treatment of established corneal ulcers in the alkali injured rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1110-1115.
333. Pfister RR, Haddox JL, Paterson CA. The efficacy of sodium citrate in the treatment of severe alkali burns of the eye is influenced by the route of administration. *Cornea* 1982;1:205-211.
334. Pfister RR, Haddox JL, Snyder TL. Topical citrate inhibits the adherence of neutrophils in postcapillary venules. *Cornea* 1990;9:238-245.
335. Pfister RR, Haddox JL, Snyder TL. The effects of citrate on the adherence of neutrophils to nylon fibers in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:869-875.
336. Pfister RR, Haddox JL, Sommers CI. Alkali-degraded cornea generates a low molecular weight chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2297-2304.
337. Pfister RR, Haddox JL, Yuille-Barr D. The combined effect of citrate/ascorbate treatment in alkali-injured rabbit eyes. *Cornea* 1991;10:100-104.
338. Pfister RR, McCulley JP, Friend J, Dohlman CH. Collagenase activity of intact corneal epithelium in peripheral alkali burns. *Arch Ophthalmol* 1971;86:308-313.
339. Pfister RR, Nicolario ML, Paterson CA. Sodium citrate reduces the incidence of corneal ulcerations and perforations in extreme alkali-burned eyes-acetylcysteine and ascorbate have no favorable effect. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;21:486-490.
340. Pfister RR, Paterson CA. Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye. *Ophthalmology* 1980;87:1050-1057.
341. Pfister RR, Paterson CA. Additional clinical and morphological observations on the favorable effect of ascorbate in experimental ocular alkali burns. *Invest Vis Sci* 1977;16:478-487.
342. Pfister RR, Haddox JL, Sommers CI. Effect of synthetic metalloproteinase inhibitor or citrate on neutrophil chemotaxis and the respiratory burst. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1340-1349.
343. Pfister RR, Paterson CA, Haves SA. Effect of topical 10% ascorbate solution on established corneal ulcers after severe alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:382-385.
344. Pfister RR, Paterson CA, Hayes SA. Topical ascorbate decreases the incidence of corneal ulceration after experimental alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17:1019-1024.
345. Pfister RR, Paterson CA, Spiers JW, et al. The efficacy of ascorbate treatment after severe experimental alkali-burns depends upon the route of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19:1526-1529.
346. Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA, et al. Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J* 1987;104:494-501.
347. Phan TM, Foster CS, Shaw CD, et al. Topical fibronectin in an alkali burn model of corneal ulceration in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991;109:414-419.
348. Phan TM, Zelt RP, Kenyon KR, et al. Ascorbic acid therapy in a thermal burn model of corneal ulceration in rabbits. *Am J Ophthalmol* 1985;99:74-82.
349. Philipp W, Gottinger W. Leukocyte adhesion molecules in diseased corneas. *Invest Vis Sci* 1993;34:2449-2459.
350. Phillips K, Arffa R, Cintron C, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch* 1983;101:640-643.
351. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1291-1297.
352. Polack FM, Rosen PN. Topical steroids and tritiated thymidine uptake: effect on corneal healing. *Arch Ophthalmol* 1967;77:400-404.
353. Potten CS. Cell replacement in the epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol* 1981;69: 271-318.
354. Potten CS. Epithelial proliferations subpopulations. In: Lord BI, Potten CS, Cole RJ, Eds. *Stem Cells and Tissue Homeostasis*. Cambridge, Cambridge University Press, 1978;317.
355. Potten CS. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal epithelial cell. *Cell Tissue Kinct* 1974;7:77-88.
356. Prabhazawat P, Burton K, Burkett G, Tseng SCG. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104:974-985.
357. Prabhazawat P, Tseng SCG. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1360-1367.
358. Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.
359. Rao GN, Blatt HL, Aquavella JV. Results of keratoprosthesis. *Am J* 1979;88:190-196.
360. Redbrake C, Buchal V, Reim M. Keratoplasty

- with a scleral rim alter most severe eye burns. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1996;208:145-151.
361. Rehany U, Lahav M, Shoshan S. Collagenolytic activity in keratoconus. *Ann Ophthalmol* 1982;14:751-753.
362. Reim M. The results of ischaemia in chemical. *Eye* 1992;6:376-380.
363. Reim M. A new treatment concept in severe caustic injuries and thermal burns of the eye. *Fort-schr* 1989;86:722-726.
364. Reim M. Pathogenesis and treatment of caustic burns. *Bull Soc Belge* 1986;213:41-61.
365. Reim M, Busse S, Leber M, Schultz C. Effect of epidermal growth factor in severe experimental alkali burns. *Ophthalmic Res* 1988;20:327-331.
366. Reim M, Kuckelkorn R. Chemical and thermal injuries of the orbital region. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1992;245:21-28.
367. Reim M, Overkamping B, Kuckelkorn R. 2 years experience with Tenon-plasty. *Ophthalmologe* 1992;89:524-530.
368. Reim M, Teping C. Surgical procedures in the treatment of most severe eye burns. Revival of the artificial epithelium. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989;192:47-54.
369. Reim M, Kuckelkorn R. Verätzungen und verbrennungen der augen. *Akt Augenheilk* 1995;20:76-89.
370. Roat MI, Thoft RA. Ocular surface epithelial transplantation. *Int Ophthalmol Clin* 1988;28:169-174.
371. Roper-Hall MJ. Thermal and chemical burns. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1965;85:631-653.
372. Ross R, Benditt EP. Wound healing and collagen formation. II. Fine structure in experimental survey. *J Cell Biol* 1962;2:533-551.
373. Saika S, Kobata S, Hashizume N, et al. Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. Immunohistochemical study. *Cornea* 1993;12:383-390.
374. Saini JB, Sharma A. Ocular clinical burns: clinical and demographic profile. *Burns* 1993;19:67-69.
375. Sakai J, Hung J, Zhu G, et al. Collagen metabolism during healing of lacerated rabbit corneas. *Exp Eye Res* 1991;52:237-244.
376. Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Ann Rev Cell Biol* 1988;4:93-126.
377. Sarnicola V, Perrone A, Addabbo P, Tartaglia B. La cheratectomia superficiale: preparazione alla cheratoplastica perforante nelle causticazioni corneali. Atti congressuali: Trapianto di cornea in Toscana, Castiglione della Pescaia (Gr) 11 ottobre 1997.
378. Sarnicola V. La patologia della superficie oculare. Atti del Congresso «Il trapianto di cornea complicato». Riunione scientifica internazionale 8-9 Ottobre 1999, Castiglione della Pescaia (GR).
379. Sarnicola V, Conti L, Manes C. Approccio in due tempi nelle causticazioni da alcali: cheratectomia superficiale come tecnica chirurgica preparatoria alla cheratoplastica perforante. In: La patologia della superficie oculare. Atti del congresso «Il trapianto di cornea complicato». Castiglione della Pescaia (GR); I.N.C. Ed., 2000;13-29.
380. Savage CJ, Cohen S. Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 1973;15:361-366.
381. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
382. Schirner G, Schrage NF, Salla S, Reim M, Burckard WG. Conjunctival tissue examination in severe eye burns: a study with scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995;233:251-256.
383. Schrage N, Flick S, Aschenbrenner W. Rinsing therapy in severe alkali burns of rabbit eyes. *Vision Res Supplement* 1996;1:248.
384. Schrage N, Flick S, Fischern von T. How do different types of bandages influence the corneal temperature. *Ophthalmologe* 1997;94:492-495.
385. Schultz G, Henkind P, Gross EM. Acid burns of the eye. *Am J Ophthalmol* 1968;66:654-657.
386. Schultz GS, Davis JB, Eiferman RA. Growth factors and corneal epithelium. *Cornea* 1988;7:96-101.
387. Schultz GS, Strelow S, Stern GA, et al. Treatment of alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3325-3331.
388. Seedor JA, Perry HD, McNamara TE, et al. Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1987;105:268-271.
389. Shapiro MIS, Friend J, Thoft KA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:135-142.
390. Sharma A, Coles WH. Kinetics of corneal epithelial maintenance and graft loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1962-1971.
391. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998;82:

235-240.

392. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104:2068-2076.
393. Shingleton BJ. Eye injuries. *N Engl J Med* 1991;325:408-413.
394. Shore JW, Foster CS, Westfall CT, Rubin PAD. Results of buccal mucosal grafting for patients with medically controlled ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1990;99:383-395.
395. Singer A, Sagi A, Ben Meir P, Rosenberg L. Chemical burns: our ten year experience. *Burns* 1992;18:250-252.
396. Singh GA, Foster CS. Epidermal growth factor in alkali burned corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987;103:802-807.
397. Slansky HH, Berman MB, Dohlman CH, Rose J. Cysteine and acetylcysteine in the prevention of corneal ulcerations. *Ann Ophthalmol* 1970;2:488-491.
398. Slansky HH, Dohlman CH. Collagenase and the cornea. *Surv Ophthalmol* 1970;14:402-416.
399. Slansky HH, Dohlman CH, Barman MB. Prevention of corneal ulcers. *Trans Am Ophthalmol Otolaryngol* 1971;75:1208-1211.
400. Slansky HH, Freeman MI. Collagenolytic activity in bovine corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 1968;80:496-498.
401. Slansky HH, Gnadinger MC, Itoi M, Dohlman CH. Collagenase in corneal ulcerations. *Arch Ophthalmol* 1969;82:108-111.
402. Snip R, Kenyon KR. Acute inflammation cells in melting human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17(Suppl):252.
403. Soong K, Martin NF, Wagoner MD, et al. Topical retinoid therapy for squamous metaplasia of various ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1988;95:1442-1446.
404. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic cells. *Science* 1998;241:58-62.
405. Spigelman AW, Vernot AJ, Deutsch TA, et al. Fibronectin in alkali burns of the rabbit cornea. *Cornea* 1985;4:169-173.
406. Sridhar MS, Aashish KB, Virender S, Gullapalli NR. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmol* 2000;130:134-137.
407. Sridhar MS, Bansal AK, Sangwan VS, et al. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmol* 2000;130:134-137.
408. Srinivasan BD, Eakins KE. The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation. *Exp Eye Res* 1979;29:595-600.
409. Srinivasan BD, Kulkarni PS. Inhibitors of the arachidonic acid cascade in the management of ocular inflammation. *Prog Clin Biol Res* 1989;312:229-249.
410. Srinivasan BD, Kulkarni PS. Polymorphonuclear leukocyte response: inhibition following corneal epithelial denudation by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Arch Ophthalmol* 1981;99:1085-1089.
411. Srinivasan BD, Worgul BV, Iwamoto T, Eakins KE. The reepithelialization of rabbit cornea following partial and complete epithelial denudation. *Exp Eye Res* 1977;25:343-351.
412. Stanley JA. Strong alkali burns of the eye. *N Engl J Med* 1965;273:1265-1266.
413. Starck T, Kenyon KR, Serrano F. Conjunctival autograft for primary and recurrent pterygia: surgical technique and problem management. *Cornea* 1991;10:196-202.
414. Stein MR, Naidoff r MA, Dawson CR. Intraocular pressure response to experimental alkali burns. *Am J Ophthalmol* 1973;75:99-109.
415. Stetler-Stevenson WG, Krutzsh HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989;264:17374-17378.
416. Stetler-Stevenson WG, Krutzsh HC, Wacher MP, et al. The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem* 1989;264:17353-17356.
417. Stoiber J, Ruckhofer J, Muss W, Grabner G. Amniotic membrane transplantation with limbal stem cell transplantation as a combined procedure for corneal surface reconstruction after severe thermal or chemical burns. *Ophthalmology* 2002;99(11): 839-848.
418. Strissel KJ, Rinehart WB, Fini ME. A corneal epithelial inhibitor of stromal cell collagenase synthesis identified as TGF-beta 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:151-162.
419. Struck HG, Geiser HG, Block HU, et al. Leukotriene antagonist S 872419 for early-phase treatment of chemical burn in the rabbit eye. *Eur J Ophthalmol* 1991;1:137-141.
420. Struck HG, Geiser HG, Taube C, et al. The anti-phlogistic effect of the ginkgolide BN 52 021 in the chemically burned rabbit eye. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1991;199:278-282.
421. Struck HG, Franke C, Tost M, Taube C. Animal experiment and clinical studies of the use of anti-in-

- flammatory agents in chemical burns of the eye. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1988;193:401-406.
422. Tan DTH, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology* 1996;103:29-36.
423. Tenn PF, Fujikawa LS, Dweeck MD, et al. Fibronectin in alkali-burned rabbit cornea: enhancement of epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26 (Suppl):92.
424. Teping C, Reim M. Tenoplasty as a new surgical principle in the early treatment of the most severe chemical eye burns. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1989;194:1-5.
425. Thoft RA. Conjunctival surgery for corneal disease. In: Smolin G, Thoft RA, Eds. *The Cornea*. Scientific Foundation and Clinical practice, Boston, Little, Brown, and Co, 1987;ed.2:577-589.
426. Thoft RA. Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 1984;97:1-6.
427. Thoft RA. Indications for conjunctival transplantation. *Ophthalmology* 1982;89:335-339.
428. Thoft RA. Conjunctival transplantation as an alternative to keratoplasty. *Ophthalmology* 1979;86:1084-1092.
429. Thoft RA. Chemical and thermal injury. *Int Ophthalmol Clin* 1979;19:243-256.
430. Thoft RA. Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol* 1977;95:1425-1427.
431. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442-1443.
432. Thoft RA, Friend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:14-20.
433. Thoft RA, Friend J, Murphv HS. Ocular surface epithelium and corneal neovascularization in rabbits. I. The role of wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:85-92.
434. Thoft RA, Wiley LA, Sundarrj N. The multipotential cells of the limbus. *Eye* 1989;3:109-113.
435. Thorig L, Wijng:aards G, VanHaeringen N. Immunological characterization and possible origin of plasminogen activator in human tear fluid. *Ophthalmic Res* 1983;15:268-276.
436. Tripathi BJ, Kwait PS, Tripathi RC. Corneal growth factors: a new generation ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea* 1990;9:2-9.
437. Tsai RJ, Sun TT, Tseng SCG. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 1990;97:446-455.
438. Tsai RJ, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994;13:389-400.
439. Tsai RJ, Tseng SCG. Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1995;14:439-449.
440. Tsai RJ, Li L, Chen J. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.
441. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3:141-157.
442. Tseng SCG, Farazdaghi M. Reversal of conjunctival transdifferentiation by topical retinoid acid. *Cornea* 1988;7:273-279.
443. Tseng SCG, Farazdaghi M, Rider AA. Conjunctival transdifferentiation induced by systemic vitamin A deficiency in vascularized rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1497-1504.
444. Tseng SCG, Hatchell D, Tiernev N, et al. Expression of specific keratin markers by rabbit corneal conjunctival and esophageal epithelium during vitamin A deficiency. *J Cell Biol* 1984;99:2279-2286.
445. Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, Green WR. Inhibition of conjunctival transdifferentiation by topical retinoids. *Invest Ophthalmic Vis Sci* 1987;28:538-542.
446. Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, Green WR. Goblet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1168-1176.
447. Tseng SCG, Maumenee AE, Stark WE, et al. Topical retinoid therapy for various eye disorders. *Ophthalmology* 1985;92:717-727.
448. Tseng SCG. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728-733.
449. Tseng SCG, Tsai RJ. Limbal transplantation for ocular surface transplantation-a review. *Fortschr Ophthalmol* 1991;88:236-242.
450. Tseng SCG, Tsubota K. Perspective. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997;124:825-835.
451. Tseng SCG, Prabhazawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765-774.
452. Tseng SCG, Prabhazawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431-441.
453. Tseng SCG, Li DQ, Ma X. Suppression of

- transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell physiol* 1999;179:325-335.
454. Tsubota K, Toda I, Saito H, et al. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102:1486-1495.
455. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.
456. Turgeon PW, Nauheim RC, Roat MI, et al. Indications for keratoepithelioplasty. *Arch Ophthalmol* 1990;108:233-236.
457. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. A Comparison of healing of corneal epithelial wounds stained with fluorescein or Richardson's stain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:127-131.
458. Ucakhan OO, Koklu G, Firat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. *Cornea* 2002;21(2):169-172.
459. Venge P, Olsson I. Cationic proteins of human granulocytes. VI. Effects on complement system and mediation of chemotactic activity. *J Immunol* 1975;115:1505-1508.
460. Vogt A. Atlas of the Slitlamp-Microscopy of the Living Eye: Technique and Methods of Examinations. Berlin, Springer, 1921.
461. Vogt A. Textbook and Atlas of the Slitlamp-Microscopy of the Living Eye. Vol 1. Bonn/Bad Godesberg, Wayenborgh, 1921;ed.3:52-53.
462. Wagoner MD, Johnson-Wint B. Intact stromal explant in vitro behave like monolayers of primary stromal fibroblast in their collagenase response to epithelial cytokines and interleukin-L. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28(Suppl):222.
463. Wagoner MD, Kenyon KR. Chemical injuries of the eye. In: Albert DM, Jakobiec FA, Eds. Principles and Practice of Ophthalmology: Clinical Practice. Philadelphia. WB Saunders, 1994;Vol.1:234-245.
464. Wagoner MD, Kenyon KR. Chemical injuries. In: Shingleton BJ, Hersh PS, Kenyon KR, Eds. Ocular Trauma. Mosby, St. Louis, 1991;63-68.
465. Wagoner MD, Kenyon KR. Conjunctival transplantation for pterygium and other ocular surface disorders. In: Bruner WR, Stark WJ, Maumenee AE, Eds. A Manual of Corneal Surgery. New York. Churchill Livingstone, 1987;119-128.
466. Wagoner MD, Kenyon KR. Noninfected corneal ulceration. Focal Points: Clinical Modules for Ophthalmologist. *Am Acad of Ophthalmol, San Francisco* 1985;Vol.3:7.
467. Wagoner MD, Kenyon KR, Gipson IK, et al. Polymorphonuclear neutrophils delay corneal epithelial wound healing in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1217-1220.
468. Wagoner MD, Kenyon KR, Shore JS. Ocular surface transplantation. In: Barrie J, Kirkness C, Eds. Recent Advances in Ophthalmology, New York, Churchill Livingstone, 1995;59-90.
469. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997;41:275-313.
470. Wang HM, Berman MB, Law M. Latent and active plasminogen activator in corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:511-524.
471. Weise RA, Mannis MJ, Vastine DW, et al. Conjunctival transplantation. Autologous and homologous grafts. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1736-1740.
472. Weissmann G, Spilberg L, Krakauer K. Arthritis induced in rabbits by lysates of granulocyte lysosomes. *Arthritis Rheum* 1969;12:103-116.
473. Williams KA, Brereton HM, Aggarwal R, et al. Use of DNA polymorphism and polymerase chain reaction to examine the survival of human limbal stem cell autograft. *Am J Ophthalmol* 1995;120:342-350.
474. Yamabavashi S, Furuva T, Gohd T, et al. Newly designed continuous corneal irrigation system for chemical burns. *Ophthalmologica* 1990;201:174-179.
475. Yang JS. Biphasic effects of the hydrocortisone on the stem cells and transient amplifying cells of rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(Suppl):1012.
476. Yao YF, Zhang B, Zhou P, Jiang JK. Autologous limbal grafting combined with deep lamellar keratoplasty in unilateral eye with severe chemical or thermal burn at late stage. *Ophthalmology* 2002;109(11):2011-2017.
477. Zhu G, Ishizaki NI, Haseba T, et al. Expression of K12 keratin in alkali-burned rabbit corneas. *Curr Eye Res* 1992;11:875-887.
478. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:143-152.
479. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA, Wasson ME, Keutmann HT. Alpha-enolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium. *Dev Biol* 1992;151:18-26.