

EPR e l'imaging retinico

di Amedeo Lucente

Brevi note isto-fisiologiche

L'epitelio pigmentato retinico (EPR) è stato individuato nell'uomo come entità istologica individuale già dall'inizio del XX secolo. Gli fu dato il nome di tapetum nigrum perché scuro, in contrapposizione al tapetum lucidum, non pigmentato e riflettente, del regno animale (Fig. 1). La diversa riflettanza dell'EPR è causa del noto riflesso luminoso pupillare "Eyeshine" di alcuni animali. Le specie animali in cui è presente hanno una buona visione notturna, che al contrario nell'uomo è poco efficiente. L'interesse della ricerca per questo strato di cellule sta aumentando progressivamente, alimentato dalle nuove strumentazioni presenti sul mercato. La possibilità offerta dalla tomografia ottica a radiazione coerente di distinguere ogni singolo strato retinico ha posto ulteriormente l'accento sul ruolo specifico dell'EPR, col quale prendono contatto i segmenti esterni dei coni e bastoncelli. Si stima che il numero delle cellule dell'EPR sia tra i 3 e i 5 milioni, variando di forma e dimensione dalla macula verso la periferia. Prevalentemente esagonali al polo posteriore con un diametro medio di 16 micron, aumentano di estensione in area equatoriale, fino a 60 micron in estrema periferia retinica. I coni sono circa 6-7 milioni, i bastoncelli 125 milioni; una singola cellula dell'EPR è in rapporto con più fotorecettori. Nella regione maculare il contatto cellulare diventa esclusivo ed ogni cellula pig-

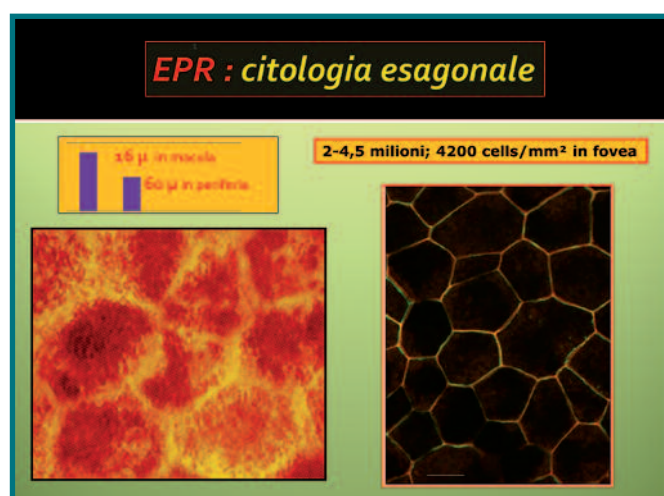


Fig. 1 - EPR al microscopio elettronico ed a fluorescenza

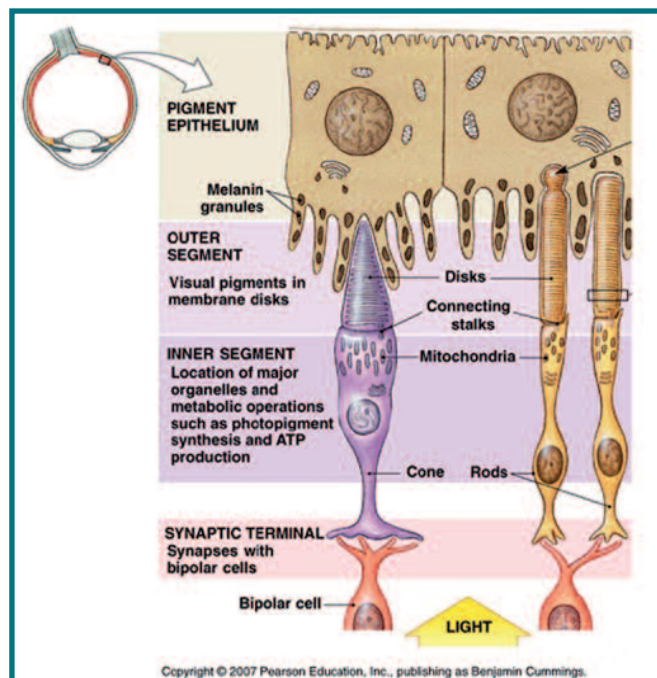


Fig. 2 - Schema dei rapporti tra fotorecettori, EPR e bipolari

mentata circonda un solo cono; oltre l'area maculare, più bastoncelli trovano contatto con una cellula pigmentata. Ne consegue la differenza numerica tra i fotorecettori, 130 milioni c.a. in totale, e le cellule dell'EPR, 5 milioni c.a. Un simile rapporto privilegiato a livello maculare, uno ad uno, esiste anche tra i coni maculari e le cellule bipolari, permettendo un'alta risoluzione delle immagini; i bastoncelli, al contrario, si connettono con le bipolari in modo non esclusivo, modalità nota come "convergenza neurale" (Fig. 2). Il tappeto dell'EPR è in stretto rapporto con la lamina di Bruch, che al microscopio ottico è formata da due strati: uno più sottile adeso all'EPR, l'altro più spesso, con fibrille di connessione, di pertinenza coriocapillare. Al microscopio elettronico la membrana di Bruch ha un aspetto pluristratificato. Dall'interno verso la coroide troviamo:

- a) la membrana basale interna
- b) lo strato collagene interno
- c) lo strato elastico intermedio
- d) lo strato collagene esterno
- e) la membrana basale esterna

Normalmente la membrana di Bruch non è visibile agli

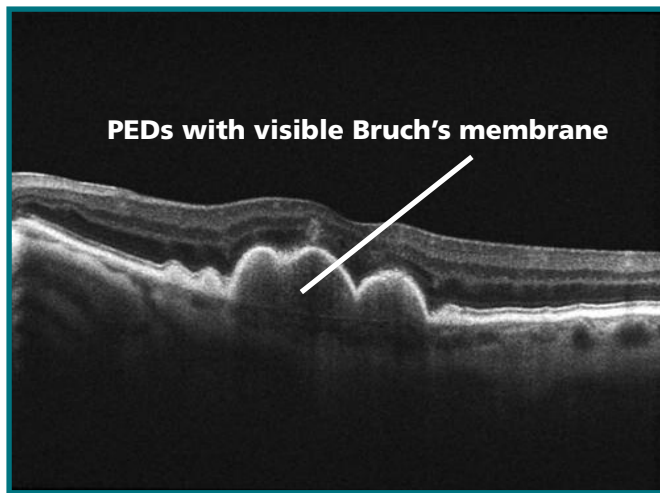


Fig. 3 - In presenza di PED la membrana di Bruch è visibile all'OCT Spectral come una linea debolmente riflettente

OCT anche Spectral Domain, tranne che in presenza di drusen o sollevamenti dell'EPR, dove si evidenzia come una sottile banda debolmente iper-riflettente (Fig. 3). Le cellule dell'EPR mantengono una forma spiccatamente esagonale soprattutto nell'area maculare, persa progressivamente oltre l'area del polo posteriore (Panda-Jonas et coll). Le singole cellule dell'EPR sono comunque sempre strettamente adese alla membrana di Bruch, per tutta la superficie retinica. Sulle caratteristiche meccaniche e bio-entropiche della geometria esagonale è stato già detto nell'articolo "L'endotelio nell'imaging corneale", nel numero precedente di questa Rivista. Le molteplici funzioni di queste cellule non si limitano comunque all'assorbimento dei fotoni di luce, nell'apportare glucosio ed acidi grassi ai fotorecettori, nella fagocitosi e reintegrazione dei dischi dei segmenti esterni esausti di coni e bastoncelli, nella partecipazione al ciclo della vitamina A, con isomerizzazione del retinolo trans in 11-cis-retinaldeide. L'attività secretoria dell'EPR è di più recente individuazione. Numerosi sono i fattori individuati. In particolare il VEGF, vascular endothelial growth factor, le cui funzioni sono note ed il PEDF, pigment epithelium derived factor, che si ritiene stimoli i fibroblasti, favorendo l'impalcatura fibrotica dei vasi e contrastando l'attivazione del VEGF, in particolare del VEGFR-1. Nel PEDF si sono inoltre evidenziate attività antiapoptotiche, di contrasto alla neurotossicità del glutammato ed anti-fototossiche (survivor factor) (Fig. 4). Le Tight Junction "giunzioni serrate" con le zonulae occludentes e adherentes presenti tra le singole cellule dell'EPR costituiscono la base anatomica della barriera ematoretinica esterna. Essa non permette al flusso di liquidi prodotti dai capillari fenestrati della coriocapillare di diffondere liberamente verso la retina.

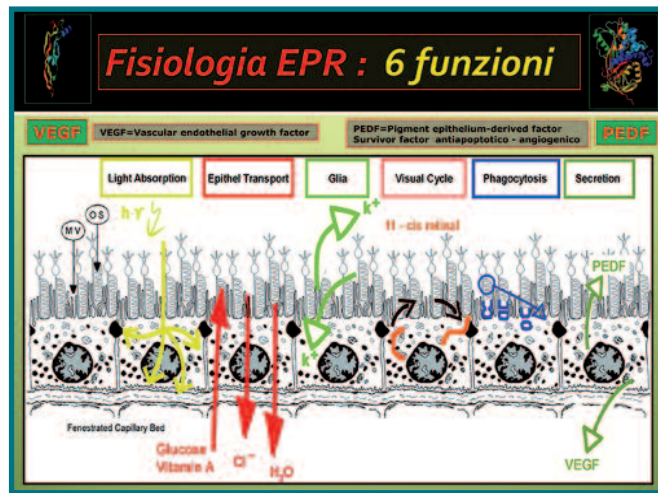


Fig. 4 - Schema delle funzioni dell'EPR con evidenza della componente secretoria

Tight Junction sono presenti anche tra le cellule dell'endotelio dei capillari intraretinici che formano la barriera ematoretinica interna, altrettanto impermeabile. Entrambe concorrono a formare la barriera emato-oculare (Fig. 5). L'importanza dei rapporti anatomici e fisiologici tra l'EPR, la lamina di Bruch e la coriocapillare risiede nel fatto che le lesioni caratteristiche e prodromiche della degenerazione maculare, le drusen, si formano proprio tra l'EPR e la sua membrana basale. Le drusen possono essere piccole e dure a margini netti con diametro inferiore a 63 micron; grandi e molli a margini sfumati con diametro maggiore di 125 micron; miste con diametro compreso tra 64 e 124 micron, di consistenza variabile. Con diametro intorno ai 500 micron sono definite drusenoidi, non distinguibili dal classico distacco dell'epitelio pigmentato PED. Spesso rimangono tali per molti anni o possono innescare l'atrofia delle cellule dell'EPR e una AMD secca. Il 20% dei casi di cecità legale è dovuto a questo tipo di degenerazione maculare ed il 90% di tutte le maculopatie sono secche, non essudative. Il WHO, World Health Organization (OMS Organizzazione Mondiale della Sanità), individua nel 2010 la AMD tra le prime tre cause di cecità; nei paesi industrializzati è la prima causa di ipovisione nei soggetti di età superiore ai 50 anni. L'EPR, come l'endotelio corneale, non si moltiplica ed è opinione comune che l'apoptosi di una cellula sia compensata dall'aumento volumetrico delle cellule adiacenti. Si è constatato, in situ, che la percentuale di apoptosi dell'EPR aumenta significativamente con l'età ed è peculiare nella macula degli anziani, ma che la densità delle cellule pigmentate maculari rimane comunque invariata, a discapito di quella periferica, per probabile migrazione cellulare verso la macula. (Lucian V. Del Priore et all. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.2002). I nu-

merosi microvilli presenti nella parte apicale dell'EPR circondano i segmenti esterni dei fotorecettori con modalità più complesse per i coni rispetto a quelle dei bastoncelli, per la presenza di interdigitazioni di maggiore lunghezza. Il citoplasma delle cellule dell'EPR contiene numerosi ribosomi e mitocondri, a conferma dell'intensa attività biologica svolta, oltre a granuli di melanina che aumentano con l'età. Altro pigmento presente nel citoplasma di queste cellule che aumenta con l'età è la lipofuscina. Questo cromoforo deriva dal materiale di scarto dei segmenti esterni dei fotorecettori ed il suo accumulo, da più ricercatori, è considerato tra le cause della generazione maculare legata all'età.

La lipofuscina conosciuta anche come pigmento dell'invecchiamento aumenta nel citoplasma delle cellule dell'EPR con il progredire dell'età, particolarmente nelle cellule pigmentate della macula, nei primi due decenni in modo quasi esponenziale, più lentamente per il resto della vita. Questa macromolecola polimerica ad elevato peso molecolare, costituita essenzialmente di residui di lipidi, proteine e pochi carboidrati, non è degradabile dalle idrolasi lisosomiali citoplasmatiche, né eliminabile per esocitosi. Assume una colorazione marrone ed è la causa principale dell'autofluorescenza retinica. (Feeney-Burns L. et. all. Invest. Opth. Vis. Sci. 1984).

La melanina è normalmente prodotta dai melanociti tramite i ribosomi del reticolo endoplasmatico rugoso e l'apparato del Golgi. Le vescicole di premelanosoma, dopo vari stadi si trasformano in melanosoma, a partire dalla tirosina tramite la tirosinasi, un metallo-enzima contenente rame. La tirosinasi, alla presenza di ossigeno, ossidrilizza la tiroxina (p-idrossifenilalanina) e la trasforma in DOPA (3,4-diidrossifenilalanina). Una successiva ossidazione porta alla formazione di dopachinone. A questo stadio la biosintesi si differenzia per le feomelanine e le eumelanine. Le feomelanine si formano per combinazione del dopachinone con cisteina; le eumelanine passano invece attraverso varie ciclizzazioni e polimerizzazioni: si forma prima leucodopacromo (acido 5,6-diidrossindolo-2-carbossilico) che diventa dopacromo e per successive ossidazioni e decarbossilazioni, in presenza di cationi metallici e di enzimi, si trasforma in eumelanina. Il melanosoma maturo può contenere entrambe questi pigmenti: la eumelanina nero-bruno, la feomelanina giallo-rossa. A questa diversa possibile biosintesi è dovuta la colorazione della pelle. Nell'uomo ci sono entrambe queste due classi di melanine, con in comune il substrato precursore della tirosina (schema della melanogenesi di Raper-Manson). Nella popolazione di colore nero è presente eumelanina

compatta, nei soggetti bianchi l'eumelanina è associata ad una quota di feomelanina. L'albinismo è caratterizzato da una riduzione di sintesi di melanina, mentre i melanociti sono normali in numero e struttura. Le cellule dell'EPR sono in grado di sintetizzare melanina e sono considerate cellule melaniche extracutanee, insieme con gli altri melanociti dei distretti profondi, le leptomeningi, la mucosa orale, l'orecchio interno e la stessa uvea. A differenza dei melanociti epidermici, la componente extra-cutanea ha la caratteristica di sintetizzare pigmento solo durante i primi stadi della vita embrionale, senza altra sintesi, anche se esistono prove discordanti per una loro attività funzionale in vita, sia fisiologicamente che in condizioni patologiche (nella cute ci sono un melanocita ogni 30-36 cellule basali). Come per i melanociti anche per l'EPR non è stata riscontrata un'eventuale frequenza di duplicazione in vivo.

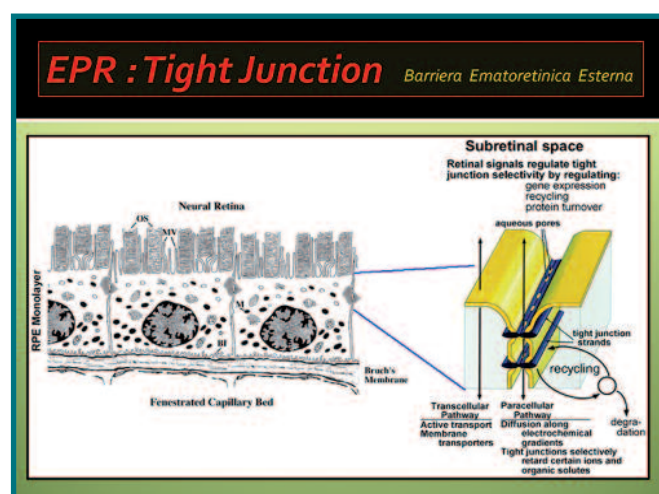


Fig. 5 - Schema dell'EPR con i segmenti esterni dei fotorecettori. In evidenza Tight Junction, capillari fenestrati della coriocapillare, spazio subretinico

La Retinografia

La prima e più semplice documentazione strumentale della retina e dell'EPR è la retinografia. E' ottenibile con una fundus camera (Topcon, Canon, Zeiss, Kowa) o con strumenti a scansione laser confocali (HRA, Heidelberg, F10 Nidek), anche in miosi relativa (3 mm), con fundus camera non midriatiche o ibride (non midr/midr), utili in alcune patologie e specifiche evenienze cliniche; sicuramente i migliori risultati iconografici si ottengono in midriasi farmacologica. Le fundus camera utilizzano una luce xenon a banda larga, possono avere angoli d'indagine da 20° a 60°, richiedono alte intensità di luce fino al 100% della dose massima di sicurezza, con una risoluzione di 15-20 micron/pixel. I sistemi laser utilizzano invece lunghezze d'onda selettive per la fotografia, l'autofluorescenza, l'angiografia con

fluoro o/e indocianina, con risoluzioni di 5 micron/pixel ed una SNR (Signal Noise Ratio=indice segnale/disturbo per audio-video) migliore rispetto alle fundus camera, con modesti livelli di luce proiettati in retina (1% rispetto alle fundus camera). Utilizzando varie lunghezze d'onda si possono ottenere diversi tipi d'immagini retinografiche (Fig. 6 e 7). In particolare è possibile avere una retinografia in (Tab. 1):

- Luce Aneritra o Red-Free o Green (532-540nm) (an=negazione e eritro=rosso), particolarmente utile per evidenziare vasi, drusen, essudati duri, membrane epiretiniche;
- Luce Blu-Verde o Cobalto (490 nm) utile per lo strato ganglionare e la superficie epiretinica;
- Luce Rossa (660-680 nm) utile per l'EPR e la coroide;
- Autofluorescenza o AF o FAF (in luce blue o infra-rosso) con filtri simili a quelli per la fluorindocianina, senza mezzo di contrasto, sfruttando la naturale fluorescenza retinica;
- Infrared o IR (da 790 a 820 nm) utile in presenza di cataratta, invisibile al paziente;
- Retro Mode (790 nm) ottenuta con luce laser infra-rosso per retrodiffusione (F 10 brevetto Nidek Co.).

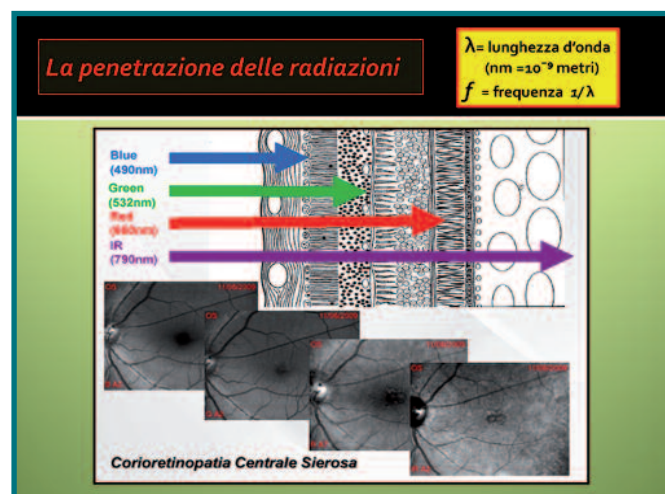


Fig. 6 - Penetrazione delle radiazioni ottiche alle diverse lunghezze d'onda nella corioretina

L'importanza della retinografia è confermata dal fatto che l'American Academy of Ophthalmology ha stabilito una scala di affidabilità nelle metodiche di screening per la retinopatia diabetica, ponendo la retinografia in midriasi eseguita in sette quadranti, secondo i parametri dell'EDTRS, al vertice di tale scala. La molteplice offerta strumentale permette oggi indagini fotografiche, tomografiche, fluoroangiografiche ed indocianinografiche con lo stesso strumento. La nuova frontiera strumentale risiede nella possibilità di avere più possibilità diagno-

stiche con un'unica unità strumentale. Alcuni OCT Spectral Domain offrono infatti, contemporaneamente alla tomografia, esami fotografici a varie lunghezze d'onda, fluoroangiografia, indocianina ed autofluorescenza (Imaging Multimodale).

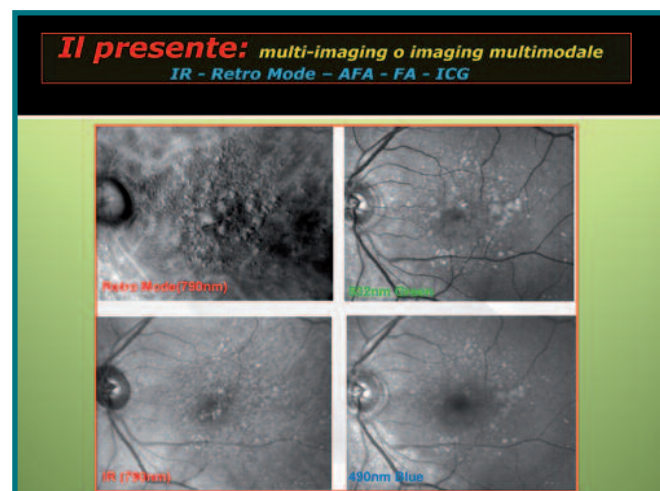


Fig. 7 - Imaging multimodale di drusen maculari in Retro Mode, Green, IR, Blue

Autofluorescenza e Retro Mode

E' opportuno porre l'accento sull'autofluorescenza per la sua attualità e perché, eseguire quest'esame insieme alla tomografia, qualifica e differenzia gli OCT. Gli OCT Spectral che possono eseguire l'autofluorescenza sono lo Spectralis Heidelberg BluePeak (40000 A Scan/sec) e il 2000 3D FA+ Topcon (50000 A Scan/sec). La fluorescenza, che fa parte della grande famiglia della luminescenza, consiste nella capacità di alcune sostanze di riemettere nello spettro del visibile le radiazioni elettromagnetiche ricevute, comunemente le ultraviolette, con una maggiore lunghezza d'onda e minore energia. Dallo stato elettronico eccitato le molecole tornano rapidamente allo stato energetico fondamentale di riposo, con emissione di radiazioni spostate verso la banda del rosso, rispetto alle lunghezze d'onda ricevute (legge di Stokes). Nella fosforescenza la luce continua ad essere emessa per un certo periodo dopo la cessazione dello stimolo; nella fluorescenza, invece, ogni attività di luminescenza cessa contemporaneamente al venir meno dell'eccitazione. La fluorescenza è presente spontaneamente in alcuni minerali, tessuti contenenti clorofilla, in certi petroli. E' questa la fluorescenza primaria. In biologia è spesso utile causare una fluorescenza secondaria o indotta, trattando i tessuti e/o le cellule con sostanze fluorescenti, i "fluocromi", che li rendono visibili. Su questo principio si basa il microscopio a fluorescenza. L'autofluorescenza è una retinografia non invasiva che consente di evidenziare la fluorescenza spontanea della

retina illuminata da lunghezze d'onda stabilite. Alcuni cromofori retinici sono fluoruri endogeni in grado di emettere un segnale di fluorescenza se eccitati da adeguate lunghezze d'onda. Le caratteristiche del segnale emesso dipendono dalla natura e concentrazione di queste sostanze all'interno dei substrati biologici. Modificazioni di tali substrati, presenti essenzialmente nelle cellule dell'EPR, determinano cambiamenti della fluorescenza emessa. Le sostanze coinvolte in questa fluorescenza sono la lipofuscina, eccitata da lunghezze d'onda di 490 nm, autofluorescenza blu (BlueAF); e la melanina, che si eccita con lunghezze d'onda di 790 nm, autofluorescenza all'infrarosso (IRAF). Entrambe queste sostanze sono contenute essenzialmente nel citoplasma delle cellule dell'EPR, anche se possono trovarsi, in minor concentrazione, in altra sede. Precursori della lipofuscina, ancora poco studiati, possono concorrere a fenomeni di autofluorescenza retinica come l'A2PE e l'A2E. L'AF era rilevabile, fino a poco tempo fa, con angiografi scanning laser SLO, come l'HRA dell'Heidelberg, o le Fundus Camera con particolari filtri. Da qualche tempo l'AF è effettuabile anche con strumentazione OCT Spectral, integrata con SLO o Fundus Camera. Il rinnovato interesse per l'EPR dipende anche da questa recente metodica d'imaging. Con sempre maggior frequenza, infatti, l'AF si esegue insieme all'esame OCT, risultando di grande aiuto nella valutazione clinica e prognostica delle più svariate malattie retiniche. Le patologie che si avvalgono di un esame in BlueAF sono principalmente la degenerazione maculare senile nella forma secca, la corioretinopatia sierosa centrale, la Stargart, la Best ed il foro maculare. Per quest'ultima patologia questa metodica è di essenziale aiuto nel distinguere uno pseudoforo da un foro lamellare, per l'aumento dell'AF solo in mancanza di tessuto retinico. L'autofluorescenza all'infrarosso (IRAF) è principalmente indotta dalla melanina dell'EPR presente in area foveale; si ottiene con gli stessi filtri dell'indocianinografia, esclusivamente con strumentazione a Scanning Laser (HRA e HRA-OCT Spectralis). Meno utilizzata di quella in luce blue è utile per monitorare i nevi coroideali e le emorragie sottoretiniche. Come si comprende l'AF è un segno indiretto della funzionalità della retina esterna ed in particolar modo dell'EPR. Un'iperautofluorescenza, iperAF, denota generalmente accumulo di lipofuscina nelle cellule pigmentate come nella maculopatia iniziale, ma può significare anche un'augmentata attività di queste cellule, come nella sierosa centrale dove, al bordo dell'area perilesionale, di solito ipoautofluorescente, ipoAF, si possono trovare punti iperAF, segno di persistenza dell'attività lesionale. Nella malattia di Stargart i "flecks" sono iperAF per l'accumulo



Tab. 1 - Quadro panoramico delle Retinografie

dei segmenti esterni dei fotorecettori destrutturati; nelle fasi iniziali della Best si ha prima iperAF e dopo ipoAF, per l'avanzare dello stato atrofico terminale della malattia. Un aumento dell'AF si può avere anche per "effetto finestra", come nel foro maculare, dove gli strati retinici sono mancanti, con esposizione dell'EPR. Nello pseudoforo maculare, come è stato detto, l'AF non si modifica, a testimonianza dell'integrità degli strati retinici. L'AF da "esposizione" deve essere distinta da quella dovuta ad accumulo di lipofuscina, primo evento per un danno cellulare. La diagnosi differenziale tra le due AF non sempre è facile, specialmente se non si hanno a disposizione altri dati clinici e strumentali della patologia in esame. Ogni esame strumentale, anche il più sofisticato, deve essere sempre "contestualizzato" con gli altri dati clinici ed anamnestici, per non incorrere in "errori tecnologici"! Questa singolare retinografia, comunque, si affianca ormai di diritto alle altre tecniche di imaging strumentale e, sempre più, è abbinata all'esame fotografico, tomografico, Retro Mode e fluoroindocianinografico. Tra l'autofluorescenza con Scannig Laser e quella con Fundus Camera esistono alcune differenze qualitative. Alcuni autori come P.J.Rosenfeld, del Bascom Palmer Eye Institute di Miami, oltre ad affermare che l'autofluorescenza e l'OCT 3D saranno il futuro dell'imaging retinica, precisano che l'autofluorescenza con Fundus Camera e filtri di Spaide (esclusiva Topcon) permette di circoscrivere ed evidenziare con più precisione le aree retiniche non ancora interessate dall'atrofia maculare, rispetto all'AF con SLO (Fig. 8). Tale dato clinico è di essenziale importanza per l'evoluzione e la prognosi della AMD secca, causa più frequente di ipovisione nelle società occidentali, oltre che per fini assicurativi, sempre molto determinanti negli USA. Gli studi sull'efficacia dell'autofluorescenza non sono stati ancora completamente sviluppati e chiariti.

Le diversità tecnologiche tra l'autofluorescenza con Fundus Camera e filtri selettivi e quella con Scanning Laser suscitano perplessità ed incertezze, anche tra gli operatori più esperti. La storia relativamente recente dell'autofluorescenza nell'imaging retinico giustifica queste diversità interpretative. L'esperienza clinica chiarirà ogni attuale incertezza e l'utilizzo di questa tecnica si affermerà sempre più, come sta già largamente avvenendo, per migliorare e completare in ogni aspetto l'imaging multimodale della corioretina.

La tecnica d'imaging Retro Mode è un retinografia ottenuta con un principio opposto a quello confocale (apertura del diaframma centrale), allo scopo di catturare le immagini per riflessione dai piani fuori fuoco, con blocco delle immagini centrali, e rilievo dello "scattering" laterale (apertura del diaframma ad anello). Così è possibile l'osservazione della corioide per riflessione dalla sclera. Mentre nel percorso ottico confocale si osserva il piano che riflette la luce proiettata su di esso, nel Retro Mode si osservano gli strati retinici con la luce proveniente dal fondo, per "retroilluminazione". Con l'imaging Retro Mode è possibile evidenziare, con immagini nuove ed inedite, l'estensione geografica delle patologie

gnostiche e prognostiche di questa promettente tecnica fotografica, non ancora completamente conosciuta e studiata interamente, ma sicuramente utile per una migliore comprensione fisiopatologica delle malattie corioretiniche.

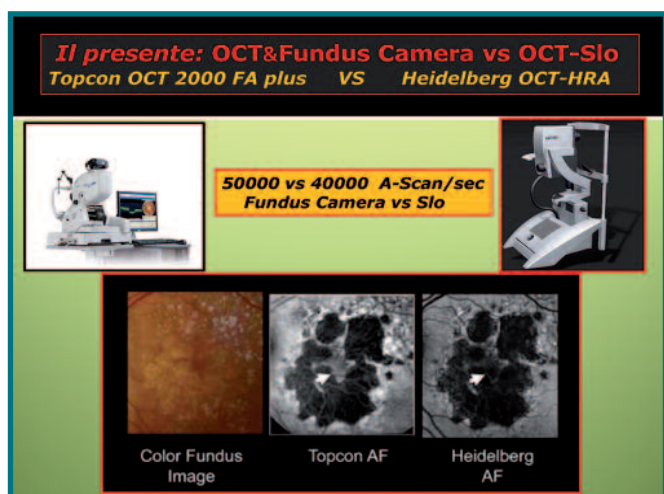


Fig. 8 - Autofluorescenza con Fundus Camera e SLO. Le aree retiniche centrali non ancora coinvolte sono meglio individuate dall'AF con Fundus Camera rispetto all'AF con SLO

corioretiniche, offrendo una visione tridimensionale delle lesioni indagate. Attualmente è possibile solo con il nuovo fluorangiografo F10 della Nidek; come le altre retinografie non richiede coloranti ed è eseguibile anche in assenza di midriasi farmacologica. L'EPR svolge in questa particolare retinografia un ruolo non secondario di "omogeneizzazione" della luce di ritorno sclerale, contribuendo alla realizzazione delle immagini "in rilievo" della corioretina (Fig. 9). Nuovi studi e confronti clinici saranno utili a svelare tutte le potenzialità dia-

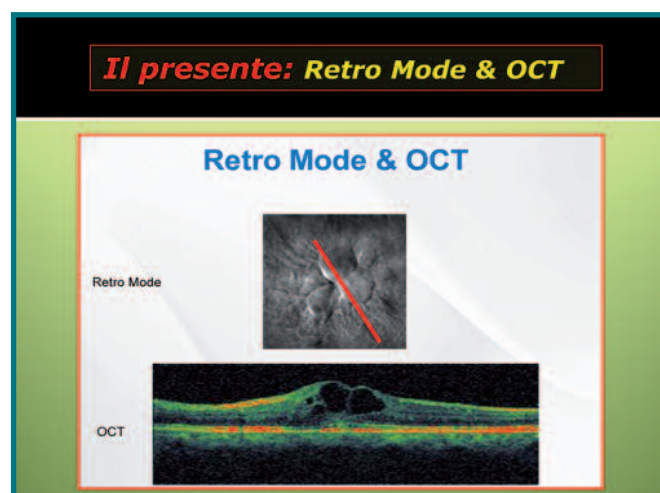


Fig. 9 - Immagine in Retro Mode e SD-OCT di edema maculare cistoide

Ultimate goal

Com'è noto il limite degli OCT Spectral è principalmente la risoluzione trasversale o laterale di 12-20 micron; quella assiale è di 3-6 micron. Il limite della risoluzione trasversale è essenzialmente dovuto alle aberrazioni che il fronte d'onda incontra nel diottero oculare. Gli studi per migliorare la risoluzione laterale degli Spectral OCT con Ottiche Adattive sono ormai in fase avanzata, soprattutto presso l'Università dell'Indiana, in collaborazione con il Lawrence Livermore National Laboratory. Tali studi beneficiano del finanziamento del Centro NSF (National Science Foundation) di Santa Cruz in California con una richiesta, per l'anno fiscale 2009, di 15 milioni di dollari. Con l'aiuto di un sensore di Shack-Hartmann e di ottiche deformabili si è messo a punto un software capace di arrivare ad una risoluzione trasversale di 2-4 micron, limite utile per la discriminazione cellulare. Questa tecnologia comunque è ancora da perfezionare per essere fruibile commercialmente su larga scala. Aspettando gli AO-OCT, OCT con Ottiche Adattive antiaberranti, le novità tecnologiche a nostra disposizione sono gli Spectral OCT di ultima generazione, con rilevazione dell'autofluorescenza integrata e studio morfo-funzionale della corioide. L'AF è disponibile con l'OCT Spectralis Blue-Peak dell'Heidelberg (40000 A-Scan/sec) e con il 3D OCT 2000 FA+ della Topcon (50000 A-Scan/sec). I vantaggi di avere l'AF integrata negli OCT, dopo quanto detto, sono facilmente intuibili, sia per lo studio dell'EPR, ago della bi-

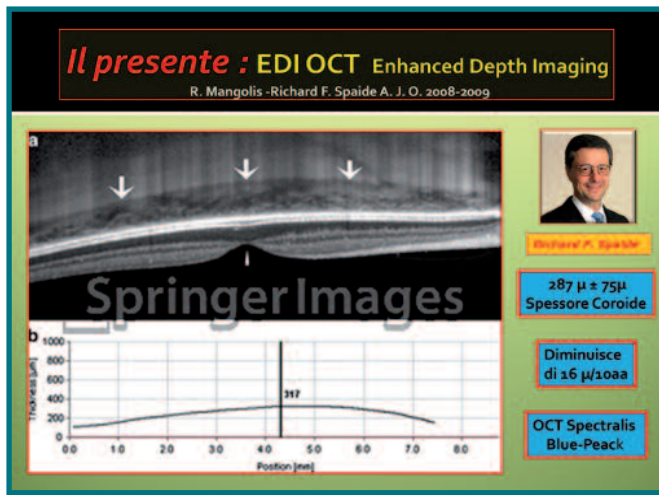


Fig.10 - EDI OCT (R.F. Spaide) con OCT Spectralis Blue-Peack Heidelberg

lancia per la patologia retino-maculare, che per un più preciso confronto nel tempo dell'avanzare dell'atrofia retinica. I maggiori dettagli tomografici raggiunti sugli strati esterni della retina, coinvolti nella patologia maculare atrofica e neovascolare, stanno fornendo nuove conoscenze fisiopatologiche e nuovi approcci terapeutici. Ron Mangolis e Richard F. Spaide (Am.J.Ophth. 2008,2009) hanno recentemente proposto una metodologia, sviluppata per l'OCT Spectralis dell'Heidelberg, denominata "Enhanced depth Imaging Spectral-Domain", EDI OCT, in cui la corioide può essere studiata con migliore definizione (Fig. 10). Questi risultati hanno richiesto come indispensabile presupposto tecnologico un buon eye-tracking attivo, TruTrack, e la presenza di filtri per ridurre il rumore di fondo della scansione, Noise Reduction. Queste due opzioni sono presenti entrambe nello Spectralis. E' stato così possibile misurare lo spessore della corioide in retine normali, con AMD e miopia elevata. Si è trovato che lo spessore della corioide diminuisce fisiologicamente con una velocità di 16 micron per decennio di vita, che il suo spessore medio è di 287 micron, con una deviazione standard di 75.7 micron, e che i pazienti con AMD atrofica hanno uno spessore corioideale minore. Naturalmente queste ricerche non sono conclusive, e lo stesso Spaide propone di allargare il campo dell'indagine corioideale anche ad altre patologie retiniche, in particolare al glaucoma normotensivo, invitando a determinare sempre lo spessore corioideale, per avere dati statisticamente sufficienti di correlazione con le patologie neuro-retiniche. L'OCT 2000 3D FA+ della Topcon permette la BlueAF, la fluoroangiografia con fundus camera, possiede un buon eye-tracking ed un software esclusivo per la conta delle drusen al polo posteriore; non è predisposto per indocianina né per l'IRAF, possibili solo con OCT Spectralis

Device	Wavelength	Scanning Depth	Axial Resolution	Scanning Speed	Ancillary Imaging
Bioptigen 3D SDOCT ¹	840 nm	2.3 mm	3-5 μm	17,000	
Carl Zeiss Meditec Cirrus ¹	840 nm	2 mm	5 μm	27,000	
Heidelberg Spectralis OCT ¹	870 nm	1.9 mm	7 μm	40,000	SLO/FA/ICG/Autofluorescence
Optko/OTI Spectral OCT/SLO ¹	840 nm	2.3 mm	5-6 μm	27,000	SLO/ICG/microperimetry
Optovue RTVue-100 ¹	840 nm	2.3 mm	5 μm	26,000	
Canon/Optopol SPOCT ¹	840 nm	2 mm	6 μm	25,000	
Canon/Optopol SPOCT • HR ²	850 nm	2 mm	3 μm	52,000	
Topcon 3D OCT-2000 ¹	840 nm	2.3 mm	5-6 μm	27,000	color fundus (12.3 MP)
Topcon 3D OCT-2000 FA (+) ²	840 nm	2.3 mm	5-6 μm	50,000	color fundus, FA, RF, FAF (+)

¹ 510(k) approved ² 510(k) pending

Tab. 2 - Caratteristiche riassuntive degli SD-OCT.

HRA, il tomografo attualmente con più possibilità d'examini (Tab. 2). Le Retinografie a lunghezza d'onda selettiva, l'AF, nelle varianti BlueAF e IRAF, l'EDI OCT, la conta delle drusen maculari, il Retro-Mode, sono tutti passi avanti verso una visione fisiopatologica globale della corioide. Le novità tecnologiche non riguardano solo gli OCT. Nuove fundus camera-fluoroangiografi sono oggi disponibili, con un'osservazione retinica fino a 200°, in modo panoramico, in un'unica acquisizione come l'Optos 200 TX. Progettato appositamente per oftalmologi e specialisti vitreoretinici, il nuovo dispositivo 200Tx™ offre molteplici opzioni di ripresa ed imaging della retina, attraverso l'uso di varie lunghezze d'onda, comprese immagini a colori, rosso prive, angiografie con fluoresceina ed autofluorescenza con laser verde. Grazie alla visione simultanea polo-periferia di oltre l'80% o di 200 gradi della retina in un'unica acquisizione, il 200Tx™ aiuta a rilevare un maggior numero di patologie ed a prendere decisioni migliori sui trattamenti da eseguire. Ad Orsay in Francia, Mark Zaccaria, in collaborazione con altri ricercatori in Giappone e negli USA, ha perfezionato una fundus camera-fluoroangiografo, rtz1 RUO, Research Use Only, per fini di ricerca, che permette, per mezzo di Ottiche Adattive, una visione cellulare del mosaico dei coni e bastoncelli per campo d'indagine, con un'iconografia molto simile alle imaging retiniche degli OA-OCT. (OA-Fundus Camera) (Fig. 11). Il percorso ottico antiaberrante con ottiche adattive verrà presto utilizzato in ogni campo strumentale sempre più ampiamente, permettendo risoluzioni di pochi micron. Le nuove tecnologie faranno comprendere in anticipo le iniziali alterazioni cellulari della retina e dell'EPR. Questo strato cellulare in particolare, come evidenziato da recenti report, è sempre più la chiave di lettura della maggior parte delle patologie retiniche. Una migliore e più dettagliata cono-

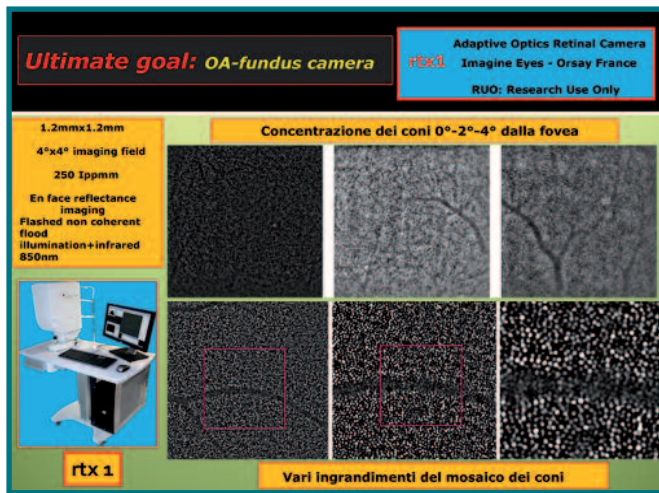


Fig. 11 - Immagini del mosaico dei fotorecettori con OA-Fundus Camera rtx1 (Imagine Eyes)



Fig. 12 - Ricostruzione degli strati cellulari retinici con OA-OCT

scienza dell'EPR sarà fondamentale nella diagnosi precoce, nella prognosi e nella terapia delle maculopatie retiniche, non più indagate su base strutturale, “a strati”, ma analizzate su base cellulare (Fig. 12). Presto sarà possibile, con le Ottiche Adattive, un conteggio delle cellule dell'EPR per campo d'indagine, vera “riserva funzionale” retinica, per stabilire la reale gravità dei danni della macula. L'integrità dell'EPR è essenziale per l'eventuale progressione dell'apoptosi lungo la catena fotorecettori-bipolari-gangliari: un danno parcellare dell'EPR può essere riparato per “vicariazione” da cellule limitrofe; danni più estesi daranno più probabilmente origine ad atrofia e/o a stimolo neovascolare, con possibilità di passaggio da una all'altra forma, e con quadri oftalmoscopici ed angiografici conseguenti. Recenti studi all'Università del Kentucky, diretti dal Dr Jayakrishna Ambati, hanno dimostrato che non codificate sequenze di DNA (non-coding DNA, junk DNA, Alu elements) possono essere responsabili dell'iniziale apoptosi delle cellule dell'EPR, con innesco dell'atrofia geografica retinica. L'EPR si presenta, sempre più chiaramente, come l'arbitro principale della maggior parte delle maculopatie retiniche.

Considerazioni Finali

Lo spirito scientifico e di ricerca che è indirizzato verso l'EPR sicuramente sarà foriero di ulteriori novità e di interessanti ricadute strumentali, estremamente accattivanti per l'imaging retinico, essenziali per una precoce diagnosi. Avere la possibilità di applicare le Ottiche Adattive sugli OCT Spectral, OA-OCT, con l'ausilio dell'AF e delle altre imaging retinici, permetterà un collage fotografico con molteplicità di dati nello stesso Printout di Stampa. La “Multi-Imaging”, o Imaging Multimodale, sarà di sicuro aiuto nello studio delle patologie corio-retino-neurali, fornendo dati fotografici a profondità differenziata.

L'aumentata velocità d'indagine con l'OA-OCT ed i bassi dosaggi d'illuminazione, con la Scansione Laser Confocale, permetteranno il massimo confort e sicurezza per il paziente. A noi il compito di comprendere sempre più il mondo di tali tecnologie, non solo dal punto di vista clinico-iconografico, ma anche per l'aspetto ottico-fisico, in modo da affrontare, con adeguata competenza scientifica e senza incertezze o lacune culturali, i molteplici Templates di Stampa. ■

BIBLIOGRAFIA

- Besharse JC and DeFoe DM. Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover. In: The Retinal Pigment Epithelium, edited by Marmor MF and Wolfensberger TJ. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 1998, p. 152-172.
- Besharse JC and Hollyfield JG. Turnover of mouse photoreceptor outer segments in constant light and darkness. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 1019-1024, 1979.
- Besharse JC, Hollyfield JG, and Rayborn ME. Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light. Science 196: 536-538, 1977.
- Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, and Hjelmeland LM. Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. Exp Eye Res 49: 217-227, 1989.
- Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, and McGinnis JF. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. J Neurosci Res 57: 789-800, 1999.

BIBLIOGRAFIA

- Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, and McGinnis JF. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1646–1652, 2001.
- Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, and Steinberg RH. Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp Eye Res* 65: 241–248, 1997.
- Garron LK. The ultrastructure of the RPE with observations on the choriocapillaris and Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* 61: 545, 1963.
- Gibbs D, Kitamoto J, and Williams DS. Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VII a, the Usher syndrome 1B protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6481–6486, 2003.
- Glazer LC and Dryja TP. Understanding the etiology of Stargardt's disease. *Ophthalmol Clin North Am* 15: 93–100, 2002.
- Lucian V, Del Priore, Ya-Hui Kuo, and Tongalp H. Tezel. Age-Related Changes in Human RPE Cell Density and Apoptosis Proportion Situ. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. October 2002, Vol. 43, No.10
- Miceli MV, Liles MR, and Newsome DA. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res* 214: 242–249, 1994.
- Miceli MV, Newsome DA, and Tate DJ Jr. Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1588–1597, 1997.
- Panda-Jonas S., Jonas JB, Jakobczyk M, Schneider U. Retinal photoreceptor count, retinal surface area, and optic disc size in normal human eyes. *Ophthalmology*. 1994 Mar; 101(3);519-23.
- Wolf Sebastian. *Ophthalmology Time Europe* 01-May 2011.
- B. Hermann, E. J. Fernández, A. Unterhuber, H. Sattmann, A.F. Fercher, W. Drexler (corresponding author), P. M. Prieto, P. Artal, "Adaptive optics ultrahigh resolution optical coherence tomography", *Optics Letters* 29 (18), 1-3, 2004.
- E.J. Fernandez, B. Povazay, B. Hermann, A. Unterhuber, H. Sattmann, P.M. Prieto, R. Leitgeb, P. Ahnelt, P. Artal, W. Drexler (corresponding author), „Three-dimensional adaptive optics ultrahigh-resolution optical coherence tomography using a liquid crystal spatial light modulator,” *Vision Res*. 45(28): 3432-44. Epub 2005 Oct 24, 2005.
- E. J. Fernandez, L. Vabre, B. Hermann, A. Unterhuber, B. Povazay, W. Drexler (corresponding author), "Adaptive optics with a magnetic deformable mirror: applications in the human eye," *Optics Express* 14(20), 8900-8917, 2006.
- E. J. Fernandez, A. Unterhuber, B. Povazay, B. Hermann, P. Artal, W. Drexler (corresponding author), "Chromatic aberration correction of the human eye for retinal imaging in the near infrared," *Optics Express* 14(13), 6213-6225, 2006.
- E. J. Fernandez, B. Hermann, B. Povazay, A. Unterhuber, H. Sattmann, B. Hofer, P.K. Ahnelt, W. Drexler (corresponding author), "Ultrahigh resolution optical coherence tomography and pancorrection for cellular imaging of the living human retina," *Optics Express* 16 (15), 11083-11094, 2008.
- C. Torti, B. Povazay, B. Hofer, A. Unterhuber, J. Carroll, P.K. Ahnelt, W. Drexler, Adaptive optics optical coherence tomography at 120,000 depth scans/s for non-invasive cellular phenotyping of the living human retina, *Optics Express*. 2009 Oct 26;17(22):19382-400.
- Drexler W, Ultrahigh resolution optical coherence tomography, *Journal Biomed Optics*, 9(1), 47-74, 2004
- Unterhuber A, Povazay B, Bizheva K, Hermann B, Sattmann H, Stingl A, Le T, Seefeld M, Menzel M, Preusser M, Budka H, Schubert C, Reitsamer C, Ahnelt PK, Morgan JE, Cowey A, Drexler W, Advances in broad bandwidth light sources for ultrahigh resolution optical coherence tomography, *Physics in Medicine and Biology* 49, 1235-1246, 2004
- Drexler W, Fujimoto JG, "Optical Coherence Tomography: Technology and Applications", Springer Publishing, 2008. 978-3-540-77549-2, 1400 pages
- Fercher AF, Optical coherence tomography – development, principles, applications, *Z. Med. Physik*, 2009
- Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Ageing human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 195–200.
- Spaide Richard. Autofluorescence from the outer retina and subretinal space : Hypothesis and. *Retina* Jan 2008; 28:5-35.
- Yehoshua Z, Wang F, Rosenfeld PJ, Penha FM, Feuer WJ, Gregori G. Natural History of Drusen Morphology in Age-Related Macular Degeneration Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 2011 Jul 1.
- Yehoshua Z, Rosenfeld PJ, Gregori G, Feuer WJ, Falcão M, Lujan BJ, Puliafito C. Progression of geographic atrophy in age-related macular degeneration imaged with spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2011 Apr;118(4):679-86. Epub 2010 Oct 29
- Leng T, Rosenfeld PJ, Gregori G, Puliafito CA, Punjabi OS. Spectral domain optical coherence tomography characteristics of cuticular drusen. *Retina*. 2009 Jul-Aug;29(7):988-93
- I. Audo, M. El Sanharawi, C. Vignal-Clermont, A. Villa, A. Morin, J. Conrath, D. Fompeydie, J.-A. Sahel, K. Gocho-Nakashima, O. Goureau, and M. Paques, (2011). Foveal damage in habitual poppers users. *Arch Ophthalmol*, 129(6):703-708.
- M. Zacharria (2011). Cellular level retinal imaging - diagnostic and prognostic capabilities could be improved as a result of adaptive optics. *Ophthalmology Times Europe*, May.
- M. Zacharria, B. Lamory, and N. Chateau, (2011). Biomedical imaging: New view of the eye. *Nature Photonics*, 5(1):24–26.
- P. Godara, A. M. Dubis, A. Roorda, J.L. Duncan, and J. Carroll. (2010). Adaptive Optics Retinal Imaging: Emerging Clinical Applications. *Optometry and Vision Science*, 87(12):930–941.
- S. G. Rosolen, B. Lamory, F. Harms, J.-A. Sahel, S. Picaud, and J.-F. Le Gargasson (2010). Cellular-resolution in vivo imaging of the feline retina using adaptive optics: preliminary results. *Veterinary Ophthalmology*, 13(6):369–376.
- M. Zacharria, (2008). The eyes have it - Adaptive optics approaches clinical ophthalmology. *BioOptics World*, 1(6):22–26.