

Capitolo 1

L'invecchiamento della retina

Introduzione

La nostra vista si indebolisce con l'età; la maggior parte delle persone anziane presenta deficit sia della visione fopica (Owsley e Bourton,1991) che scotopica (Sturr et al., 1992) non correlabili ad alcuna patologia organica, ma facenti parte di un generale declino di tutte le funzioni dell'organismo. In base alla teoria del deterioramento fisico si ritiene che l'organismo sia sottoposto a stress ed insulti estrinseci (dipendenti dall'ambiente) ed intrinseci (dipendenti dai processi biologici). Il danno, sia intrinseco che estrinseco, deriva da piccole molecole altamente reattive, i radicali liberi, prodotte durante il normale metabolismo cellulare ed associate ad importanti funzioni cellulari. Fra gli agenti dannosi consideriamo gli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) capaci di indurre stress ossidativo, ma anche i perossinitriti, gli agenti alchilanti endogeni ed i prodotti dell'aldeide, proveniente dalla ossidazione lipidica che hanno tutti la capacità di danneggiare le macromolecole organiche (proteine e lipidi complessi, DNA ecc.). Dal danno macromolecolare si arriva alla disfunzione cellulare che si manifesta con

instabilità nucleare, con eventi di differenziazione cellulare inappropriati e conseguente morte cellulare (necrosi o apoptosi) (vedi lo stress ossidativo fotoindotto e la patologia retinica).

Quindi, secondo la teoria dell'invecchiamento, il livello di senescenza è stabilito dall'interazione tra i fattori che la promuovono e quelli che la contrastano, in pratica dalla capacità di rigenerazione cellulare che è sotto il controllo genetico. Da questo punto di vista la "teoria del deterioramento fisico" si unisce all'altra teoria dell'invecchiamento che è quella dell'"orologio biologico". Quest'ultima asserisce che la durata della vita di ogni specie è geneticamente determinata e che le sue variazioni sono frutto o di influenze ambientali o di mutazioni genetiche.

Organizzazione morfologica e funzionale della retina

La retina costituisce la più interna delle tre tuniche che rivestono la parete posteriore dell'occhio. Essa si estende dal nervo ottico al margine pupil-

lare dell'iride. Può essere divisa in una *parte ottica*, deputata alla funzione visiva ed in una *parte cieca*, in rapporto con il margine pupillare. Le due parti sono separate a livello dell'ora serrata. La retina è distinta strutturalmente in due foglietti: uno esterno ed uno interno.

■ 1) Foglietto esterno della retina

Il *foglietto esterno* della retina è costituito dall'*epitelio pigmentato della retina* (EPR) che poggia su una lamina elastica: la *membrana di Bruch*. L'EPR con la membrana di Bruch e la coriocapillare costituiscono un unico complesso funzionale chiamato da Sarks (1976), Green ed Enger (1993) "complesso membrana di Bruch/EPR": dall'integrità di questa struttura dipende quella dei fotorecettori retinici e di conseguenza l'integrità della funzione visiva.

L'EPITELIO PIGMENTATO

Le cellule dell'EPR sono cellule postmitotiche con una forma esagonale che formano un epitelio cuboidale monostratificato che separa il segmento esterno dei fotorecettori dalla coroide. L'EPR fornisce supporto metabolico e funzionale al segmento esterno dei fotorecettori. Ciascun occhio umano contiene da *4 a 6 milioni* di cellule dell'EPR. Nella retina centrale la forma e la dimensione delle cellule dell'EPR sono uniformi. Esse misurano circa 14 μm di diametro e 12 μm di altezza. All'equatore le cellule sono più alte e più larghe e in estrema periferia perdono uniformità nella dimensione e nella forma. Alcune cellule possono contenere più di un nucleo e all'ora serrata le cellule dell'EPR possono misurare fino a 60 μm di diametro (Marmor e Wolfersberger, 1988). Queste cellule presentano una porzione basale, una apicale e sei facce laterali. La porzione basale è costituita da una membrana cellulare con numerose invaginazioni che si approfondano nel

citoplasma fino ad 1 μm , al fine di aumentare la superficie assorbente. La membrana basale di queste cellule è adiacente alla lamina basale che costituisce lo strato prossimale della membrana di Bruch. Le invaginazioni basali aumentano la superficie della membrana cellulare, dato che essa è coinvolta nelle funzioni di trasporto. La porzione apicale delle cellule dell'EPR, che sta di fronte al segmento esterno dei fotorecettori, è ripiegata a formare microvilli di 5-7 μm di lunghezza, che si estendono a circondare il terzo terminale del segmento esterno dei fotorecettori. Poiché i segmenti esterni dei bastoncelli e dei coni sono di differenti dimensione, i villi che circondano il segmento esterno dei bastoncelli sono più piccoli (3 μm) di quelli che circondano i coni. Dal punto di vista funzionale esistono due differenti tipi di microvilli: uno più sottile, deputato al trasporto transepiteliale, e l'altro connesso alle lamine distali dei fotorecettori.

Le membrane laterali dell'EPR sono unite (zonula occludens e adherens) a formare la *barriera emato-retinica esterna* ed allo stesso tempo interconnesse attraverso giunzioni intercellulari. Le cellule hanno un nucleo rotondo basale ed il citoplasma ricco di lisosomi, reticolo endoplasmatico liscio, mitocondri (a livello basale) e di granuli pigmentati rotondi ed ovali contenenti *melanina*. La maggior parte dei granuli di melanina si trova nella parte apicale oppure nei villi. I granuli misurano fino ad 1 μm di diametro e 2-3 μm di larghezza. La loro funzione è quella di assorbire la luce prevenendone la diffusione e agiscono anche come "scavengers" di radicali liberi.

Le cellule dell'EPR che contengono una maggior quantità di pigmento sono quelle localizzate nella regione maculare ed all'equatore (Feeney-Burns et al., 1984).

L'EPR, nel suo ruolo di barriera ematoretinica, regola lo scambio transepiteliale di ioni, liquidi e metaboliti attraverso le giunzioni laterali, gra-

zie alla presenza di proteine specializzate a livello della membrana plasmatica. Il mancato funzionamento dell'equilibrio ionico causa un'infiltrazione di liquidi nel microambiente dei fotorecettori. Il passaggio di ioni da e verso la retina è importante per la polarizzazione e ripolarizzazione delle membrane cellulari, per il trasporto dei fluidi e per la regolazione del pH. Attraverso trasporti attivi passano proteine e glucosio (tramite GLUT-1), mentre i gas diffondono liberamente.

Inoltre, l'EPR gioca un ruolo fondamentale nel trasporto e nell'immagazzinamento dei retinoidi, essenziali per il mantenimento del ciclo visivo.

Un'altra funzione dell'ERP è quella di eliminare le componenti dei segmenti esterni dei fotorecettori attraverso un'attività di fagocitosi mediata dalla catepsina D e dalle integrine che agiscono da recettori di membrana che mediano la fagocitosi. I fagosomi si uniscono ai lisosomi e formano i fagolisosomi (organuli nei quali avviene la digestione da parte degli enzimi intracellulari) che si dispongono in prossimità della superficie basale delle cellule. I prodotti finali del metabolismo sono successivamente espulsi per esocitosi, attraversano la membrana di Bruch e sono immessi nella circolazione coroideale; altrimenti, se non avviene una loro digestione completa, si accumulano all'interno delle cellule come "granuli di lipofuscina". Questi granuli aumentano con l'età (Wing et al., 1978), specialmente nell'area maculare. Infatti, la costante esposizione dell'EPR alla luce e ad elevate concentrazioni di ossigeno, nonché l'intensa attività metabolica di queste cellule, creano un ambiente favorevole, specialmente a livello maculare, alla formazione di radicali tossici, reattivi dell'ossigeno.

Per difendersi dallo stress ossidativo le cellule dell'EPR contengono agenti antiossidanti quali la superossidodismutasi, la catalasi, il glutatione ridotto, la melanina ed i carotenoidi. In realtà, con l'avanzare degli anni la loro quantità si riduce venendo meno le difese antiossidanti.

LA MEMBRANA DI BRUCH

La membrana di Bruch (BrM) rappresenta un sottile strato di tessuto connettivo posto tra l'EPR e la coriocalpillare. Per la sua localizzazione e le sue proprietà questa struttura costituisce uno strato limitante gli scambi metabolici tra le due strutture adiacenti (Marshall et al., 1998). Alterazioni del trasporto di nutrienti attraverso di essa possono provocare variazioni della normale funzionalità fotorecettoriale e rappresentare una possibile causa di maculopatia età-dipendente (ARM) (Sarks, 1976; Grindle e Marshall, 1978; Bird e Marshall, 1986; Chen et al., 1992; Starita et al., 1996). Questa membrana è formata da 5 strati e si estende dal disco ottico all'ora serrata; il suo spessore varia in differenti parti dell'occhio: è maggiore in vicinanza del disco ottico (2-4 μm) ed è più sottile in periferia (1-2 μm). La membrana basale delle cellule dell'EPR forma lo strato più interno della membrana di Bruch, seguono poi lo strato di collagene interno, lo strato elastico, lo strato di collagene esterno e la membrana basale della coriocalpillare. Il collagene e l'elastina sono le proteine strutturali principali della membrana di Bruch. Certi tipi di collagene (tipo I, II, III, V, e XI) si aggregano in lunghe fibrille, altri (IX e XII) si trovano sulla superficie delle fibrille e sono uniti alle diverse componenti della matrice, inoltre il collagene tipo IV forma una sottile rete. Le fibre di elastina conferiscono elasticità alla membrana. La fibronectina e la laminina sono grandi glicoproteine che, per i loro multipli legami, aiutano le cellule ad aderire alla membrana.

2) Foglietto interno della retina o retina neurosensoriale

Il foglietto interno della retina, o retina neurosensoriale, rappresenta la tonaca nervosa vera e propria del bulbo oculare; è di derivazione diencefalica e pertanto deriva direttamente dal sistema nervoso centrale. Viene

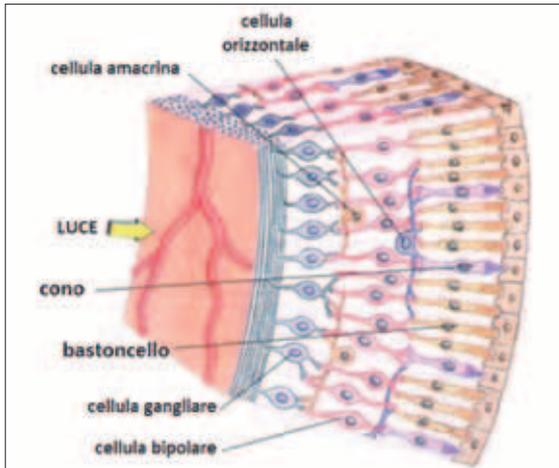


Fig. 1: Immagine istologica della retina

schematizzata in una catena di tre neuroni consecutivi, identificabili con i *coni ed i bastoncelli* (primo neurone), le *cellule bipolari* (secondo neurone) e le *cellule gangliari* (terzo neurone). In realtà, le cellule retiniche ed i loro processi sono disposti in 10 strati se si include il foglietto esterno della retina (Fig. 1):

- EPR (foglietto esterno della retina)
- lo strato dei segmenti esterni dei fotorecettori
- la membrana limitante esterna, che non è una vera e propria membrana ma una zona ristretta

con numerose zonulae adherens tra le cellule di Müller ed i fotorecettori

- lo strato nucleare esterno (ONL) formato dai corpi cellulari dei fotorecettori
- lo strato plessiforme esterno formato dalle sinapsi tra i fotorecettori, le cellule bipolari e le cellule orizzontali
- lo strato nucleare interno (INL) che contiene i corpi cellulari di cinque tipi cellulari: orizzontali, bipolari, amacrine, interplessiformi e delle cellule di Müller
- lo strato plessiforme interno formato dalle sinapsi tra le cellule bipolari, le cellule amacrine e le cellule gangliari
- lo strato delle cellule gangliari (CGL) che contiene anche alcune cellule amacrine
- lo strato delle fibre nervose (NFL) che contiene gli assoni delle cellule gangliari
- la membrana limitante interna (MLI) formata dai processi terminali delle cellule di Müller.

La retina neurosensoriale è quindi costituita da una grande varietà di cellule: la prima categoria cellulare è quella dei neuroni (*fotorecettori, cellule bipolari e cellule gangliari*); la seconda categoria è rappresentata dalle cellule *gliali: macroglia e microglia*.

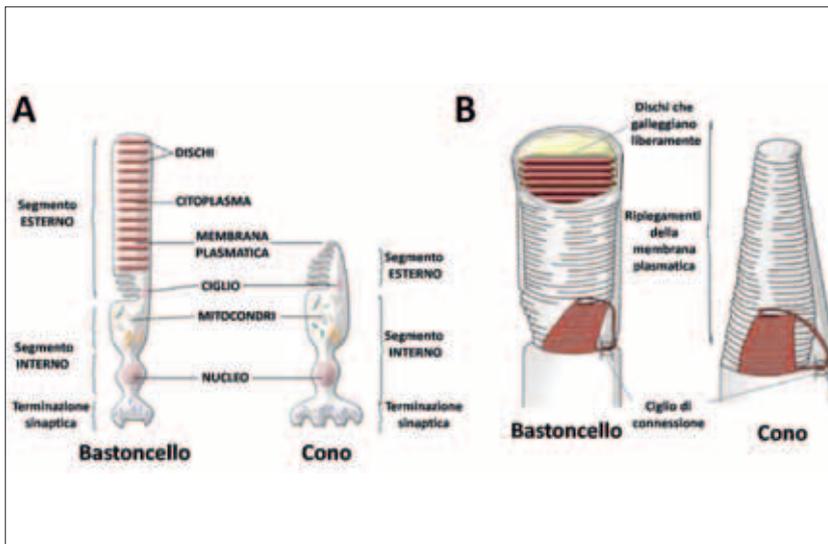


Fig. 2:

A-Schematizzazione struttura dei fotorecettori retinici: coni e bastoncelli. B-Particolare immagine A (da Guyton, 1996)

La retina contiene due tipi di fotorecettori: i *coni*, deputati prevalentemente alla funzione dell'acuità visiva ed alla percezione dei colori ed i *bastoncelli*, che sono principalmente responsabili della visione crepuscolare o notturna (Fig. 2).

Queste cellule sono rispettivamente in rapporto di 1:20 (Lamb et al., 2006).

Sia i bastoncelli che i coni contengono un gran numero di dischi, valutabili nell'ordine delle migliaia ed i pigmenti fotosensibili, incorporati nelle membrane dei dischi stessi come proteine transmembrana, non sono altro che proteine coniugate. Questi dischi seguono un continuo rinnovamento per fagocitosi da parte dell'epitelio pigmentato (Williams, 1984; Grierson et al., 1994) e rinnovati ogni 10 giorni con eliminazione dei loro costituenti attraverso la circolazione coroideale (Holz et al., 1994; Lois et al., 2002). Ciò permette l'integrità della retina (Snodderly, 1995; Gonzalez-Fernandez, 2002).

La *rodopsina* è una proteina a sette eliche inserita nel doppio strato lipidico della membrana dei dischi dei bastoncelli di cui costituisce oltre l'80 %. Si tratta di una proteina coniugata, costituita da una parte proteica (*opsina*) e da un gruppo prostetico, il *retinale*, che deriva dalla vitamina A.

La molecola del *retinale* è in larga misura idrocarburica e la sua caratteristica più importante è quella di essere costituita da una catena in cui si alternano legami carbonio-carbonio semplici e doppi. Questa caratteristica dà luogo a due proprietà: 1) la catena idrocarburica è rigida, non è libera di muoversi e di arrotolarsi a spirale, 2) gli elettroni della catena sono invece mobili e possono cambiare posizione abbastanza facilmente, ciò consente alla molecola di assorbire energia dalla luce. Un'altra caratteristica della molecole è la presenza di un gruppo -CHO, molto reattivo che può pertanto combinarsi con altre molecole che gli stanno vicino, in particolare le proteine. Nei bastoncelli la molecola del retinale è, come detto, legata all'*opsina*, una proteina, con cui

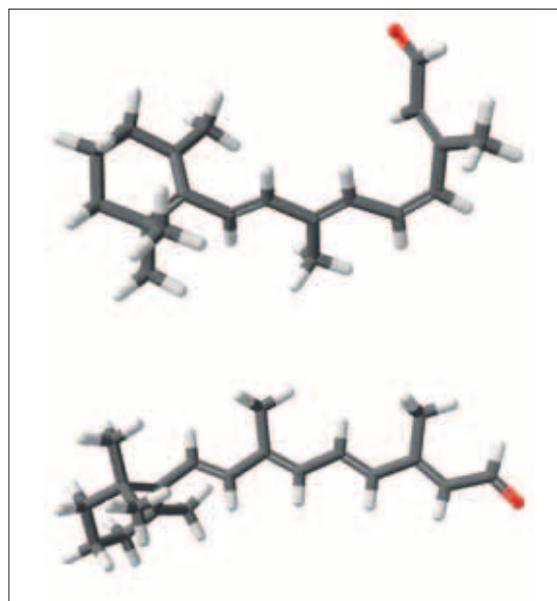


Fig. 3: Disegno schematico delle molecole di 11-*cis* retinale e tutto-*trans* retinale

dà luogo alla *rodopsina* fotosensibile. Nei coni, le molecole del retinale sono invece legate a tre opsine leggermente diverse che trasducono le lunghezze d'onda della luce in sensazioni cromatiche (Bloomfield, 1994).

La molecola del *tutto-trans retinale* ha la struttura chimica identica a quella dell' 11-*cis retinale*; fisicamente, invece, le due molecole risultano diverse in quanto la forma *tutto-trans* si presenta per metà ruotata attorno a uno dei doppi legami ed assume, dunque, una disposizione rigida, in cui la catena laterale è completamente distesa piuttosto che ripiegata come la forma *cis* (Liebman, 1987) (Fig. 3). Quando la luce raggiunge un bastoncello o un cono, viene assorbita dall' 11-*cis retinale* di quel recettore. L'assorbimento di luce provoca lo spostamento di un elettrone; in questo caso viene divisa una delle due coppie di elettroni fra i due atomi situati nel punto in cui la molecola dell' 11-*cis retinale* si piega a gomito. Il doppio legame viene immediatamente sostituito da un legame singolo; ciò consente a un'estremità della molecola di ruotare rispetto all'altra assumen-

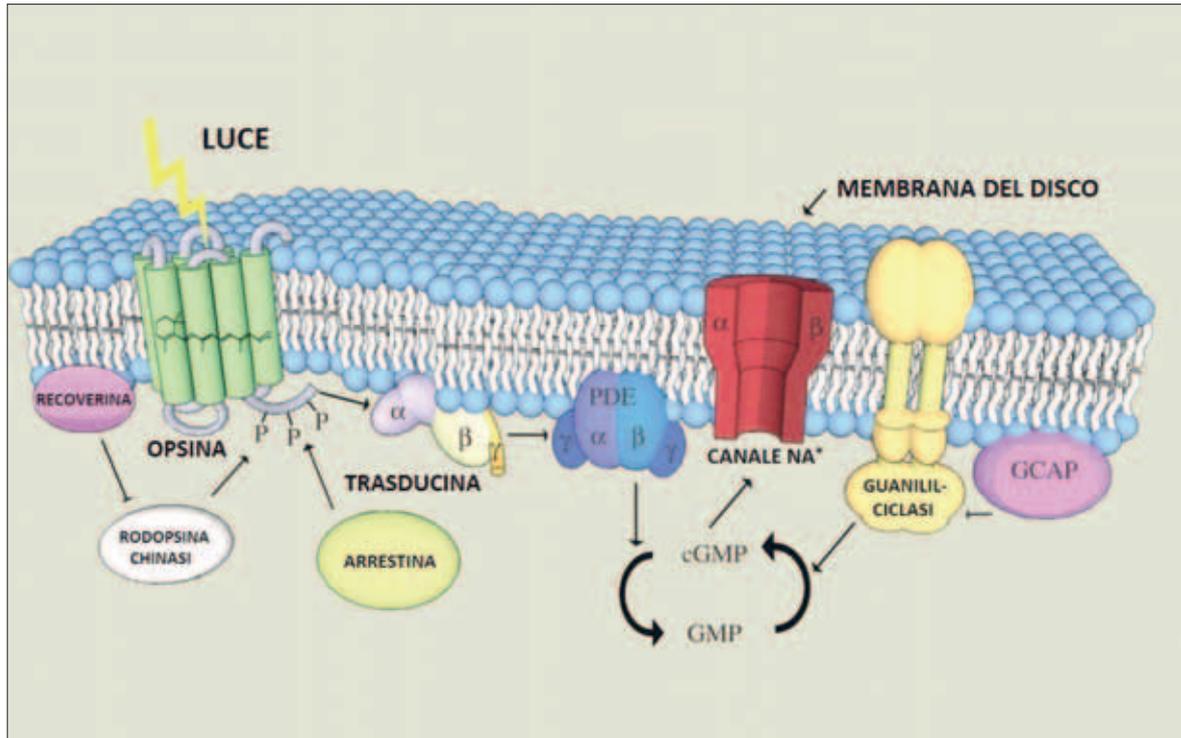


Fig. 4: Scema delle strutture coinvolte nel processo di fototrasduzione.

do immediatamente la forma *tutto-trans*. A questo punto il doppio legame si riforma congelando la molecola nella nuova conformazione. Il *tutto-trans retinale* si allontana così dal suo sito sull'opsina e viene riconvertito altrove a *11-cis retinale* che si riattacca a un'opsina ed è pronto per assorbire la successiva radiazione (Liebman, 1987).

Questo processo è alla base della fototrasduzione con iperpolarizzazione del recettore e trasmissione del segnale attraverso le varie cellule delle vie ottiche fino al cervello.

Il lavoro di Lamb et al. del 2006 analizza molto bene il fenomeno della fototrasduzione del segnale luminoso, ben rappresentato graficamente dalla Figura 4. I meccanismi della fototrasduzione comportano una serie di eventi biochimici a cascata nel segmento esterno dei fotorecettori che gli Autori hanno schematicamente diviso in 5 fasi.

Queste possono essere così elencate: *l'attivazione della rodopsina, l'attivazione della proteina-G, l'attivazione della fosfodiesterasi, l'idrolisi del guanosin-monofosfato ciclico ed infine la chiusura dei canali ionici.*

Essenzialmente, la fototrasduzione comporta la chiusura di canali al Na^+ , che al buio sono normalmente aperti grazie agli elevati livelli intracellulari di cGMP (guanosin-monofosfato ciclico). La luce, infatti, viene assorbita dalle molecole di fotoripimento (rodopsina, nei bastoncelli) che, attivate, stimolano una proteina-G (transducina, nei bastoncelli) che attiva, a sua volta, una cGMP-fosfodiesterasi. Questo enzima catalizza la degradazione del cGMP a 5'-GMP, provocando la riduzione della concentrazione intracellulare del cGMP e quindi la chiusura dei canali del Na^+ , determinando l'iperpolarizzazione dei fotorecettori, che rappresenta quindi la risposta di questi alla stimolazione luminosa.

L'enzima è un membro della famiglia più grande delle fosfodiesterasi nucleotidiche cicliche che idrolizzano differientemente il cGMP ed il cAMP. È possibile ricostruire la struttura dell'enzima, composto essenzialmente da tre domini principali, grazie all'ausilio della microscopia elettronica. I siti di legame del cGMP sono localizzati nelle due subunità α e β (domini GAF-1 e GAF-2) di circa 99 kD ed insieme alle due identiche subunità γ di circa 10 kD, che servono a mantenere i livelli di attività basale dell'enzima al buio, formano i primi due domini non catalitici. Invece, il terzo dominio dell'enzima, formato dalle estremità C-terminali associate alle due subunità α e β , costituisce la regione catalitica.

La concentrazione del cGMP nel segmento esterno dei fotorecettori non è regolata soltanto dalla luce, ma anche dalla concentrazione intracellulare del calcio. La modulazione esercitata dagli ioni Ca^{2+} sui livelli di cGMP è importante per i processi di adattamento alla luce, che si verificano quando si passa da un ambiente oscuro ad uno molto illuminato. In questa circostanza, all'inizio la luce ha un effetto accecante, ma dopo qualche decina di secondi, l'occhio si adatta alla nuova situazione. Il fenomeno dipende da una serie di fattori come, ad esempio, la contrazione della pupilla, ma le modifiche principali che esso comporta sono a carico dei fotorecettori. Una luce molto vivace fa chiudere tutti i canali cGMP-dipendenti, iperpolarizzando massimalmente i coni, che non sono quindi più in grado di rispondere ad ulteriori variazioni del flusso luminoso. Lentamente, però, i coni si depolarizzano di nuovo, a parità di flusso luminoso, tornando ad essere sensibili alle sue variazioni e l'elevata luminosità di fondo non risulta più accecante. In tutto questo, gli ioni Ca^{2+} svolgono un ruolo importante, in quanto normalmente inibiscono la *guanilatociclastasi*, l'enzima che produce il cGMP. Quando i canali per il Na^+ sono chiusi, gli ioni Ca^{2+} che normalmente li attraversano entrando nella cellula si trovano sbar-

rata la via di ingresso, la loro concentrazione intracellulare si riduce (il processo attivo che li pompa fuori dalla cellula non viene invece alterato) e si riduce quindi anche l'inibizione che essi esercitano sulla *guanilatociclastasi*. Viene quindi sintetizzato più cGMP ed i canali per il Na^+ tornano ad aprirsi.

La retina modifica ed elabora i segnali evocati dalla luce nei fotorecettori prima di inviarli al sistema nervoso centrale. I neuroni d'uscita della retina sono le cellule gangliari, i cui assoni formano il nervo ottico e raggiungono il corpo genicolato laterale, il collicolo superiore ed altri nuclei del tronco dell'encefalo. A differenza dei *fotorecettori*, che rispondono alla luce con *modificazioni graduali del loro potenziale di membrana*, le *cellule gangliari* trasmettono le loro informazioni sotto forma di scariche di *potenziali d'azione*. I segnali dei fotorecettori vengono trasmessi alle cellule gangliari tramite tre tipi di interneuroni: le cellule bipolari, le cellule orizzontali e le cellule amacrine. Queste cellule sommano anche i segnali provenienti da diversi fotorecettori.

Come ben noto gli Autori sottolineano anche l'attenzione sulla rigenerazione della rodopsina che vede come primo stadio la riconversione del retinale dalla forma *tutto-trans* alla forma *11-cis*.

Questo processo richiede energia ed è catalizzato tra l'altro dall'enzima *retinale isomerasi*. Una volta formatosi, l'*11-cis retinale* si ricombina automaticamente con la scotopsina per riformare rodopsina, che si mantiene stabile finché non viene di nuovo innescata la sua scomposizione, per assorbimento di energia luminosa (Fig. 5).

Nella retina periferica umana ogni cellula dell'EPR trae contatto con un singolo cono e con circa 20-30 bastoncelli; questo è possibile grazie a dei microvilli che si estendono dalla porzione apicale delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico stesso (Lamb et al., 2006).

In conclusione, dal recente lavoro di Lamb et al. (2006) è possibile dividere i cicli della fototrasdu-

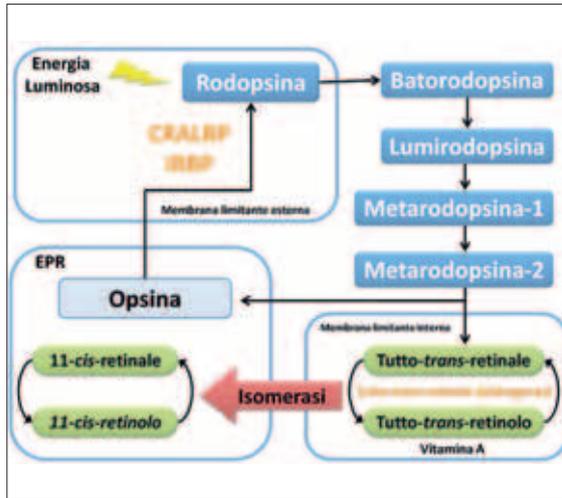


Fig. 6: Il ciclo visivo della Rodopsina-Retinale (da Guyton, 1996)

zione essenzialmente in due gruppi: il primo che vede la isomerizzazione di 11-cis retinale a tutto-trans retinale, mentre il secondo coinvolge la riduzione del tutto-trans retinale in tutto-trans retinolo dalla tutto-trans retinolodeidrogenasi. Il tutto-trans retinolo abbandona così il segmento esterno dei fotorecettori per passare nello spazio interfotorecettoriale per poi entrare nell' EPR con una proteina vettrice (IRBP).

Il tutto-trans retinolo nell'EPR verrà convertito in 11-cis retinolo da una isomerasi. Poi, un altro enzima converte l'11-cis retinolo, precedentemente formato, in 11-cis retinale. Da qui, ulteriori trasportatori come la CRALBP (proteina legante la retinaldeide) e la IRBP (proteina legante nella matrice interfotorecettoriale) legano l'11-cis retinale per trasportarlo nel segmento esterno dei fotorecettori (bastoncelli) dove la scotopsina formerà nuovamente il fotopigmento e così il ciclo potrà riiniziare.

La *macroglia* è costituita da cellule che regolano il metabolismo retinico e modulano la funzione dei neuroni e dei vasi sanguigni (Abbott et al., 1992). Ci sono due tipi cellulari appartenenti alla *macroglia*: le *cellule di Müller* e gli *astrociti*.

Le *cellule di Müller* attraversano lo spessore della retina dall'EPR alla membrana limitante interna; il loro corpo cellulare si trova nello strato nucleare interno e sono le principali cellule regolatrici del metabolismo del glutammato, del bilancio ionico e della funzione neuronale. Le fibre del Müller formano un'estesa rete che sostiene e circonda tutte le cellule nervose. I loro assoni ed i dendriti contribuiscono, inoltre, a formare la membrana limitante interna ed esterna.

Gli *astrociti*, al contrario, sono limitati all'interno dello strato delle fibre nervose e con i loro processi cellulari avvolgono i vasi e le cellule gangliari. I processi ramificati di queste cellule decorrono su un piano perpendicolare rispetto alle fibre del Müller e non contraggono connessioni con esse. Gli astrociti hanno una forma stellata, con nuclei rotondi e numerosi processi sottili. Sono disposti orizzontalmente a circondare i vasi con una densa rete di fibre mostrando, infatti, forti ancoraggi alla parete vasale. Formano, inoltre, una struttura arcuata, a nido d'ape, che avvolge e sostiene gli assoni provenienti dalle cellule gangliari.

Le *cellule di Müller* e gli *astrociti*, insieme, integrano l'attività vascolare e nervosa nella retina. La conferma di ciò ci è fornita da diversi studi alcuni dei quali prevedono l'utilizzo di acido ascorbico (vitamina C), il quale agisce come neuroprotettore e come neuromodulatore. L'acido ascorbico, sintetizzato dal rene e dal fegato o introdotto con la dieta, è distribuito a tutto l'organismo attraverso il sangue, i cui livelli plasmatici sono intorno alle 50 µM/l.

Il cervello, il midollo spinale e le ghiandole adrenergiche hanno la più alta concentrazione di ascorbato. In condizioni normali, il turnover dell'ascorbato è circa del 2%/ora; in condizioni di deficit di ascorbato, con una riduzione del 2% per giorno, la sua concentrazione rimane costante; infatti, i livelli di ascorbato cerebrali sono sotto un duplice controllo statico e dinamico. L'uptake dell'ascorba-

to dal sangue al *fluido cerebrospinale* (CSF) avviene attraverso un trasporto attivo, Na dipendente, a livello del plesso coroideale. La proteina coinvolta è l'isoforma SVCT2 (Tsukaguchi, 1999) che trasporta l'ascorbato nel CSF fino ad una concentrazione di 500 μM /l, cento volte più alta di quella plasmatica. In seguito l'ascorbato diffonde dal CSF al *fluido extracellulare cerebrale* (ECF) (Stamford, 1984). Questa vitamina può entrare nell'ECF attraverso i capillari nonostante essi formino la barriera emato-encefalica e siano sprovvisti dell'SVCT2 e dell' SVCT1. Una possibile spiegazione è che venga trasportato il prodotto di ossidazione dell'ascorbato, il deidroascorbato, attraverso i *trasportatori del glucosio* presenti a livello della barriera emato-encefalica (Agus, 1997). L'acido ascorbico dall'ECF è captato, infine, all'interno dei neuroni e delle cellule gliali: nei primi entra attraverso il SVCT2 fino a raggiungere una concentrazione di 10 mM, mentre penetra nelle cellule gliali attraverso un trasportatore non noto sino ad una concentrazione di 1 mM (Tsukaguchi, 1999).

La concentrazione extracellulare di ascorbato è regolata non solo omeostaticamente ma anche dinamicamente, attraverso il rilascio di glutammato. Un incremento del quantitativo extracellulare di tale vitamina è provocato da un eteroscambio con il glutammato; cioè, nella membrana delle cellule gliali e dei neuroni si trovano dei cotrasportatori che captano una molecola di glutammato e contemporaneamente ne rilasciano una di ascorbato (Fig. 6) (Rice, 2000).

La *microglia*, ossia i macrofagi tissutali, sono normalmente quiescenti ma anche sensibili alle alterazioni dell'omeostasi della retina: quando quest'ultima si altera essi si trasformano repentinamente in fagociti (Broderick et al., 2000).

Infine, nella retina troviamo anche le *cellule endoteliali ed i periciti* che fiancheggiano le cellule nervose e gliali oppure si dispongono intorno alla

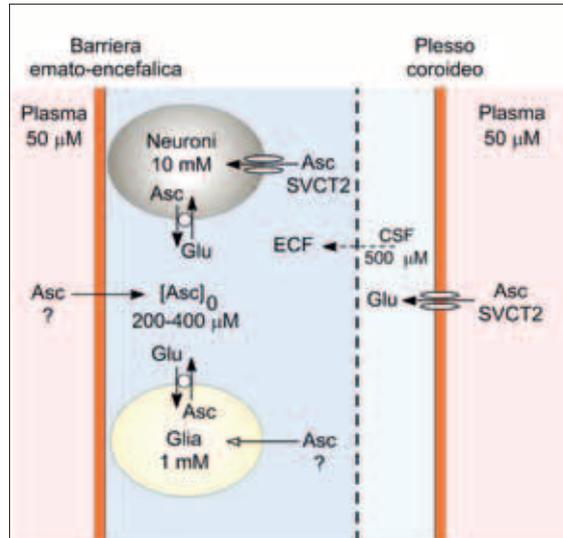


Fig. 7: Compartimentalizzazione e regolazione dell'acido ascorbico nel sistema nervoso centrale. CSF: fluido cerebrospinale, ECF: fluido extracellulare cerebrale

parete dei vasi. I periciti sono cellule muscolari lisce modificate che regolano il flusso vascolare tramite la dilatazione e la contrazione.

Le cellule endoteliali regolano, invece, la funzione omeostatica e costituiscono la *barriera emato-retinica interna*.

L'invecchiamento del foglietto esterno della retina

Invecchiamento delle cellule dell'epitelio pigmentato

Le cellule EPR, come detto, sono postmitotiche e svolgono, durante la vita, numerose funzioni metaboliche non solo per loro stesse, ma anche per i fotorecettori (Fig. 6). A partire dai 20 anni d'età, le cellule dell'EPR mostrano alterazioni morfologiche e funzionali che derivano dalla loro costante attività nel corso degli anni. Basti pensare che una sola cellula dell'EPR supporta metabolicamente circa trenta fotorecettori (Dryja et al., 1998).



Fig. 7: Funzioni dell'epitelio pigmentato retinico

Ogni giorno, il 10-15% del segmento esterno di ciascun bastoncello è fagocitato e rimpiazzato ad opera delle cellule dell'EPR. Dato che il più alto turnover del segmento esterno dei fotorecettori retinici coinvolge i bastoncelli parafoveali (Foulds, 1980; Curcio et al., 1993), *i primi segni di invecchiamento retinico compaiono nella macula.*

L'EPR sub-foveale è quello che mantiene la propria funzionalità per un periodo più lungo, forse per la sua elevata concentrazione di xantofilla e per l'alta densità dei coni (Weiter et al., 1988).

Con l'invecchiamento si ha una riduzione della funzionalità dell'EPR (Bird, 1997) che si rende progressivamente manifesta attraverso alcuni segni morfologici.

I segni dell'invecchiamento dell'EPR consistono *nella riduzione dei granuli di melanina (depigmentazione) e nella migrazione dei granuli di pigmento nella porzione basale delle cellule (Eagle, 1984; Young, 1987), nella perdita dell'esagonalità delle cellule foveali, nella riduzione della densità cellulare (atrofia, iperplasia, ipertrofia, migrazione cellulare) e nell'accumulo intracitoplasmatico di molecole abnormi sottoforma di granuli intracitoplasmatici (lipofuscina, melanolipofuscina) a causa dell'incompleta degradazione dei prodotti del metabolismo.*

Questi granuli sono in parte il risultato di un processo di fagocitosi dei segmenti esterni dei coni e dei bastoncelli e della loro eliminazione da parte dei fagosomi.

All'interno di questi ultimi ha luogo la digestione graduale dei dischi dei segmenti esterni, con formazione dei corpi residui. Molti dischi incompletamente digeriti e alcuni fagosomi sono eliminati nella lamina basale e nella membrana di Bruch.

Grosse quantità di corpi residui si osservano maggiormente negli occhi di individui tra i 40-60 anni, con un forte incremento dopo gli 80 anni. L'accumulo di questi detriti cellulari comporta inevitabilmente sofferenza dell'EPR (Burns e Feeney-Burns, 1980). Tali modifiche sono più estese nella macula piuttosto che nelle aree equatoriali e periferiche.

Da un recente studio di Cavallotti e Schveoller (2008), condotto in maniera comparativa su retine di soggetti di 21 e 75 anni d'età, si è ottenuta la conferma più recente delle alterazioni morfologiche cui va incontro l'EPR con il passare degli anni delle quali vediamo ora, in modo più dettagliato, i segni tipici.

■ Variazioni nel tipo, nella quantità e nella struttura dei granuli

GRANULI DI LIPOFUSCINA

Con l'avanzare degli anni, all'interno delle cellule dell'EPR, compaiono i granuli di lipofuscina che rappresentano l'accumulo lisosomiale di corpi residui contenenti i prodotti finali non degradabili del metabolismo cellulare e, come già detto, dei segmenti esterni dei fotorecettori fagocitati (Feeney, 1978; Feeney-Burns ed Eldred, 1983; Katz et al., 1986; Boulton et al., 1989).

Ciascuna cellula dell'epitelio pigmentato retinico (EPR) è in un continuo processo di rinnovamento intracellulare (Young, 1979; 1982). A

volte questo processo di degradazione molecolare non è completo e l'incompleta digestione porta all'accumulo di "detriti metabolici" che interferiscono con le altre attività metaboliche di queste cellule. I materiali residui sono "inutili" aggregati molecolari, comunemente chiamati "*granuli di lipofuscina*" (Armstrong, 1984), che contengono cellule dell'EPR danneggiate e membrane di coni e bastoncelli fagocitate, cioè detriti cellulari non completamente degradati. L'incompleta degradazione molecolare sembrerebbe causata da substrati alterati e quindi non riconosciuti dai sistemi enzimatici (Koshland, 1973). Queste alterazioni molecolari scaturiscono dai nocivi effetti che i radicali liberi dell'ossigeno esplicano agendo sulle cellule dell'EPR e sui fotorecettori ricchi di acidi grassi polinsaturi che vengono perossidati. Le molecole danneggiate sono fagocitate dalle cellule dell'EPR e vanno ad accumularsi nel loro citoplasma, inducendo così la compromissione del loro metabolismo e la morte cellulare (Young, 1987). Il segmento esterno dei fotorecettori retinici può essere alterato da danni ossidativi prima della fagocitosi oppure può esserlo ereditariamente. Il motivo per cui il segmento esterno dei fotorecettori è sensibile agli stress ossidativi è la sua ricchezza di lipidi polinsaturi (Lerman, 1988). L'esposizione alla luce e soprattutto alle radiazioni a breve lunghezza d'onda potenzia la produzione di radicali liberi ed incrementa l'accumulo di lipofuscina in particolar modo nell'EPR *maculare*, che ne contiene la più alta quantità. Anche alcuni fattori ambientali, tra cui il fumo di sigaretta, riducono i livelli di sostanze antiossidanti e promuovono la produzione di radicali liberi, contribuendo all'accumulo di detriti cellulari.

La lipofuscina è presente all'interno delle cellule dell'EPR sottoforma di granuli giallo-verdi quando eccitati dalla luce ultravioletta (Brizee ed Ordy, 1981). Topograficamente i granuli di lipofuscina si accumulano in maggior quanti-

tà nel polo posteriore del bulbo oculare, mentre si riducono nella fovea (Wing et al., 1978). Questa distribuzione di lipofuscina in rapporto alla localizzazione rimarrà costante durante tutto l'arco della vita e si correla con la densità dei fotorecettori (Brizee and Ordy, 1981; Marshall, 1987). I granuli di lipofuscina contengono lipidi e proteine; in particolare è stata riscontrata la componente A2E che interviene nel processo di fototrasduzione sull'11-cis retinale.

Il volume citoplasmatico delle cellule dell'EPR occupato dalla lipofuscina aumenta con l'età: dall'8% a 40 anni passa al 19% ad 80 anni (Feeney-Burns et al., 1984). Inoltre, il volume citoplasmatico cellulare occupato dalla lipofuscina nella macula è maggiore di quello che si riscontra in periferia: il 19% nella macula rispetto al 13% in periferia. L'accumulo eccessivo di lipofuscina nelle cellule dell'EPR rallenta l'attività metabolica di queste cellule e predispone all'instaurarsi della degenerazione maculare legata all'età (DMLE).

La lipofuscina è un nome generico dato ad un gruppo eterogeneo di aggregati lipo-proteici che si riscontrano nelle cellule invecchiate di tutti i tessuti umani. Diversamente dagli altri tessuti, nella retina la lipofuscina non deriva dalla degradazione di organuli intracitoplasmatici, ma dall'incompleta degradazione dei prodotti derivati dalla fagocitosi del segmento esterno dei fotorecettori in seguito alla perossidazione degli acidi grassi insaturi. Secondo alcuni Autori, una volta accumulatasi, la lipofuscina causa la *morte delle cellule dell'EPR* poiché si comporta come un vero e proprio generatore di "radicali liberi" (Boulton et al., 1993), secondo altri essa è in grado di rilasciare amine lisosomotropiche (Eldred e Lasky, 1993); altri ancora, infine, considerano la lipofuscina come una sostanza inerte che agisce esclusivamente attraverso la congestione del citoplasma (in certi tessuti la lipofuscina può occupare fino al 30% del volume cellulare).

GRANULI DI MELANINA

La melanina ha un duplice ruolo nella retina: riduce l'aberrazione cromatica aumentando l'acuità visiva e protegge contro lo stress ossidativo agendo come un antiossidante cellulare (Handelman e Dratz, 1986). La sua concentrazione aumenta dall'equatore al polo posteriore per raggiungere il picco nella macula (Feeney-Burns et al., 1984; Weiter et al., 1986). L'elevata concentrazione maculare di melanosomi è dovuta al fatto che a questo livello le cellule dell'EPR sono più grandi e concentrate in un'area limitata rispetto alle più piccole cellule dell'EPR extramaculare disperse in un'area più vasta. La distribuzione differenziale dei melanosomi si mantiene costante durante i primi 40 anni di vita, ma dopo i 40 anni d'età si osserva una significativa riduzione dei granuli di melanina in tutte le regioni della retina (Feeney-Burns et al., 1984; Weiter et al., 1986; Schmidt e Peisch, 1986). Per operare dei paragoni sono stati considerati tre gruppi di età (1-20; 21-60; 61-100) e la riduzione nei melanosomi tra la prima e terza classe risulta del 35%. Parlando in termini di volume cellulare, circa l'8% di esso è occupato dalla melanina nelle prime due decadi di vita, si riduce al 6% nel successivo gruppo di età ed infine raggiunge il 3,5% nel terzo (Feeney-Burns et al., 1984).

La melanina è un biopolimero eterogeneo complesso che contiene radicali liberi identificabili con la *spettroscopia electron spin resonance (ESR)* (Sarna et al., 2003). Grazie a questa tecnica è stato possibile osservare, nell'invecchiamento, una riduzione del 40% del contenuto di melanina. I meccanismi che possono spiegare queste evidenze sono tre: l'estrusione di granuli, la degradazione lisosomiale ed il danno chimico. L'estrusione dei granuli può essere una possibilità, nonostante questi non siano stati ritrovati né nella membrana di Bruch né nello spazio interfotorecettoriale (Boulton e Wassel, 1998). La degradazione lisosomiale è fisiologicamente molto elevata per la sua funzione di digestione dei

segmenti esterni dei fotorecettori. Con l'invecchiamento si ha, però, un incremento del numero dei melanolisosomi, accompagnato da una variazione dell'aspetto dei granuli di melanina. Nonostante la morfologia dei melanosomi cambi in seguito alla fusione con i lisosomi, è verosimile che la *melanina non sia degradata* e che le alterazioni derivino dalla degradazione delle proteine della matrice su cui la melanina è depositata. Il terzo meccanismo è quello della degradazione chimica.

L'irradiazione dell'occhio umano con intensa luce blu induce un "fotosbiancamento" non uniforme dei melanosomi. La mancanza di uniformità del fotosbiancamento sembrerebbe dovuta al fatto che nei granuli complessi delle cellule dell'EPR invecchiate si trova anche la lipofuscina che è più fotoreattiva della melanina o addirittura agirebbe da fotosensibilizzante. La luce blu indurrebbe quindi una fotodegradazione ossidativa della melanina per formazione dell'anione superossido e perossido di idrogeno (Sarna et al., 2003). Se da un lato la fotodegradazione della melanina (ossidazione e suo irreversibile sbiancamento) non ha alcun significato biologico nei tessuti ad alto turnover (come nella pelle e nei capelli), dall'altro lato questo stesso evento acquista importanza a livello di quei tessuti a basso turnover come nelle cellule dell'EPR, che sono cellule postmitotiche.

GRANULI COMPLESSI

Con l'avanzare dell'età la melanina, la lipofuscina ed i lisosomi possono fondersi a formare strutture complesse (melanolipofuscina e melanolisosomi) all'interno dell'EPR (Feeney-Burns et al., 1990). Questi granuli hanno una distribuzione regionale simile a quella della lipofuscina; cioè la più alta concentrazione si riscontra a livello maculare con riduzione in periferia e nella fovea (Feeney-Burns et al., 1984).

Il volume cellulare percentuale occupato dai granuli complessi è di 3,3% nella prima decade di

vita e raggiunge l'8-10% nella sesta decade. L'associazione dei lisosomi con i granuli di pigmento (ad es. melanosomi, granuli di lipofuscina e pigmenti complessi) spiega le variazioni età-dipendenti che si osservano a carico degli enzimi lisosomiali e dell'attività delle cellule dell'EPR (Boulton et al., 1994). L'aumento dei granuli di pigmento con l'età, infatti, si associa ad un incremento dei lisosomi e dell'attività di alcuni enzimi quali la fosfatasi acida e la catepsina D al fine di mantenere il normale ciclo degradativo che segue l'ingestione del segmento esterno dei fotorecettori da parte delle cellule dell'EPR.

■ Variazioni della densità cellulare

In molti studi è stato osservato come con l'avanzare dell'età, specie nella macula, si verifichi un *declino fisiologico* del numero di cellule dell'EPR (Dorey et al., 1989; Feeney-Burns et al., 1990; Gao et al., 1992). Nella retina periferica, invece, il numero di cellule dell'EPR può ridursi, rimanere invariato o addirittura aumentare con l'avanzare degli anni (Tso e Friedman, 1968; Dorey et al., 1989; Gao et al., 1992).

Come precedentemente affermato, Dorey et al. (1989) e Watzke et al. (1993) hanno verificato, nella macula, la progressiva riduzione con l'invecchiamento della densità delle cellule dell'EPR. Più precisamente, Panda-Jonas et al. (1996) hanno osservato una perdita media annuale di 17 cellule EPR/mm² di retina rispetto ad una popolazione cellulare originaria nell'EPR di 5.232 cellule/mm². Questi Autori hanno stimato che nel corso di una vita di 100 anni vada perso il 30% circa di cellule dell'EPR. Tali valori sono associati ad una perdita correlata all'età di 3.000-5.000 fibre del nervo ottico, circa lo 0,3% all'anno, su una popolazione di 1,4 milioni di fibre presenti alla nascita (Mikelberg et al., 1989; Jonas et al., 1990) ed a una diminuzione della densità dei coni e dei bastoncelli dello 0,3-

0,5% all'anno rispetto alla densità dei fotorecettori nel neonato (Dorey et al., 1989).

Queste osservazioni indicano una ridotta capacità di riserva nei pazienti più anziani rispetto agli individui più giovani. Ciò può essere la causa del declino della funzionalità visiva che avviene anche in assenza di processi patologici attivi.

Dato che le cellule dell'EPR non hanno la capacità di riprodursi, le cellule adiacenti a quelle perse si modificano aumentando il loro volume e ripristinando la normale continuità delle cellule dell'EPR/fotorecettori. Dorey et al. (1989) hanno riscontrato che il rapporto medio tra fotorecettori/cellule dell'EPR è più alto nella macula rispetto all'area paramaculare ed equatoriale e che questo rapporto aumenta con l'età.

L'EPR è uno dei tessuti maggiormente reattivi dell'occhio e può andare incontro a modifiche atrofiche, ipertrofiche e iperplastiche ed anche a processi di migrazione (Rutnin e Schepens, 1967; Straatsma et al., 1980; Humphry et al., 1984; Lewis et al., 1985, 1986) (Fig. 8, 9, 10, 11, 12).

■ L'invecchiamento della membrana di Bruch

La membrana di Bruch dell'uomo invecchia come la tonaca intima delle arterie e gli altri tessuti connettivi, nei quali le lipoproteine plasmatiche rappresentano la fonte conosciuta di colesterolo extracellulare. Studi morfologici e biochimici hanno dimostrato che la membrana di Bruch con l'invecchiamento va incontro a profondi cambiamenti quali l'*ispessimento* ed il *progressivo accumulo di depositi negli strati interni* (Hogan, 1971; Marshall et al., 1988; Pauleikhoff et al., 1990; Moore et al., 1995; Johnson et al., 2000). L'incremento dello spessore e della complessità strutturale di questa membrana sono da ricondurre essenzialmente al rimodellamento della matrice extracellulare ed all'accumulo, a questo livello, di inclusioni di diversa

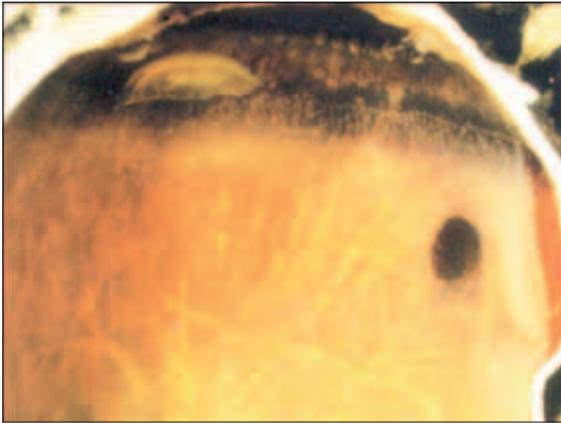


Fig. 8: Aspetto macroscopico di un'area solitaria di 3 mm di ipertrofia dell'ERP



Fig. 9: Le cellule dell'EPR ipertrofiche appaiono distese da granuli di pigmento melanico grossi e sferici (acido-periodico di Schiff, x 400)

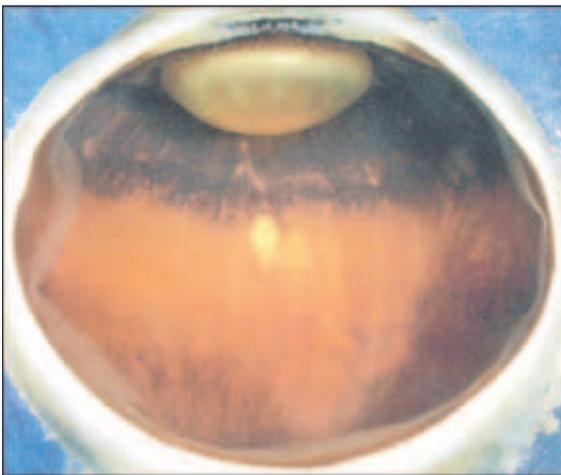


Fig. 10: Banda dello spessore di 4 mm costituita da ipertrofia dell'ERP, localizzata all'ora serrata

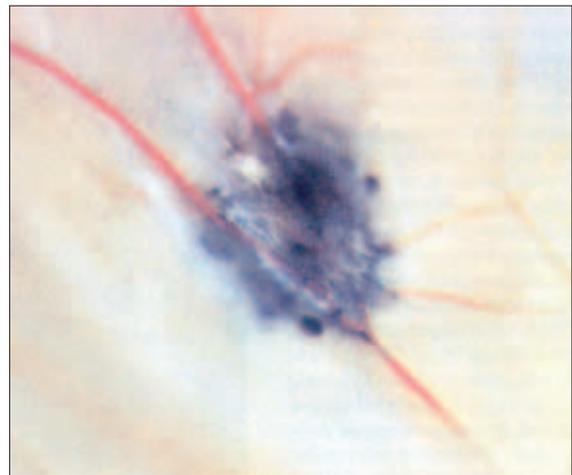


Fig. 11: Aspetto macroscopico di un'area localizzata di iperplasia dell'EPR



Fig. 12: EPR iperplastico sotto e all'interno della retina in sede perivascolare (acido-periodico di Schiff x 400)

natura (Ramrattan et al., 1994), le quali, nella fase più avanzata della vita umana, sembrano aggregarsi a formare depositi basali spesso associati alla maculopatia degenerativa età-dipendente (Sarks, 1976; Pauleikhoff et al., 1990; van der Schaft et al., 1992; Green ed Enger, 1993; Curcio e Millican, 1999).

I cambiamenti della membrana di Bruch, ed in particolare la presenza di queste inclusioni, riducono progressivamente l'efflusso di fluidi dalla retina alla coroide e lo scambio metabolico tra coriocabillare ed EPR (Sarks, 1976; Bird e Marshall, 1986). Moore e Clover (2001) hanno dimostrato una riduzione, legata all'età, della *permeabilità* (conduttività idraulica) e dell'*elasticità* della membrana di Bruch sia periferica che maculare, con conseguenti disturbi del metabolismo del EPR e dei fotorecettori. Inoltre, è stato accertato che la presenza di *depositi lipidici* gioca un ruolo statisticamente importante nella riduzione della permeabilità della membrana stessa (Hodgetts et al., 1998).

I lipidi costituiscono *uno* dei componenti della membrana di Bruch. Gli altri costituenti sono il collagene, le molecole di adesione, le lipoproteine ed i prodotti finali glicosilati (AGE); questi ultimi possono inibire l'attività degli enzimi lisosomiali (Sarks, 1976; Marshall, 1987).

Gli effetti dell'invecchiamento sul passaggio di metaboliti attraverso la membrana di Bruch deve essere meglio accertato. Comunque, più gruppi di studio hanno dimostrato che il *flusso di macromolecole viene a ridursi con l'età*. Il primo gruppo, mediante fluorangiografia, ha osservato che nel fundus di pazienti anziani con una buona acuità visiva ci sono zone che manifestano una ridotta perfusione coroideale (Pauleikhoff et al., 1990). Infatti, la deposizione di lipidi nella membrana di Bruch porta alla degenerazione delle fibre elastiche e collagene, causando l'irrigidimento di queste strutture con conseguente riduzione della loro "compliance". Tale riduzione determina l'aumento delle resistenze dei vasi coroideali, edema e

riduzione del flusso ematico. Questi eventi portano all'indebolimento di tutte le funzioni dell'EPR tra cui quella di trasportare i cataboliti provenienti dai fotorecettori. Le indagini funzionali hanno dimostrato che tali aree posseggono un'elevata soglia di adattamento al buio e un pattern di alterazioni simili a quelle osservate in caso di deficit di vitamina A (Steinmetz et al., 1993).

Un secondo gruppo di lavoro è arrivato alle stesse conclusioni dimostrando che la distrofia di Sorsby, malattia che induce la perdita della visione centrale in giovane età, è caratterizzata dalla presenza di depositi ricchi di lipidi (con spessore di 30 μm) entro la membrana di Bruch (Steinmetz et al., 1992).

La conclusione di entrambi questi studi è che la perdita funzionale della visione è dovuta all'accumulo di depositi nella membrana di Bruch che agiscono da barriera allo smaltimento dei cataboliti e all'arrivo dei nutrienti alla retina.

Lo studio di Moore e Clover (2001) è stato il primo a misurare la permeabilità della membrana di Bruch alle macromolecole, il primo a tentare di determinare il limite massimo delle dimensioni delle macromolecole che possono attraversare la membrana di Bruch ed il primo ad accertare gli effetti della vecchiaia sulla barriera che la membrana di Bruch rappresenta al flusso di sostanze diverse dall'acqua.

La vecchiaia ha tre effetti sulla permeabilità delle macromolecole attraverso la membrana di Bruch. In primo luogo il limite di esclusione molecolare in base al peso molecolare si riduce gradualmente; in secondo luogo, dalla ottava decade di vita la membrana impedisce selettivamente il passaggio di specifiche macromolecole non più sulla base del loro peso molecolare, ma in base ad altri criteri. Infine, alla nona decade di vita la membrana diviene una "barriera" impermeabile a qualsiasi molecola. La permeabilità alle proteine del siero si riduce di circa dieci volte passando dalla prima

alla nona decade di vita; inoltre, se la membrana di occhi giovani è permeabile a molecole con peso molecolare superiore ai 200 kDa, con il passare degli anni permetterà il passaggio esclusivo di molecole con peso molecolare inferiore ai 200 kDa. I fattori che determinano la permeabilità sono lo spessore e la porosità determinati dall'assetto delle fibre, dalla matrice extracellulare e dall'accumulo di detriti ricchi di lipidi. Lo spessore (e l'idrofobicità) aumentano con l'accumulo di lipidi mentre l'alterazione strutturale fibrillare determina una riduzione delle dimensioni dei pori. Hussain et al. (1997) hanno constatato una riduzione dei pori nello strato fibroso della membrana di Bruch dei soggetti anziani.

Con l'utilizzo del microscopio elettronico è stato dimostrato che nell'invecchiamento si ha una *disorganizzazione dell'architettura della membrana di Bruch*. La zona del collagene degenera e diventa più densa (collagene di tipo I) così come lo strato elastico, le cui fibre diventano basofile e si osservano segni di mineralizzazione. Lo strato collagene interno si riempie di piccole vescicole contenenti materiale amorfo e PAS+ che è simile al contenuto dei fagosomi dell'EPR; ciò avviene anche nello strato elastico (Farkas et al., 1971). Nello strato collagene esterno le vescicole sono più grandi e si possono osservare frammenti o aggregati di membrana. Queste vescicole contengono fine materiale granulare, gocce elettrone-trasparenti o piccole vescicole. Sempre con il microscopio elettronico si evidenzia un progressivo aumento nella densità di colorazione dello strato collagene interno ed esterno con l'avanzare dell'età. Queste variazioni di colorazione sono dovute all'accumulo di materiale amorfo intorno alle fibrille collagene che si infiltrano nei pilastri intercapillari della coroide interna. È stata riscontrata una buona correlazione tra i risultati istochimici e ultrastrutturali; infatti, l'aumentato contenuto in lipidi corrisponde all'accumulo di particelle membranose e depositi

amorfi nello strato collagene interno ed esterno.

La natura chimica dei depositi nella membrana di Bruch influenza, come già detto, la *permeabilità* della stessa. I lipidi neutri rendono questa struttura non solo più rigida, ma anche idrofobica: diventa, cioè, una barriera impermeabile al passaggio di nutrienti dalla coroide all'EPR (e quindi alla neuroretina) e di acqua e cataboliti dall'EPR alla coroide. La permeabilità della membrana di Bruch subisce una *drastica riduzione: dal 100% nella prima decade di vita si passa al 40-50% nella nona decade di vita*.

Holz et al. (1994) hanno analizzato i lipidi estratti dalla membrana di Bruch. Principalmente essi sono costituiti da fosfolipidi, trigliceridi e colesterolo libero. Il più grande accumulo di lipidi si ha nella macula forse perché qui si ha la più alta densità di fotorecettori e anche perché in questo punto della retina si ha la maggiore possibilità di perossidazione dei lipidi contenuti nel segmento esterno dei fotorecettori. I lipidi, non potendo essere metabolizzati dall'EPR e si accumulano proprio nelle cellule dell'EPR.

Grazie alle tecniche di colorazione immunostochimica e di microscopia elettronica, Pauleikhoff et al. (1990) hanno esaminato le proprietà immunostochimiche ed ultrastrutturali della membrana di Bruch in 30 occhi umani di età compresa tra 1 e 95 anni. I risultati dei tre gruppi di età da 0 a 30, da 31 a 60 e da 60 in poi mostravano un *incremento progressivo di lipidi* nella membrana di Bruch in relazione all'età. Per determinare la composizione e la distribuzione dei lipidi sono state usate tre diverse colorazioni: la colorazione Bromine-Sudan black B che colora tutte le classi di lipidi, Bromine-acetone Sudan black B individua solo i fosfolipidi e l'Oil red O per evidenziare i grassi neutri (specialmente esteri di acidi grassi saturi ed insaturi). Nel gruppo d'età giovane nessun campione si colorava con nessun tipo di analisi istochimica. 8 campioni su 10 appartenenti al secondo gruppo e tutti

i campioni del gruppo oltre i 60 anni si coloravano con la colorazione Bromine Sudan black B, mentre solo pochi campioni del secondo e terzo gruppo mostravano una debole colorazione con Bromine-acetone Sudan black B, infine solo i campioni del terzo gruppo assumevano una colorazione intensa con Oil red O (Fig. 13).

Le tecniche per la preparazione delle sottili sezioni da analizzare con la microscopia elettronica a trasmissione causano, però, una perdita di queste inclusioni lipidiche. Ruberti et al. (2003) hanno utilizzato la tecnica del “quick-freeze/deep-etch” (QFDE) per preservare queste inclusioni e poter analizzare la loro ultrastruttura. Hanno potuto osservare, dunque, particelle ricche di lipidi accumulate nella BrM, ma anche un vero e proprio “muro lipidico” che si forma nello strato di collagene interno (ICL) in alcuni occhi. Più recentemente, Huang et al. (2007) hanno utilizzato la stessa tecnica su

un campione maggiore di occhi al fine di valutare l'evoluzione di questo processo di accumulo lipidico, ma anche le altre alterazioni del compartimento extracellulare. In questa indagine sono state riconosciute strutture di diverso tipo che rappresentano combinazioni differenti di 3 composti basilari: molecole lipoproteine simili (LLPs), piccoli granuli (SGs) e strutture membranoso-simili. Queste inclusioni sono associate alle fibre elastiche e collagene tramite sottili filamenti. Negli occhi giovani si localizzano preferenzialmente nello strato elastico (EL) ed in quello di collagene esterno (OCL), occupando una porzione estremamente ristretta dello spazio interfibrillare. Con l'avanzare dell'età le LLPs e gli SGs si accumulano nello spazio interfibrillare dell'EL e dello strato di collagene interno (ICL) con successiva formazione (dopo i 70 anni di età) del “muro lipidico” lungo il confine tra la lamina basale dell'EPR e l'ICL.

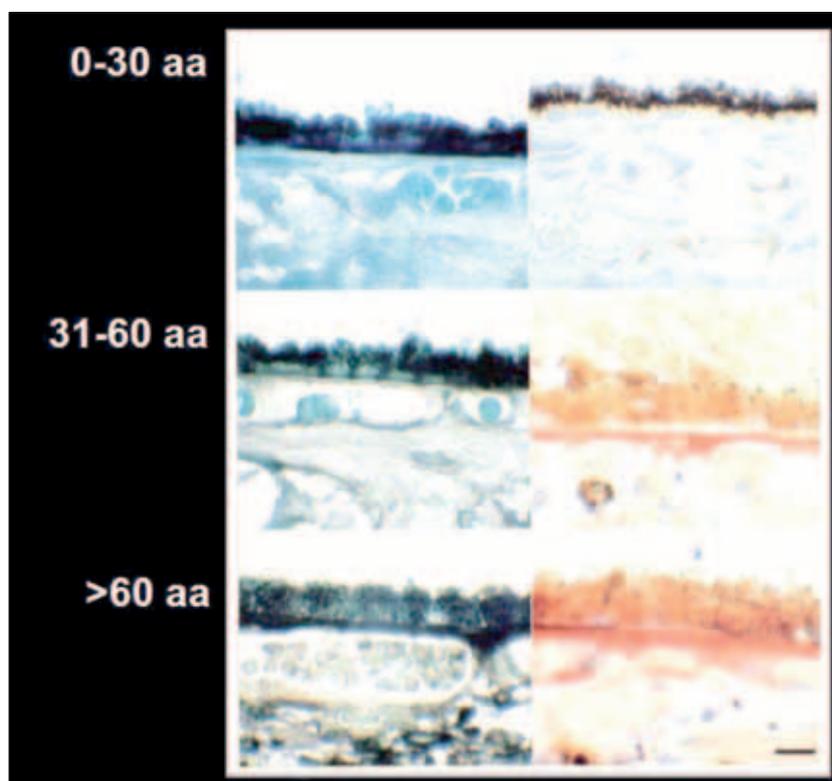


Fig. 13:

Fotografia al microscopio della membrana di Bruch di un occhio appartenente a donatore di 15 anni (in alto), di 47 anni (al centro) e di 75 anni (in basso). Le tre figure sulla sinistra sono colorate con Bromine-acetone-Sudan black B, quelle a destra sono colorate con oil red O. Si osservi che con l'invecchiamento aumenta l'intensità di tutte e due le colorazioni; ciò indica il progressivo accumulo di lipidi

Dunque questo studio afferma come l'EL sia il primo strato ad essere "invaso" da LLPs e SGs; lo stesso accade nelle prime fasi del processo aterosclerotico con la deposizione di LDL nella lamina elastica dell'intima (Kramsch e Hollander, 1973; Guyton et al., 1985; Bocan et al., 1988; Podet et al., 1991; Bobryshev e Lord, 1999; Wang et al., 2001). È stato ipotizzato che le LDL interagiscano con le fibre di elastina tramite aminoacidi idrofobici (Bobryshev e Lord, 1999) oppure attraverso gli ioni calcio leganti le fibre stesse (Wang et al., 2001). Rimane da scoprire se questi stessi meccanismi si verificano anche a livello della BrM.

Nel corso degli anni sono state proposte diverse teorie con lo scopo di chiarire l'origine di queste LLPs: inizialmente si pensava che derivassero dal plasma (Frank e Fogelman, 1989), ma in seguito alle osservazioni di Huang et al. (2007), oggi sembra più probabile che esse derivino dall'EPR. Infatti, il progressivo accumulo di LLPs nell'EL e nell'ICL, rispetto ai quali OCL rimane relativamente libero, induce a pensare che queste particelle, originate nell'EPR, siano ostacolate e quindi accumulate nello strato più interno della MrB.

Un'altra proprietà che influisce sulla permeabilità di membrana è la *polarità*. Come tutte le membrane basali, la membrana di Bruch è ricca di proteoglicani e glicosaminoglicani che le conferiscono una netta carica negativa (Pino et al., 1982; Call e Hollyfield, 1990). È noto come una alterazione nel contenuto dei glicosaminoglicani possa determinare una variazione della permeabilità macromolecolare della matrice extracellulare (Kanwar et al., 1980). Con l'invecchiamento si ha, inoltre, una variazione del contenuto di proteoglicani. Infatti, mentre i glicosaminoglicani sono sintetizzati nella stessa quantità durante tutta la vita, dopo i 70 anni vengono sintetizzati soltanto i proteoglicani ad elevato peso molecolare. L'alterazione

del contenuto e della struttura dei proteoglicani determina una variazione della polarità di membrana.

Il turnover e il rinnovamento della matrice extracellulare (ECM) è regolato dalle *metalloproteasi della matrice (MMP)* e dagli *inibitori tissutali delle MMP (TIMP)* (Birkedal-Hansen et al., 1993).

La concentrazione di TIMP-3 presente nella membrana è età dipendente. Sezioni di fovea di occhi di donatori giovani (20-30 anni) non mostravano un'immunoreattività ad anticorpi anti TIMP-3. Invece, la distribuzione di TIMP-3 in campioni appartenenti ad occhi di donatori della nona-decima decade, presentava un'immunoreattività dalla membrana di Bruch alla matrice intorno alla coriocapillare. L'analisi quantitativa ha mostrato che il contenuto e la funzione di TIMP-3 nella macula aumenta con l'età.

Le proteine che aumentano o diminuiscono con l'età possono essere considerate "*proteine età-dipendenti*" e sono considerate causa di malattie età correlate (McFall-Ngai et al., 1985; Yamada et al., 1988).

Kamei e Hollyfield (1999) hanno concluso che l'incremento del TIMP-3 nella membrana di Bruch avviene durante il normale invecchiamento ed anche in condizioni patologiche come la ARM; questa è, dunque, una delle proteine responsabili dell'ispessimento della membrana di Bruch.

L' invecchiamento del foglietto interno della retina o neuroretina

■ Invecchiamento dei neuroni (fotorecettori, cellule bipolari, cellule gangliari)

La maggior parte delle persone anziane ha deficit della visione sia fotopica (Owsley e Burton, 1991) che scotopica (Sturr et al., 1992) non correlabili a patologie manifeste.

La normale funzione visiva dipende dall'integrità di numerosi fattori che comprendono la trasparenza dei mezzi diottrici, il mosaico fotorecettoriale, l'integrità delle vie intraretiniche e la connessione nervosa tra cervello e le strutture deputate alla visione.

Tutti questi elementi possono manifestare delle alterazioni correlate all'età. Ad esempio, la costrizione pupillare e la opacizzazione dei mezzi diottrici riducono entrambi la quantità di luce che colpisce la retina (Weale, 1978).

Una delle più importanti questioni nello studio dell'invecchiamento del sistema visivo è quella di determinare il contributo relativo sia dei fattori ottici che dei fattori nervosi poichè entrambi riducono la visione fopica e scotopica (Elliot, 1987).

Studi sull'invecchiamento della retina neurosensoriale avevano descritto la degenerazione e la perdita di un gran numero di fotorecettori. *Il segmento esterno sia dei coni (Marshall, 1979) che dei bastoncelli (Marshall et al., 1979) si disorganizza e il segmento interno si riempie di corpi rifrangenti, presumibilmente di lipofuscina (Tucker, 1986; Iwasaki e Inomata, 1988).*

Il dislocamento e la perdita parziale dei nuclei dei fotorecettori si hanno senza significative alterazioni dell'EPR, della membrana di Bruch e della coriocapillare (Gartner e Henkind, 1981).

Il numero dei nuclei dei fotorecettori è inversamente correlato con l'età nei donatori neri e con i livelli di lipofuscina dell'adiacente EPR nei donatori bianchi (Dorey et al., 1989).

Gao e Hollyfield (1992) suggeriscono che la perdita dei bastoncelli avviene precocemente durante la vita adulta e che la densità dei coni periferici diminuisce gradualmente nell'estrema periferia retinica. Curcio et al. (1990) affermano, inoltre, che non c'è alcuna prova di una riduzione nella densità del picco dei coni foveali, sebbene sia alta la variabilità interindividuale.

La perdita dei fotorecettori foveali comincia a manifestarsi nelle persone oltre i 90 anni (Feeney-Burns et al., 1990).

Poiché gli studi condotti sino a questo momento non avevano specificato in modo preciso la localizzazione anatomica delle zone analizzate era difficile confrontare le alterazioni anatomiche retiniche riscontrate con le variazioni età-correlate nella funzione visiva.

A tal fine lo studio di Curcio et al. (1993) ha esaminato, tramite indagini digitali computerizzate, la topografia della retina di occhi sani di persone divise in quattro gruppi in base all'età: gruppo 1 (da 27 a 37 anni), gruppo 2 (da 44 a 58), gruppo 3 (da 61 a 75) e gruppo 4 (da 82 a 90), con lo scopo di distinguere le alterazioni para-fisiologiche dell'invecchiamento da quelle patologiche.

È stato così visto che nei 43° centrali sono i bastoncelli e non i coni ad essere persi durante la vita.

ASPETTO QUALITATIVO DEL MOSAICO FOTORECETTORIALE

Il mosaico fotorecettoriale di retine invecchiate, ma senza alterazioni patologiche, è simile a quello delle retine giovani. Nonostante ciò la retina invecchiata presenta due aspetti citologici tipici. Il primo è la presenza di particelle rifrangenti di circa 1 µm di diametro presenti a livello della giunzione ellissoide-mioide dei coni. Queste particelle appaiono come corpi rifrangenti o granuli di lipofuscina che si trovano nel segmento interno e che iniziano a vedersi dopo i 30-40 anni di età (Fig. 14a). Il secondo aspetto è la dislocazione dei nuclei che occasionalmente sono situati nello strato dei segmenti interni piuttosto che nello strato nucleare esterno (Fig. 14b, 14c).

ALTERAZIONI ETÀ CORRELATE NEI CONI EXTRAFOVEALI

Dallo studio di Curcio et al. (1993) è emerso anche che la densità dei coni in tutti e quattro i gruppi di età è alta nella fovea (Fig. 15a) e si riduce rapidamente con l'eccentricità ed, in misura minore, nel-

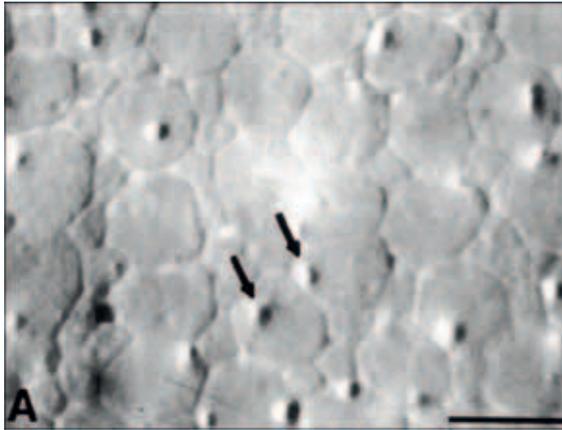


FIG. 14a: *Inclusioni intracellulari altamente rifrangenti (indicati dalle frecce) vicini alle giunzioni ellissoidi mioidi (Curcio et al., 1993)*

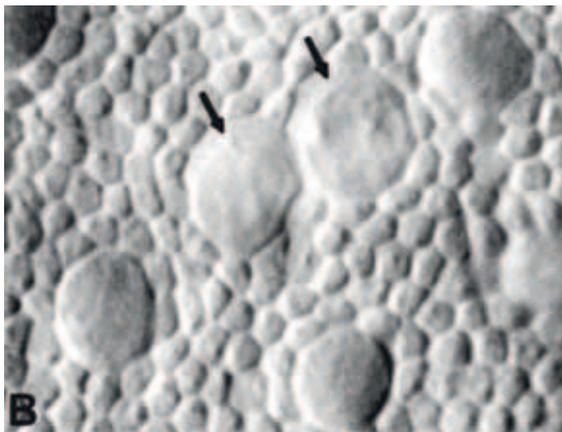


FIG. 14b: *Nuclei (indicati dalle frecce) di due coni adiacenti migrati dallo strato nucleare esterno a quello interno (Curcio et al., 1993)*

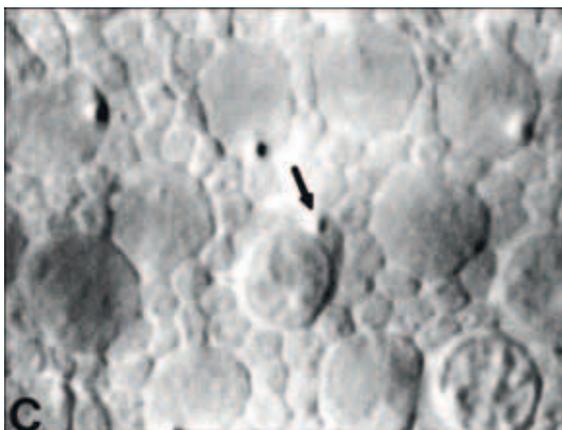


FIG. 14c: *Coni con nucleo dislocato agli strati interni e contenenti particelle rifrangenti (Curcio et al., 1993)*

la retina nasale e in un'area che si estende intorno al disco ottico. La densità dei coni è variabile nei diversi gruppi (coefficiente di variabilità dal 15 al 30%); intorno al disco ottico è comunque sempre bassa (<15%) oltre 1 mm di eccentricità.

Le mappe della Figura 15a colonna destra rappresentano la differenza media tra ciascuno dei tre gruppi più anziani e del gruppo più giovane, i colori freddi indicano una densità minore rispetto al gruppo più giovane; mentre i colori caldi indicano che in quella popolazione la densità media è maggiore di quella del gruppo 1 (di riferimento). Una mappa con il giallo-verde indica che la differenza tra i gruppi è minima.

Queste mappe indicano che il gruppo 2 (da 44 a 58 anni) ha la differenza di densità minore dei coni (l'88% di quella del gruppo 1), ma piccole perdite sono state viste anche nei gruppi 3 e 4 (4% e 5% per il 3° e 4° gruppo). Comunque non ci sono differenze di densità statisticamente rilevanti tra i 4 gruppi.

La regione retinica mappata in tutti gli occhi era di 8 mm di diametro è cioè il 5% dell'intera area retinica che contiene il 10% dei coni che si trovano nei 28,5° centrali. Il numero medio di coni entro questa regione era di 488.600 in tutti gli occhi. Più recentemente (2009) Shelley et al. hanno esaminato le alterazioni morfologiche dei coni in retine istologicamente normali e in pazienti affetti da degenerazione maculare età-dipendente (AMD). La regione maculare è stata escissa da 18 occhi di donatori tra i 22 e i 96 anni e criosezionata. Alterazioni dell'immunoreattività verso l'opsina dei coni sono state riscontrate in tutte le retine esaminate (dal 3,5% al 95% per ogni campione) e risultano correlate al rigonfiamento distale dell'assone dei coni. Nelle 10 retine che non presentano AMD tali anomalie sono principalmente localizzate a livello extra-foveale. La natura di queste alterazioni sembra essere la stessa sia nelle retine sane che nelle regioni adiacenti alle aree di evi-

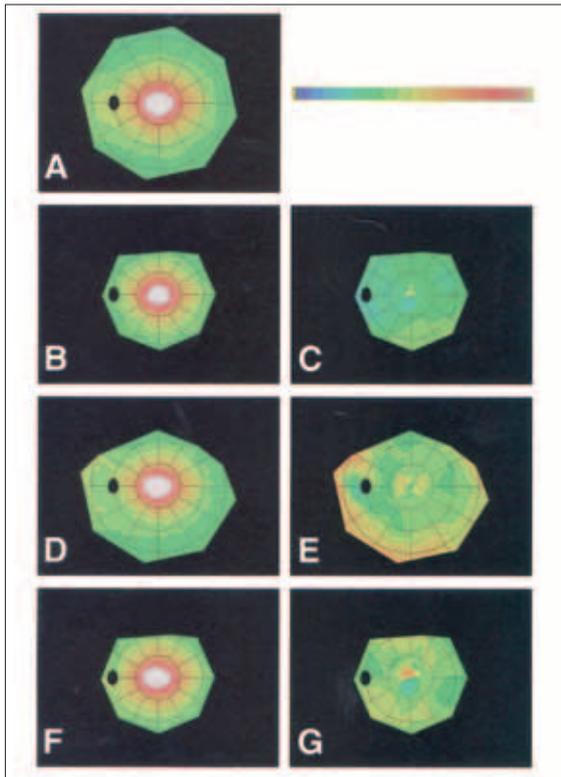


Fig. 15A:

Densità media dei coni in retine di gruppi con diversa età (colonna sinistra) e differenza di densità tra i gruppi più vecchi e più giovani (colonna destra). Le mappe riproducono il fondo oculare di sinistra, la macchia nera rappresenta il disco ottico. Gli anelli di isoeccentricità sono disegnati ad intervalli di 2 mm. I colori delle figure A, B, D, F indicano che la densità spaziale dei coni (coni/mm²) va da 0 a 200.000. Ciascun colore discreto rappresenta un'area con una densità spaziale dei coni pari a 1.000 coni/mm². Nella fovea il colore bianco indica che la densità è di oltre 16.000 coni/mm². I colori delle figure C, E, G riproducono la differenza media tra una popolazione test (gruppi 2, 3, 4 rispettivamente) e una popolazione di riferimento (gruppo 1). I colori freddi indicano che la popolazione test ha una più bassa densità media dei coni rispetto alla popolazione di riferimento; i colori caldi indicano che la popolazione test ha una più alta densità media di coni rispetto a quella di riferimento. Se nella mappa predominano i colori dal giallo-verde al giallo-arancio vuol dire che la differenza della densità dei coni è minima. A) Densità dei coni nel gruppo 1. Notare che la densità dei coni è maggiore nella fovea e si riduce con l'eccentricità rimanendo più alta nasalmente che temporalmente. B) Densità dei coni nel gruppo 2. C) Differenze della densità dei coni tra gruppo 2 ed 1. D) Densità dei coni nel gruppo 3. E) Differenze tra gruppo 3 ed 1. F) Densità dei coni nel gruppo 4. G) Differenze della densità dei coni nel gruppo 4 ed 1 (Curcio et al., 1993)

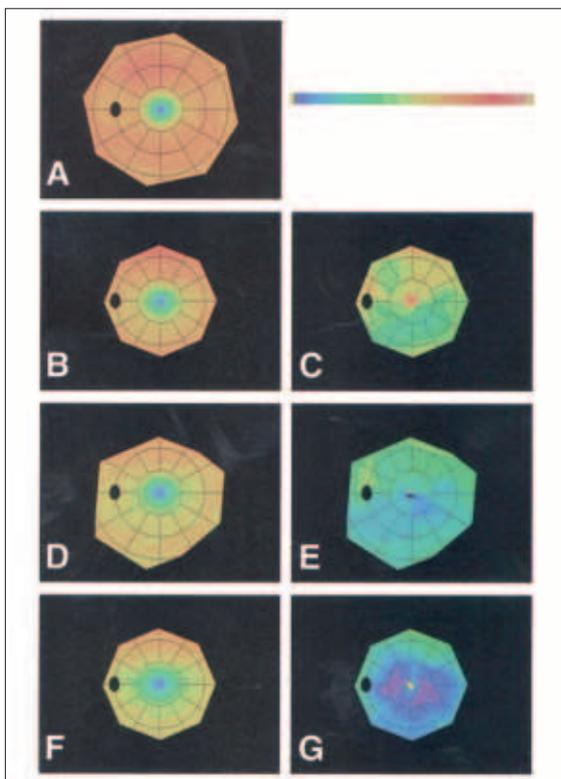


Fig. 15B:

Densità media dei bastoncelli di retine di individui appartenenti a gruppi di diversa età (colonna sinistra) e differenza della densità media dei bastoncelli tra gruppi più anziani e più giovani (colonna destra). I colori delle figure A, B, D, F mostrano che la densità spaziale (cellule/mm²) dei bastoncelli è tra 0 e 200.000. Ciascun colore discreto rappresenta un'area con una densità spaziale di bastoncelli di 12.500 bastoncelli/mm². I colori delle figure C, E, G mostrano la differenza tra la popolazione test (gruppo 2, 3, 4 rispettivamente) e la popolazione di riferimento (gruppo 1). A) Densità dei bastoncelli nel gruppo 1. Notare che la densità dei bastoncelli è più bassa nella fovea, aumenta con l'aumentare dell'eccentricità e in particolare nei settori superiori. B) Densità dei bastoncelli nel gruppo 2. C) Differenza della densità dei bastoncelli tra il gruppo 2 (test) e gruppo 1 (riferimento). D) Densità dei bastoncelli nel gruppo 3. E) Differenza della densità dei bastoncelli tra il gruppo 3 e 1. F) Densità dei bastoncelli nel gruppo 4. G) Differenza della densità dei bastoncelli tra il gruppo 4 e 1. Osservare l'annulus viola nella parafovea, esso rappresenta un'area praticamente priva di bastoncelli (Curcio et al., 1993)

dente degenerazione in retine affette da AMD. Dunque, la ridistribuzione dell'opsina e il rigonfiamento della porzione distale dell'assone sono comuni nel processo di invecchiamento oculare, ma possono indicare una suscettibilità alla AMD.

ALTERAZIONI ETÀ CORRELATE DEI CONI FOVEALI

Il range di densità dei coni tra i 56 ed i 90 anni è piuttosto limitato (116.600 a 210.000 coni/mm²) sovrapponendosi nei più anziani al limite più basso dei donatori più giovani.

Una regione di 0,8 mm di diametro, centrata sulla fovea, è la sola parte della retina dove i coni superano i bastoncelli. Questa regione contiene 31.200 coni su mm² con un coefficiente di variabilità di solo il 12% e lo slope della regressione lineare rispetto all'età non è significativamente diverso da zero. Questi dati forniscono l'evidenza che la popolazione dei coni nei 2,8° centrali rimane stabile durante la vita adulta ed inoltre, per quanto riguarda la topografia dei coni, non è stata trovata nessuna rilevante evidenza, come già detto, della perdita età correlata dei coni entro i 28° centrali.

I coni extrafoveali non sono più vulnerabili all'invecchiamento di quelli foveali in accordo con l'ipotesi che il pigmento maculare, altamente concentrato nei 2° centrali, è un antiossidante che migliora la perossidazione lipidica luce-indotta e poiché una piccola quantità di questi carotenoidi è rintracciabile anche fuori della fovea (Bone et al., 1988). Comunque, la stabilità del numero totale dei coni non esclude la perdita di un piccolo numero di coni stessi.

La sensibilità dei meccanismi blu sensibili si riduce con l'età, particolarmente nella parafovea (Hagerstrom-Portnoy, 1988), anche dopo correzione delle alterazioni dei mezzi oculari che filtrano la luce a breve lunghezza d'onda (Snyder e Miller, 1977; Johnson et al., 1988; Hirsh e Curcio, 1989; Feeney-Burns et al., 1990; Swanson e Birch, 1991; Curcio et al., 1991; Scheffrin et al., 1992).

È richiesto un decremento del 75% nella densità cellulare per avere una riduzione della risoluzione visiva da 60 c/g a 30 c/g (da 20/10 a 20/20 Snellen). Dato che non ci sono evidenze per una così massiva perdita dei coni, l'aumento della distanza tra i coni foveali non contribuisce in modo significativo al declino età correlato della risoluzione visiva (Pitts, 1982).

La perdita nell'acuità che si manifesta con il passare degli anni può essere quindi spiegata da alterazioni in altre sedi del sistema visivo, incluso *una riduzione età-correlata del 25% delle cellule gangliari che presiedono agli 11° centrali del campo visivo* (Curcio et al., 1993). Peraltro, recenti evidenze mostrano che, nella maggior parte dei casi, fattori ottici piuttosto che retinici contribuiscono ai deficit della funzione fotopica e, dunque, una riduzione nella sensibilità al contrasto tra medie ed alte frequenze spaziali trova una valida spiegazione in una più bassa modulazione di trasferimento dei mezzi ottici negli occhi di anziani sani.

Comunque, i fattori neuronali possono giocare un ruolo in altre funzioni svolte a livello fotopico, come la sensibilità luminosa differenziale (attraverso il campo visivo) (Johnson et al., 1989) o la visione spaziale (ad es. sensibilità al contrasto e acuità visiva) valutata a livello mesopico o scotopico alto (Sloane et al., 1988).

Forse il ridotto illuminamento retinico, negli occhi invecchiati, provoca l'intrusione dei bastoncelli e delle vie rod-driven con una più bassa risoluzione spaziale delle vie cone-driven.

ALTERAZIONI ETÀ CORRELATE

NELLA TOPOGRAFIA DEI BASTONCELLI

I bastoncelli sono assenti al centro della retina ed aumentano con l'eccentricità formando un anello ellittico ad elevata densità (>150.000 bastoncelli/mm²) da 2 a 5 mm di eccentricità, con un picco 4-5 mm superiormente alla fovea (Curcio et al., 1990)

(Fig. 15b). La variabilità interindividuale della densità dei bastoncelli per tutti e quattro i gruppi di età analizzati è veramente alta (coefficiente di variazione >45%) al confine della zona priva di bastoncelli, alta (30-45%) entro 1 mm dalla fovea e intorno al disco ottico, mentre è bassa (<15%) nelle restanti parti.

Con l'invecchiamento, la densità dei bastoncelli è ridotta nella retina sia extrafoveale che foveale.

La perdita più significativa si riscontra nell'anello con più alta densità dei bastoncelli.

Il numero dei bastoncelli entro gli 8 mm centrali in tutte le retine esaminate va da $7,41 \times 10^6$ all'età di 45 a $3,60 \times 10^6$ a 82 anni.

Lo slope della regressione lineare suggerisce che si ha una perdita media di 684 bastoncelli/mm²/anno nei 28,5° centrali di visione, così che a 90 anni i bastoncelli totali sono ridotti al 69% rispetto a quelli che si osservano a 34 anni.

■ Estrema periferia retinica

Come precedentemente affermato Curcio et al. (1993) hanno dimostrato la stabilità dei coni centrali e la riduzione dei bastoncelli tra i 50 ed i 60 anni. Questo dato contrasta i risultati di Gao e Hollyfield (1992). Questi ultimi, infatti, affermano che all'equatore temporale, la densità dei bastoncelli si abbassa del 15% tra la seconda e quarta decade di età e del 32% dalla nona decade di vita e che la densità dei coni si riduce significativamente del 23% durante il medesimo periodo.

Questi risultati indicano, nel loro insieme, che *la retina periferica invecchia in modo differente da quella centrale.*

ALTERAZIONI ETÀ CORRELATE DEL DIAMETRO DEL SEGMENTO ESTERNO E DEL "COVERAGE" DEI FOTORECETTORI E DELLE FIBRE DENDRITICHE

L'area di selettiva perdita dei bastoncelli è localizzata a 3 mm dalla fovea. Gli spazi lasciati vuoti dalla perdita cellulare sono occupati da bastoncelli

più grandi. Il diametro del segmento interno dei bastoncelli di retine giovani va da 2,2 a 2,8 μm, quello dei bastoncelli superstiti delle retine più vecchie è del 13,5% maggiore, allo stesso range di eccentricità.

Uno dei più significativi risultati a cui Curcio et al. (1993) sono giunti è che *la densità spaziale dei bastoncelli si riduce di circa il 30% nei 28,5° centrali durante il periodo che va dai 34 ai 90 anni in occhi apparentemente sani. Questa perdita è minore nella fovea tra i 45 e i 61 anni e, dalla nona decade, è maggiore in un anulus parafoveale da 0,5 a 3 mm di eccentricità.* Nonostante la diffusa perdita dei bastoncelli della retina centrale l'aspetto del mosaico fotorecettoriale è qualitativamente normale, poiché solo due bastoncelli/mm² circa vengono persi al giorno. Inoltre, il mosaico non mostra rotture né inserzioni di altri tipi cellulari (glia) così che l'estensione del segmento interno dei rimanenti bastoncelli è uguale a quella delle retine giovani. Non ci sono evidenze di una riduzione età correlata nel contenuto di rodopsina come ci si potrebbe aspettare dalla perdita di fotorecettori. I rimanenti fotorecettori, dunque, sono sufficienti per espletare la loro funzione.

Con la densitometria è stato dimostrato che si verifica, dai 12 ai 78 anni, un piccolo, ma significativo incremento della densità di pigmento dei bastoncelli fino ai 16° temporali. Poiché il numero dei bastoncelli a questo livello diminuisce con l'età, il segmento esterno delle cellule rimanenti dovrebbe contenere più pigmento nelle retine più vecchie rispetto a quelle più giovani. Questo incremento potrebbe essere dovuto, almeno in parte, *all'attorcigliamento che effettivamente incrementa la lunghezza totale del segmento esterno dei bastoncelli di circa il 40%*, mentre rimane invariata la distanza tra la membrana limitante esterna e l'EPR (Marshall et al., 1979). Si calcola che questo processo coinvolga dal 10 al 20% della popolazione totale dei bastoncelli dalla settima decade

(Marshall et al., 1979), mentre nella retina centrale è del 2%, sia nei donatori anziani che giovani (Marshall et al., 1979), suggerendo che l'incremento del contenuto di rodopsina potrebbe essere dovuto al fatto che i segmenti esterni negli occhi degli anziani sono più grandi di quelli dei giovani, ma morfologicamente simili. Per esempio, se il diametro del segmento esterno incrementa in proporzione al segmento interno, le membrane dei dischi potrebbero contenere il 29% di pigmento in più negli occhi più vecchi rispetto a quelli dei giovani (Katz e Robison 1986).

L'ipertrofia compensatoria del segmento esterno dei bastoncelli è in accordo con la prova della plasticità del sistema dei bastoncelli degli adulti dopo parziale perdita degli stessi.

A questo punto c'è da chiedersi se la perdita dei bastoncelli età correlata contribuisca al deficit della funzione scotopica. Dato che l'estensione dei bastoncelli è la medesima nelle retine giovani ed anziane si pensa che altri fattori come l'alterazione della sensibilità dei fotopigmenti, della rigenerazione, della risposta dei neurotrasmettitori e dei potenziali di membrana indeboliscano la sensibilità dei bastoncelli (Sturr e Hannon, 1991).

Tra gli studi più recenti riguardanti la riorganizzazione cellulare retinica nell'invecchiamento, risulta particolarmente interessante quello condotto da Eliasieh et al. (2007). Questa indagine ha lo scopo di valutare la natura e l'estensione della riorganizzazione neuronale retinica nell'invecchiamento, partendo dal presupposto che, fino a questo momento, la base neurobiologica della riduzione della performance visiva nella senescenza fosse attribuita ad un processo degenerativo e regressivo della retina. Basandosi sull'immunoistochimica sono state identificate le diverse cellule retiniche e sono state confrontate tra loro nelle retine giovani e vecchie. Dallo studio è emerso come, nelle retine invecchiate, fibre dendritiche di cellule bipolari si

accregono nello stato nucleare esterno, ben oltre il limite dello strato plessiforme esterno. Inoltre, gli Autori hanno osservato che questo fenomeno segue un chiaro gradiente spaziale con una accentuazione a livello periferico piuttosto che nella regione centrale della retina. Anche le cellule orizzontali, che normalmente formano delle triadi sinaptiche con fotorecettori e cellule bipolari, presentano lo stesso fenomeno: proiettano nello stato nucleare esterno dendriti che si sovrappongono a quelli delle cellule bipolari. Nonostante questi prolungamenti siano stati riscontrati, talvolta, anche nelle retine giovani, la loro lunghezza e la loro densità sono notevolmente maggiori in quelle invecchiate. Dunque, sebbene in letteratura sia stato sempre enfatizzato l'aspetto degenerativo della retina invecchiata, questo studio ne evidenzia invece l'elevato grado di plasticità cellulare. Ancor prima di questo riscontro, ottenuto nelle retine invecchiate umane, lo stesso gruppo di studio aveva descritto simili evidenze analizzando retine di topi.

■ Perché solo i bastoncelli muoiono con l'invecchiamento?

Un possibile meccanismo è la selettiva vulnerabilità dei bastoncelli.

La maggiore vulnerabilità dei bastoncelli rispetto ai coni trova una probabile spiegazione nel fatto che i primi hanno un tasso di rinnovamento dei dischi del segmento esterno più rapido. Ciò richiede un notevole dispendio energetico sia da parte dei bastoncelli, per il rinnovamento di nuovi dischi, sia da parte dell'EPR, per lo smaltimento dei vecchi dischi.

L'EPR presiede a numerose funzioni responsabili dell'integrità dei fotorecettori (Boulton, 1991); è stato osservato come le alterazioni età correlate dei fotorecettori, indipendenti da quelle dell'EPR, siano generalmente di lieve entità (Young, 1987).

Ad esempio, una disfunzione dell'EPR determina un rallentamento del tasso di rigenerazione dei fotopigmenti (sia dei coni che dei bastoncelli) ed un incremento delle circonvoluzioni del segmento esterno dei bastoncelli.

Le principali alterazioni dell'EPR età correlate sono l'accumulo di lipofuscina e la riduzione dei granuli di melanina (Wing et al., 1978; Schmidt et al., 1986) che si hanno in concomitanza con l'ispessimento e la formazione di depositi nella membrana di Bruch (Feeney-Burns e Ellersiek, 1985).

È stato osservato che l'accumulo di lipofuscina intracellulare (Feeney-Burns et al., 1984) riduce in modo significativo la funzione dei fotorecettori (Dorey et al., 1989).

Elevati livelli di lipofuscina, inoltre, sono stati correlati ad un basso numero di nuclei dei fotorecettori nella sottostante retina (Dorey et al., 1989).

Secondo questa ipotesi, poiché la lipofuscina è strettamente correlata ai bastoncelli (Wing et al., 1978), la perdita dei bastoncelli dovrebbe essere massima nell'anello con più alta densità dei bastoncelli, cioè a 3-5 mm dal centro della fovea (Osterberg, 1935; Curcio et al., 1990). Al contrario i risultati di Curcio et al. (1993) collocano la perdita dei fotorecettori più vicina alla fovea a 0,5-3 mm, confutando la correlazione tra l'accumulo di lipofuscina e la perdita di fotorecettori.

■ Ruolo del sistema proteolitico ubiquitina-dipendente nella struttura della retina

La via proteolitica dell'ubiquitina è coinvolta nella regolazione di processi cellulari essenziali, come il ciclo cellulare, la proliferazione, la differenziazione e l'organogenesi della retina, del cristallino e della cornea (Shang et al., 2004).

L'espressione di tale sistema proteolitico in questi tessuti *varia sia in funzione dell'invecchiamento che in risposta allo stress*, infatti, la sua attivazione

avviene in seguito all'accumulo di proteine danneggiate che, se non degradate, potrebbero essere citotossiche (Fischer, 2003).

L'ubiquitina è presente in tutta la retina, in modo particolare nelle cellule gangliari e la maggior parte di essa è legata covalentemente a proteine bersaglio (Naash et al., 1997).

Si è visto che, inducendo un *danno ischemico* nella retina di topo aumenta considerevolmente l'espressione di ubiquitina e parallelamente aumenta anche l'espressione di UCH-L1; questa è un'idrossilasi carbossiterminale specifica dei neuroni detta anche PGP 9.5. In questa situazione di stress le proteine anti-apoptotiche prodotte, come Bcl-2 e XIAP, vengono ubiquitinate e successivamente degradate dal sistema proteolitico Ub-dipendente; in questo modo la cellula danneggiata irreparabilmente può seguire il programma apoptotico. Quindi l'ubiquitina può promuovere sia la sopravvivenza che l'apoptosi delle cellule a seconda della gravità del danno che queste ultime hanno subito (Breitschopf et al., 2000).

Recenti studi hanno dimostrato che causando una delezione nel gene che codifica per UCH-L1 (enzima deubiquitante) si assiste nei topi all'insorgenza di una patologia neurodegenerativa assonale (Saigoh et al., 1999). Dopo l'induzione di un danno ischemico, nella retina di questi topi, i livelli di ubiquitina rimanevano bassi, mentre i livelli di espressione di Bcl-2, di XIAP e di altre proteine che normalmente vengono degradate dal sistema ubiquitina-proteosoma erano significativamente aumentati e ciò causa in questi topi una riduzione del 70% dell'attività delle caspasi inibendo quindi fortemente l'apoptosi e facendo sì che il danno ischemico peggiori. In questo caso, dopo lo stress ischemico, i livelli di ubiquitina non aumentano in quanto tale processo è finemente regolato dall'attività di due gruppi di enzimi: gli enzimi ubiquitinanti E1, E2, E3 e gli enzimi deubiquitinanti di cui fanno parte le UCH (Wilkinson et al., 1989);

essendo quest'ultimo mutato l'ubiquitina non poteva essere riciclata.

Durante il *processo di invecchiamento* si verifica nella retina di ratto una diminuzione dell'attività del sistema proteolitico Ub-dipendente; si è dimostrato inoltre che inibendo tale sistema proteolitico nei ratti giovani, la retina di questi ultimi assume caratteristiche morfologiche tipiche di quella invecchiata. Ciò indica che questo sistema svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità strutturale di questo tessuto.

Anche nella retina umana è stata dimostrata l'importanza dell'attivazione di tale sistema nella degradazione di proteine danneggiate ed inoltre il suo coinvolgimento in diverse patologie oculari tra le quali il glaucoma (Wunderlich et al., 2002). Approfondendo l'argomento consideriamo come l'omeostasi cellulare è mantenuta essenzialmente da meccanismi di tipo biochimico, in equilibrio tra di loro e con l'esterno. Quando tale equilibrio viene turbato, la cellula subisce uno stress. È quindi definibile "fattore di stress" qualsiasi evento di tipo chimico, fisico e biologico (pH, temperatura, pressione osmotica, agenti ossidanti o tossici, infezioni, etc.) in grado di perturbare l'omeostasi cellulare.

La cellula esposta a stress di diverso tipo, come ad esempio ipossico, termico, chimico, risponde inizialmente con l'aumento della sintesi di proteine particolari, chiamate "proteine da shock termico" (*Heat-Shock Proteins* o HSP), così definite perché evidenziate per la prima volta nelle situazioni di danno da calore. La risposta si sviluppa nell'arco di pochi minuti e dura circa 24 ore. Le HSP, di cui esistono diversi gruppi suddivisi in base al peso molecolare (HSP-90, HSP-75, HSP-60), hanno sostanzialmente la funzione di riconoscere le proteine danneggiate, nonché quelle non ripiegate e/o glicosilate correttamente, di ripararle e di reindirizzarle alla giusta localizzazione cellulare. Numerosi dati sperimentali indicano che la sintesi di HSP aiuta la cellula a superare brevi periodi di

stress, impedendo che imbocchi la via del danno irreversibile. Tuttavia, se lo stimolo nocivo è troppo intenso o dura a lungo e le proteine vengono danneggiate in modo irreparabile, la cellula indirizza quest'ultime verso la degradazione. Le cellule eucariotiche possiedono *due metodi distinti per la degradazione delle proteine: il sistema lisosomale e il complesso proteolitico ubiquitino-dipendente.*

A differenza degli enzimi lisosomali, che normalmente sono racchiusi nelle proprie vescicole, qualsiasi attività proteolitica libera nel normale citosol deve essere sotto rigido controllo. Essa infatti deve attaccare soltanto le proteine la cui distruzione è necessaria ossia quelle danneggiate, sintetizzate scorrettamente oppure non più richieste in un particolare stadio del ciclo cellulare. Deve esistere quindi un mezzo per "marcare" le proteine che devono essere degradate. Questo ruolo è svolto dall'ubiquitina, un peptide di 76 residui aminoacidici presente in tutte le cellule, che si lega alle proteine da degradare e le indirizza alle proteasi citosoliche.

La cellula tende quindi, in situazioni di stress, a mantenere livelli sub-letali mediante l'aumentata sintesi di proteine, che sostengono una funzione protettiva consistente nel:

- *mantenere il corretto ripiegamento spaziale delle proteine;*
- *permettere il riavvolgimento funzionale delle proteine denaturate reversibilmente;*
- *eliminare le molecole la cui struttura e funzionalità siano compromesse irrimediabilmente.*

Quest'ultima funzione sembra coinvolgere maggiormente l'ubiquitina e il suo sistema di proteolisi (Mathews et al., 1994).

L'UBIQUITINA (Ub)

Nonostante i suoi livelli cellulari relativamente elevati, paragonabili a quelli dell'actina, della tubulina e degli istoni (cioè da 2 a 100 µg/g di tes-

suto) l'Ub venne scoperta solo nel 1975 da Goldstein e sequenziata lo stesso anno da Schlesinger (Rechsteiner, 1988).

Successivamente, si dimostrò che quella che veniva chiamata "proteina epatica di ratto A24" era un istone H2A monoubiquitinato. Inoltre, il "fattore proteolitico ATP-dipendente" dei lisati di reticolociti (APF 1), che viene legato covalentemente a vari substrati proteici, è proprio l'Ub (Ciechanover et al., 1980).

Questo fu il primo passo verso la definizione del ruolo dell'Ub nella proteolisi cellulare, non lisosomiale. Data l'enorme importanza dei processi proteolitici, nel *turn-over* delle sostanze cellulari, nei sistemi di trasduzione, nel mantenimento dell'omeostasi, etc, questa piccola proteina, presente in tutti gli eucarioti, dal lievito ai mammiferi, fu ed è tuttora molto studiata.

Oggi si sa che il sistema proteolitico Ub-dipendente è specifico, localizzato sia nel citoplasma, sia nel nucleo ed è ATP-dipendente. Oltre a questo ruolo l'Ub assolve anche ad altre mansioni, ma comunque esplica sempre la sua funzione legandosi ad un substrato ed il risultato ultimo è una monoubiquitinazione o una poliubiquitinazione dello stesso. Anche l'organizzazione genetica dell'Ub riflette questa varietà di funzioni. I dati si riferiscono al lievito *Saccharomyces cerevisiae*, ma c'è un altissimo grado di conservazione in tutti gli eucarioti (Rechsteiner, 1988).

L'ubiquitina è codificata da una famiglia di 4 geni UBI1, UBI2, UBI3 e UBI4, dei quali i primi tre codificano una molecola di Ub, con un introne e una coda di più di 50 residui, successivamente eliminata. UBI4, invece, contiene 5 sequenze per l'Ub, unite testa-coda, senza introni e con una coda di un solo amminoacido. Questo è il gene di cui nel lievito viene stimolata l'espressione durante la risposta allo stress. Il prodotto di UBI4 è un pentamero che viene maturato attraverso il distacco dell'amminoacido singolo e di un mono-

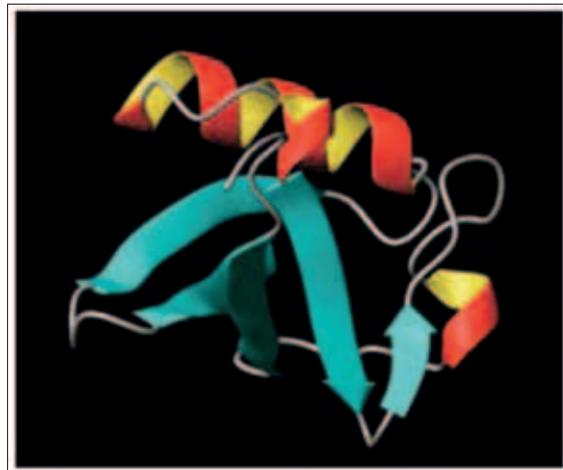


Fig. 16: Struttura dell'ubiquitina. L'incredibile conservazione del complesso genico dell'Ub, nell'ambito degli eucarioti, riflette probabilmente una estrema funzionalità del complesso stesso, sia per quanto riguarda la sua espressione in condizioni fisiologiche per la cellula, sia per la sua attivazione a seguito di stress cellulare

mero, la restante componente tetramerica è quella che svolge un ruolo attivo nella degradazione delle proteine alterate in seguito a stress cellulare.

La molecola di Ub nella sua forma attiva è composta da 76 amminoacidi con un peso molecolare (P.M.) di 8,6 kDa e la sequenza è altamente conservata con pochissime variazioni. La struttura è globulare con un *core* idrofobico e molte strutture secondarie mantenute da legami idrogeno (α -eliche e piani- β) (Fig. 16). Sono probabilmente queste caratteristiche a renderla molto stabile al calore.

Il C-terminale sporge dal *core* della proteina per formare i legami con le proteine substrato (o altre Ub). Inoltre, gli amminoacidi acidi sono raggruppati sulla faccia opposta a quella degli amminoacidi basici, mentre vicino al C-terminale c'è una porzione superficiale idrofobica che probabilmente serve al riconoscimento/interazione dell'Ub da parte degli enzimi coinvolti nel suo metabolismo. È interessante notare che i residui variabili nelle diverse specie sono confinati nella regione oppo-

sta a questa, che probabilmente non partecipa alla funzione proteolitica (Rechsteiner, 1988).

■ Il sistema proteolitico ubiquitinodipendente

La funzione più diffusa e studiata dell'Ub è quella nell'ambito del sistema proteolitico di cui essa fa parte. Esistono, come detto, diverse vie proteolitiche, come ad esempio quella lisosomiale o altre vie ATP-dipendenti, ma non mediate dall'Ub.

Il sistema dell'Ub è schematizzabile brevemente in questo modo: una serie di tre enzimi (attivatore, trasportatore e ligasi) mediano il legame dell'Ub ad una proteina bersaglio; per "proteina bersaglio" si intende una molecola denaturata o comunque non più funzionale o, in alternativa, facente parte di un segnale che deve cessare. La proteina "marchata" dall'Ub viene riconosciuta da una proteasi specifica e quindi degradata (Fig. 17). L'ATP entra in questa catena di reazioni a vari livelli, con la funzione di rendere specifica la reazione, probabilmente mediante modificazioni conformazionali. Alla fine del processo, che è assimilabile ad un ciclo, l'Ub viene riciclata mediante enzimi specifici che la staccano dalla proteina bersaglio.

IL PROTEOSOMA

Nel corso degli anni '80 Rechsteiner ed Hershko, indipendentemente tra loro, dimostrarono che una proteina ubiquitinata (il lisozima) veniva rapidamente degradata in estratti di reticolociti e che il processo richiedeva ATP (Hershko et al., 1984).

Successivamente, fu purificato e parzialmente caratterizzato il grande complesso multienzimatico responsabile della proteolisi (Hershko et al., 1992), fu stimato il suo coefficiente di sedimentazione in gradiente di glicerolo, di 26S ed il suo

P.M. tra 1000 e 1500 kDa. Inoltre, furono purificate diverse subunità del complesso con P.M. tra 34 e 110 kDa e un ulteriore gruppo di subunità con P.M. tra 21 e 32 kDa, simili a quelle già identificate come facenti parte di un altro complesso proteasico di 20S, che agisce in maniera ATP-indipendente (Hough et al., 1987).

Usando un diverso metodo di purificazione (in assenza di ATP), si separarono tre fattori, tutti necessari al corretto funzionamento del complesso chiamati: CF-1, CF-2 e CF-3 (*Conjugate-degrading Factors 1-3*) (Ganoth et al., 1988). CF-1 e CF-2 contengono siti di legame per l'ATP, ma non sembrano possedere l'attività proteasica. CF-3 è il componente con l'attività proteolitica ed in realtà era già noto da tempo, in diverse cellule eucariotiche, ed era stato chiamato con diversi nomi: "complesso proteinasico multicatalitico" (MPC) (Wilk, 1983), "proteasi ad alto peso molecolare" (Rechsteiner, 1988), "proteasi alcalina" (De Martino et al., 1979) o "proteosoma" (Arrigo et al., 1988) o "proteosoma".

Esso coincide con la proteasi 20S, che possiede tre diversi tipi di attività endopeptidasiche: l'enzima agisce tagliando i legami peptidici sul lato carbossilico di amminoacidi basici, neutri o idrofobici e acidi (Wilk et al., 1983).

Quindi, il proteosoma 20S in realtà è la porzione catalitica del proteosoma 26S, privato delle subunità regolatorie. Successivamente, sono stati fatti molteplici esperimenti che hanno confermato questa relazione e l'identità del proteosoma 20S con la subunità CF-3 (Eytan et al., 1993).

Il proteosoma 26S si trova sia nel citoplasma che nel nucleo e quindi sembra partecipare al controllo dei pool proteici di entrambi questi compartimenti (Peters et al., 1994).

Il proteosoma 20S costituisce il core proteolitico ATP-indipendente e aspecifico del proteosoma 26S ed è formato da quattro anelli proteici, ognuno di sei subunità, che nel loro insieme for-

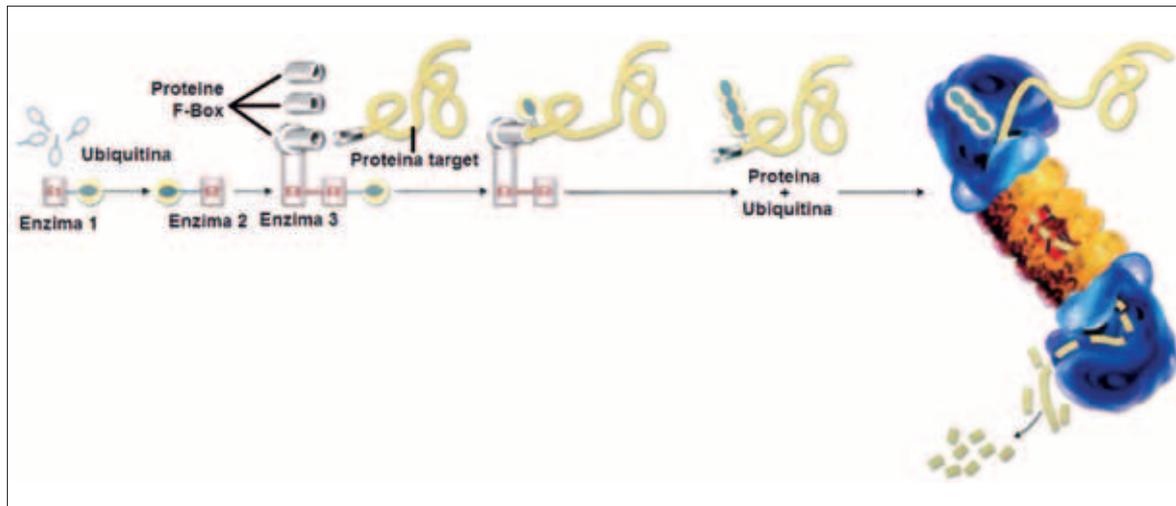


Fig. 17: Percorso proteolitico mediato dall'ubiquitina

mano una struttura cilindrica. I due anelli più interni sono omologhi e sono chiamati β , quelli più esterni α . È possibile che la composizione delle particelle che lo costituiscono possa variare in cellule diverse o per assolvere a diverse funzioni (Rechsteiner et al., 1993). Alle sue estremità sono saldamente legati altri due grandi complessi, che formano una sorta di “cappuccio” a forma di V e con alcune masse proteiche al loro interno (Fig. 18). Il loro orientamento è opposto, dando al proteosoma intero una “configurazione *trans*” e dimostrando che non è permessa una rotazione libera delle varie parti che lo compongono. Dal momento che l’attacco di queste due porzioni conferisce al proteosoma le attività ATPasica, isopeptidasica e di specificità del substrato, assenti nel complesso 20S, esse sono state chiamate “cappucci regolatori”. Recentemente, sono stati purificati ed il loro coefficiente di sedimentazione è stato stimato di 19S ed il loro P.M. di 600-700 kDa. Contengono le subunità proteiche ad alto P.M. caratteristiche del proteosoma 26S (34-110 kDa), ma nessuna delle subunità del cilindro 20S. Non è ancora chiaro se il cappuccio 19S corrisponda al subcomplesso CF1 o all’insieme

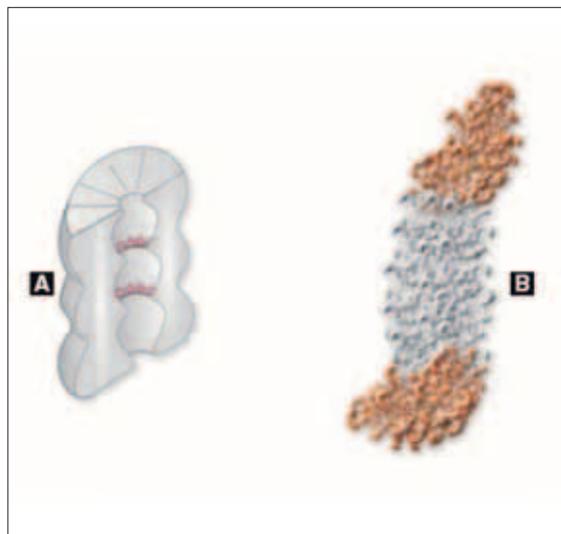


Fig. 18: A. Una veduta interna del cilindro centrale 20 S, tramite cristallografia a raggi X, del proteosoma con i siti attivi delle proteasi indicati con punti rossi. B. La struttura dell'intero proteosoma, in cui il cilindro centrale (grigio) è integrato da un cappuccio 19 S (arancione) a ciascuna estremità, la cui struttura è stata elaborata al computer a partire da immagini ottenute dal microscopio elettronico. Il cappuccio lega le proteine marcate per la distruzione, quindi usa idrolisi ATP dipendente per svolgere le catene polipeptidiche e introdurre nella camera interna del cilindro 20 S per la digestione in piccoli peptidi

di CF1 e CF2 (Peters, 1994), comunque molti dei suoi polipeptidi sono delle ATPasi.

Questa organizzazione, con un *core* proteolitico e un complesso ATPasico con funzione regolatoria ricorda la proteasi ATP-dipendente degli eubatteri chiamata Clp, anche se non c'è una reale omologia di sequenza. È però interessante notare che la subunità ATPasica CApl è un membro delle HSP, con attività di avvolgimento/svolgimento delle proteine. Analogamente, il cappuccio 19S potrebbe funzionare legando specifici substrati al proteosoma, svolgendoli e trasportandoli nel *core* proteolitico, ricavando energia dall'idrolisi di ATP. Attualmente sono state identificate almeno sei ATPasi diverse associate al proteosoma 26S umano (Tanaka e Tsurumi, 1997). Esse fanno parte di una vasta famiglia, chiamata "proteine AAA", caratterizzata dalla presenza di un dominio centrale di circa 200 residui, altamente conservati, che contiene un sito di legame per l'ATP.

La famiglia possiede più di 100 membri, con funzioni diverse tra loro: oltre a far parte del proteosoma, partecipano alla fusione di vescicole, alla biogenesi dei perossisomi, alla trascrizione e alla *targeting* di proteine nei mitocondri.

LE IDROSSILASI CARBOSSITERMINALI DELL'Ub

Le proteine ubiquitinate, prodotte dall'azione degli enzimi E1, E2 ed E3, sono strutture il cui contenuto in Ub è vario. Maggiore è la presenza di residui di Lys della proteina disponibili al legame, più molecole di Ub possono legarsi; inoltre l'Ub forma dei polimeri anche ramificati. Per il corretto funzionamento del sistema proteolitico è essenziale che l'Ub venga riciclata. Il processamento di queste strutture richiede la presenza di una serie di enzimi che scindono il legame Ub-substrato ed Ub-Ub. Sono state descritte diverse forme di questi enzimi che sono tutte delle idrossilasi C-terminali. Esse cioè scindono il legame amidico formato dal gruppo carbossilico terminale dell'Ub

e il gruppo aminico del substrato o di un'altra Ub. La nomenclatura delle idrossilasi carbossiterminali è varia, ma la più utilizzata è UCH (*Ub Carboxyl-terminal Hidrolases*).

Le funzioni di tali enzimi sono:

- riciclaggio dell'Ub dai residui prodotti nella proteolisi;
- disassemblaggio delle catene di poliubiquitina, idrolizzando il legame peptidico tra il residuo C-terminale ed N-terminale di due molecole di Ub;
- processamento dei precursori dell'Ub;
- rimozione dell'Ub da molecole non dirette verso la proteolisi, con conseguente cessazione/attivazione del segnale (ad es. gli istoni H2A e H2B vengono rapidamente deubiquitinati durante la mitosi e riubiquitinati subito dopo);
- rimozione dell'Ub da piccoli ligandi non proteici.

Sono state caratterizzate diverse idrossilasi, che intervengono nelle varie funzioni o nei diversi tessuti. Ci sono almeno tre isoenzimi di 30 kDa che però non agiscono sui grossi coniugati, tipici del percorso proteolitico, bensì su piccole proteine e potrebbero quindi avere un ruolo nel processamento dei precursori dell'Ub. Una forma più grande dell'enzima, di circa 90 kDa sembra il candidato più probabile per la scissione dell'Ub dalle proteine più grandi, anche se si pensa che non sia attiva sulle proteine poliubiquitinate. Un enzima di circa 100 kDa, chiamato isopeptidasi T, agisce invece soprattutto sui legami tra molecole di Ub, legate a proteine che vengono degradate dal proteosoma 26S e potrebbe essere coinvolto nella rimozione delle catene di poliubiquitina dal complesso, in un momento successivo alla degradazione della proteina. Infine, è stata caratterizzata un'idrossilasi che probabilmente agisce come parte del proteosoma 26S, in maniera ATP-dipendente e scinde i legami sia lineari sia isopeptidici, con rilascio di Ub libera negli stadi finali della proteolisi (Eytan et al., 1993).

COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA PROTEOLITICO UBIQUITINO-DIPENDENTE NELL' APOPTOSI

Nel corso del processo apoptotico si osservano elevate concentrazioni di proteine coniugate con l'ubiquitina e ci sono innumerevoli evidenze sperimentali che confermano una regolazione di questo processo di morte programmata da parte del sistema proteolitico Ub-dipendente (Lee et al., 2003). In un modello sperimentale di deprivazione da siero, i fibroblasti 3T6 in coltura vanno incontro ad una sequenza di eventi degenerativi e di rimangiamento del materiale genetico che culminano con la frammentazione nucleosomale del DNA. È stato dimostrato che queste cellule, nelle prime fasi, tentano di ridurre tale danno attivando il sistema proteolitico Ub-dipendente e solo successivamente, se l'insulto persiste, intraprendono un programma di morte apoptotica (Bresin et al., 2001).

Pertanto, i tentativi di mantenimento omeostatico ed il riconoscimento della necessità di indurre l'apoptosi sembrano progredire contemporaneamente e probabilmente interagire in modo reciproco. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in vivo, in un modello sperimentale di ischemia cerebrale. Infatti, questo trattamento ottenuto mediante occlusione delle carotidi del ratto, provoca nei neuroni ippocampali una attivazione del sistema Ub-dipendente (Gubellini et al., 1997).

Osservazioni sono state effettuate nei timociti e nei neuroni simpatici dopo essere stati indotti ad attivare un sistema di morte cellulare programmata.

Recenti esperimenti, svolti su cellule tumorali umane, hanno dimostrato che la via proteolitica Ub-dipendente svolge un ruolo di difesa primaria anche come sistema anti-apoptotico di sorveglianza eliminando le attività delle caspasi; infatti queste ultime vengono degradate, nelle fasi iniziali di induzione apoptotica, da questo sistema proteolitico e soltanto in seguito, se la cellula non è in grado di riparare i danni subiti, il programma apoptotico prosegue (Kim et al., 2004).

A conferma dello stretto legame tra il sistema proteolitico Ub-dipendente ed il programma apoptotico, si è anche dimostrato che l'induzione dell'apoptosi può regolare l'attività del proteosoma 26S (Kim et al., 2004). Infatti, durante l'apoptosi l'attivazione delle caspasi provoca la scissione di tre subunità specifiche del complesso 19S, le quali hanno il compito di riconoscere i substrati poliubiquitinati e di tenere insieme il complesso 19S al proteosoma centrale 20S.

Questa scissione, mediata dalle caspasi, inibisce la degradazione proteosomale Ub-dipendente.

Il modello più utilizzato per studiare l'invecchiamento neuronale è la retina di topo

Lo sviluppo postnatale della retina rivela che la morfogenesi retinica nel ratto non è completa alla nascita.

Nel primo giorno postnatale la retina di un ratto albino è costituita dal nervo ottico, dallo strato delle cellule gangliari, dallo strato plessiforme interno e un singolo strato di cellule neuroblastiche indifferenziate impacchettate nell'altra metà.

Numerose figure mitotiche sono riscontrate in particolar modo in una zona (di questo strato neuroblastico) prossima al margine corioideale e le cellule dell'EPR sono strettamente aderenti a tali nuclei mitotici.

Questo grado di sviluppo della retina di ratto corrisponde alla retina di un feto umano di 4-5 mesi (Weidman e Kuwabara, 1968).

Al momento dell'apertura palpebrale, tra il 14° e il 17° giorno dalla nascita, quando il sistema visivo del topo diventa funzionante, la retina assume la struttura stratificata adulta che consiste di 3 neuroni. La maturazione della retina si completa dopo 30-40 giorni dalla nascita, quando lo strato nucleare interno raggiunge il suo massimo spesso-

	W1STAR/ALBINO	NORWAY/PIGMENTATO	BDH(HAN)/PIGMENTATO
Strato nucleare esterno	50 (44-54)	34 (29-40)	38 (36-42)
Strato nucleare interno	31 (29-33)	27 (16-43)	33 (24-43)
Strato delle cellule gangliari	Confrontabile con la perdita cellulare dello strato nucleare interno		

TAB. 1: In tutti e tre i tipi di neuroni si ha una riduzione in percentuale della densità nucleare tra 1 e 27 mesi (Weisse, 1995)

re, il segmento esterno dei bastoncelli raggiunge la lunghezza adulta ed il contenuto di rodopsina dei segmenti esterni aumenta.

A maturazione completa inizia lentamente ed inesorabilmente la perdita delle cellule nervose.

La principale scoperta del processo dell'invecchiamento è la significativa perdita in percentuale dei tre tipi di neuroni retinici (Tab. 1) (Weisse et al., 1995).

La morte delle cellule nervose inizia dopo la maturazione completa della retina.

Il tasso di perdita cellulare è simile nelle regioni centrali, medio-periferiche e periferiche della retina, ma da un punto di vista patomorfologico, la degenerazione è maggiore nella retina periferica a causa di un più basso numero di nuclei per unità di area retinica. Nei ratti albini e pigmentati, la rarefazione delle cellule nervose inizia alla fine del primo mese di vita, o piuttosto a completa maturazione retinica e continua fino alla morte. Se facessimo una sezione a livello della retina centrale di un ratto albino di 2 o 31 mesi in ambedue i casi gli strati retinici sarebbero tutti presenti. Nei topi vecchi, comunque, si ha un *assottigliamento globale* della retina dovuto in particolare alla *perdita dei nuclei dagli strati nucleari esterni ed interni e all'accorciamento dei segmenti esterni ed interni dei fotorecettori*. Nonostante identiche condizioni ambientali, la *graduale, ma continua morte cellulare negli strati nucleari è più pronunciata nei topi albini e differisce tra i cono e i bastoncelli*; in effetti, la percentuale dei nuclei dei cono aumenta con l'aumen-

tare dell'età dall'1,5% al 2,6%. La più alta perdita dei bastoncelli nei topi albini è dovuta al sinergico effetto della luce (Shinowara et al., 1982). Nei topi pigmentati la perdita dei fotorecettori è di entità minore e tale perdita è uguale per i cono e i bastoncelli (Norway: giovane 2%, vecchio 2%; BDH (han): giovane 1,8%, vecchio 2%).

Citopatologicamente, la graduale, ma continua perdita dei fotorecettori in retine di topi invecchiati si manifesta in due forme:

1. I fotorecettori morti in situ hanno il pericario dentro lo strato nucleare esterno, i nuclei sono pallidi e rigonfi o picnotici ed il segmento interno mostra una colorazione aumentata o ridotta. Queste alterazioni precedono le alterazioni del segmento esterno. Tale forma di degenerazione necrotica è distribuita per tutta la retina.
2. I fotorecettori morti sono localizzati nello spazio subretinico e hanno perso le loro connessioni con lo strato nucleare esterno. La cromatina nucleare di queste cellule dislocate sembrerebbe essere più o meno intatta; invece, i loro segmenti interni ed esterni, le fibre di connessioni e gli assoni sono degenerati o totalmente persi. Mentre si muovono verso l'esterno, i nuclei discendenti migrano o scivolano attraverso la membrana limitante esterna all'interno dei propri segmenti interni. Questi sono più frequentemente osservati nelle regioni periferiche e iuxtapapillari (Weisse, 1995).

La necrosi in situ ed il movimento verso l'esterno a cui segue la morte cellulare sono i due meccanismi di perdita dei fotorecettori. Questo evento conduce clinicamente ad un indebolimento visivo ed elettrofisiologicamente alla riduzione dell'ampiezza dell'onda a e b dell'ERG (Lai et al., 1982). La perdita dei neuroni avviene con il normale invecchiamento (Shoji et al., 1998) della retina nei topi di ceppo "senescence – accelerated mouse" (SAM), costituito da ceppi resistenti alla vecchiaia accelerata (SAMPR) e ceppi predisposti alla vecchiaia accelerata (SAMP) e nei topi BALB/c. I ceppi SAMP invecchiano precocemente e la loro vita è breve; invece, i ceppi SAMPR invecchiando più tardi e, vivendo più a lungo, presentano i "segni" di alterazione correlati all'età (Takeda, 1994). Tutti e tre i ceppi mostrano un'atrofia della retina età correlata. Il tasso di perdita dei fotorecettori è maggiore nella retina periferica che in quella centrale in tutti e tre i ceppi.

Il tasso di perdita delle cellule gangliari non differisce tra la retina periferica e centrale nei tre ceppi. I topi SAMP, ad invecchiamento precoce e vita breve, non mostrano una significativa perdita cellulare età correlata; al contrario, i topi SAMPR manifestano una tardiva e marcata perdita di fotorecettori e di cellule gangliari a causa della loro vita più lunga. Per tale motivo è stato scelto questo ultimo ceppo come modello per lo studio dei meccanismi di perdita neuronale età correlata.

Le patologie oftalmologiche età correlate del segmento anteriore nei topi SAMP sono la blefarite, la cheratite e la cataratta (Hosokawa et al., 1984). Le patologie età correlate del segmento posteriore sono più difficili da individuare oftalmoscopicamente.

La perdita delle cellule nervose di tutti gli organi di senso e del cervello è parte del normale processo di invecchiamento della retina; infatti, in questi topi si osserva l'invecchiamento del bulbo olfattorio, del proencefalo (Schimada et al., 1994) e

del nervo acustico, per perdita delle cellule hair cocleari e delle cellule gangliari spinali (Saitoh et al., 1995).

Molti studi hanno riscontrato la morte età correlata delle cellule nervose della retina negli uomini (Curcio et al., 1993) e nei topi di laboratorio (Weisse, 1995). Questi fenomeni sono considerati normali nell'ambito di alterazioni della retina nella senescenza.

Nello studio di Shoji et al. (1998), prima riportato, è stata osservata la *marcata atrofia retinica ed in particolare la perdita dei fotorecettori e delle cellule gangliari nei topi SAMPR*.

Questo ceppo è stato scelto per studiare i processi del normale invecchiamento retinico, incluso il meccanismo con cui sono perse le cellule nervose.

La zona periferica e centrale delle retine dei topi di 3 mesi erano istologicamente normali. Lo spessore di tutta la retina nei topi anziani si riduceva marcatamente alla periferia e al centro, si osservava l'atrofia dello strato nucleare esterno, la perdita delle cellule gangliari, il dislocamento nucleare dei fotorecettori dallo strato nucleare interno allo strato plessiforme esterno.

Gli studi istomorfometrici hanno mostrato che nella retina periferica la perdita dei fotorecettori con l'avanzare dell'età era significativa ($p < 0,01$) in tutti i ceppi. La perdita di tali cellule inizia a 2 mesi di età ed il segmento esterno dei fotorecettori è quello maggiormente affetto. In tutti i ceppi i valori dopo i 9 mesi erano più bassi di quelli a 3 mesi ($p < 0,05$). La riduzione nel numero dei fotorecettori nella retina periferica era più grande che in quella centrale con l'avanzare dell'età ($p < 0,05$). *Anche il numero delle cellule gangliari si riduce con l'aumentare dell'età sia nella retina periferica che centrale. Al contrario della perdita dei fotorecettori, il tasso di riduzione delle cellule gangliari nella retina periferica era lo stesso che in quella centrale. Il confronto del numero di cellule gangliari a 3 e 18 mesi di età ha evidenziato che la differenza diventa-*

va significativa sia al centro che alla periferia retinica nei ceppi SAMPR e BALB/c ($p < 0.05$).

Inoltre, Gao e Hollyfield (1992) avevano già dimostrato che i bastoncelli e le cellule gangliari periferiche erano più vulnerabili dei coni e che il tasso di perdita era maggiore in periferia piuttosto che nella fovea.

Un ulteriore studio finalizzato a capire se la morte cellulare neuronale nella retina accompagna la vecchiaia è stato condotto da Katz e Robison (1986). Oggetto di studio sono state le retine di topi pigmentati di varie età, analizzate in base alle variazioni della dimensione, della densità cellulare, del contenuto di DNA, delle dimensioni dei nuclei e dei livelli di rodopsina.

Tra i 4 e 30 mesi, è stata osservata una significativa riduzione della densità dei nuclei in tutti e tre gli strati nucleari della retina.

In questo lasso di tempo, la densità nucleare nello strato nucleare esterno (ONL) si è ridotta dal 32 al 41%, a seconda della regione di retina esaminata, mentre nello strato nucleare interno (INL) questo stesso valore è aumentato dal 25 al 34%.

A questo punto si rendeva necessario determinare se tale perdita cellulare fosse dovuta a morte cellulare piuttosto che ad uno stiramento della retina, riconducibile al suo accrescimento. A tale scopo sono state messe in relazione le dimensioni della retina con la perdita cellulare.

La lunghezza della retina aumenta dell'8-9% nei due meridiani principali tra i 4 e i 12 mesi di età. Questa variazione nella geometria retinica predice una riduzione nella densità cellulare del 15%. In realtà la perdita osservata è stata maggiore sia nello GCL (25%) che nello ONL (25%).

Allo stesso modo tra i 12 e i 30 mesi si ha un incremento della lunghezza del 5% con una perdita del 5% della densità cellulare; mentre la riduzione cellulare dell'ONL effettiva è stata maggiore del 20% e cioè è pari al 25%.

L'evidenza che una parte significativa della riduzione della densità cellulare sia dovuta alla morte cellulare

è supportata dalla scoperta che il contenuto di DNA si riduce con l'invecchiamento. Tra i 4 ed i 12 mesi la quantità media di DNA è invariata mentre, tra i 12 e i 30 mesi si riduce del 13% ($P < 0,01$). Questa riduzione è comunque inferiore a quella predicibile in base all'effettivo numero di fotorecettori morti.

Le variazioni età correlate del contenuto in rodopsina non sono risultate uguali alla riduzione nel numero dei fotorecettori. Tra i 4 e gli 11 mesi di età, i livelli di rodopsina aumentavano del 10% e rimanevano costanti fino a 26 mesi. In questo stesso lasso di tempo c'è stata una riduzione nel numero dei fotorecettori di circa il 15%. Queste scoperte suggeriscono che la quantità di rodopsina per fotorecettore incrementa fino al 25% tra i 4 ed i 26 mesi di età. Tra i 26-36 mesi, i livelli di rodopsina si riducono del 10%, in parallelo con il numero di fotorecettori.

Lo studio di Cavallotti et al. (2001) ha analizzato, inoltre, le alterazioni morfochimiche e biochimiche che accompagnano l'invecchiamento (Tab. 2). L'analisi quantitativa degli elementi retinici è stata possibile con un microscopio a scansione laser (4.800X) che raffigura dettagli microanatomici e cioè non solo le cellule, ma anche i loro particolari quali le connessioni intercellulari, i processi cellulari dei corpi sinaptici visti tridimensionalmente e lo spazio intercellulare.

Con il microscopio a scansione laser è stato visto che il segmento esterno dei fotorecettori, in contatto con lo strato dell'epitelio pigmentato, mostra un apice coperto dalla matrice extracellulare ed il segmento interno mostra numerosi processi intercellulari (14.400X). Ogni singolo elemento comunica con l'altro attraverso delle "connessioni intercellulari". Le cellule bipolari e le cellule multipolari sono costituite di numerosi corpi sinaptici e processi cellulari. Nello spazio intercellulare ci sono numerosi capillari.

Lo strato plessiforme esterno retinico è formato dalle sinapsi tra i fotorecettori ed i dendriti delle cellule bipolari ed orizzontali. Le fibre dei foto-

ALTERAZIONI MORFOLOGICHE*	GIOVANI (N=6)	ADULTI (N=6)	ANZIANI (N=6)
Spessore della retina ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$)	132 \pm 21,4	210 \pm 31,6	150 \pm 18,3
Area retinica di topo (mm^2)	31,1	34,6	19,2
Area**delle cellule gangliari ($\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$)	110.826	110.418	85.836
Area dei capillari ($\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$)	8,4	7,3	3,5
Corpi sinaptici/area ($\text{CU} \pm \text{SEM}$)	61,4	62,6	38,4
Processi cellulari/area ($\text{CU} \pm \text{SEM}$)	44,2	43,2	28,1
Connessioni Intercellulari/area ($\text{CU} \pm \text{SEM}$)	54,1	52,2	18,6
Numero delle cellule gangliari con diametro <0,4 μm	42136	41328	21622
Numero delle cellule gangliari con diametro 0,4-0,9 μm	31354	30526	29456
Numero delle cellule gangliari con diametro 0,6-0,9 μm	1833	766	621
Contenuto proteico /mg tessuto fresco	82,1	76,3	61,5

Tab. 2: Variazioni morfologiche e biochimiche nelle retine di ratto di varie età (Cavallotti et al., 2001)

recettori terminano con una dilatazione denominata, rispettivamente, sferula per i bastoncelli e peduncolo per i coni.

Queste terminazioni sono ricche di vescicole pre-sinaptiche. Generalmente un solo cono prende contatto con una sola cellula bipolare; viceversa più bastoncelli prendono contatto con una sola cellula bipolare.

Tutte queste strutture sono state quantificate e poi paragonate tra le differenti età. Tutte si riducono con l'invecchiamento.

1. Lo spessore della retina è relativamente piccolo negli animali giovani, diventa più spesso una volta adulti e poi si riduce in modo significativo nei topi anziani (circa 60 μm più sottile).
2. L'estensione totale della retina si riduce significativamente (circa il 20-25%) con l'invecchiamento.
3. Le cellule gangliari sono le cellule più vulnerabili alla perdita età correlata; infatti, si calcola una riduzione del 20-25% del loro numero nei topi vecchi rispetto ai giovani.

4. Le cellule gangliari sono distribuite in modo piuttosto uniforme nella retina di topo, la variazione tra la più alta e più bassa densità rientra in un range da 6.000 a 1.000 cellule/mm² (Lai et al., 1978; Dreher et al., 1984). Il numero totale delle cellule gangliari è di 109.000-115.000 (Perry et al., 1983). Perry et al. hanno diviso le cellule gangliari in tre tipi in base al loro diametro assonale: tipo I (diametro assonale 0,9 µm), tipo II (diametro assonale 0,6 µm) e tipo III (diametro assonale 0,4 µm). Il numero delle cellule di tipo II rimane invariato con l'invecchiamento mentre quello delle cellule di tipo I e III si riduce significativamente. Sembra che le cellule di tipo I e III presentino una elevata sensibilità alle alterazioni trofiche che si instaurano con l'invecchiamento, in confronto alle cellule con assoni di calibro medio (tipo II).
5. Il "trofismo retinico", termine che indica sia l'area occupata dai capillari che alcune caratteristiche morfologiche delle cellule retiniche (ad es. numero dei corpi sinaptici, processi cellulari e connessioni intercellulari per area osservata), è quasi uguale tra i topi adulti e giovani e significativamente ridotto nei topi anziani.
6. Il numero totale del contenuto proteico si riduce con l'invecchiamento per lento e progressivo deterioramento del metabolismo retinico.

Amenta et al. (1984) hanno condotto degli studi finalizzati a capire quale fosse l'effetto della L-carnitina e la L-acetil-carnitina sull'invecchiamento oculare. Gli autori hanno visto che il trattamento con L-carnitina preservava l'istologia retinica nei ratti senescenti, mostrando un'aumentata cromofilia negli elementi gangliari retinici ed un miglioramento della morfologia dei fotorecettori. Inoltre, nella cornea, il trattamento con L-carnitina induceva la diminuzione dell'incidenza di fibrosi nelle aree stromali. Gli Autori hanno osservato che i ratti senescenti, confrontati con quelli giovani, presentavano una riduzione della cromofilia citoplasmatica della retina e della cornea, una diminuzione dell'ordine di disposizione degli elementi cellulari retinici, specialmente a livello dello strato granulare esterno ed interno; non è stato possibile analizzare gli elementi gangliari interni. Il trattamento con L-acetil-carnitina preservava la morfologia retinica nei ratti senescenti e riduceva il contenuto di lipofusina nell'EPR. Infine, Amenta et al. (1984) hanno saggiato l'attività istoenzimatica retinica in ratti senescenti di controllo rispetto a topi giovani

ISTOENZIMI RETINICI	RATTI SENESCENTI DI CONTROLLO	RATTI SENESCENTI TRATTATI CON ALCAR
G6PDH	costante	costante
LDH	costante	costante
SDH	diminuisce rispetto ai giovani	aumenta
NADHD	diminuisce rispetto ai giovani	aumenta
GPDH	costante	costante
ATPasi	aumenta rispetto ai giovani	diminuisce
AChE	aumenta rispetto ai giovani	diminuisce
MAO	aumenta rispetto ai giovani	costante

TAB. 3: Attività istoenzimatica degli enzimi glucosio-fosfato deidrogenasi (G6PDH), lattico deidrogenasi (LDH), succinico deidrogenasi (SDH), NADH diaforesi (NADHD), α-glicerolofosfato deidrogenasi (GPDH), acetilcolinesterasi (AChE), monoaminossidasi (MAO) in topi senescenti di controllo, trattati con L-acetil-carnitina (ALCAR) rispetto a topi giovani (Amenta et al., 1984)

e a quelli trattati con L-acetil-carnitina. Nei ratti senescenti di controllo gli enzimi succinicodeidrogenasi (SDH), NADH diaforesi (NADHD) diminuiscono rispetto ai topi giovani mentre nei topi trattati aumentano. Gli enzimi ATPasi, acetilcolinesterasi (AChE) aumentano nei topi senescenti di controllo rispetto a quelli giovani, mentre diminuiscono nei topi trattati. Gli enzimi glucosio-fosfato deidrogenasi (G6PDH), lattico deidrogenasi (LDH), α -glicerolo fosfato deidrogenasi (GPDH) rimangono invariati. L'enzima monoaminossidasi (MAO) aumentava nei topi senescenti di controllo rispetto ai giovani mentre rimaneva costante in quelli trattati (Tab. 3).

La retina ha il vantaggio rispetto al cervello di avere confini ben delimitati e di aver uno strato cellulare, lo strato dei fotorecettori, apparentemente privo di glia, che nel resto del cervello è intimamente unita ai neuroni. Per questi motivi è più facile determinare le alterazioni dei neuroni che la costituiscono. La dimostrazione di un declino età correlato nel numero delle cellule durante la vecchiaia è importante per numerose ragioni.

È possibile che la riduzione età correlata nella funzione visiva possa essere parzialmente attribuibile alla riduzione nel numero di cellule retiniche (Ordy e Brizzee, 1979). Se questo è vero sarà importante identificare i fattori responsabili della perdita cellulare. Inoltre, gli studi sugli effetti dell'invecchiamento dei neuroni retinici completano quelli sui neuroni del cervello: il confronto degli effetti dell'invecchiamento sui neuroni di diverse parti del sistema nervoso può condurre ad identificare i fattori generali che decretano la sopravvivenza neuronale.

La determinazione della densità cellulare retinica e del contenuto di DNA retinico suffragano l'ipotesi che, nei topi, con la senescenza si hanno significative perdite di neuroni retinici.

La stima della perdita totale cellulare età correlata

(approssimativamente del 18%) si basa sulla conta dei nuclei. Con questa metodica si ottiene una stima della perdita cellulare più elevata (circa del 13%) di quella ottenuta con la misurazione del DNA. Questo suggerisce che, forse, il tasso di perdita cellulare età correlato è piuttosto minore nelle regioni della retina dove i nuclei vengono contati, o forse che la quantità di DNA per cellula aumenta moderatamente durante la vecchiaia.

Gartner e Henkind (1981) hanno anche riportato che si ha una riduzione nel numero dei fotorecettori nella zona maculare della retina.

Il numero delle cellule gangliari umane, calcolato in base alla densità degli assoni del nervo ottico, si riduce del 75% a 70 anni. Ovviamente questo contribuisce, almeno in parte, ai problemi visivi dell'anziano. Alla luce di studi precedenti (Katz e Robison, 1984; 1985), sembra possibile che la perdita delle cellule retiniche, in modo particolare dei fotorecettori, sia correlata alle alterazioni legate all'età dell'EPR. L'EPR forma la "barriera emato-retinica esterna" che si interpone tra coriocapillare e fotorecettori; dalla sua integrità dipende quella dei fotorecettori (Zinn e Marmor, 1979). L'alterazione morfofunzionale dell'EPR comporta l'alterazione dei fotorecettori.

L'identificazione dei fattori causali della perdita delle cellule retiniche, correlati alle alterazioni dell'EPR o meno, potrebbe portare ad una migliore conoscenza dei processi tipici della senescenza.

Invecchiamento della macroglia (cellule di Müller ed astrociti)

L'indebolimento funzionale del SNC che si ha con l'invecchiamento, così come le malattie neurodegenerative età correlate, sono state in parte attribuite al declino della funzione mitocondriale (Linnane et al., 1989; Curti et al., 1990; Bowling et al. 1993; Dykens, 1999). In particolare, è stato

dimostrato un danno ossidativo al DNA mitocondriale nel cervello umano invecchiato (Mecocci et al., 1993). È stato evidenziato come il DNA mitocondriale sia particolarmente suscettibile ai danni che si accumulano nel tempo per la perdita di istoni protettivi, per la riduzione dei sistemi di riparazione e per la vicinanza della membrana mitocondriale interna alle specie reattive dell'ossigeno. L'ipotesi che i radicali liberi siano coinvolti nell'indebolimento della funzione mitocondriale è stata avallata da recenti scoperte: ad esempio la somministrazione di scavengers esogeni dei radicali liberi, come l'estratto di Ginkgo Biloba (Egb761), migliora la funzione del cervello e del fegato di animali invecchiati.

Lo studio di Paasche et al. (2000) ha stimato i parametri ultrastrutturali e funzionali dei mitocondri nelle *cellule di Müller* (gliali) invecchiate di cane, con e senza somministrazione di Egb 761. Questo modello è stato scelto per vari motivi:

7. nella retina le cellule di Müller rappresentano la principale riserva di scavengers di radicali liberi endogeni con una grande quantità di glutatione ridotto (GSH) nei loro mitocondri;
8. la riduzione di GSH età correlata può essere contrastata dalla somministrazione di Egb761;
9. cellule di Müller intatte viventi possono essere facilmente dissociate dal tessuto e sottoposte a studi biochimici, immunoistochimici e fluorometrici;
10. le cellule di Müller sono soggette alle alterazioni età correlate.

I mitocondri nelle cellule di Müller vanno incontro, con l'invecchiamento, ad una riduzione del numero di creste, nonché del loro potenziale di membrana e dell'indice di vitalità, mentre il contenuto in GABA-transaminasi rimane invariato (Wallace et al., 1995; Paasche et al., 2000).

Inoltre, è stato dimostrato che le alterazioni dei mitocondri (quali la rottura delle creste e la vacuolizzazione della matrice causate da un'altera-

zione della composizione lipidica delle membrane mitocondriali in animali invecchiati o anche da alterazioni funzionali o strutturali delle proteine codificate dal DNA mitocondriale) sono ridotte dalla somministrazione a lungo termine di Egb 761. L'Egb761 agisce sia come scavengers dei radicali liberi esogeni sia prevenendone la produzione (Paasche et al., 2000).

Con ulteriori esperimenti è stato osservato che, sia il danno funzionale ossidativo, che le alterazioni morfologiche dei mitocondri del cervello e del fegato, possono essere prevenute o ridotte dall'Egb761 (Sastre et al., 1998). In particolare, esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'Egb761 protegge la sintesi dell'ATP mitocondriale dall'insulto di anossia/riperfusione grazie allo scavenging dell'anione superossido generato dai mitocondri (Du et al., 1999). La somministrazione di Egb761 preserva, quindi, la funzione morfologica e sensoriale della retina (Ranchon et al., 1999).

Inoltre, è stato osservato che i livelli di GSH nel cervello di cane vecchio sono più bassi di quelli di animali giovani e che possono essere riportati a valori normali con la somministrazione di Egb761.

Prima di descrivere le alterazioni età correlate degli *astrociti* ricordiamo la loro morfologia e la loro distribuzione nelle retine di individui giovani. Gli astrociti sono cellule di interconnessione tra i neuroni ed il circostante tessuto connettivo (fibroblasti, cellule mesenchimali e cellule endoteliali). Alterazioni di queste cellule inducono, dunque, modifiche delle relazioni intercellulari e della funzione nervosa. È stato dimostrato che gli astrociti sono piuttosto resistenti agli stress ossidativi per l'alto contenuto di antiossidanti e la loro capacità a rigenerare il glutatione e l'ascorbato (Kettenmann et al., 1996; Wilson, 1997). Queste cellule agiscono, quindi, da protettori neuronali (Vernadakis, 1986) difendendo i neuroni contro i radicali liberi.

In seguito alla up-regulation delle difese antiossidanti enzimatiche e non enzimatiche è stato visto che si ha una *gliosi reattiva* (Wilson, 1997; Iadecola, 1999). Gli astrociti sono dunque cellule importanti per la sopravvivenza neuronale e quindi per il normale funzionamento della retina.

La finalità dello studio di Ramirez et al. (2001) è stata quella di studiare gli astrociti di retine umane giovani, le alterazioni “parafisiologiche” che si hanno con l’invecchiamento e quelle “patologiche” che si hanno nella degenerazione maculare (ARM). Lo studio è stato condotto su occhi umani enucleati, forniti dalla banca degli occhi spagnola 2-4 ore post-mortem per il trapianto di cornea e classificati in tre gruppi d’età (giovane, anziano e con ARM).

Gli *astrociti dei soggetti giovani* presentano numerosi e sottili processi che circondano i capillari dello strato cellulare gangliare (CGL), formando un plesso a nido d’ape (Ramirez et al., 1994). La guaina astrogliale intorno ai vasi è molto spessa ed i capillari sono tenuti insieme da numerosi fasci astrogliali. Gli spazi del plesso astrogliale a nido d’ape nel polo posteriore della zona A (area tra la seconda e terza divisione delle branche delle arterie retiniche, vicino al disco ottico) sono circolari e molto piccoli negli individui più giovani, mentre assumono una forma quadrangolare negli individui più anziani. Nella zona B (dalla terza divisione dell’arteria retinica all’equatore retinico, più vicino alla periferia) la dimensione degli spazi è variabile ed irregolare. In questa zona i legami astrogliali che tengono uniti i capillari hanno spessore variabile: alcuni spessi ed altri sottili. Nello strato NFL gli astrociti si trovano paralleli agli assoni delle cellule gangliari ed ai capillari peripapillari radiali (Ramirez et al., 1994). I fasci astrogliali sono molto spessi vicino al disco ottico.

Negli *individui anziani gli astrociti* presentano un corpo cellulare grande e robusti processi, soprattutto quelli presenti nell’NFL. Nel gruppo di per-

sone con oltre 60 anni di età, gli astrociti presentano una elevata immunoreattività GFAP rispetto a quella dei soggetti giovani, in particolare nello strato delle fibre nervose. Questa osservazione è stata confermata dalla microscopia elettronica che ha mostrato una più alta densità di filamenti gliali (costituiti dalla proteina gliale fibrillare acida) nel citoplasma astrogliale nel gruppo degli anziani. Nello strato NFL si osserva la mancanza del segnale GFAP(+) tra i fasci astrogliali il che indica che in questo strato gli astrociti hanno perso i loro processi. Occasionalmente si osservano organelli GFAP(+) sia nello CGL che nell’NFL, i quali corrispondono ad astrociti degenerati. Gli astrociti perivasali hanno pochi processi sottili e costituiscono una guaina astrogliale più sottile di quella che si riscontra negli individui più giovani. Sporadicamente si trovano astrociti reattivi. La struttura a nido d’ape non è facilmente individuabile nello CGL e gli spazi del plesso astrogliale hanno forma variabile (circolare, quadrata, rettangolare), le dimensioni sono comunque maggiori di quelle dei soggetti più giovani sia nella zona A (più vicina al disco ottico) che in quella B (più vicina alla periferia). Il numero degli spazi del plesso astrogliale a nido d’ape nel CGL è più piccolo nel gruppo di età tra 60 e 89 anni. Questo significa, come detto, che gli spazi sono più grandi a causa della scomparsa degli astrociti dalle pareti vasali e dei processi astrogliali che suddividono gli spazi. *La riduzione del numero di astrociti aumenta con l’età*, come è dimostrato dal confronto tra gruppi di persone con più di 80 anni di età con altri tra i 60 e i 79 anni.

Il paragone tra retine giovani e vecchie ha, quindi, ancora una volta mostrato che l’invecchiamento determina numerose alterazioni degli astrociti retinici. Si ha un aumento del numero degli organelli intracitoplasmatici (mitocondri, ribosomi, poliribosomi, reticolo endoplasmatico rugoso) a causa di una maggiore attività cellulare, un aumento dei

lisosomi e dei *corpi densi* (che aumentano anche all'interno delle cellule di Müller), un incremento dei filamenti intermedi gliali, un ispessimento della membrana limitante interna, i cui costituenti sono meno omogenei ed un accrescimento dello spazio tra le terminazioni gliali e la membrana basale della membrana limitante interna.

Tutte le cellule nervose retiniche presentano numerosi lisosomi nel loro citoplasma. Nell'NFL gli assoni delle cellule gliali presentano *corpi densi* costituiti da mielina non del tutto digerita, che rigonfiano gli assoni.

In alcuni casi, in retine invecchiate, sono stati riscontrati *astrociti di grandi dimensioni* (Madigan et al., 1994), che possiedono un'elevata attività cellulare ed una più alta densità di filamenti intermedi. Queste cellule sono considerate come *astrociti reattivi* (Nieto-Sampedro and Verdù, 1998).

Il compito degli *astrociti reattivi* è quello di proteggere i neuroni (in questo caso le cellule gangliari) *dall'ischemia, producendo fattori neurotrofici, incrementando l'espressione di sostanze antiossidanti (glutazione, vitamina C) ed aumentando sia il trasporto che la produzione di glucosio* (Wilson, 1997). Comunque, è stato osservato che gli astrociti, durante l'invecchiamento, sono più vulnerabili al danno ossidativo (Syková et al., 1998). Infatti, con il passare del tempo gli astrociti reattivi producono *alterazioni nella geometria e nel volume dello spazio extracellulare che rallentano la diffusione di sostanze neuroattive*.

Lo spazio extracellulare non è solo il microambiente delle cellule nervose, ma anche un importante "canale di comunicazione" tra neuroni e astrociti. Le alterazioni dei parametri di diffusione, che insorgono con l'invecchiamento, possono portare al "venir meno" dei segnali di trasmissione e aumentare la sensibilità del tessuto nervoso all'ischemia. L'ischemia è dovuta ad un'aumentata acidità extracellulare e all'accumulo di potassio e sostanze tossiche, simil

glutammato, che danneggiano i neuroni. Gli astrociti reattivi hanno un numero elevato di organelli (lisosomi secondari e lipofuscina) e un'elevata attività cellulare (Winckler et al., 1999). Queste cellule, e quindi anche la lipofuscina in esse contenuta, se esposte alla luce visibile (400-700 nm) e ad un'alta concentrazione di ossigeno (70 mmHg), ideale per la formazione delle specie reattive dell'ossigeno, possono sviluppare danni alle proteine cellulari e ai lipidi di membrana (Winckler et al., 1999)

Le specie reattive dell'ossigeno possono, infatti, alterare gli elementi cellulari e nucleari. Se aggiungiamo a questo la presenza di un'elevata concentrazione di sostanze tossiche (glutammato) nello spazio extracellulare (dagli astrociti reattivi), si viene a creare un massivo afflusso cellulare di glutammato, idrogeno e potassio dovuto ad un'aumentata permeabilità delle membrane cellulari, aggredite e indebolite dai radicali liberi. L'esito terminale di questo processo è il rigonfiamento cellulare. Così l'edema cellulare causa la "rottura" dei filamenti intermedi degli astrociti e quindi la perdita dell'immunoreattività GFAP ed infine la *morte cellulare* (Liu et al., 1999).

Ciò spiega perché, negli anziani, si osserva sia la riduzione del numero di astrociti nel CGL, sia la scomparsa dei processi degli astrociti nell'NFL.

Nel gruppo anziano è stato anche osservato che la membrana limitante interna è più spessa di quella del gruppo giovane. L'aumento di spessore della stessa impedisce l'interscambio di sostanze tra retina ed umor vitreo, il quale rappresenta una riserva di glucosio, di aminoacidi, di potassio e di glutazione per la retina ed un deposito per i prodotti di degradazione della stessa (Williams e Blumenkranz, 1998). L'ischemia nella retina interna, determinata dalla presenza di vasi nudi o acellulari (formati da un'ispessimento della membrana basale dei capillari), sarebbe quindi aggravata dalla difficoltà di diffusione attraverso la membrana limitante interna dei nutrienti e dalla difficoltà di smaltimento dei cataboliti.

Nel gruppo di persone con ARM le alterazioni sono più gravi di quelle in individui normali della stessa età. Le alterazioni strutturali della retina interna in individui con ARM sono equivalenti a quelle della retina esterna (Campochiaro, 1999) e rappresentano un processo avanzato dell'invecchiamento retinico. Nel gruppo di studio di pazienti con ARM, la membrana basale dei capillari retinici è considerevolmente più spessa di quella degli individui normali della stessa età, con uno spesso strato esterno di collagene in contatto con la glia astrocitaria e con le cellule di Müller. Il numero di capillari acellulari è più elevato in individui con oltre 81 anni, specialmente nei casi di ARM; infatti, l'ischemia che si instaura in questi casi è considerevolmente peggiore di quella degli individui sani di pari età.

In tutti i casi di ARM si osserva un elevato numero di astrociti ipertrofici e reattivi. Al microscopio elettronico è stato visto che questi astrociti fagocitano i residui delle cellule gangliari morte per necrosi o apoptosi. Gli astrociti contengono elevate quantità di lisosomi e lipofuscina, come le cellule gangliari e i loro assoni. L'estesa ischemia retinica che si ha con la ARM, insieme alla perdita delle cellule astrogliali che si ha con il normale invecchiamento, causano la morte delle cellule gangliari che non sono protette dallo stress ossidativo. Nella ARM, inoltre, la membrana basale della membrana limitante interna diventa più spessa di quella degli individui della stessa età, ostacolando gli scambi metabolici tra retina e vitreo. Gli astrociti reattivi sono sovraccarichi di materiale elettron denso che espellono nella membrana limitante interna.

In tutti gli individui con ARM sono state riscontrate delle protrusioni astrogliali a forma di tronco fortemente GFAP(+) che attraversano la membrana limitante interna e si situano nell'umor vitreo. Queste protrusioni sono formate dagli astrociti che hanno lunghi processi paralleli alla membrana limi-

tante interna e formano una membrana gliale. Al microscopio elettronico sono state osservate cellule nel vitreo che, a giudicare dalle loro caratteristiche ultrastrutturali, possono essere astrociti (Hogan et al., 1971; Ikui et al., 1976; Ramirez et al., 1996). Queste cellule presentano un citoplasma chiaro con un gran numero di organelli cellulari e densi filamenti gliali; i loro processi, inoltre, intercomunicano attraverso numerose gap junctions.

Gli astrociti possiedono anche microvilli in contatto con l'umor vitreo, lì dove è assente la membrana basale, che permettono un diretto contatto tra umor vitreo e astrociti.

Queste cellule possiedono, inoltre, caratteristiche ultrastrutturali simili alle membrane epiretinarie osservate in altre patologie (Spencer et al., 1985). È stato individuato anche un altro tipo cellulare più spesso, fortemente GFAP(+) a forma di colonna, che giace parallelamente alla membrana limitante interna e si confonde con gli astrociti ora menzionati. Le caratteristiche morfologiche di queste cellule ricordano quelle delle cellule di Müller in quanto più robuste, a forma di colonna e con pochi processi. Queste cellule dovrebbero essere *glia di Müller reattiva*, che in situazioni patologiche esprime le proteine GFAP (Tyler e Burns, 1991).

Solo Madigan et al. (1994) avevano già descritto, nelle retine con ARM, la presenza di astrociti ipertrofici distesi sulla superficie interna della retina.

Numerosi sono stati gli studi sulle membrane neovascolari che si presentano nella ARM, prodotte dalla migrazione delle cellule endoteliali coroideali attraverso la membrana di Bruch nello spazio subretinico ma non si è mai parlato delle membrane epiretinarie gliali (Hinton et al., 1998).

Molti studi hanno dimostrato che le membrane epiretinarie possono derivare da processi infiammatori, rotture retiniche od occlusioni vascolari retiniche (Williams e Blumenkranz, 1998). Nella ARM, l'estesa ischemia retinica induce gli astrociti-

ti a migrare nell'umor vitreo, ricco di riserve metaboliche. In questo modo l'umor vitreo garantisce il nutrimento degli astrociti rimasti nella retina interna, dato che in questo strato rimangono salde le giunzioni intercellulari tra le prime e le seconde. Non è noto quali siano tutti i fattori che causano, nella ARM, la migrazione degli astrociti e delle cellule di Müller nell'umor vitreo. Inoltre, non si conosce se queste membrane siano pericolose e cioè possano, dopo trazione, determinare un distacco di retina.

Invecchiamento della microglia

I precursori microgliali che si trovano sulla retina prima della vascolarizzazione sono MCH I e II positivi ed esprimono il marker CD45, ma non quello specifico dei macrofagi. Essi si differenziano in microglia parenchimale ramificata nella retina adulta. Una seconda categoria di precursori microgliali, che esprime i markers tipici dei macrofagi, migrano nella retina insieme ai precursori vascolari. Essi si localizzano intorno ai vasi sanguigni nella retina dell'adulto e sono simili ai macrofagi o fagociti mononucleati. La microglia si trova nello strato plessiforme esterno, nucleare esterno, plessiforme interno, gangliare e delle fibre nervose della retina dei primati. Nella retina umana la microglia esprime le molecole MCH I, MHCII, CD3 (linfociti T), CD1a (cellule dendritiche), CD45 (leucociti), CD68 (macrofagi) e CD22 (linfociti B).

Lo studio di Yang et al. (2000) ha dimostrato, grazie ad esami immunoistochimici, la presenza di diverse popolazioni di macrofagi nella retina quali cellule CD45+, cellule CD45+/HLA-DR+, cellule HLA-DR, cellule CD 68+ e cellule CD 68/HLA-DR+.

Le cellule presentanti l'antigene (CD1+) sono presenti in bassa quantità nella retina umana, mentre le cellule B e T sono del tutto assenti.

La densità dei macrofagi è molto bassa al polo posteriore ed elevata in periferia. Questa sembrerebbe una strategia biologica necessaria, probabilmente, per il mantenimento di una buona visione in condizioni normali. La bassa densità di macrofagi potrebbe, comunque, essere implicata nella patogenesi della ARM; essa, infatti, ha un ruolo importante nella clearance dei detriti cellulari e dei cataboliti del tessuto nervoso.

I macrofagi nella retina sono coinvolti nella difesa contro infezioni virali, batteriche, parassitarie, nell'immunoregolazione, nella riparazione dei tessuti, nel catabolismo di neurotrasmettitori ed ormoni, nel turnover lipidico del tessuto nervoso. La retina umana contiene un'elevata concentrazione di cellule microgliali HLA-DR+, ma poche cellule CD1+. Tuttavia, esperimenti in vitro hanno mostrato come la microglia HLA-DR+ abbia la capacità di presentare l'antigene. Questo potrebbe fare luce sul ruolo dei macrofagi retinici nello sviluppo e nel perpetuarsi delle uveoretiniti umane, soprattutto perché queste cellule immunocompetenti si trovano in un ambiente che contiene un grande numero di antigeni uveogenetici. Sembrerebbe che i macrofagi sopprimano le APC, come accade nel polmone; nella retina, inoltre, la loro attivazione e proliferazione sembrerebbe inibita dalle cellule di Müller. Infine, anche le cellule dell'EPR sarebbero capaci di esercitare una down-regulation delle APC tramite la secrezione della prostaglandina E₂ e l'NO, in condizioni normali. I linfociti T e B, del tutto assenti nella retina, sono presenti nella congiuntiva, nell'iride e nella coroide. L'assenza dei linfociti nella retina potrebbe contribuire al mantenimento dell'omeostasi dell'immuno-microambiente retinico. L'alterazione di questo equilibrio potrebbe portare, infatti, alla presentazione degli antigeni retinici ai linfociti T, i quali determinerebbero una *risposta autoimmune* e quindi un'inflammatione oculare. Le infiammazioni quali le uveoretiniti, includendo la vasculite retinica,

non sono rare nell'uomo. Infatti, le cellule CD1+, HLA-DR+, CD4+ e CD 68+ si localizzano prevalentemente *intorno ai vasi retinici* e questo spiega la predominanza delle vasculiti in alcune uveiti (malattia di Beçhet e sarcoidosi).

Il trapianto di retina è visto come un tentativo per il trattamento di certe malattie retiniche. Il successo che ci si aspetta da questo trapianto si basa sull'ipotesi che la retina, come la cornea, sia un tessuto immunologicamente privilegiato. La dimostrazione di una quantità significativa di cellule MHC di classe II, capaci di agire come APC, indica che, sebbene la rigenerazione nervosa possa essere una strategia da intraprendere, il *rigetto immunologico* può diventare una conseguenza da non sottovalutare del trapianto retinico (Yang et al., 2000).

La microglia gioca un ruolo importante nella difesa contro i microrganismi, nell'immunoregolazione e nella riparazione dei tessuti.

Sia l'instaurarsi di fenomeni neurodegenerativi, ma anche il normale invecchiamento determinano il passaggio dalla forma quiescente a quella reattiva della microglia (Kunert et al., 1999).

La microglia reattiva ha il compito di fagocitare i detriti e facilitare i processi rigenerativi (Chen et al., 2002). La morfologia e la localizzazione della microglia non è uguale per tutta la vita. È stato visto nei topi appena nati che le cellule della microglia sono rotonde e ameboidi, con processi pseudopolipoidi spessi e tozzi distribuiti nello strato delle fibre nervose e gangliari. Nei topi di 10 giorni i corpi cellulari assumono una forma bastoncellare con pseudopodi oppure fusiforme, con processi ramificati e snelli. La maggior parte delle cellule si trovano nello strato delle cellule gangliari e alcune nello strato plessiforme interno. A 20 giorni le cellule diventano più piccole, con lunghi processi ramificati. Esse sono localizzate nello strato plessiforme interno e nello strato delle cellule bipolari. Negli animali adulti le cellule della microglia sono piccole e appiattite, con lunghi processi ramificati (Ling et al., 1982).

Kunert et al. (1999) hanno studiato le alterazioni correlate all'età della microglia nelle quaglie e nei piccioni. Il primo evento è la migrazione della microglia nella retina esterna, dove le cellule *reattive* assumono una forma *arrotondata*. Cellule della microglia rotonde (reattive) sono state trovate tra i fotorecettori di quaglie e piccioni anziani, soprattutto nella retina periferica più che in quella centrale. Inoltre, è stato visto che la microglia è inversamente correlata al numero di fotorecettori e cioè, è più numerosa nei punti di maggior perdita di questi ultimi. Gli Autori concludono che l'attivazione della microglia non sembrerebbe un fenomeno generale di invecchiamento, ma piuttosto un fenomeno indotto in modo specifico dalla perdita dei fotorecettori.

L'invecchiamento dei vasi della retina

Alterazioni età correlate dei vasi retinici sono state riscontrate sia nella rete capillare superficiale che in quella profonda. Lo spessore della membrana basale dei capillari aumenta di 2-3 volte (Weisse, 1995). Nei preparati retinici di ratto di 28-32 mesi, Glatt e Henkind (1979) hanno notato una riduzione nel numero delle cellule endoteliali capillari e dei periciti.

Anche Ramirez et al. (2001) hanno descritto alterazioni dei vasi retinici con l'invecchiamento. I capillari presentano un *ispessimento* della membrana basale, pari al doppio di quello dei capillari degli individui giovani, con *numerosi accumuli di lipidi*. Il lume dei capillari diviene più irregolare e le cellule endoteliali appaiono piene di lisosomi e lipidi, poi riversati nel lume vasale. I periciti adiacenti alle cellule endoteliali dei vasi presentano un citoplasma ricco di corpi densi.

Peraltro, precedenti studi di Cogan (1963) avevano mostrato che, dall'età di 50 anni, c'è una *perdita* delle cellule endoteliali dai capillari della retina

periferica, i quali assumono l'aspetto di *vasi nudi o capillari acellulari*. Lo stesso accade nei vasi della retina centrale dai 60 anni in poi. La perdita delle cellule endoteliali e l'ispessimento della membrana basale dei capillari indeboliscono il passaggio di ossigeno e di nutrienti al tessuto nervoso retinico. Questo fatto determina *ipossia* e rallentamento dell'eliminazione dei prodotti del catabolismo.

Alterazione dell'espressione di fattori di crescita nella retina invecchiata

Una potenziale spiegazione della morte dei fotorecettori che, come detto, si osserva nell'invecchiamento retinico è da individuare nei cambiamenti della vascolarizzazione retinica sopra descritti. Questi, causando l'ipossia tissutale, sembra inducano una neoangiogenesi (Hughes et al., 2006). Sebbene molti processi tipici dell'invecchiamento oculare siano ormai noti, poco si sa dei fattori di crescita coinvolti e delle loro alterazioni.

Smith e Steinle (2007) hanno valutato (nelle retine di topi di 8, 22 e 32 mesi) i cambiamenti età-dipendenti nell'espressione di diversi fattori di crescita coinvolti nel processo di rimodellamento vascolare. Il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), ad esempio, è un potente fattore angiogenico e mitogeno espresso dalle cellule endoteliali coinvolte nella promozione della migrazione, della replicazione e della neoformazione vasale (Cross e Claesson-Welsh, 2001). Il VEGF manifesta un legame preferenziale con flt-1 (VEGF-R1) e con flk-1/VEGF-R2 inducendo l'attivazione della cellula endoteliale. Lavori precedenti avevano già riscontrato l'espressione di questo fattore, non solo sulle cellule endoteliali retiniche (Kroll e Waltenberger, 1998), ma anche su periciti (Darland et al., 2003) e glia retinica (Stone et al., 1995). Il fattore di derivazione dall'epitelio pigmentato (PEDF), invece, è un

noto inibitore endogeno dell'angiogenesi, riscontrato in quasi tutto il sistema nervoso centrale, così come in gran parte del bulbo oculare (Holekamp et al., 2002). È nota, inoltre, la sua capacità di incrementare la crescita e la sopravvivenza dei fotorecettori, così come quella di proteggere i neuroni immaturi dall'apoptosi (Marciniak et al., 2006). Al contrario di VEGF, VEGFR2 e PEDF, coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare, l'angiopoietina-1 (Ang-1), legandosi al suo recettore, Tie-2, sembra avere un effetto stabilizzante sui vasi neoformati (Hayes et al., 1999; Papapetropoulos et al., 1999).

Dallo studio è emerso che la PCR real time non ha rilevato cambiamenti significativi con l'avanzare dell'età nell'espressione dell'mRNA per il VEGF, ma i livelli proteici sono significativamente aumentati nei topi di 32 mesi rispetto a quelli di 8 e 22 mesi. Ciò sta ad indicare un incremento dell'attività di tale fattore e si correla alla formazione di nuovi vasi che invadono il tessuto retinico (Curatola et al., 2005). Un incremento del VEGF si riscontra sia nel fisiologico processo di invecchiamento che in patologie età-correlate. La ragione della discrepanza tra mRNA e proteina non è nota; l'unica ipotesi rimane la ridotta stabilità dell'mRNA. Un riscontro dello stesso tipo è stato ottenuto analizzando il VEGFR2, il principale recettore per il VEGF e localizzato sulle cellule endoteliali (Shalaby et al., 1995). L'incremento di questa proteina nei topi di 22 e 32 mesi suggerisce che la retina è effettivamente suscettibile ad un rimodellamento vascolare.

Nonostante nei topi di diversa età non siano state individuate variazioni significative nell'espressione dell'mRNA codificante per il PEDF, i suoi livelli proteici sia a 22 che a 32 mesi risultano molto inferiori se paragonati a quelli degli 8 mesi. Da quando il PEDF è comunemente ritenuto un fattore anti-angiogenico, il decremento dei suoi valori proteici nella senescenza rappresenta un ulterio-

re fattore che avvalorava l'ipotesi di neoangiogenesi nella retina invecchiata. Inoltre, l'assenza della sua capacità protettiva sembra provocare difficoltà di sopravvivenza dei fotorecettori.

Il fatto che il PEDF si modifica in direzione opposta rispetto al VEGF induce a pensare che questo fattore contribuisce al mantenimento dell'equilibrio della neovascolarizzazione nei tessuti oculari. L'mRNA codificante per Ang-1 risulta significativamente incrementato a 32 mesi rispetto agli 8 e ai 22, mentre non sono state riscontrate variazioni nella sua attività proteica.

I livelli proteici di Tie-2 si riducono progressivamente fino ai 32 mesi, quando questi valori diventano significativi rispetto a quelli degli 8 mesi, mentre i suoi livelli di mRNA crescono. La riduzione del contenuto proteico di Tie-2 indica che probabilmente la neovascolarizzazione non è in fase di stabilizzazione.

È importante sottolineare come molti cambiamenti nell'espressione di fattori di crescita siano stati riscontrati in diverse patologie oculari. Nella fase attiva delle retinopatie proliferative, ad esempio, si individuano aumenti dei livelli di VEGF (Adamis et al., 1994; Aiello et al., 1994), così la sintesi e la secrezione di PEDF diminuisce, oltre che con l'invecchiamento, anche nelle retinopatie proliferative e nelle AMD essudative (Holekamp et al., 2002; Marciniak et al., 2006; Ohno-Matsui et al., 2001).

Poiché i cambiamenti nell'espressione di questi fattori di crescita sono stati riscontrati nel normale processo di invecchiamento retinico si può ipotizzare che in queste patologie si verifichi un processo di invecchiamento precoce. Studi futuri dovranno comunque chiarire i cambiamenti nell'espressione dei fattori di crescita che si verificano nel normale invecchiamento piuttosto che nelle diverse patologie oculari e per spiegare la discrepanza tra espressione genica e livelli proteici.

Quadri clinici tipici delle alterazioni senili della corioretina

Le alterazioni senili della corioretina sono in massima parte conosciute e lo saranno sempre più, poiché l'età media di vita va via via aumentando. Ippocrate, fissava a 64 l'età media di vita.

Nel 1963 le statistiche indicavano questo valore attorno ai 70 anni ed oggi è aumentato ancor di più. È molto frequente il riscontro di lesioni senili dell'occhio con riduzione dell'acuità visiva ed anche lesioni corioretiniche periferiche, che causano danni retinici anche gravi quali il *distacco retinico senile*. L'interesse dello studio delle alterazioni visive geriatriche sta nell'evidenziare il più precocemente possibile le primissime lesioni oculari. Non che si possa, almeno fino ad oggi, impedire l'evoluzione inesorabile dei fenomeni degenerativi, ma con una diagnosi precoce si possono quanto meno ritardare molti di questi fenomeni.

Con l'avanzare degli anni, la normale architettura della retina va incontro a modifiche a partire dall'ora serrata e verso il polo posteriore per una distanza variabile (Rutnin e Schepens, 1967).

Al *polo posteriore* si osservano le verrucosità della membrana di Bruch (drusen), depositi lipoidei o di saponi calcarei e capillarosi (aneurismi obliterati).

La degenerazione maculare secca e umida rappresentano quadri clinici frequenti trattati ampiamente in patologia (Owsley et al., 2000), che omettiamo in questa trattazione.

Infine, abbiamo la degenerazione cistoide della macula che inizia con edema con riflessi foveali irregolari, brillanti, riflessi radiali che circondano la stessa.

Nella macula può esserci una vescicola isolata, di colore rosso scuro, a margini netti.

In *periferia*, le lesioni più frequenti sono la degenerazione cistica e le lacune di Blessig-Iwanoff, localizzate nell'ora serrata.



Fig. 19: Aspetto macroscopico di degenerazione cistoide periferica tipica della retina



Fig. 20: Degenerazione cistoide periferica tipica con spazi cistici nello strato plessiforme esterno (ematossilina – eosina, x40)

DEGENERAZIONE CISTICA

La MLI cresce di spessore. La retina mostra due tipi di spazi cistoidi: tipico e reticolare. Il primo origina dallo strato plessiforme esterno mentre il secondo origina dallo strato delle fibre nervose. Queste modifiche sono molto frequenti dopo i 70 anni d'età (O'Malley e Allen, 1967).

Il primo tipo di affezione, *degenerazione cistoide periferica tipica (DCPT) (cisti di Blessig-Iwanoff)*, è caratterizzato da cisti dello strato plessiforme esterno contenenti acido ialuronico, che può anche coartarsi producendo un aspetto lobulato con canali tortuosi che si ramificano irregolarmente (Fig. 19, 20). Le complicanze sono rare; i fori retinici non producono distacco della retina poiché il vitreo è di solito integro al disopra della lesione. L'estensione della lesione oltre l'equatore è rara. La rottura della parete della cisti (o lacuna) determina la formazione di fori lamellari periferici con limiti a stampo. La retina non è scollata, non esiste l'opercolo del vero foro retinico. Rara, ma possibile, la formazione di fori veri con opercolo, al quale aderiscono filamenti di corpo vitreo, ciò in seguito ad una degenerazione filamentosa dello stesso e del suo scollamento dall'ora serrata. Essa può essere causa di un'altra alterazione periferica: la *retinoschisi degenerativa tipica*.

Il secondo tipo di modificazione è la *degenerazione cistoide periferica reticolare* (Fig. 21, 22): è quasi sempre in continuità e localizzata posteriormente ad aree di degenerazione cistoide periferica tipica e di solito si trova nel quadrante infero-temporale.

Ha un aspetto reticolare che corrisponde ai vasi retinici degli strati interni. Una superficie interna finemente punteggiata corrisponde ai punti di attacco dei cuscinetti di tessuto allo strato interno. Gli spazi cistici sono localizzati nello strato delle fibre nervose. Questo processo si ha nel 18% degli adulti, in forma bilaterale nel 41%. Può evolvere nella *retinoschisi degenerativa reticolare* (Foos e Feman, 1970; Foos, 1970).

RETINOSCHISI

Sono state descritte due forme degenerative di retinoschisi; entrambe si manifestano più frequentemente nel quadrante infero-temporale e derivano da una forma preesistente di degenerazione cistoide periferica. La degenerazione cistoide periferica tipica può evolvere nella *retinoschisi degenerativa tipica*, mentre entrambe le forme di degenerazione cistoide periferica, tipica e reticolare, possono trasformarsi in *retinoschisi degenerativa reticolare* (Foos, 1970). La *retinoschisi degenerativa tipica* (Fig. 23) provoca un'elevazione smussa della retina nell'1% degli



Fig. 21: Aspetto macroscopico della degenerazione cistoide periferica reticolare



Fig. 22: Degenerazione cistoide periferica reticolare con spazi cistici nello strato delle fibre nervose (ematossilina – eosina, x100)

adulti (bilaterale nel 33% dei casi). La degenerazione cistoide periferica tipica circonda la lesione. La retina si divide in corrispondenza dello strato plessiforme esterno: di conseguenza lo strato interno comprende la MLI, lo strato delle fibre nervose, i vasi retinici, le cellule gangliari, lo strato plessiforme interno e lo strato interno dei nuclei, sebbene siano visibili solo la MLI, lo strato delle fibre nervose e parte dello strato interno dei nuclei; lo strato esterno è più spesso scavato e costituito dallo strato esterno dei nuclei e dei fotorecettori. La *retinoschisi degenerativa reticolare* (Fig. 24) si sviluppa dalla concomitante presenza della degenerazione cistoide della retina periferica, tipica e

reticolare (Foos, 1970; Straatsma e Foos, 1973). È caratterizzata da aree ovali o rotonde di scollamento retinico, nelle quali un rilievo bollosa dello strato interno estremamente sottile è stato osservato nell'1-6% degli adulti (in forma bilaterale nel 15% dei casi). Lo scollamento si realizza nello strato delle fibre nervose: la porzione interna contiene solo la MLI, alcuni vasi retinici e porzioni variabili dello strato delle fibre nervose; la porzione esterna è costituita dagli strati retinici restanti e relativamente integri.

Di solito la degenerazione cistoide periferica tipica è localizzata anteriormente alla retinoschisi degenerativa reticolare, mentre la forma reticolare



Fig. 23: Aspetto macroscopico di due aree di retinoschisi degenerativa tipica immediatamente posteriori a degenerazione cistoide periferica tipica

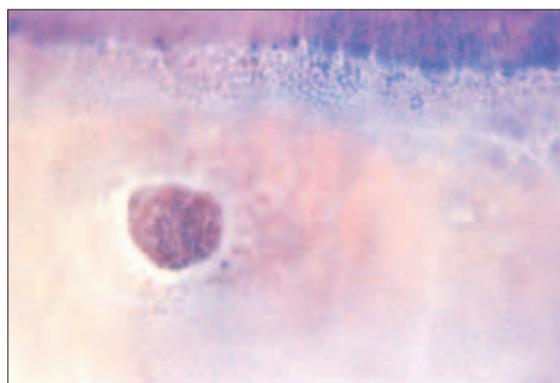


Fig. 24: Aspetto macroscopico di retinoschisi degenerativa reticolare, con foro a margini arrotondati nello strato esterno

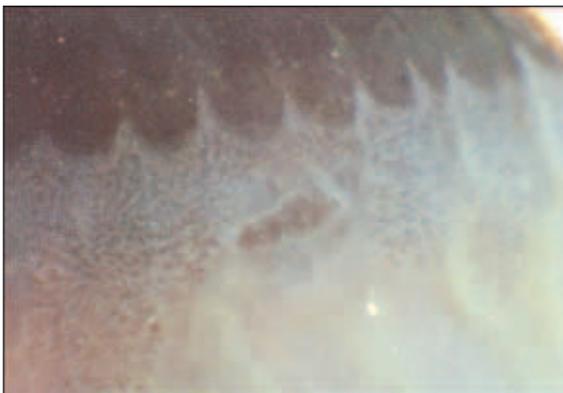


Fig. 25: *Aspetto macroscopico dell'assottigliamento retinico in un'area di degenerazione a lattice*

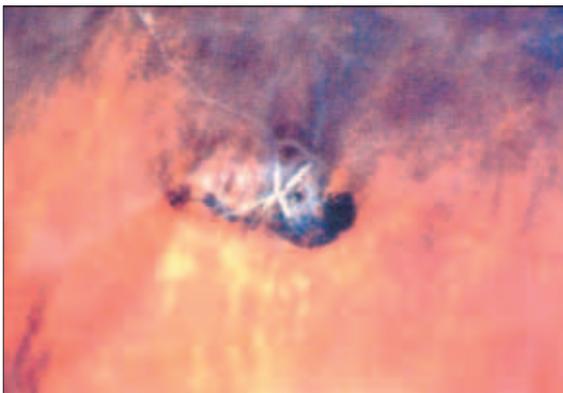


Fig. 26: *Aspetto macroscopico di degenerazione a lattice con associata ipertrofia dell'EPR e un aspetto a graticciata dei vasi sanguigni sclerotici*

è adiacente.

Talvolta la retinoschisi tipica e quella reticolare si manifestano contemporaneamente. Byer (1986) ha osservato che la differenziazione tra retinoschisi degenerativa tipica e retinoschisi degenerativa reticolare non sempre può essere effettuata su base clinica, a meno che non vi siano un aspetto bologno, presenza di fori nel lembo esterno oppure estensione posteriore, caratteristiche più comuni nella forma reticolare che in quella tipica.

Il trattamento della retinoschisi degenerativa è indicato quando l'estensione posteriore mette a rischio l'area maculare, se vi è associazione con

distacco retinico non regmatogeno e se esistono soluzioni di continuo in ambo i lembi (Straatsma et al., 1980).

Secondo Byer (1986) il trattamento è indicato solo se c'è un distacco di retina progressivo e sintomatico.

DEGENERAZIONE A LATTICE

La frequenza della degenerazione a lattice riscontrata in un ampio studio clinico condotto da Byer (1989) è dell'8% e del 10,7% negli studi autoptici di Straatsma et al. (1974).

Le lesioni sono bilaterali e simmetriche nel 48,1% dei casi, la frequenza cresce dopo il secondo decennio. La maggior parte delle lesioni, localizzata nella regione preequatoriale è orientata secondo la circonferenza ed è più frequente nei meridiani verticali.

Le lesioni a lattice hanno l'aspetto dell'assottigliamento retinico (Fig. 25), possono avere aspetto "a graticciata", determinato da vasi sclerotici, e possono avere pigmentazione variabile in seguito ad ipertrofia dell'EPR (Fig. 26). Istologicamente, la degenerazione a lattice è caratterizzata da una sacca vitreo fluido sovrastante, assenza di MLI, condensazione di vitreo a margine, iperplasia delle cellule gliali e dell'EPR al margine e, in alcuni casi, assottigliamento e formazione di fori retinici al centro della lesione, sclerosi dei vasi maggiori, sclerosi ed acellularità dei capillari, ipertrofia ed iperplasia dell'EPR.

In presenza di DPV si può formare una lacerazione in virtù di aderenze vitreo retiniche più tenaci. Le alterazioni pigmentarie sono spesso la caratteristica oftalmoscopica che attira l'attenzione sulla lesione. La degenerazione a lattice "a graticciata" è dovuta a sclerosi dei vasi maggiori ed è presente in circa l'11% delle lesioni.

È stato suggerito che disturbi della circolazione retinica siano la causa primaria della degenerazione a lattice (Straatsma et al., 1974). Tuttavia, l'aspetto delle lesioni che si sovrappongono non è com-

patibile con l'ischemia, piuttosto il processo può essere correlato a difetti delle cellule di Müller.

DEGENERAZIONE A CIOTTOLO

Questo comune processo degenerativo corio-retinico è presente fino al 27% dei soggetti dopo i 30 anni (O'Malley e Allen, 1967). È localizzato tra l'ora serrata e il versante posteriore dell'equatore e rappresenta la zona di confine tra la circolazione coroideale posteriore e quella ciliare anteriore. Oftalmoscopicamente appare come una *piccola e discreta area bianco-giallastra, con vasi coroidei estremamente visibili, talvolta con EPR ipertrofico e scuro al margine* (Fig. 27). Le lesioni possono confluire a formare una banda di depigmentazione posteriormente all'ora serrata. Studi istopatologici mostrano segni di atrofia ischemica della retina esterna, con attenuazione o scomparsa dei coriocalpillari, perdita dell'EPR e degli strati retinici esterni fino a comprendere la parte esterna dello strato interno dei nuclei. Queste modifiche sono limitate alla porzione della retina irrorata dalla coriocalpillare e possono essere riprodotte nel coniglio dopo legatura dell'apporto ematico coroideale (Nicholls, 1938).

La degenerazione a ciottolato è una caratteristica che indirizza verso la vasculopatia periferica e può essere molto estesa nella stenosi carotidea (Michellson et al., 1971).

DEGENERAZIONE PIGMENTOSA SENILE PERIFERICA

La degenerazione pigmentosa senile periferica si associa a verrucosità della lamina vitrea di Bruch ed a sclerosi della coroide. È sovente bilaterale. Un tipo di alterazione pigmentaria, che però non è periferica, è rappresentata dalle *strie pigmentate moniliformi della corioetina* costituite da granuli di pigmento che sembrano localizzati su vasi coroideali sclerotici con predilezione nel quadrante nasale inferiore.



Fig. 27: Aspetto macroscopico di tre aree di degenerazione a ciottolato

DISTACCO DI RETINA SENILE

Definire un distacco retinico come senile non è cosa facile. Esistono delle alterazioni corio-retiniche e vitreali tipicamente geriatriche che possono causare un distacco di retina.

1. *Degenerazione cistica della periferia della retina.* La degenerazione cistica da un lato produce un assottigliamento ed indebolimento della retina e dall'altro favorisce la formazione di aderenze patologiche con il vitreo e quindi crea i presupposti per una rottura retinica a lembo o ad opercolo. Inoltre, la parete della cisti si può rompere e si possono così formare fori retinici, come già detto (Byer, 1981).
2. *Degenerazione a selciato, a ciottolato, degenerazione pavimentosa come ha proposto Straatsma (1973) o "cobblestones degeneration"* degli anglosassoni o focolai di coroidosi atrofica di Gonin. Dal punto di vista istologico si osserva, a livello di queste lesioni, la scomparsa della coriocalpillare e dell'epitelio pigmentato, l'atrofia degli strati più esterni della retina, cioè di quelli che dipendono dal trofismo della coriocalpillare. La retina si mostra fortemente saldata alla coroide a livello di questi focolai degenerativi. Quasi mai si formerebbero fori o rotture della retina a tale livello. Questo tipo

di degenerazione di per sé quindi non favorirebbe l'insorgenza del distacco di retina, ma denuncierebbe l'esistenza di un'usura, di una degenerazione della coroide e della retina alla periferia che potrebbe favorire l'insorgenza di un distacco di retina. Infatti, O'Malley e Allen (1967) hanno osservato, in numerosi pazienti che presentavano degenerazione pavimentosa, la presenza, accanto a queste lesioni, di degenerazioni cistiche della retina, di degenerazione a palizzata, retinoschisi, di fori, rotture retiniche e cisti della pars plana.

3. *Degenerazione senile del vitreo.* Secondo Goldmann il vitreo incomincerebbe ad invecchiare o per lo meno a trasformarsi dal momento della nascita. Tuttavia, dopo i 50 anni inizia nell'occhio emmetrope una degenerazione fibrillare e lacunare del vitreo, che progredendo lentamente può portare al distacco posteriore del vitreo con collasso. È questa un'affezione tipicamente senile che, secondo la casistica di Favre e Goldmann (1956), si riscontrerebbe nel 65% degli individui con oltre 65 anni, e pressoché nel 100% degli individui con oltre 77 anni. Il distacco posteriore del vitreo può provocare, dove esiste un'aderenza vitreo-retinica, una rottura della retina per trazione. Accanto alla teoria della trazione vitreale di Leber e Gonin quale causa della rottura retinica e quindi del distacco della retina si pone la teoria di Paufique e Hervouet (1962) secondo cui la rottura della retina sarebbe secondaria ad un'essudazione coroideale di origine infiammatoria, congestizia o allergica, che superato l'epitelio pigmentato determinerebbe una pressione sulla retina verso l'interno del bulbo, provocando, appunto, la sua rottura in un punto di minor resistenza. A contatto del liquido di essudazione coroideale il vitreo poi si coarterebbe. Tutte e due le teorie sono valide, ma la prima è più frequente.

Secondo Heer (in Bellan, 1971) a provocare il distacco di retina senile sarebbero essenzialmente la degenerazione cistica della retina e il distacco posteriore del vitreo con collasso e ciò perché nei casi di distacco senile quasi sempre si riscontra la presenza di un distacco posteriore del vitreo con collasso. Se si considera però la rarità del distacco di retina rispetto alla presenza del distacco posteriore del vitreo e della degenerazione cistica della retina nell'età senile, bisogna ammettere che, nella patogenesi del distacco retinico, hanno importanza molti altri fattori quali la predisposizione genetica, fattori vascolari coroideali e retinici e fattori abiotrofici (Paufique e Hervouet, 1962).

Le alterazioni che danno origine ad un distacco di retina nell'occhio senile sono assai simili a quelle che si hanno in un occhio miope. Una ricerca condotta da Grignolo (in Bellan, 1971) su 829 casi di distacco osservati in tre anni, ha rilevato che fra essi i miopi rappresentavano circa il 34% ed i non miopi il 66%, fra i quali il 63% circa corrispondeva a soggetti con età superiore ai 40 anni. Si nota, quindi, come la senilità svolga un ruolo importante nella genesi del distacco. Indubbiamente essa è responsabile di lesione degenerative della retina e della coroide, lesioni che spesso non hanno dei caratteri che la differenziano in modo apprezzabile dalle lesioni degenerative miopiche. Nel caso della senilità, le lesioni sono legate ad eventi ostruttivi dei capillari retinici e talora coroideali. Lo studio dei casi di distacco di retina appartenenti a soggetti non miopi in età senile ha permesso di stabilire che spesso, in queste lesioni degenerative, sono evidenti delle ostruzioni vascolari sotto forma di sottili vasi oblitterati che prevalgono nel quadrante temporale superiore. Negli occhi di soggetti di età senile non miopi è possibile osservare con frequenza maggiore che in soggetti più giovani delle piccole chiazze equatoriali pigmentate a contorno spesso esagonale. Esse non raramente sono il punto di origine di rotture a ferro di cavallo, sul cui lembo si trovano depositi di pigmento. Infine, si possono osservare soluzioni di continuo maculari derivanti da alterazioni senili della

macula. Nelle degenerazioni maculari senili si possono produrre dei fori maculari lamellari che, seppure non molto frequentemente, vanno incontro a perforazione con conseguente distacco di retina. La senilità, oltre a favorire l'insorgenza di alterazioni retiniche regmatogene, è anche responsabile di alterazioni degenerative vitreali che, come già osservato, possono produrre trazioni, rotture e quindi distacco di retina. Favre e Goldmann (1956) hanno constatato, come detto, che la percentuale di frequenza delle diverse alterazioni vitreali è maggiore dopo i 65 anni d'età con particolare frequenza il distacco di vitreo. Le modifiche di struttura del vitreo, senile e miopico, hanno per substrato un disgregamento del suo reticolo collagene per una depolimerizzazione delle molecole di acido ialuronico contenute in esso. Anche le alterazioni retiniche non hanno, nel distacco senile, caratteristiche particolari. È noto da tanti anni che le alterazioni cistoidi intraretiniche, che si verificano a livello dell'ora serrata, rappresentano una manifestazione abituale della involuzione senile dell'occhio. Esse, già segnalate da Blessig (1855) e ben descritte da Ivanoff (1869), appaiono generalmente tra i 30 e i 40 anni estendendosi, con l'età, dai settori temporali a tutta la periferia, e confluendo tra loro per trasformarsi in entità cliniche. Le alterazioni cistoidi intraretiniche sarebbero conseguenza di una insufficienza circolatoria giustificata dalla loro sede a livello dello strato plessiforme esterno, che è il più lontano dall'arteria centrale della retina e da quello della coriocapillare. La degenerazione cistoide periferica è ben individuabile quando la retina è sollevata anche leggermente. Poiché il vitreo dei soggetti in età superiore ai 50

anni aderisce intimamente alla retina fino all'equatore, come hanno dimostrato Teng e Chi nel 1957, è evidente che questo prolungamento posteriore della base del vitreo può provocare la rottura della retina stessa, resa fragile al punto da non poter più sopportare le trazioni da parte del vitreo collassato. Alterazioni di tipo lacunare sono state, inoltre, dimostrate istologicamente nei lembi retinici di lacerazioni "a ferro di cavallo". In assenza di trazioni da parte del vitreo la rottura delle pareti delle cavità determina la formazione di piccoli fori senza opercolo. L'influenza di alterazioni vascolari nella patogenesi del distacco di retina senile è senza dubbio da prendere in considerazione, dato che si ha una riduzione della performance cardiaca e polmonare con l'invecchiamento; è stato, inoltre, osservato un parallelismo tra le lesioni aterosclerotiche dei vasi retinici con quelle di altri organi.

Ricordiamo, infine, che l'*afachia*, oggi di rara osservazione, in un intervento ben riuscito per cataratta, ha una stretta correlazione con il distacco di retina, il quale origina da piccole rotture o fori posti all'ora serrata. Nell'occhio afachico senile si riscontra molto spesso alla periferia, e particolarmente all'ora serrata, una degenerazione retinica con piccoli fori localizzati spesso a livello delle pieghe meridionali della retina. Vail (in Bellan, 1971) ritiene che queste lesioni si possono creare durante l'intervento di estrazione intracapsulare del cristallino, oggi, come detto, non più attuale. Tale intervento comportava alterazione della statica del vitreo in seguito alla trazione esercitata sulle fibre della zonula.

Bibliografia

Abbot N.J., Revest P.A., Romero I.A.: Astrocyte-endothelial interaction physiology and pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1992;18:424-433

Adamis A.P., Miller J.W., Bernal M.T., D'Amico D.J., Folkman J., Yeo T.K., Yeo K.T.: Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 1994;118:445-450

Agus D.B.: Vitamin C crosses the blood – brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.*, 1997;100:2842-2848

Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel H.D., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E.: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.*, 1994;331:1480-1487

Amenta F., Ghirardi O., Lucreziotti R. et al.: Effect of acetyl-L-carnitine on the morphology of the retina in old rats. Abstract of the eight European Neuroscience Congress, The Hague, The Netherlands, September 11-15, 1984. *Neurosc. Letters*, 1984;18:s328

Amenta F., Ghirardi O., De Rossi M. et al.: Effect of long-term Acetyl-L-Carnitine treatment on the nervous system and ocular tissue in old rats. *Rapporto interno n. 10-85/A*, 1984 Sigma Tau

Amenta F., Ghirardi O., De Rossi M. et al.: Effetti del trattamento a medio termine con L carnitina sul sistema nervoso ed i tessuti oculari di ratto senescente. *Rapporto interno n. ST 8-85/G*, 1984 Sigma Tau

Armstrong D.: Free radical involvement in the formation of lipopigments. In: Armstrong D., (Ed.), *Free Radicals in Molecular biology, aging and disease*. New York, Raven Press, 1984;pp. 137-182

Bird A.C., Marshall J.: Retinal pigment epithelial detachments in the elderly. *Trans. Soc. Ophthalmol. U.K.*, 1986;105:674-682

Bird A.C.: What is the future of research in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, 1997;115:1311-1313

Birkedal-Hansen H., Moore W., Bodden M. et al.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 1993;4:197-250

Blessig (1855) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.: Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica*. Simposi Italseber, 1971;pp.241-369

Bloomfield S.A.: Orientation-sensitive amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. *J. Neurophysiol.*, 1994, 71;1672-1691

Bobryshev Y.V., Lord R.S.: Accumulation of co-localised unesterified cholesterol and neutral lipids within vacuolised elastin fibres in athero-prone areas of the human aorta. *Atherosclerosis*, 1999;142:121-131

Bocan T.M., Brown S.A., Guyton J.R.: Human aortic fibrolipid lesions. Immunochemical localization of apolipoprotein B and apolipoprotein A. *Arteriosclerosis*, 1988;8:499-508

Bone R.A., Landrum J.T., Fernandez L., Tarsis S.L.: Analysis of the macular pigment by HPLC: Retinal distribution and age study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1988;29:843-849

Boulton M.: Aging of the retinal pigment epithelium. In: Osborne N.N., Chander G.J. (Eds.), *Progress in Retinal Research*. Oxford, Pergamon, 1991;pp.125-151

Boulton M., Dontsov A., Jarvis- Evans J. et al.: Lipofuscin is a photoinducible free radicals generator. *J. Photochem. Photobiol.*, 1993;19:201-204

Boulton M., Moriarty P., Jarvis-Evans J., Moarcyniuk B.: Regional variations and age-related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium. *Br. J. Ophthalmol.*, 1994;78:125-129

Boulton M., Wassel J.: Ageing of the human retinal epithelium. In: Coscas G., Piccolino F.C. (Eds.), *Retinal Pigment Epithelium and Macular Disease*. *Doc. Ophthalmologica*, 1998;62:20-28

Boulton M.E., McKechnie N.M., Breda J. et al.: The formation of autofluorescent granules in cultured human RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989;30:82-89

Bowling A., Mutisya E.M., Walker L.C. et al.: Age dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J. Neurochem.*, 1993;60:1964-1967

Breitschopf K., Zeiher A.M., Dimmeler S.: Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bcl-2. A functional consequence on apoptosis induction. *J. Biol. Chem.*, 2000;275:21648-21667

Bresin A., Iacoangeli A., Risuleo G., Scarsella G.: Ubiquitin dependent proteolysis is activated in apoptotic fibroblasts in culture. *Mol. Cell. Biochem.*, 2001;220(1-2):57-60

Brizee K.R., Ordy J. M.: Cellular features, regional accumulation, and prospects of modification of age pigments in mammals. In: Sohal R.S. (Ed.), *Ageing pigments*. Amsterdam, Elsevier/North – Holland Biomedical Press, 1981

- Broderick C., Dunca L., Taylor N., Dick A.D.:** IFN- γ and LPS mediated IL -10 dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000;41:2613-2622
- Burns R.P., Feeney- Burns L.:** Clinico -morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Soc.*, 1980;78:206-255
- Byer N.E.:** Long-term natural history of lattice degeneration of the retina. *Ophthalmology*, 1989;96:1396-1402
- Byer N.E.:** Cystic retinal tufts and their relationship to retinal detachment. *Arch. Ophthalmol.*, 1981;92:1788-1790
- Byer N.E.:** Long-term natural history of senile retinoschisis with implications for management. *Ophthalmology*, 1986;93:1127-1137
- Call T., Hollyfield J.:** Sulphate proteoglycans in Bruch's membrane of the human eye: localisation and characterisation using cupromeronic blue. *Exp. Eye Res.*, 1990;51:451-462
- Campochiaro P.A.:** The pathogenesis of age-related macular degeneration. *Mol. Vis.*, 1999;5:24
- Cavallotti C., Artico M., Pescosolido N., Feher J.:** Age-related changes in rat retina. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 2001;45:68-75
- Cavallotti C., Schweoller M.:** Aging of the Retinal Pigmented Epithelium. In: Cavallotti C., Cerulli L. (Eds.), *Age-Related Changes of the Human Eye*. Totowa, Humana Press, 2008;pp.203-215
- Chen J.C., Fitzke F.W., Pauleikhoff D., Bird A.C.:** Functional loss in age-related Bruch's membrane change with choroidal perfusion defect. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1992;33:334-340
- Chen L., Yang P., Kijlstra A.:** Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2002;10:27-39
- Ciechanover A., Heller H., Elias S., Haas A.L., Hershko A.:** ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980;77:1365-1368
- Cogan D.G.:** Development and Senescence of the Human Retinal Vasculature. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.*, 1963;83:465-489
- Cross M.J., Claesson-Welsh L.:** FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001;22:201-207
- Curatola A.M., Moscatelli D., Norris A., Hendricks-Munoz K.:** Retinal blood vessels develop in response to local VEGF-A signals in the absence of blood flow. *Exp. Eye Res.*, 2005;81:147-158
- Curcio C.A., Sloan K.R., Kalina R.E., Hendrickson A.E.:** Human photoreceptor topography. *J. Comp. Neurol.*, 1990;292:497-523
- Curcio C.A., Allen K.A., Sloan K.R. et al.:** Distribution morphology of human cone photoreceptors stained with anti-blue opsin. *J. Comp. Neurol.*, 1991;312:611-625
- Curcio C.A., Millican C.L., Allen K. A., Kalina R.E.:** Aging of the human photoreceptor mosaic: Evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1993;34:3278-3296
- Curcio C.A. and Millican C.L.:** Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 1999;117:329-339
- Curti D., Giangare M.C., Redolfi M.E. et al.:** Age related modification of cytochrome c oxidase activity in discrete brain regions. *Mech. Ageing Dev.*, 1990;55:171-180
- Darland D.C., Massingham L.J., Smith S.R., Piek E., Saint-Geniez M., D'Amore P.A.:** Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.*, 2003;264:275-288
- De Martino C., Floridi A., Marcante M.L., Malorni W., Scorza Barcellona P., Bellocchi M., Silvestrini B.:** Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell. Tissue Res.*, 1979;196:1-22
- Dorey C.K., Wu G., Ebestein D. et al.:** Cell loss in the aging retina: relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989;30:1691-1699
- Dryja T.P., Briggs C.E., Berson E.L., Rosenfeld P.J.:** ABCR gene and age-related macular degeneration. *Science*, 1998;279:1107
- Du G., Willet K., Sluse F.E. et al.:** Egb 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999;27:596-604
- Dykens J.A.:** Free radicals and mitochondria dysfunction in excitotoxicity and neurodegenerative disease. In: Koliatos V.E., Rantan R.R. (Eds.), *Cell death and diseases of the Nervous System*. Totowa, Humana Press, 1999;pp.45-68
- Eldred G.E., Lasky M.R.:** Retinal age pigments generated by self-assembling lysomotrophic detergents. *Nature*, 1993;361:724-726
- Elliot D.B.:** contrast sensitivity with aging: a neuronal or optical phenomenon. *Ophthalm. Physiol. Opt.*, 1987;7:415-419
- Eliasieh K., Liets L.C., Chalupa L.M.:** Cellular reorganization in the human retina during normal aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007;48:2824-2830

- Eytan E., Armon T., Heller H., Beck S., Hershko A.:** Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex. *J. Biol. Chem.*, 1993;268:4668-4687
- Farkas T.G., Sylvester V., Archer D.:** The ultrastructure of drusen. *Am. J. Ophthalmol.*, 1971;71:1206-1215
- Favre e Goldmann (1956) riportato in Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica. Simposi Italseber*, 1971;pp 241-369
- Feeney L.:** Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium: fluorescence, enzyme cytochemical and ultrastructural studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1978;17:583-600
- Feeney-Burns L., Burns R.P., Gao C.L.:** Age related macular changes in humans over 90 years old. *Am. J. Ophthalmol.*, 1990;109:265-278
- Feeney-Burns L., Eldred G.E.:** The fate of the phagosome: Conversion to "age pigment" and impact in human retinal pigment epithelium. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*, 1983;103:416-421
- Feeney-Burns L., Ellersiek M.R.:** Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane. *Am. J. Ophthalmol.*, 1985;100:686-697
- Feeney-Burns L., Hilderbrand E.S., Eldridge S.:** Aging human PRE: morphometric analysis of macular, equatorial and peripheral cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1984;25:195-200
- Fischer J.A.:** Deubiquitinating enzymes: their roles in development, differentiation, and disease. *Int. Rev. Cytol.*, 2003; 229:43-72
- Foos R.Y., Feman S.S.:** Reticular cystoid degeneration of the peripheral retina. *Am. J. Ophthalmol.*, 1970;70:329-403
- Foos R.Y.:** Senile Retinoschisis: relationship to cystoid degeneration. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol.*, 1970;68:329-403
- Foulds W.S.:** Factors influencing visual recovery in retinal detachment surgery. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.*, 1980;100:72-77
- Frank J.S., Fogelman A.M.:** Ultrastructure of the intima in WHHL and cholesterol-fed rabbit aortas prepared by ultra-rapid freezing and freeze-etching. *J. Lipid Res.*, 1989;30:967-978
- Ganath D., Leshinsky E., Eytan E., Hershko A.:** A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation. *J. Biol. Chem.*, 1988;263:12412-13419
- Gao H., Hollyfield J.G.:** Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1992;33:1-17
- Gartner S., Henkind P.:** Aging and Degeneration of the Human Macula. I. Outer Nuclear Layer and Photoreceptors. *Br. J. Ophthalmol.*, 1981;65:23-28
- Glatt H.J., Henkind P.:** Aging changes in the retinal capillary bed of the rat. *Microvasc. Res.*, 1979;18:1-17
- Gonzalez-Fernandez F.:** Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins. *J. Endocrinol.*, 2002;175:75-88
- Green W.R., Enger C.:** Age-related macular degeneration histopathologic studies: the 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology*, 1993;100:1519-1535
- Grierson I., Hiscott P., Hogg P., Robey H., Mazure A., Larkin G.:** Development, repair and regeneration of the retinal pigment epithelium. *Eye*, 1994;8:255-262
- Grignolo (1971) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica. Simposi Italseber*, 1971;pp.241-369
- Grindle C.F., Marshall J.:** Ageing changes in Bruch's membrane and their functional implications. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*, 1978;98:172-175
- Gubellini P., Bisso G.M., Ciofi-Luzzatto A., Fortuna S., Lorenzini P., Michalek H., Scarsella G.:** Ubiquitin-mediated stress response in a rat model of brain transient ischemia/hypoxia. *Neurochem Res.*, 1997;22:93-100
- Guyton J.R., Bocan T.M., Schifani T.A.:** Quantitative ultrastructural analysis of perifibrous lipid and its association with elastin in nonatherosclerotic human aorta. *Arteriosclerosis*, 1985;5:644-652
- Haegerstrom-Portnoy G.:** Short-wavelength-sensitive-cone sensitivity loss with aging: A protective role for macular pigment? *J. Opt. Soc. Am.*, 1988;5:2140-2144
- Handelman G.J., Dratz E.A.:** The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of pro-oxidant induced damage. *Adv. Free Radic. Biol. Med.*, 1986;2:1-89
- Hayes A.J., Huang W.Q., Mallah J., D. Yang, Lippman M.E. and Li L.Y.:** Angiotensin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc. Res.*, 1999;58:224-237
- Herr (1971) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica. Simposi Italseber*, 1971;pp.241-369

- Hershko A., Heller H., Eytan E., Kaklij G., Rose I.A.:** Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984;81:7021-7025
- Hershko A., Ciechanover A.:** The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1992;61:761-807
- Hinton D.R., He S., Lopez P.E.:** Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, 1998; 116:203-209
- Hirsch J., Curcio C.A.:** The spatial resolution capacity of the human fovea. *Vision Res.*, 1989;29:1095-1101
- Hodgetts A., Hussain A.A., Marshall J.:** Effects of enzymatic modulation on the hydrodynamics of ageing human Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1998;39:S368
- Hogan M.J., Alvarado J.A., Weddel J.E.:** Histology of the human eye. Philadelphia, Saunders, 1971
- Holekamp N.M., Bouck N., Volpert O.:** Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002;134:220-227
- Holz F.G., Sheraidah G., Pauleikhoff D., Bird A.C.:** Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch. Ophthalmol.*, 1994;112:402-406
- Hosokawa M., Takeshia S., Higuchi K. et al.:** Cataract and other ophthalmic lesions in senescence accelerated mouse (SAM): Morphology and incidence of senescence associated ophthalmic changes in mice. *Exp. Eye Res.*, 1984;38:105-114
- Hough C.J.:** A predictive model of enzymatic cleavage of nucleic acids. *Biopolymers*, 1987;26:1789-1807
- Huang J.-D., Presley B., Chimento M.F., Curcio C.A., Johnson M.:** Age-related changes in human macular Bruch's membrane as seen by quick-freeze/deep-etch. *Exp. Eye Res.*, 2007;85:202-218
- Hughes S., Gardiner T., Hu P., Baxter L., Rosinova E., Chan-Ling T.:** Altered pericyte-endothelial relations in the rat retina during aging: implications for vessel stability. *Neurobiol. Aging* 27, 2006;12:1838-1847
- Humphrey W.L., Carson R.E., Valone J.A.:** Senile reticular pigmentary degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 1984;98:717-722
- Hussain A.A., Starita C., Patmore A., Marshall J.:** Ultrastructural evaluation of porosity of individual layers of Bruch's membrane and correlation with the rate limiting site for fluid transport (ARVO Abstract). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1997;38:S353
- Iadecola C.:** Mechanism of cerebral ischemic damage. In: Walz W. (Ed.), *Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology*. Totowa, Humana press, 1999;pp.3-32
- Ikui H., Uga S., Kohno T.:** Electron microscope study on astrocytes in the human retina using ruthenium red. *Ophthalmic Res.*, 1976;8:100-110
- Ivanoff (1869) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica*. Simposi Italseber, 1971;pp.241-369
- Iwasaki M., Inomata H.:** Lipofuscin granules in human photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1988;29:671-679
- Johnson C.A., Adams A.J., Lewis R.A.:** Evidence for a neural basis of age-related visual field loss in normal observers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989;30:2056-2064
- Johnson C.A., Adams A.J., Twelker J.D., Quigg J.M.:** Age related changes in the central retina visual field for short-wavelength-sensitive pathways. *J. Opt. Soc. Am.*, 1988;5:2131-2139
- Johnson L.V., Staples M.K., Nealon M.R., Anderson D.H.:** Age-related maculopathy: immune complex pathogenesis in drusen formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000;41:S24
- Jonas J.B., Muller -Berg J.A., Scholtzer U.M., Naumann G.O.:** Histomorphometry of the human optic nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1990;31:736-744
- Kamei M., Hollyfied J.G.:** TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999;40:2367-2375
- Kanwar Y.S., Linker A., Farquar M.G.:** Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulphate) by enzyme digestion. *J. Cell. Biol.*, 1980;86:688-693
- Katz M.L., Drea C., Eldred G., Hess H., Robinson W.G.:** Influence of early photoreceptor degeneration on lipofuscin in the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.*, 1986;43:561-573
- Katz M.L., Robison W.G.:** Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. *Exp. Eye Res.*, 1986;42:293-304
- Kettenmann H., Faissner A., Trotter J.:** Neuron glia interactions in homeostasis and degeneration. In: Greger R., Windhorst U. (Eds.), *Comprehensive human physiology. From cellular mechanism to integration*. Berlin, Springer, 1996;pp.533-543
- Kim K.I., Giannakopoulos N.V., Virgin H.W., Zhang D.E.:** Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol. Cell. Biol.*, 2004;24:9592-9600

- Koshland D.E.:** Protein and biological control. *Sci. Am.*, 1973;229:52-64
- Kramersch D.M., Hollander W.:** The interaction of serum and arterial lipoproteins with elastin of the arterial intima and its role in the lipid accumulation in atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.*, 1973;52:236-247
- Kroll J. and Waltenberger J.:** VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998;252:743-746
- Kunert K.S., Fitzgerald M.E., Thomson L., Dorey C.K.:** Microglia increases as photoreceptor decrease in the aging avian retina. *Curr. Eye Res.*, 1999;18:440-447
- Lai Y.L., Lug R., Masuda K., Lin Y.P.:** Mechanism and significance of photoreceptor cell loss in the Fischer rat retina; In Hollyfield J.G. (Ed.), *The structure of eye*. Amsterdam, Elsevier North Holland, 1982;pp.134-139
- Lamb T.D., Pugh E.N.:** Phototransduction, dark adaptation and rhodopsin regeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006;47;12:5138-5152
- Leber Gonin (1971) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica*. Simposi Italseber, 1971;pp.241-369
- Lee J.C., Peter M.E.:** Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.*, 2003;193:39-47
- Lerman S.:** Ocular phototoxicity. *N. Engl. J. Med.*, 1988;319:1475-1477
- Lewis H., Straatsma B.R., Foos R.Y., Lightfoot D.O.:** Reticular degeneration of the pigment epithelium. *Ophthalmology*, 1985;92:1485-1495
- Lewis H., Straatsma B.R., Foos R.Y.:** Chorioretinal juncture. Multiple extramacular drusen. *Ophthalmology*, 1986;93:1098-1112
- Liebman P.A., Parker K.R., Dratz E.A.:** The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. *Ann. Rev. Physiol.*, 1987;49:765-91
- Ling E.A.:** A light microscopic demonstration of amoeboid microglia and microglial cells in the retina of rats of various ages. *Arch. Histol. Jpn.*, 1982;45:37-44
- Linnane A.W., Ozawa T., Marzuki S., Tanaka M.:** Mitochondrial DNA mutation as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet*, 1989;1:642-645
- Liu D., Smith C.L., Barone F.C., Ellison J.A. et al.:** Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. *Mol. Brain Res.*, 1999;68:29-41
- Lois N., Owens S.L., Coco R., Hopkins J., Fitzke F.W., Bird A.C.:** Fundus autofluorescence in patients with age-related macular degeneration and high risk of visual loss. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002;133:341-349
- Madigan M.C., Penfold P.L., Provis P.L. et al.:** Intermediate filament expression in human retinal macroglia. Histopathologic changes associated with age related macular degeneration. *Retina*, 1994;14:65-74
- Marciniak K., Butwicka A., Nowak J.Z.:** PEDF: an endogenous factor displaying potent neuroprotective, neurotrophic, and antiangiogenic activity. *Postepy. Hig. Med. Dosw.*, 2006;60:387-396
- Marshall J.:** Ageing changes in human cones. In: Shimizu K. e Oosterhuis J. A. (Eds.), *Proceedings of the XXIII International Congress (Kyoto)*, 14-29 May 1978. Amsterdam, Excerpta Med., 1979;pp.375-378
- Marshall J., Grindle J., Ansell P.L., Borwein B.:** Convolution in human rods: an aging process. *Br. J. Ophthalmol.*, 1979;63:181-187
- Marshall J.:** The ageing retina: physiology and pathology. *Eye*, 1987;1:282-295
- Marshall J., Hussain A.A., Starita C., Moore D.J., Patmore A.L.:** Ageing and Bruch's membrane. In: Marmor M.F., Wolfensberger T.J., (Eds.), *Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*. New York, Oxford University Press, 1998;pp.669-692.
- Mathews W.R., Guido D.M., Fisher M.A., Jaeschke H.:** Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic. Biol. Med.*, 1994;16(6):763-770
- McFall-Ngai M., Ding L., Takemoto L., Horwitz J.:** Spatial and temporal mapping of the age-related changes in human lens crystallins. *Exp. Eye Res.*, 1985;41:745-758
- McFarland R. A., Domey R.G., Warren A. B., Ward D.C.:** Dark adaptation as a function of age: I: A statistical analysis. *J. Gerontol.*, 1960;15:149-154
- Mecocci P., MacGarvey U., Kaufman A.E. et al.:** Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.*, 1993;34:609-616
- Michellson P.E., Knox D.L., Green W.R.:** Ischemic ocular inflammation. A clinico pathologic case report. *Arch. Ophthalmol.*, 1971;86:274-280
- Mikelberg F.S., Drance S.M., Schulzer M. et al.:** The normal human optic nerve. Axon count and axon diameter distribution. *Ophthalmology*, 1989;96:1325-1328
- Moore D., Hussain A., Marshall J.:** Age related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1995;36:1290-1297

- Moore D.J., Clover G.M.:** The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001;42:2970-2975
- Naash M.I., Al-Ubaidi M.R., Anderson R.E.:** Abstract Light exposure induces ubiquitin conjugation and degradation activities in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1997;38(11):2344-54
- Nicholls J.V.V.:** The effect of section of the posterior ciliary arteries in the rabbit. *Br. J. Ophthalmol.*, 1938;22:672-687
- Nieto-Sampedro M., Verdù E.:** Lesiones del sistema nervoso: respuesta neuronal y reparacio. In: Delgado (Ed.), *Manual de Neurociencia*. 1998;pp.929-969
- Ohno-Matsui K., Morita I., Tombran-Tink J., Mrazek D., Onodera M., Uetama T., Hayano M., Murota S.I., Mochizuki M.:** Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J. Cell Physiol.*, 2001;189:323-333
- O'Malley P.F., Allen R.A.:** Peripheral cystoid degeneration of the retina. Incidence and distribution in 1.000 autopsy eyes. *Arch. Ophthalmol.*, 1967;77:769-776
- Osterberg G.A.:** Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmologica*, 1935; 13(Suppl.6):1-103
- Owsley C., Burton K.B.:** Aging and spatial contrast sensitivity: underlying mechanism and implications for everyday life. In: Bagnoli P., Hodos W. (Eds.), *The changing visual system*. New York, Plenum Press, 1991; pp.119-136
- Owsley C., Jackson G.R., Cideciyan A.V. et al.:** Psychophysical evidence for rod vulnerability in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000;41:267-273
- Paasche G., Gartner U., Germer A. et al.:** Mitochondria of retinal Muller (Glial) cells: the effect of aging and of application of free radical scavengers. *Ophthalmic Res.*, 2000;32:229-236
- Panda Jonas S., Jonas J., Jakobczyk-Kmija M.:** Retinal pigment epithelial cell count distribution and correlations in normal human eyes. *Am. J. Ophthalmol.*, 1996;121:181-189
- Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Dengler T.J., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D., Sessa W.C.:** Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors, *Lab. Invest.*, 1999;79:213-223
- Paufique e Hervout (1962) riportati da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica*. Simposi Italseber, 1971;pp.241-369
- Pauleikhoff D., Chen J., Chisholm I., Bird A.C.:** Choroidal perfusion abnormality with age-related Bruch's membrane change. *Am. J. Ophthalmol.*, 1990;109:211-217
- Pauleikhoff D., Harper A., Marshall J., Bird A.C.:** Aging changes in Bruch's membrane: a histochemical and morphological study. *Ophthalmology*, 1990;97:171-178
- Perry V.H., Henderson Z., Linden R.:** Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp. Neurol.*, 1983;219:356-368
- Peters J.M., Franke W.W., Kleinshmidt J.A.:** Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 1994;269(10):7709-18
- Pino R.M., Essner, Pino L.C.:** localization and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 1982;30:245-252
- Pitts D.G.:** The effects of aging on selected visual functions: Dark Adaptation, visual acuity, streopsis and brightness contrast. In: Sekuler R., Kline D., Dismukes K. (Eds.), *Aging and Human visual function*. New York, AR Liss, 1982;pp.131-159
- Podet E.J., Shaffer D.R., Gianturco S.H, Bradley W.A., Yang C.Y. and Guyton J.R.:** Interaction of low density lipoproteins with human aortic elastin. *Arterioscler. Thromb.*, 1991;11:116-122
- Ramirez J. M., Ramirez A.I., Salazar J.J. et al.:** Changes astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.*, 2001;73: 601-616
- Ramirez J.M., Trivino A., Ramirez A.L. et al.:** Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.*, 1994; 34:1935-1946
- Ramrattan R.S., van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., Mulder P.G., de Jong P.T.:** Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1994;35:2857-2864
- Ranchon I., Gorrard J.M., Doly M. et al.:** Functional protection of photoreceptor from light- induced damage by dimethylthioures and Ginkgo Biloba extract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999; 40:1191-1199
- Rechsteiner M.:** Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. *Adv. Enzyme Regul.*, 1988; 27:135-151
- Rechsteiner M., Hoffman L., Dubiel W.:** The multicatalytic and 26 S proteases. *J. Biol. Chem.*, 1993;268(9):6065-6068
- Rice M.E.:** Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.*, 2000;23:209-216

- Ruberti J.W., Curcio C.A., Millican C.L., Menco B.P., Huang J.D., Johnson M.:** Quick-freeze/deep-etch visualization of age-related lipid accumulation in Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003;44:1753-1759
- Rutnin U., Schepens C.S.:** Fundus appearance in normal eyes. Peripheral degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 1967;64:1040-1062
- Saigoh K., Wang Y.L., Suh J.G., Yamanishi T., Sakai Y., Kiyosawa H. Et al.:** Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat. Genet.*, 1999;23(1):47-51
- Saitoh Y., Hosokawa M., Shimada A. et al.:** Age related cochlear degeneration in Senescence-Accelerated Mouse. *Neurobiol. Aging*, 1995;16:129-136
- Sarks S.H.:** Aging and degeneration in the macular region: a clinico pathological study. *Br. J. Ophthalmol.*, 1976;60:324-341
- Sarna T., Burke J.M., Korytowski W. et al.:** Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp. Eye Res.*, 2003;76:89-98
- Sastre J., Millan A., Juan G. et al.:** A Ginkgo Biloba extract (Egb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998;24:289-304
- Scheffrin B.E., Werner J.S., Plach M. et al.:** Sites of age-related sensitivity loss in short-wave cone pathway. *J. Opt. Soc. Am.*, 1992;9:355-363
- Schmidt S.Y., Peisch R.D.:** Melanin concentration in retinal pigment epithelium: regional variation and age-related reduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1986;27:1063-1067
- Schmidt SY., Peisch R.D.:** Melanin concentration in the normal human retinal pigment epithelium: Regional variation and age-related reduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1986;27:1063-1067
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L. and Schuh A.C.:** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995;376:62-66
- Shang F., Taylor A.:** Function of the ubiquitin proteolytic pathway in the eye. *Exp. Eye Res.*, 2004;78:1-14
- Shelley e.J., Madigan M.C., Natoli R., Penfold P.L., Provis J.M.:** Cone degeneration in aging and age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, 2009;127:483-492
- Shimada A., Hosokawa A., Ohta A., Akiguchi I., Takeda T.:** Localization of atrophy-prone areas in the aging mouse brain: comparison between the brain model SAM-P/10 and the normal control SAM-P/1. *Neuroscience*, 1994;59:859-869
- Shoji M., Okada M., Otha A. et al.:** A morphological and morphometrical study of the retina in aging SAM mice. *Ophthalmic Res.*, 1998;30:172-179
- Sloane M.E., Owsley C., Jackson C.A.:** Aging and luminance-adaptation effects on spatial contrast sensitivity. *J. Opt. Soc. Am.*, 1988;28:1235-1246
- Smith C., Steinle J.J.:** Changes in growth factor expression in normal aging of rat retina. *Exp. Eye Res.*, 2007;85:817-824
- Snodderly D.M.:** Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995;62:1448S-1461S
- Snyder A.W., Miller W.H.:** Photoreceptor diameter and spacing for highest resolving power. *J. Opt. Soc. Am.*, 1977;67:696-698
- Spencer W.H., Font R.L., Green W.R. et al.:** Pathology of the macula. In: Spencer (Ed.), *Ophthalmic Pathology*. Philadelphia, WB Saunders, 1985;pp.294-1034
- Stamford J.A.:** Regional differences in extracellular ascorbic acid levels in the rat brain determined by high speed cyclic voltammetry. *Brain Res.*, 1984;299:289-295
- Starita C., Hussain A.A., Pagliarini S., Marshall J.:** Hydrodynamics of aging Bruch's membrane: implications for macular disease. *Exp. Eye Res.* 1996;62:565-572
- Steinmetz R.L., Polkinghorne P.C., Fitzke F.W. et al.:** Abnormal dark adaptation and rhodopsin kinetics in Sorby's fundus dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1992;33:1633-1636
- Steinmetz R.L., Haimovichi R., Jubb C. et al.:** Symptomatic abnormalities of dark adaptation in patients with age related Bruch's membrane change. *Br. J. Ophthalmol.*, 1993;77:549-554
- Stone J., Itin A., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T., Keshet E.:** Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.*, 1995;15:4738-4747
- Straatsma B.R., Zeegan P.D., Foos R.Y.:** Lattice degeneration of the retina (XXX Edward Jackson Memorial Lecture). *Am. J. Ophthalmol.*, 1974;77:619-649
- Straatsma B.R., Foos R.Y.:** Typical and reticular degenerative retinoschisis. XXVI Francis I Proctor Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.*, 1973;75:551-575
- Straatsma B.R., Foos R.Y., Feman S.S.:** Degenerative diseases of the peripheral retina. In: Duane T. D. (Ed.), *Clinical Ophthalmology*. Philadelphia, Harper & Row, 1980;3:pp.1-27

- Sturr J.F., Hannon D.J.:** Methods and models for specifying sites and mechanism of sensitivity regulation in the aging visual system. In: Bagnoli P. and Hodos W. (Eds.), *The changing visual system*. New York, Plenum Press, 1991;pp.219-231
- Swanson W., Birch D.G.:** SWS-cone defects. In: *Technical Digest, non-invasive Assessment of the Visual System*. Vol.1. Washington, DC, Optical Society of America, 1991;pp.208-211
- Syková E., Mazel T., Simonová Z.:** Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging. *Exp. Gerontol.*, 1998;33:837-851
- Takeda T.:** *The SAM model of senescence*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1994
- Tanaka K., Tsurumi C.:** The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol. Biol. Rep.*, 1997;24(1-2):3-11
- Teng Chi (1957) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica*. Simposi Italseber, 1971;pp.241-369
- Tso M., Friedman E.:** The retinal pigment epithelium: III growth and development. *Arch. Ophthalmol.*, 1968;80:214-216
- Tsakaguchi H.:** A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 1999;399:70-75
- Tucker G.S.:** Refractile bodies in the inner segments of cones in the aging human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1986;27:708-715
- Tyler N.K., Burns M.S.:** Alterations in glial cell morphology and fibrillary acidic protein expression in urethane-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1991;32 :246-256
- Vail (1971) riportato da Streiff E.B. e Faggioni R.:** Alterazioni senili della corioretina. In: Bellan B. (Ed.), *Atti del Simposio Internazionale di Oftalmologia Geriatrica*. Simposi Italseber, 1971;pp.241-369
- Van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., Oron F.G., Mulder P.G., de Jong P.T.:** Histologic features of the early stages of age-related macular degeneration. A statistical analysis. *Ophthalmology*, 1992;99:278-286
- Vernadakis A.:** Changes in astrocytes with aging. In: Federoff S., Vernadakis A. (Eds.), *Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Orlando, USA, Academic Press, 1986;pp.377-407
- Wallace D.C., Lott M.T., Brown M.D. et al.:** Report of the committee on human mitochondrial DNA. In: Cuticchia A.J. (Ed.), *Human gene mapping 1995: A compendium*. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1995;pp.910-954
- Wang X., Greilberger J., Ratschek M., Jurgens G.:** Oxidative modifications of LDL increase its binding to extracellular matrix from human aortic intima: influence of lesion development, lipoprotein lipase and calcium. *J. Pathol.*, 2001;195:244-250
- Watzke R.C., Soldevilla J.D., Trune D.R.:** Morphometric analysis of human retinal pigment epithelium: correlation with age and location. *Curr. Eye Res.*, 1993;12:133-142
- Weale R.A.:** *The eye and aging*. Interdiscipl. Topics Gerontol., 1978;13:1-13
- Weidam T.A., Kuwabara T.:** Postnatal development of the rat retina. *Arch. Ophthalmol.*, 1968;79:470-484
- Weisse I.:** Change in aging rat retina. *Ophthalmic Res.*, 1995;27 (Suppl.1):154-163
- Weiter J.J., Delori F., Dorey C.K.:** Central sparing in anular macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 1988;106:286-292
- Weiter J.J., Delori F.C., Wing G.I., Fitch K.A.:** Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in humans eyes. *Am.J. Ophthalmol.*, 1986;27:145-152
- Wilk S.:** Prolyl endopeptidase. *Life Sci.* 1983;33(22):2149-57
- Williams T.P.:** Some properties of old and new rhodopsin in single Bufo rods. *J. Gen. Physiol.*, 1984;83:841-852
- Williams G.A., Blumenkranz M.S.:** *Vitreous humor*. In: Tasman W., Jaeger E.A. (Eds.), *Duane's Ophthalmology on CD-ROM*, Philadelphia, USA, Lippincott-Raven, 1998
- Wilson J.X.:** Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997;75:1149-1163
- Wing G.L., Blanchard G.C., Weiter J.L.:** The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1978;17:601-607
- Winkler B.S., Boulton M.E., Gottsh J.D., Sternberg P.:** Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.*, 1999;5:32
- Wunderlich K., Golubnitschaja O., Pache M., Eberle A.N., Flammer J.:** Increased plasma levels of 20S proteasome alpha-subunit in glaucoma patients: an observational pilot study. *Mol. Vis.*, 2002;8:431-435
- Yamada M., Tsukagoshii H., Otomo E., Hayakawa M.:** Systemic amyloid deposition in old age and dementia of Alzheimer type: the relationship of brain amyloid to other amyloid. *Acta Neuropathol.*, 1988;77:136-141
- Yang P., Das P.K., Kijlstra A.:** Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2000;8:3:149-157

L'invecchiamento dell'apparato della visione

Young R.W.: Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.*, 1987;31:291-306

Young R.W.: The Bowman Lecture, 1982. Biological Renewal. Applications to the eye. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*, 1982;102:42-75

Young R.W.: The Bowman Lecture, 1982. Metabolism of the pigment epithelium. In: Shimizu K., Oosterhuis J.A., (Eds.), *Proceedings of the XXIII International Congress (Kyoto), 14-20 May, 1978.* Amsterdam, Excerpta Med., 1979;pp.159-166

L'invecchiamento dei vasi retinici

IL PROCESSO DELLA VASCULOGENESI/ANGIOGENESI

Com'è noto, la formazione dei vasi avviene attraverso processi denominati vasculogenesi e angiogenesi. Per *vasculogenesi* si intende la formazione *de novo* dei vasi a partire da cellule progenitrici, gli *angioblasti*, che migrano dove si formeranno i futuri vasi e ove si uniscono in cordoni cellulari. Successivamente avremo il differenziamento in cellule endoteliali (Risau, 1997). Viene denominato *angiogenesi*, invece, il processo in cui non sono coinvolti gli angioblasti e la rete vascolare si estende tramite la proliferazione di cellule endoteliali preesistenti (Klagsbrun e Moses, 1999). Mentre la vasculogenesi si verifica principalmente all'inizio dell'embriogenesi, l'angiogenesi può aver luogo anche nell'adulto, sia in condizioni fisiologiche, come accade ciclicamente nel sistema riproduttivo femminile o nella guarigione delle ferite, che in processi patologici come il cancro e le retinopatie proliferative (Fruttiger, 2002). Durante l'*angiogenesi*, in particolare, le cellule endoteliali sono coinvolte in una serie di eventi

quali proliferazione, differenziamento, migrazione e organizzazione morfologica, in stretta connessione con il tessuto circostante. La formazione di un vaso, infatti, passa attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modifiche dell'endotelio e della matrice extracellulare. Nella prima tappa dell'angiogenesi si verifica una *destabilizzazione* dei vasi preesistenti, dovuta ad un aumento della permeabilità vasale e una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali. Segue una fase di *migrazione e proliferazione* delle cellule endoteliali nel punto del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi; nel corso di tale fase vengono liberati enzimi proteolitici, che alterano la densità della matrice extracellulare allo scopo di facilitare la migrazione delle cellule endoteliali. Il terzo stadio corrisponde alla *differenziazione* delle cellule endoteliali ed è caratterizzato dall'arresto della proliferazione cellulare e dalla formazione di capillari primitivi. L'ultima tappa di maturazione funzionale è caratterizzata dal *reclutamento di cellule periendoteliali* di supporto, quali periciti e cellule muscolari lisce, nonché dalla riorganizzazione delle interazioni cellulari (Bussolino et al., 1998).

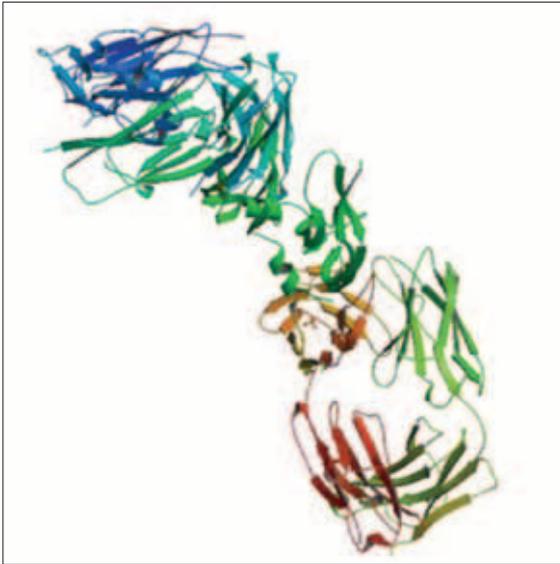


Fig. 1: Struttura del VEGF-A

Il VEGF, il *fattore di crescita per l'endotelio dei vasi* (vascular endothelial growth factor), è il principale regolatore della formazione e della funzione dei vasi (Klagsbrun e Moses, 1999; Hughes et al., 2000; Funatsu et al., 2001; Gerhardt et al., 2003) e assume un ruolo fondamentale nell'angiogenesi sia fisiologica che patologica. Per esempio la sua importanza durante lo sviluppo embrionale è confermata dall'osservazione che la perdita di un singolo allele del gene che codifica per il VEGF porta alla morte dell'embrione tra l'11° e il 12° giorno di gestazione. Un aumento della sua concentrazione si riscontra, invece, nell'umor acqueo e nell'umor vitreo in individui affetti da retinopatie proliferative associate al diabete o alla prematurità e inoltre

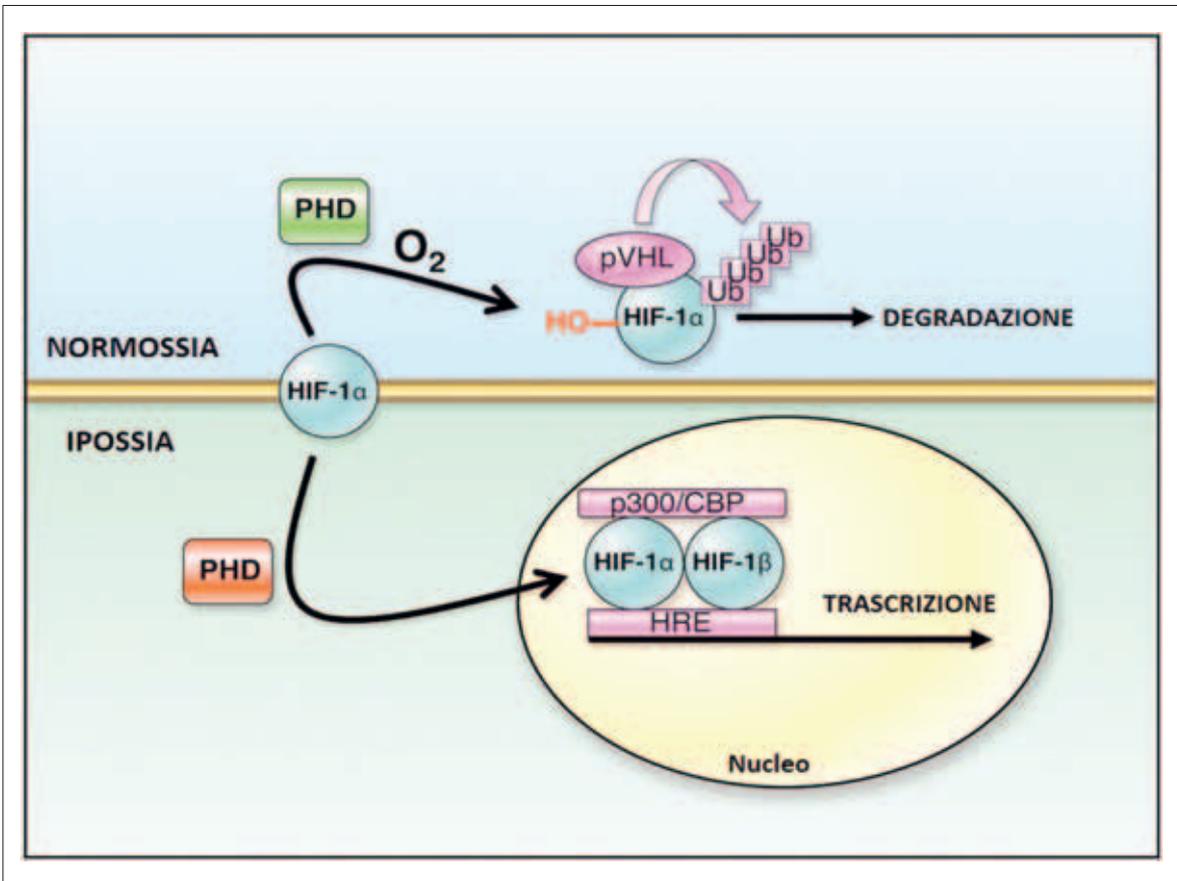


Fig. 2: HIF- α in condizioni normossiche ed ipossiche (per spiegazioni vedere testo)

esso viene secreto da molte linee cellulari tumorali (Ferrara, 1999).

Il VEGF regola diverse funzioni delle cellule endoteliali, incluse la proliferazione, la migrazione e l'assemblaggio in tubi, oltre che la sopravvivenza delle cellule stesse (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Esso è un mitogeno per le cellule endoteliali derivate da arterie, vene e vasi linfatici e funge anche da fattore di sopravvivenza per cellule endoteliali in coltura in condizioni di deplezione del siero; induce infatti l'espressione delle proteine antiapoptotiche Bcl-2 e A1 nelle cellule endoteliali umane (Gerber et al., 1998). In particolare è stato dimostrato che il VEGF è un fattore di sopravvivenza per i vasi retinici immaturi (Alon et al., 1995) e che induce una forte risposta angiogenica in una varietà di modelli *in vivo* (Ferrara, 1999). Il VEGF è anche conosciuto come *fattore della permeabilità vascolare* (vascular permeability factor, VPF). Infatti, quando viene iniettato nella pelle del porcellino d'India esso provoca un aumento di permeabilità dei vasi, con conseguente fuoriuscita di proteine plasmatiche e formazione di un gel extravascolare di fibrina, che a sua volta costituisce un substrato per la crescita delle cellule endoteliali e tumorali (Ferrara, 1999).

Dal punto di vista strutturale il VEGF, anche chiamato VEGF-A, è una proteina omodimerica di 40-45 kDa, che presenta una bassa omologia di sequenza con il fattore di crescita derivato dalle piastrine (platelet-derived growth factor, PDGF) (Keck et al., 1989) e che viene rilasciato da diverse cellule (Fig. 1). Oltre al VEGF-A, sono state identificate diverse proteine strutturalmente omologhe, comprendenti il fattore di crescita placentare (placental growth factor, PlGF), il VEGF-B e il VEGF-C (Klagsbrun e D'Amore, 1996).

Nell'uomo il VEGF-A presenta cinque differenti isoforme di 121, 145, 165, 189 e 206 aminoacidi, che sono prodotte tramite splicing alternativo a partire da un singolo gene contenente otto eso-

ni (Ferrara, 1999). Il VEGF₁₂₁ ed il VEGF₁₆₅, che sono le isoforme più abbondanti, differiscono abbastanza nelle loro proprietà biologiche in quanto il VEGF₁₆₅ ha una certa affinità per l'eparansolfato e di conseguenza è in parte sequestrato sulla superficie cellulare e nella matrice extracellulare, mentre il VEGF₁₂₁ che non si lega all'eparansolfato è una proteina liberamente diffusibile; inoltre, il VEGF₁₆₅ è un mitogeno più potente per le cellule endoteliali (Keyt et al., 1996; Soker et al., 1997).

La tensione d'ossigeno è un regolatore chiave dell'espressione del *gene vegf* sia *in vitro* che *in vivo*; in particolare, la produzione di RNA messaggero per il VEGF in seguito a esposizione a basse pressioni di ossigeno si riscontra in una varietà di cellule sia normali che trasformate (Ferrara, 1999). Per quanto riguarda il meccanismo mediante il quale viene indotta l'espressione sia del *vegf* che di altri geni regolati dall'ipossia, un ruolo fondamentale è svolto da una famiglia di fattori di trascrizione, *i fattori inducibili da ipossia (HIF)*, che si legano come eterodimeri *all'elemento di risposta all'ipossia (HRE)*, situato nel promotore di questi geni, stimolandone la trascrizione. In particolare sia nel ratto che nell'uomo nella regione del promotore del *gene vegf* è stata identificata una sequenza di 28 basi che media la trascrizione indotta da ipossia (Levy et al., 1995). In *condizioni normossiche* l'idrossilazione di un residuo di prolina nella proteina HIF-1, catalizzata da un enzima dipendente da ossigeno, Egl9, promuove il legame della proteina stessa con la proteina VHL, codificata dal gene oncosoppressore von Hippel-Lindau, e ne determina in tal modo la poliubiquitinazione e l'indirizzamento al proteasoma per la distruzione (Ohh et al., 2000; Jaakkola et al., 2001); *in condizioni ipossiche*, al contrario, l'idrossilazione non avviene, HIF-1 non viene distrutto e quindi può dimerizzare con HIF-1 e trasferirsi nel nucleo (Rankin et al., 2005) (Fig. 2).

Nelle cellule endoteliali, di cui, come precedentemente detto, il VEGF influenza la proliferazione,

la migrazione e l'assemblaggio in tubi, oltre che la stessa sopravvivenza (Ferrara e Davis-Smyth, 1997), tale regolazione avviene tramite l'interazione con recettori ad alta affinità dotati di attività tirosinchinasica e localizzati non solo sulle cellule in proliferazione, ma anche su quelle quiescenti.

Nell'uomo sono stati identificati due di questi recettori, Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2); KDR lega il VEGF-A e il VEGF-C, mentre Flt-1 lega il VEGF-A e il PlGF. Entrambi i recettori sono costituiti da una regione extracellulare che comprende sette domini di tipo immunoglobulinico, da una regione transmembrana e da un dominio citoplasmatico con attività tirosinchinasica (Fig. 3).

In entrambi, il sito di legame per il VEGF si trova nel secondo dominio di tipo immunoglobulinico e infatti, in Flt-1, la delezione di questo segmento della proteina abolisce completamente il legame del VEGF.

Pur presentando un'affinità per il VEGF₁₆₅, minore di quella mostrata dal recettore Flt-1 (Ferrara, 1999), nelle cellule endoteliali il recettore KDR sembra essere il principale trasduttore dei segnali indotti dal VEGF, segnali che, in tali cellule, oltre ad influenzare la chemiotassi, inducono proliferazione, riorganizzazione dell'actina e in generale grossi cambiamenti a livello morfologico (Waltenberger et al., 1994; Ferrara e Davis-Smith, 1997).

In seguito al legame del fattore di crescita e attivazione del recettore, le tirosine fosforilate del recettore creano siti di legame per una serie di proteine citosoliche dotate di domini SH2 (src homology 2, domini omologhi a src), come PLC- γ o Grb2, determinandone la fosforilazione e quindi l'attivazione (Fig. 4). Questo meccanismo è stato implicato nell'attivazione della cascata Raf-1/MEK/ERK, una via di segnalazione cruciale che porta alla proliferazione delle cellule endoteliali e all'angiogenesi (Ng et al., 2006). La distruzione mirata del gene che codifica per il recettore KDR/Flk-1 nel topo risulta in un difetto

nello sviluppo delle cellule endoteliali e nella morte dell'embrione al decimo giorno di gestazione (Shalaby et al., 1995).

Il recettore Flt-1 (VEGFR-1), che nonostante la sua maggiore affinità per il VEGF non è mitogenico per le cellule endoteliali, è però un mediatore importante dell'angiogenesi; l'inattivazione del gene *vegfr-1* nel topo porta, infatti, alla morte in utero tra il 9° e il 10° giorno di vita embrionale a causa dell'incapacità delle cellule endoteliali di assemblarsi in vasi sanguigni funzionali (Fong et al., 1995).

La mancata formazione dei vasi in questi animali risulta associata ad un abnorme aumento del numero dei progenitori delle cellule endoteliali, che si presume sia dovuto ad una iperattività del VEGF, e questa osservazione supporta l'idea che il VEGFR-1 funzioni come un recettore esca che regola in modo negativo la funzione del fattore di crescita durante lo sviluppo (Ng et al., 2006).

Flt-4 (VEGFR-3) è un altro recettore appartenente alla famiglia di recettori di tipo tirosinchinasico, con sette domini extracellulari di tipo immunoglobulinico, che però non lega il VEGF-A, ma piuttosto il VEGF-C ed è coinvolto nella regolazione dell'angiogenesi linfatica (Jeltsch et al., 1997) (Fig. 3). Inoltre, in cellule endoteliali, neuronali e tumorali è stato individuato un ulteriore recettore, specifico per il VEGF₁₆₅, che risulta identico alla neuropilina-1 umana, un recettore per la famiglia di proteine delle semaforine/collapsine, che guida la crescita assonale durante lo sviluppo del sistema nervoso (Soker et al., 1998; Adamis e Shima, 2005).

La *neuropilina-1* (*Np-1*), è una proteina transmembrana con un corto dominio citoplasmatico di circa 40 aminoacidi che manca di un dominio di segnalazione e cinque domini extracellulari, a1/a2, b1/b2 e c. I domini a1/a2 e b1/b2 contengono i siti di legame per le semaforine e per il VEGF₁₆₅ rispettivamente, mentre il dominio c media la for-

mazione di omodimeri ed eterodimeri funzionali con un altro membro della famiglia, la neuropilina-2 (Np-2) (Mamluk et al., 2002; Neufeld et al., 2002). Nelle cellule endoteliali, la neuropilina-1 si comporta come un corecettore, che presenta il VEGF₁₆₅ al recettore KDR, determinando un potenziamento nella trasduzione del segnale mediata dal recettore stesso; quando è coespressa con KDR, infatti, la neuropilina-1 aumenta il legame del VEGF₁₆₅ a KDR e l'induzione della chemiotassi; al contrario l'inibizione del legame del VEGF₁₆₅ alla neuropilina-1 inibisce il legame del VEGF stesso a KDR e la sua attività mitogenica per le cellule endoteliali (Soker et al., 1998).

L'inattivazione del gene Np-1 causa principalmente difetti a livello della vascolatura, come l'insufficiente vascolarizzazione del sacco del tuorlo e del tubo neurale, e difetti cardiovascolari che portano alla morte dell'embrione tra l'11° ed il 13° giorno di gestazione (Kitsukawa et al., 1995; Kawasaki et al., 1999).

Per quanto riguarda i geni che codificano per i recettori del VEGF, il loro livello di espressione viene influenzato, sia *in vitro* che *in vivo*, da molti fattori, fra cui la concentrazione del VEGF e del TGF-, che in cellule endoteliali in coltura agiscono rispettivamente in senso positivo e negativo (Ferrara, 1999) e la tensione d'ossigeno.

LA VASCULOGENESI/ANGIOGENESI DELLA RETINA

Come nel resto del sistema nervoso centrale dei mammiferi, anche nella retina la vascolarizzazione comprende la formazione di un letto vascolare primordiale, derivato dalla proliferazione e migrazione di cellule progenitrici e situato sulla superficie del neuroepitelio e la successiva estensione di tale rete mediante la gemmazione di nuovi vasi da quelli preesistenti.

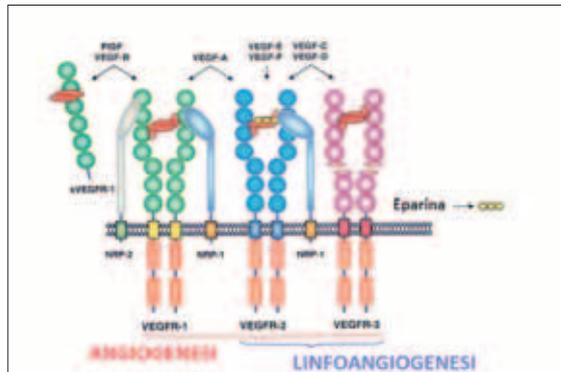


Fig. 3: VEGFR e loro principali ligandi

Nella retina i primi vasi originano in corrispondenza della testa del nervo ottico e si estendono sulla superficie retinica interna seguendo una rete di astrociti formatasi in precedenza; *generalmente si ritiene che la rete vascolare primaria si formi per vasculogenesi* e, nell'uomo in particolare, studi immunocitochimici hanno indicato la natura angioblastica delle cellule precursori fusiformi. Dopo che la rete vascolare primaria si è allargata a tutta la retina i vasi iniziano a spingersi in profondità, fino allo strato plessiforme esterno, dove stabiliscono una *rete vascolare secondaria*, parallela alla prima e non associata ad astrociti; questa seconda fase avviene *sicuramente mediante angiogenesi*.

Sebbene la vascolarizzazione della retina avvenga con modalità simili in tutti i mammiferi, esistono delle differenze tra le specie per quanto riguarda il periodo della vita in cui tali eventi si verificano. Nell'uomo la migrazione di cellule mesenchimali fusiformi dal disco ottico, la loro proliferazione e il differenziamento per produrre corde di cellule endoteliali avvengono molto presto, per cui a 15 settimane di vita intrauterina negli strati retinici interni alcuni cordoni cellulari sono già cavi e formano un albero vascolare immaturo; dopo questa fase un processo angiogenico fa aumentare la densità vascolare di questo plesso immaturo, ne aumenta l'estensione verso la periferia e lo rimo-

della; a circa 25-26 settimane, intorno alla fovea incipiente comincia a formarsi il letto capillare esterno, tramite l'estensione di gemmazioni da vasi preesistenti (Hughes et al., 2000) e alla nascita la vascolarizzazione della retina è completa. È importante sottolineare come nell'uomo la vascolarizzazione della retina avvenga in utero, dove la tensione di ossigeno delle arterie è minore di 30 mmHg, mentre in altre specie animali quale quella dei roditori la maggior parte dei vasi si formano dopo la nascita, in presenza di tensioni di ossigeno molto più elevate.

Si ritiene che *nella seconda fase della vascolarizzazione retinica* la gemmazione e l'allungamento dei capillari avvengano in risposta a una ipossia fisiologica, che si verrebbe a creare in vaste aree della retina, a causa dell'aumentato fabbisogno di ossigeno da parte di neuroni in corso di maturazione (Chan-Ling et al., 1995). Ad esempio, nell'uomo, la formazione del plesso vascolare esterno comincia intorno alla 25°-26° settimana di gestazione, quando avviene l'apertura degli occhi e si può per la prima volta registrare un potenziale evocato, indicativo di un pathway visivo funzionale e dell'attività dei fotorecettori (Dreher e Robinson, 1988).

Per quel che concerne i fattori implicati, l'ipossia sicuramente induce la produzione di VEGF; è stato infatti dimostrato che l'espressione di tale fattore da parte delle cellule della nevroglia è spazialmente e temporalmente associato sia con la formazione dei vasi retinici durante lo sviluppo normale (Stone et al., 1995; Provis et al., 1997; Kim et al., 1999), che con la neovascolarizzazione patologica (Miller et al., 1994; Viores et al., 2006). In particolare è stato dimostrato che gli astrociti situati nella parte avascolare della retina rispondono all'ipossia aumentando il livello di trascrizione dell'mRNA per il VEGF (Stone et al., 1995; Stone e Maslin, 1997). A conferma di questa ipotesi, ricordiamo che l'espressione del VEGF viene downregolata dall'iperossia (Stone et al.,

1995), che a sua volta inibisce la formazione dei vasi stessi (Chan-Ling et al., 1995).

Da più di cinquant'anni l'uso di tecniche di colorazione di perfusione ha permesso di osservare che i capillari retinici crescono profusamente quando adiacenti alle nascenti venule e in modo più rado attorno alle arterie; recentemente, anche nei primati è stato dimostrato come i capillari adiacenti alle arterie neoformate si ritirino dando origine alle caratteristiche zone periarteriolari prive di capillari (Gariano e Gardner, 2005). Questa rimozione selettiva dei capillari adiacenti alle arterie appena formate supporta l'idea che lo sviluppo della vascolatura retinica sia controllato da una molecola ossigeno-sensibile e si è dimostrato che il rimodellamento stesso è correlato ad una riduzione della sintesi di RNA messaggero per il VEGF e all'apoptosi delle cellule endoteliali in quest'area. Probabilmente, la relativa iperossia che circonda le arterie regola in modo negativo la produzione del VEGF e il suo conseguente effetto come fattore di sopravvivenza per le cellule endoteliali (Gariano e Gardner, 2005).

Al rimodellamento della nascente vascolatura retinica pare che partecipino anche cellule del sistema immunitario, quali linfociti T e altri leucociti, provenienti dal circolo; tali cellule, infatti, sono in grado di aderire alle cellule endoteliali mediante la molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1) e CD18 e di provocare l'apoptosi mediata dall'interazione FAS/ligando-FAS, inducendo in tal modo l'obliterazione di tratti di capillari (Ishida et al., 2003).

A differenza con quanto detto per la seconda fase, sicuramente angiogenica, della vascolarizzazione retinica, nell'uomo la formazione della *rete vascolare primaria*, che avviene soprattutto entro la 18° settimana, da alcuni Autori (Hughes et al., 2000) viene ritenuta indipendente sia dalle necessità metaboliche dei neuroni in corso di maturazione che dall'espressione del VEGF indotta dall'ipossia;

tale idea si basa sul fatto che il VEGF viene individuato solo a partire dalla 20^a settimana e sul fatto che in questa fase i vasi raggiungono una densità particolarmente elevata in un'area non corrispondente a quella dove stanno maturando i neuroni gangliari. Al contrario, altri Autori ritengono che tutta la vascolarizzazione retinica avvenga in relazione alle aumentate necessità metaboliche e alla relativa ipossia che si verificano, nel tempo, nelle aree dove si differenziano le differenti popolazioni neuronali. In accordo con questa teoria, la componente più interna della vascolarizzazione retinica si formerebbe per prima perché gli strati più interni, più lontani dalla circolazione corioideale, sono i primi a divenire ipossici; in seguito, con l'aumentare del metabolismo dei fotorecettori, diventerebbe ipossico lo strato nucleare interno e verrebbe quindi indotta l'espressione del VEGF da parte delle cellule di Müller e anche dei neuroni gangliari (Sandercoe et al., 2003).

In ogni caso, in specie diverse da quella umana i livelli intratissutali di ossigeno, l'espressione del VEGF e la vascolarizzazione non sono sempre correlati; per esempio nel porcellino d'India la retina pur essendo virtualmente anossica rimane priva di vasi (Yu et al., 1996), mentre nella retina di uccello la sovraespressione di VEGF non induce la vascolarizzazione (Schmidt e Flamme, 1997). Per quanto riguarda i roditori, nello sviluppo postnatale precoce della retina di topo è stato dimostrato che il VEGF favorisce la formazione di estensioni filopodiali da parte di cellule endoteliali specializzate, situate nella parte apicale dei capillari esistenti e strettamente aderenti ad astrociti, sul corpo cellulare e sui processi nei quali si estendono i filopodi stessi, e nello stesso tempo il VEGF induce la proliferazione delle cellule endoteliali che si trovano nel resto del capillare. In particolare, la formazione di pseudopodi e la migrazione delle cellule apicali dipendono dal gradiente del VEGF, mentre la proliferazione delle

cellule non apicali è regolata dalla sua concentrazione (Gerhardt et al., 2003). Questi risultati, insieme ad altri ottenuti studiando l'angiogenesi in differenti situazioni fisiologiche e patologiche (Stone et al., 1995; Pierce et al., 1996; Provis et al., 1997), nonché le alterazioni dell'organizzazione vascolare osservate in condizioni di iperplasia e ipoplasia degli astrociti, suggeriscono che *gli astrociti stessi giocano un ruolo fondamentale nella proliferazione dei vasi retinici* (Gerhardt et al., 2003). Nel topo attorno al 17^o giorno di vita embrionale i precursori degli astrociti entrano nella retina attraverso il nervo ottico, nei giorni immediatamente successivi si forma una rete di astrociti che si allarga verso la periferia e alla nascita le cellule endoteliali iniziano a gemmare guidate da tale rete, che funge quindi da stampo per i vasi in crescita (Uemura et al., 2006).

L'interazione tra le cellule endoteliali e i processi delle cellule gliali dipende da molecole di adesione presenti sulla superficie cellulare, le *R-caderine*; la distruzione di tali interazioni, ottenuta mediante anticorpi specifici per le caderine gliali, induce infatti una vascolarizzazione anomala, che non segue l'organizzazione degli astrociti e si estende nella parte esterna della retina, che in condizioni normali rimane avascolare (Dorrell et al., 2002). Anche le *cellule murali*, comprendenti i *periciti* e le *cellule muscolari lisce* (Hirschi e D'Amore, 1996), sono importanti per la stabilizzazione dei vasi, in quanto limitano la proliferazione delle cellule endoteliali e prevengono la regressione dei vasi stessi (Hughes e Chan-Ling, 2004).

L'ordine cronologico nello sviluppo dei diversi tipi cellulari è un requisito richiesto per la corretta formazione della rete vascolare retinica, poiché ciascun tipo di cellula secerne i fattori di crescita necessari per la migrazione e la proliferazione delle altre cellule. In primo luogo l'entrata degli astrociti nella retina è stimolata dal fattore di crescita derivato dalle piastrine PDGF-A, secreto dalle cellule gangliari;

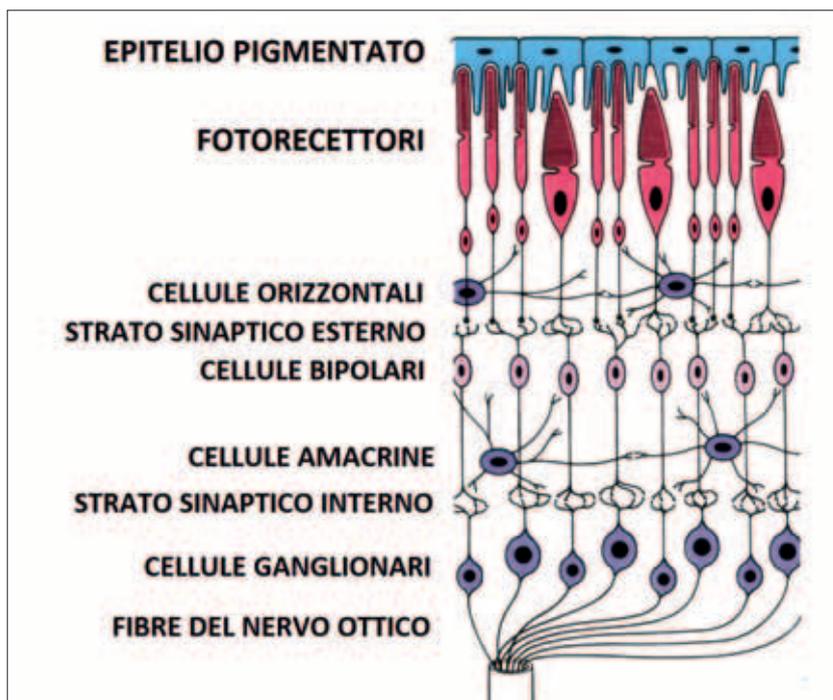


Fig. 4:
Strati cellulari della retina

gli astrociti, a loro volta, sono la principale sorgente di VEGF necessario per la crescita dei vasi, mentre le cellule endoteliali secernono PDGF-B necessario per il reclutamento, la proliferazione e la migrazione delle cellule murali attorno ai vasi in crescita.

A loro volta i periciti, situati a livello del fronte di avanzamento dei vasi in corso di sviluppo, promuovono la crescita dei vasi stessi secernendo VEGF (Darland et al., 2003) e inducendo, attraverso il fattore di crescita TGF-1, l'espressione del recettore VEGFR-1 nelle cellule endoteliali (Shih et al., 2003). Per contro, una diminuzione nella produzione di VEGF da parte dei periciti può causare sia una riduzione nella formazione dei vasi che la perdita di vasi già formati, per i quali il VEGF costituisce un importante fattore di sopravvivenza (Gariano e Gardner, 2005). Per quanto riguarda le arteriole, la presenza abbondante di cellule muscolari lisce mature, esprimenti -SMA, sembra renderle più resistenti a locali diminuzioni di VEGF (Hughes e Chan-Ling, 2004).

La relazione tra questi componenti cellulari ri-

sulta però essere bidirezionale piuttosto che unidirezionale.

Infatti, le cellule murali inviano segnali alle cellule endoteliali mediante diverse molecole inclusa l'angiopoietina-1 (Ang1), che svolge un ruolo fondamentale nel regolare il rimodellamento e mantenere l'integrità; allo stesso modo segnali derivanti dalle cellule endoteliali o murali possono influenzare gli astrociti, nei quali sia l'attività mitotica che l'espressione della proteina acida gliofibrillare (GFAP) appaiono modificati in seguito al contatto con i vasi sanguigni (Uemura et al., 2006).

IRRORAZIONE EMATICA DELLA RETINA

Gli strati esterni della retina (Fig. 4) (epitelio pigmentato, strato dei coni e bastoncelli, membrana limitante esterna, strato nucleare esterno, per uno spessore complessivo di 130 μm) non presentano

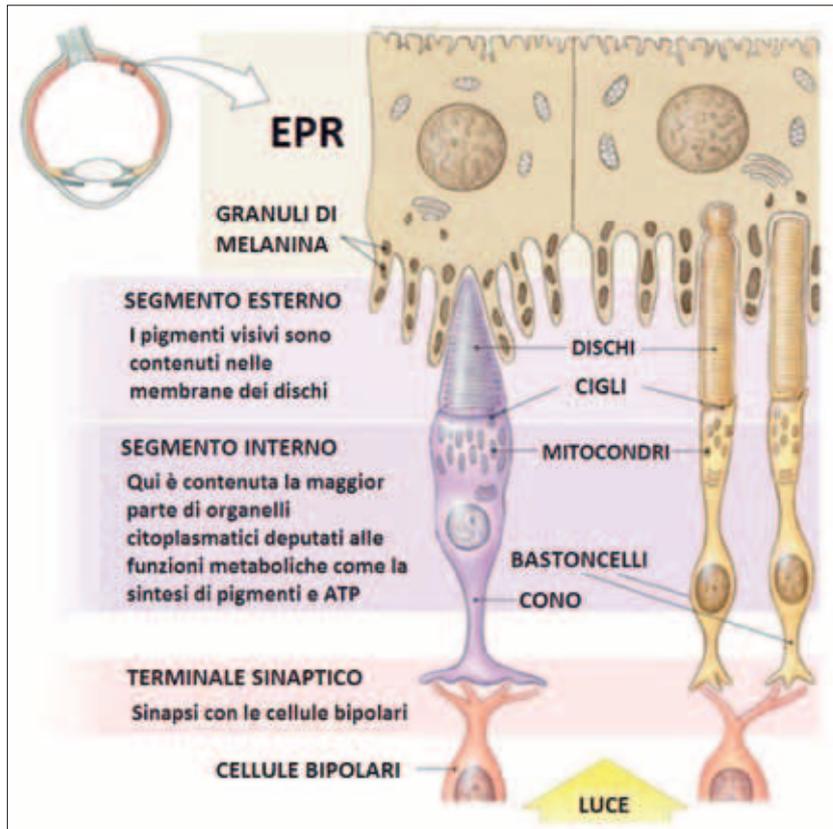


Fig. 5:
Rapporto tra fotorecettori ed EPR

vasi sanguigni e vengono nutriti grazie alla circolazione coroidea. I capillari di tale rete vascolare sono fenestrati, per cui si ha un libero passaggio di liquidi e molecole attraverso la loro parete, così come attraverso la membrana di Bruch, fino al versante basale del-

le cellule dell'epitelio pigmentato (Fig. 5). Poiché tali cellule sono strettamente unite da complessi giunzionali, l'ulteriore passaggio di sostanze negli strati retinici esterni dipende da un processo di trasporto attivo da parte delle cellule stesse; a questo proposito

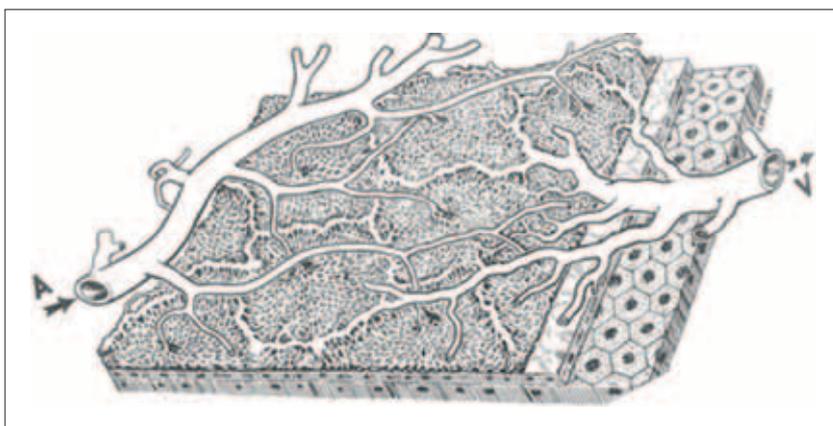


Fig. 6:
Struttura schematica della barriera emato-retinica

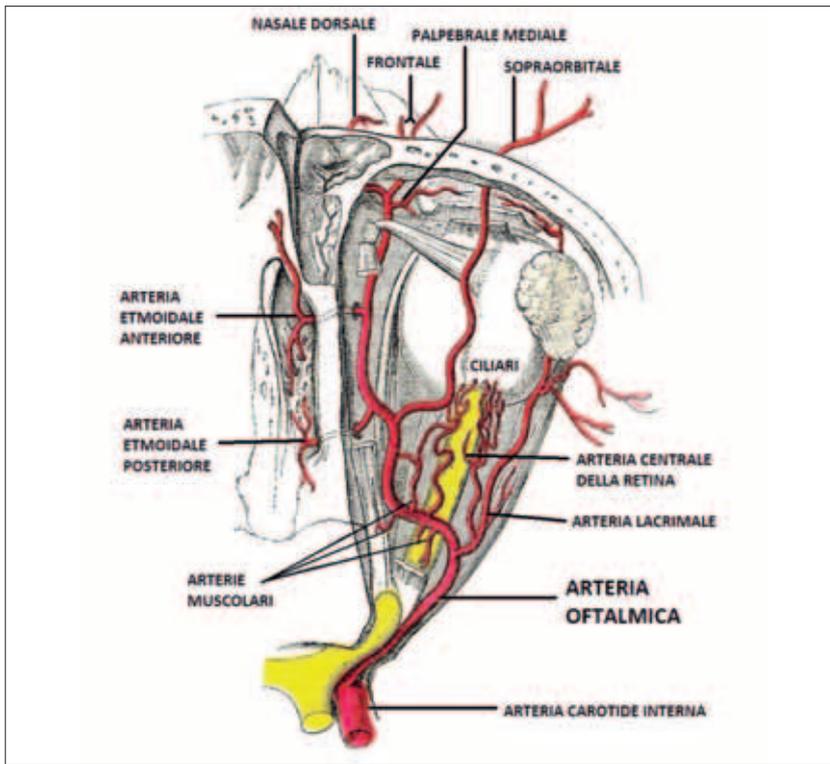


FIG. 7:
Immagine schematica dell'arteria oftalmica e dei suoi rami principali (modificato da www.wikipedia.org)

si parla di *barriera emato-retinica esterna* (Fig. 6)
Negli strati retinici che vanno dallo strato plesiforme esterno alla membrana limitante interna sono presenti invece molti capillari, che originano



FIG. 8: *Immagine del fondo oculare che permette la visualizzazione delle 4 venule principali che confluiscono nella vena centrale della retina*

a partire dall'arteria centrale della retina, un ramo dell'arteria oftalmica, che penetra nel nervo ottico a circa 10 mm dal polo posteriore (Fig. 7).
Pur avendo un calibro simile a quello delle arteriole, l'arteria centrale della retina presenta le tre tonache caratteristiche delle grandi arterie e può essere affetta da lesioni di tipo arteriosclerotico. Dopo aver oltrepassato la lamina cribrosa essa si divide in 4 rami terminali denominati temporale superiore, temporale inferiore, nasale superiore e nasale inferiore, che sono situati nello strato delle fibre nervose e non presentano anastomosi tra di loro e dai quali per ramificazione dicotomica prendono origine le arteriole e quindi i plessi capillari; dai plessi capillari il sangue passa nelle 4 venule principali (temporale superiore, temporale inferiore, nasale superiore e nasale inferiore), che a loro volta confluiscono nella vena centrale della retina (Fig. 8). La vena decorre accanto all'arte-

ria centrale nella parte assiale del nervo ottico, lo abbandona a circa 10 mm dal polo posteriore, attraversa la fessura orbitaria superiore nell'anello di Zinn e raggiunge il seno cavernoso.

Nella maggior parte della retina si distinguono due reti vascolari principali, localizzate rispettivamente a livello dello strato delle fibre del nervo ottico e al confine tra lo strato nucleare interno e quello plessiforme esterno e collegate da capillari molto sottili. Nella regione della macula, con l'eccezione della parte centrale della fovea (0,5 mm di diametro) che è avascolare (FAZ), si evidenziano tre reti capillari, mentre nella periferia retinica è presente una rete unica.

Nei *capillari retinici* è presente la membrana basale e le *cellule endoteliali* sono unite da complessi giunzionali; ne risulta una elevata impermeabilità al passaggio di liquidi e molecole nella retina (barriera emato-retinica interna); si stima inoltre che siano presenti *periciti* in numero pressoché uguale a quello delle cellule endoteliali.

■ **Fattori di regolazione del calibro retinico**

Il gettito ematico retinico dipende dalla *pressione di perfusione* (differenza tra la pressione nell'arteria centrale della retina e la pressione intraoculare), dalla resistenza propria dei vasi retinici e dalla viscosità ematica. Il flusso ematico retinico è modulato da numerosi fattori che tendono ad attenuare le variazioni dello stesso flusso legate alle variazioni delle condizioni di perfusione (Hart, 1992). Si tratta dell'autoregolazione del flusso sanguigno retinico, ovvero la capacità del sistema vascolare di garantire una costanza di flusso ematico del distretto irrorato in rapporto alle esigenze.

L'autoregolazione retinica è stata dimostrata variando la pressione arteriosa sistemica (PAS) e la pressione intraoculare (IOP). Così, quando la PAS aumenta, si produce una vasocostrizione arteriosa di contro, quando la IOP aumenta, si

produce una vasodilatazione. I limiti nei quali si esercita questa autoregolazione sono variabili secondo gli studi. Classicamente, si ritiene che il limite superiore dell'autoregolazione è raggiunto per un aumento del 40% della PAS e per una IOP di 30 mmHg. Più che di variazioni assolute, bisogna considerare l'ordine di grandezza di questi valori. Il solo meccanismo con il quale i vasi retinici possono esercitare questa autoregolazione è una variazione del loro diametro. Il fenomeno dell'autoregolazione è puramente intraretinico in quanto i vasi retinici sono sprovvisti di innervazione. Più tipi di meccanismi possono partecipare a tale fenomeno: lo stiramento parietale induce una costrizione riflessa delle cellule muscolari lisce della parete arteriosa, la liberazione dell'ossido nitrico o di altri modulatori endotelio-dipendenti, mediatori sintetizzati dalle cellule gliali, etc. (Grieshaber et al., 2007) (vedi avanti).

In alcuni lavori, è stato osservato come l'*iperghlicemia* tenda ad aumentare il flusso sanguigno retinico (Feke et al., 1985; Grunwald et al., 1986; 1992; 1996; Patel et al., 1992) mentre altri Autori, al contrario, hanno riscontrato una diminuzione del flusso sia nell'animale (Small et al., 1987; Bursell et al., 1992) che nell'uomo (Bursell et al., 1996; Clermont et al., 1997).

Le arterie retiniche si restringono in situazioni di *iperossia* e si dilatano in *ipossia*. Il flusso sanguigno retinico aumenta del 3% per aumento della pCO_2 di 1 mmHg (Tsacopoulos e David, 1973). La costrizione conseguente all'iperossia è molto più pronunciata nell'animale neonato (Ashton e Cook, 1954), potendo condurre a una completa obliterazione vascolare. La dilatazione collegata all'ipossia potrebbe essere un effetto diretto del lattato come suggeriscono le tecniche di microiniezioni di lattato nella retina della scimmia (Brazitikos et al., 1993). Nei diabetici, sembra esservi una perturbazione di questa reattività all'ossigeno. In effetti, uno studio che ha utilizzato l'eco-

colordoppler della arteria centrale della retina ha dimostrato che l'iperossia modificava di meno la velocità sanguigna dei soggetti diabetici rispetto ai soggetti normali. Per gli Autori di questo lavoro vi è, durante il diabete, una perdita dell'autoregolazione vascolare retinica all'ossigeno (Evans et al., 1997) e dunque una minore risposta vasodilatatrice all'ischemia.

Più recentemente (2009), Tayyari et al. hanno condotto uno studio al fine di valutare la variazione del calibro arteriolare retinico in risposta ad una stimolazione metabolica con O₂ o CO₂ in 10 soggetti giovani e in salute. Ne è emersa una riduzione del flusso plasmatico nelle fasi di iperossia ed un incremento nelle fasi di ipercapnia. Inoltre, la valutazione della capacità reattiva vascolare totale (TVRC) ha mostrato un valore più elevato nei siti di misurazione che mostravano un diametro arteriolare basale più elevato.

L'autoregolazione dipende, come detto, da numerosi mediatori endotelio-dipendenti che andremo ora a discutere. I primi lavori pubblicati sull'argomento sono quelli di Ferchgot all'inizio degli anni '80 che riportavano l'ipotesi della vasodilatazione attiva delle arterie grazie a molecole sintetizzate dalle stesse cellule endoteliali. Questa costatazione ha aperto la via a tutta una serie di lavori che hanno condotto alla scoperta del *nitrossido di azoto (NO)*. Si tratta di un gas ad emivita breve dell'ordine del secondo sintetizzato dalle cellule endoteliali e che diffonde verso le cellule muscolari lisce per inibirne la loro contrazione. In seguito, ci si è resi conto che tale composto non era il solo mediatore vasomotore sintetizzato dall'endotelio. Altri mediatori identificati a tutt'oggi sono le *prostaglandine*, l'*endotelina* ed il *sistema renina-angiotensina tissutale* (Brown e Jampol, 1996). La localizzazione istologica dell'enzima che sintetizza l'NO, la NOS, permette di identificare le cellule che lo liberano nei differenti tessuti oculari. Ciò ha permesso di dimostrare che

questo composto è presente nella retina e nella coroide e viene inoltre liberato dalle cellule nervose in essa presenti. È dunque possibile che la coroide partecipi alla regolazione del tono vascolare retinico. Inoltre, alcuni studi su colture cellulari hanno dimostrato che i periciti possono dilatarsi in risposta all'NO, suggerendo un ruolo di vasodilatazione capillare per l'NO grazie alla mediazione dei periciti (Haefliger et al., 1994). Questa osservazione in effetti è contestata perché, classicamente, i capillari non possiedono attività vasomotrice reagendo in maniera passiva alle variazioni del gettito sanguigno. La somministrazione sottolinguale di nitroglicerina, potente donatore di NO, dilata le arterie e vene retiniche nell'uomo (Frayser e Hickam, 1965), senza peraltro modificare i tempi di transito artero-venosi. Uno studio, utilizzando ecocolor Doppler, ha riscontrato un aumento del gettito ematico dell'arteria oftalmica dopo somministrazione di un analogo della nitroglicerina (Sinclair et al., 1993).

Le *prostaglandine (PG)* sono altri mediatori utili all'autoregolazione retinica. Sono prodotte dall'azione della cicloossigenasi sull'acido arachidonico e degradate in situ. Numerose molecole sono raggruppate in questa famiglia: alcune sono vasocostrittrici, altre vasodilatatrici e altre ancora senza alcun effetto vascolare. Le PG presenti nella circolazione hanno una concentrazione troppo ridotta per un'attività sui vasi. Sembra che l'inibizione delle PG con indometacina aumenti la capacità di autoregolazione della rete vascolare retinica. I periciti in coltura si contraggono in risposta al trombossano e si dilatano in risposta alla PGI₂ (Dodge et al., 1991).

L'*endotelina (ET)* è una piccola proteina di 21 aminoacidi di cui si conoscono 3 isoforme: ET-1, ET-2 ed ET-3. L'ET-1 è la forma maggiormente rappresentata: è prodotta dall'endotelio retinico ed è la sostanza vasocostrittrice più potente attualmente conosciuta. Esistono recettori per ET sulla superficie delle cellule endoteliali retiniche,

i recettori ETA ed ETB attraverso i quali l'ET-1 è in grado di attivare la fosfolipasi che a sua volta genera inositolo e diacilglicerolo con aumento del Ca^{2+} intracellulare che consente l'effetto di vasocostrizione. Paradossalmente, la risposta vasocostrittiva all'ET è minore nel ratto diabetico che nell'animale normale (Bursell et al., 1995). In vitro, l'ET contrae i periciti (Chakravarthy et al., 1992). Per le sue potenti azioni vasocostrittive è stato ipotizzato come l'ET-1 possa giocare un ruolo importante nelle alterazioni vascolari che si sviluppano in corso di glaucoma. Questa ipotesi si basa su diversi esperimenti che forniscono prove di un potenziale collegamento tra neuropatia ottica glaucomatosa ed endotelina. Infatti, l'infusione endovenosa di ET-1 nei soggetti sani riduce il flusso ematico coroideale, retinico e della testa del nervo ottico (Polak et al., 2001; 2003). Inoltre, molteplici evidenze suggeriscono come un'alterata regolazione del microcircolo oculare, ed in particolare la riduzione del flusso plasmatico a livello della testa del nervo ottico possa contribuire alla progressione del glaucoma stesso (Flammer et al., 2001). A tal proposito, recentemente (2009), è stato condotto uno studio da Resch et al. al fine di valutare se la somministrazione di *bosentan*, un antagonista di entrambi i recettori dell'ET inducesse un incremento del flusso ematico oculare in soggetti con glaucoma. Dai dati ottenuti in questo studio è emerso come la somministrazione di questo farmaco induce una significativa vasodilatazione sia arteriolare che venulare retinica, nonché un notevole incremento del flusso sia in soggetti sani che in occhi glaucomatosi. Basandoci su questi risultati emerge dunque che gli antagonisti dei recettori dell'ET-1 possono rappresentare una nuova opportunità terapeutica per il glaucoma, sebbene siano necessari ulteriori studi per valutare meglio la relazione dose-risposta di tali farmaci e per definire il ruolo dei diversi sottotipi di recettori dell'ET.

Anche il *sistema renina-angiotensina* partecipa

all'autoregolazione dei vasi retinici e così l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) è presente sulla superficie delle cellule endoteliali retiniche. Esso converte l'angiotensina I in angiotensina II che degrada la bradichinina, attivatore dell'NO. Uno studio di infusione di angiotensina II nell'uomo ha dimostrato una vasocostrizione retinica in certi soggetti (Rhie et al., 1982). Peraltro, in questi soggetti è stato dimostrato anche un aumento della PAS che ha suggerito che la vasocostrizione retinica osservata poteva essere condotta a un fenomeno di autoregolazione. Gli inibitori dell'ACE non introducono variazioni del tono vascolare retinico per cui il sistema renina-angiotensina-aldosterone non appare implicato nel mantenimento del tono vascolare allo stato basale. La bradichinina e gli inibitori dell'ACE devono agire in sinergia per dilatare le arterie retiniche.

Uno studio condotto da Izumi et al. (2008) si è proposto lo scopo di valutare nei gatti la capacità dell'NO (ossido di azoto) di regolare il flusso ematico a livello retinico dopo l'induzione di iperossia tramite la somministrazione di una miscela al 100 % di ossigeno per 10 minuti. Prima e dopo l'iperossia sono stati misurati i diametri dei vasi arterioli retinici di secondo ordine e la velocità del flusso ematico (con la velocimetria laser doppler), il flusso ematico retinico (RBF) e il wall shear rate (WSR). Prima dell'induzione dell'iperossia venivano inoltre somministrati PBS, L-NAME, D-NAME, BQ-123, BQ-788 o 7-nitroindrazolo (7-NI). Il PBS (Phosphate buffered saline = tampone fosfato salino) è una soluzione tampone che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato. La sua concentrazione salina combacia con quella del corpo umano (cioè è isotonica). Il PBS in questo studio è stato utilizzato principalmente come veicolo per la somministrazione dei farmaci. L-NAME rappresenta un inibitore non selettivo delle NOS (NO sintasi), mentre il D-NAME cor-

risponde al suo stereoisomero inattivo. BQ-123 e BQ-788 rappresentano gli antagonisti specifici rispettivamente dell'ETA (endotelina di tipo A) e dell'ETB (endotelina di tipi B). Il 7-NI rappresenta invece un inibitore selettivo della nNOS (NO sintasi neuronale).

Nel gruppo cui era stato somministrato PBS si è osservata una riduzione sia del calibro vasale che della velocità di flusso che del BRB durante l'iperossia, con un ritorno ai valori basali nei 10 minuti successivi alla cessazione dello stimolo. Il WSR decresceva transitoriamente per poi tornare ai valori basali per la prolungata costrizione delle arteriole retiniche durante l'iperossia. Nei gruppi trattati con L-NAME o BQ-788 la riduzione del RBF durante l'iperossia non differiva da quella osservata nel primo gruppo, sebbene il recupero dello stesso nei 20 minuti successivi al termine dell'iperossia era significativamente ridotto rispetto al gruppo trattato con PBS. Nel gruppo in cui invece era stata effettuata l'iniezione intravitreale con BQ-123 si è osservata una minore riduzione della velocità del flusso retinico e del RBF durante l'iperossia dal momento che esso tornava immediatamente ai valori basali al termine dell'iperossia stessa. D-NAME e 7-NI non alteravano il RBF in risposta all'iperossia. Da questo risultato si può quindi evincere come l'NO contribuisca al recupero del RBF dopo l'iperossia, probabilmente attraverso l'azione della eNOS e il recettore ETB posto sulle cellule endoteliali delle arteriole retiniche. La risposta endoteliale all'iperossia può, dunque, essere utilizzata come metro di valutazione della funzione delle arteriole retiniche.

Dello stesso anno (2008) è lo studio condotto da Mendrinis et al. al fine di indagare nei porcellini la sintesi dell'NO e il suo ruolo in risposta a uno stimolo vasodilatatore quale il lattato. In 10 occhi veniva effettuata un'infusione endovenosa di L-NAME, seguita 1 ora dopo dalla microiniezione intravitreale iuxta-arteriolare di 30 µL di L-lattato

0,5 M. 10 minuti dopo in 9 di questi occhi veniva eseguita una nuova iniezione intravitreale iuxta-arteriolare con 30 µL di L-NAME 0,01 M e in 1 occhio una soluzione fisiologica (PSS). In altri 3 occhi, invece, veniva effettuata solo l'iniezione intravitreale di L-lattato, senza somministrazione endovenosa o intravitreale di L-NAME. Questi ultimi mostravano un aumento dei diametri arteriolarici retinici che persisteva per tutta la durata dello studio. Negli altri occhi, invece, i diametri arteriolarici, mostravano una riduzione, anche se non significativa, 1 ora dopo l'infusione endovenosa di L-NAME e un significativo incremento dei diametri dopo iniezione di L-lattato. Una nuova riduzione significativa del calibro è stata poi osservata 10 minuti dopo la somministrazione intravitreale di L-NAME. La somministrazione di PSS non ha avuto alcun effetto. Dunque, si può concludere che la somministrazione intravitreale di L-NAME sopprime in maniera significativa gli effetti vasodilatatori del lattato e dunque l'NO sembra rappresentare un importante mediatore degli effetti vasodilatatori dello stesso.

Per valutare l'effetto vasodilatatore dell'acido N-Metil-D-Aspartato, agonista del recettore del glutammato e dell'adenosina, Holmgaard et al. (2008) hanno condotto uno studio al fine di valutare il meccanismo attraverso cui ciò si esplica a livello delle arteriole retiniche dei maiali. Queste arteriole, prelevate con il tessuto perivascolare venivano montate su un miografo per la misurazione del tono isometrico. Cambiamenti di tono venivano indotti aumentando le concentrazioni di NMDA in presenza di bloccanti dei recettori dell'adenosina e idrolisi di ATP o incrementando la concentrazione di adenosina in presenza di bloccanti dei recettori del NMDA. L'esperimento è stato inoltre ripetuto anche in seguito a rimozione del tessuto perivascolare. È emerso che l'NMDA induce una dilatazione dei vasi retinici solo in presenza del tessuto perivascolare, dilata-

zione che tuttavia si riduce in maniera significativa in presenza di bloccanti dei recettori per l'NMDA o dell'adenosina o con l'idrolisi dell'ATP. L'adenosina produce invece una dilatazione concentrazione-dipendente che non è modificata in maniera significativa in presenza di bloccanti del recettore NMDA. Ciò suggerisce che l'effetto vasodilatatore dell'NMDA nelle arterie di maiale in vitro sia mediato dall'idrolisi dell'ATP in presenza di adenosina nel tessuto perivascolare.

Wickremasinghe et al. in un altro studio del 2008 descrivono i cambiamenti del calibro vascolare retinico in risposta ad una singola iniezione intravitale di triamcinolone (IVTA) in pazienti con edema maculare diabetico. Il calibro dei vasi retinici dei pazienti sottoposti allo studio è stato misurato tramite la valutazione dell'equivalente arteriolare centrale retinico (CRAE) e dell'equivalente venoso centrale retinico (CRVE) a livello basale e dopo 3 mesi dall'IVTA. Questa valutazione a 3 mesi ha mostrato una riduzione significativa del calibro arteriolare e venulare retinico in pazienti trattati con IVTA rispetto ai livelli basali e in rapporto al gruppo di controllo non trattato con lo stesso farmaco. Dunque si può concludere che l'IVTA possiede un effetto vasocostrittore sui vasi retinici sia a livello venoso che arterioso in pazienti affetti da edema maculare diabetico.

Tra i tanti fattori coinvolti nella regolazione del calibro vasale a livello retinico si sono rivelati interessanti anche gli inibitori dell'anidrasi carbonica (CAIs). Questi sono in grado di provocare vasodilatazione dei vasi ematici nella retina e nella testa del nervo ottico degli animali sia in vivo che in vitro, nonché nella retina umana in vivo, un effetto che sembra essere indipendente dall'NO. L'attività enzimatica dell'anidrasi carbonica è quella di convertire la CO_2 e l' H_2O in H_2CO_3 . L'acido carbonico poi si dissocia spontaneamente in H^+ e HCO_3^- . Tuttavia, poichè non è nota in vivo la concentrazione dei metaboliti (né dei reagenti, né

dei prodotti) di tale reazione, rimane sconosciuta la direzione verso cui volge questa reazione perchè venga indotta vasodilatazione tramite l'utilizzo dei CAIs. L'inibizione dell'anidrasi carbonica è un principio importante anche nel trattamento del glaucoma. Questo effetto sembra essere dovuto all'inibizione della secrezione di umore acqueo nei corpi ciliari con la successiva riduzione della pressione intraoculare che protegge l'occhio dal danno ischemico. Ciononostante, sembra che tale effetto sia dovuto anche alla dilatazione dei vasi ematici che circondano la testa del nervo ottico in maniera tale da migliorare la perfusione a questo livello. Topping et al. (2009) hanno recentemente condotto uno studio al fine di valutare se la CO_2 , l' H^+ o altri fattori oltre agli CAIs possano essere coinvolti nel processo di vasodilatazione mediato dagli stessi inibitori dell'anidrasi carbonica. Gli Autori hanno perciò valutato l'azione della *acetazolamide* e della *dorzolamide* (inibitori dell'anidrasi carbonica) sulle arteriole retiniche porcine in vitro, in condizioni di normocapnia e di ipercapnia, sia con un pH normale sia in condizioni di acidosi, in presenza del tessuto perivascolare e dopo la sua rimozione. Da questa valutazione è emerso che l'effetto vasodilatatore indotto su questi stessi vasi dagli inibitori dell'anidrasi carbonica è mediato dal tessuto perivasale e dipendente dall'acidosi, ma non dall'ipercapnia.

Come detto in precedenza, l'autoregolazione del flusso ematico retinico è un processo fondamentale per il mantenimento delle normali funzioni retiniche sia in condizioni fisiologiche che negli stati patologici oculari quali la retinopatia diabetica, la retinopatia ipertensiva o il glaucoma. Poichè le arteriole rappresentano la principale sede di resistenza vascolare nel microcircolo retinico (Hill, 1977), i meccanismi di regolazione del tono delle cellule muscolari lisce di questi vasi costituiscono i fattori maggiormente responsabili della regolazione del

flusso retinico e della pressione capillare. E' noto come queste cellule esprimano diversi canali ionici sulla loro membrana plasmatica, canali da cui dipendono il tono vascolare basale e la risposta contrattile agli agenti vasoattivi (Jackson, 2000). E' stato recentemente dimostrato come tra questi canali presenti nei miociti delle arteriole retiniche vi siano dei canali del Ca^{2+} ad alta conduttanza attivati dal K^+ (McGahon et al., 2005; 2007). In alcuni miociti, tra cui quelli arteriolarli coroideali, sono stati inoltre identificati anche dei canali del Cl^- attivati dal Ca^{2+} (Lamb et al., 1994). L'apertura di questi canali determina un efflusso di Cl^- e una depolarizzazione di membrana.

Gli agonisti sono in grado di indurre vasocostrizione in seguito al rilascio intracellulare di Ca^{2+} che agisce o direttamente sul sistema contrattile o indirettamente stimolando i canali del Cl^- Ca^{2+} -dipendenti, con depolarizzazione di membrana e apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (Large e Wang, 1996). McGahon et al. nel 2009 hanno condotto uno studio al fine di indagare le caratteristiche biofisiche, farmacologiche e funzionali dei canali del Cl^- attivati dal Ca^{2+} . Dallo studio è emerso come questi canali possano essere attivati da correnti del Ca^{2+} che entrano dall'esterno nella cellula attraverso i canali L, ma anche dal rilascio intracellulare del Ca^{2+} stesso. Come detto, inoltre, questi canali partecipano alla vasocostrizione mediata dagli agonisti.

PATOLOGIE VASCOLARI vs PROCESSO FISIOLGICO DELL' INVECCHIAMENTO

Il principale aspetto dell'invecchiamento dei vasi retinici è la comparsa dell'*arteriosclerosi* (Fig. 9); questa sclerosi vasale colpisce le arterie muscolari di piccolo calibro e in modo particolare le arteriole che sono in effetti i vasi presenti a livello retinico.



Fig. 9: Fasi dell'arteriosclerosi
(da: www.malattievascolari.com)

Dal punto di vista istologico la sclerosi è caratterizzata da una modifica della guaina muscolare della media da parte di fibre collagene, da una iperplasia dell'intima con disposizione concentrica di tessuto elastico e da una ialinizzazione. Queste alterazioni provocano un indurimento e ispessimento della parete vasale con possibile riduzione del lume. Il riscontro più frequente di arteriosclerosi retinica è nei soggetti con più di 60 anni, ma è possibile osservarla anche nei pazienti più giovani affetti da ipertensione arteriosa sistemica.

Il primo segno di arteriosclerosi retinica osservabile oftalmoscopicamente è la modifica del riflesso arteriolare, causato dall'ispessimento della parete vasale, che perde la sua lucentezza diventando più sfumato; la progressione dell'ispessimento con conseguente riduzione del calibro conferisce inizialmente alle arteriole il caratteristico aspetto a "filo di rame" (Fig. 10) che si può modificare in quello a "filo d'argento" (Fig. 11) nei casi di marcato ispessimento e scomparsa pressochè totale della

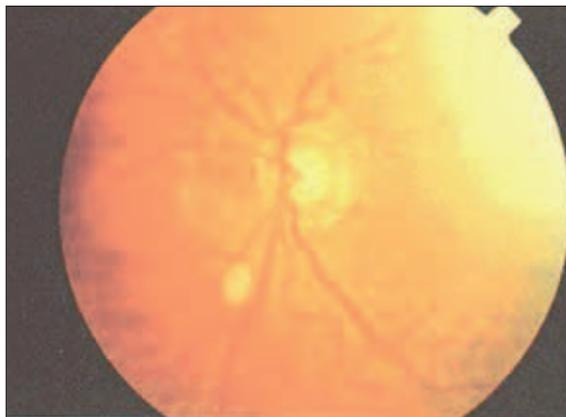


Fig. 10: Aspetto arteriolare a "filo di rame" (da www.xagenait.it)



Fig. 11: Aspetto arteriolare a "filo d'argento" (da www.xagenait.it)

colonna ematica. Questa riduzione del diametro arteriolare si presenta generalmente in modo irregolare e localizzata dando ai vasi un aspetto segmentato (*aspetto a corona di rosario*), differenziandosi dalla retinopatia ipertensiva in cui la riduzione del calibro appare, invece, diffusa a tutto l'albero arterioso.

La sclerosi può causare anche anomalie del decorso dei vasi che *possono diventare troppo rettilinei* o al contrario presentare un'*accentuazione della tortuosità*. Anche le vene subiscono delle modifiche, appa-

rendo congeste e tortuose; le anomalie più particolari si evidenziano a livello degli incroci artero-venosi, dove arterie e vene sono avvolte in un'unica guaina avventiziale. L'ispessimento della parete arteriolare provoca a livello dell'incrocio una compressione della vena che apparirà come spezzata in due zone più pallide e di calibro ristretto (*segno di Gunn*) (Fig. 13); il *segno di Salus*, invece, è dato dallo spostamento che subisce la vena dopo aver incrociato l'arteria, assumendo un aspetto a U o ad S (Fig. 14).

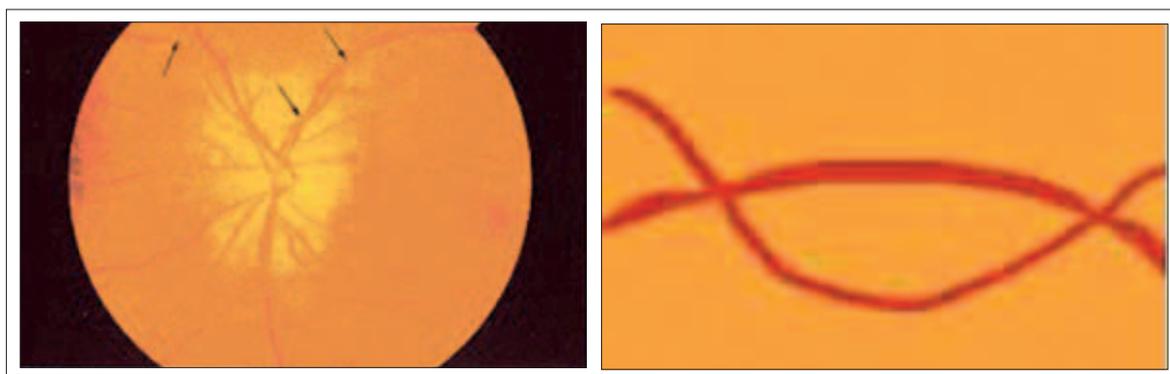


Fig. 13: A = Alterazioni agli incroci artero-venosi: segno di Gunn. Si noti come in molti punti di incrocio tra arteria e vena si assiste ad un affusolamento o a scomparsa della vena (da www.xagenait.it); B = Immagine schematica che evidenzia il segno di Gunn

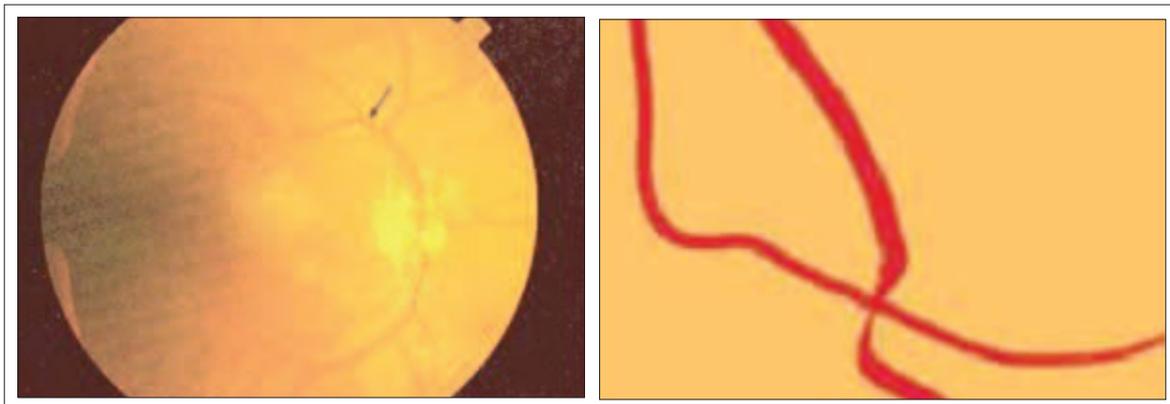


Fig. 14: A = Alterazioni agli incroci artero-venosi: segno di Salus. La vena cambia repentinamente traiettoria incrociando l'arteria (da www.xagen.it); B = Immagine schematica che evidenzia il segno di Salusvenosi: segno di Gunn. Si noti come in molti punti di incrocio tra arteria e vena si assiste ad un affusolamento o a scomparsa della vena (da www.xagen.it); B = Immagine schematica che evidenzia il segno di Gunn

Quando la stasi venosa provocata dalla compressione diviene severa si può instaurare un quadro di pretrombosi (*segno di Bonnet*), caratterizzato dalla presenza di emorragie ed essudati, espressione dell'edema ischemico della retina, nell'immediata vicinanza dell'incrocio artero-venoso (Fig. 15).

Il procedere della sclerosi involutiva, favorita dall'ipertensione arteriosa, rende insufficiente il flusso ematico con conseguente anossia tissutale, determinando il quadro della *retinopatia arterio-sclerotica*, caratterizzata dalla presenza di essudati duri ed eventuali microemorragie. Gli *essudati duri*, probabile manifestazione di processi ischemici cronici, che si formano nello strato plessiforme esterno della retina, hanno un colorito cereo a margini netti e possono confluire fra di loro, particolarmente al polo posteriore, configurando il tipico aspetto a *stella maculare* (Fig. 16) o di *retinopatia circinata* (Fig. 17).

Nel valutare l'invecchiamento dei vasi retinici va attentamente considerato, però, che l'arteriosclerosi insorge nei vasi arteriosi sia in presenza che in assenza di fattori di rischio (Dohi et al., 1995; Stork et al., 2006). Risulta dunque *difficile definire*

il limite tra il fisiologico processo di invecchiamento vascolare e la patologia arteriosclerotica. Entrambi, infatti, sottendono un processo molecolare simile e si manifestano con analoghe alterazioni nella vascolarizzazione (Ferrari et al., 2003; Yildiz, 2007). In uno studio del 2008 Kotliar et al., partendo dalla constatazione che l'invecchiamento induce



Fig. 15: Immagine schematica che evidenzia il segno di pretrombosi di Bonnet il quale prelude spesso all'occlusione vasale. Consiste in uno spruzzo emorragico ed un insieme di essudati duri attorno al punto di incrocio



Fig. 16: Essudati duri con aspetto a "stella maculare"

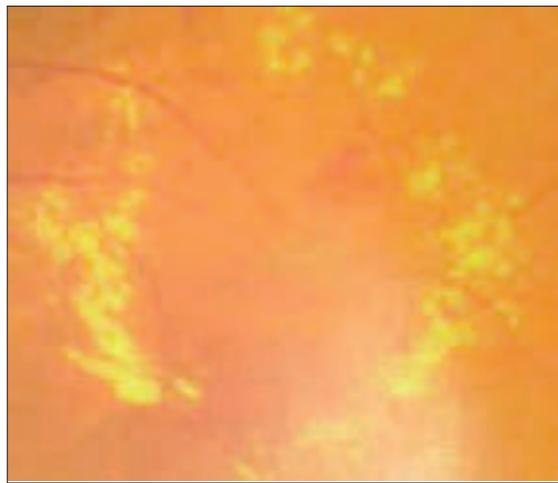


Fig. 17: Essudati duri con aspetto a cercine

cambiamenti nella struttura parietale dei vasi del microcircolo, hanno ipotizzato che nelle persone più giovani il profilo longitudinale dei vasi retinici sia più liscio e regolare rispetto a quello della popolazione più anziana e che questa constatazione nelle persone più giovani non si modifica con la vasocostrizione o la vasodilatazione. Per valutare tale ipotesi gli Autori hanno diviso in tre gruppi di età (21-27, 40-59, 60-85 anni) 33 persone in salute, le quali sono state esposte per 60 secondi all'applicazione di una luce flicker monocromatica di 12,5 Hz. Infatti, tramite un processo ampiamente studiato nella comunità oftalmica, definito *accoppiamento neurovascolare* (Polak et al., 2002; Kotliar et al., 2004; Nagel et al., 2004), è possibile ottenere la dilatazione dei vasi retinici (utilizzando l'illuminazione flicker a una frequenza compresa tra gli 8 ed i 20 Hz). Utilizzando l'analizzatore dei vasi retinici (RVA) è stato possibile osservare gli stessi vasi a ogni tempo predefinito prima, durante e dopo l'applicazione dello stimolo flicker monocromatico. Agli stessi soggetti veniva quindi misurato il diametro vasale per ogni mm di lunghezza al fine di tracciare il profilo longitudinale del vaso e valutare, dunque, tutte le irregolarità del calibro

e la frequenza delle stesse prima, durante e dopo la stimolazione.

Tali differenze di ampiezza dei vasi e la frequenza delle alterazioni del margine vasale vengono valutate tramite un parametro specifico: la *spectral edge frequency* (SEF). Questa valutazione ha permesso di individuare notevoli differenze (sia a livello basale che nella fase di dilatazione, di costrizione o di rilassamento vasale) tra il gruppo di persone più giovani e quello delle persone anziane ($p < 0,05$). La SEF ha permesso anche di individuare una differenza significativa ($p < 0,05$) tra il gruppo di persone più giovani e quello di età intermedia sia in dilatazione che in costrizione o in rilassamento, ma non in condizioni basali.

Mentre gli studi di questo genere effettuati su vasi di calibro più grande (come le carotidi) erano noti da tempo, le tecnologie per indagare questo fenomeno nei vasi di piccolo calibro non sono disponibili da molto. I vasi retinici, essendo facilmente osservabili dall'esterno ed essendo parte del microcircolo, possono essere utilizzati per la valutazione del microcircolo stesso nel suo complesso. In conclusione, questo studio ha permesso di accertare la presenza di un numero maggiore di irregolarità nello strato più interno della parete dei

vasi arteriosi retinici e nel loro profilo longitudinale nei soggetti più anziani rispetto a quelli di più giovane età in tutte le condizioni. I pazienti di età intermedia, invece, avranno un profilo più irregolare solo negli stati di dilatazione, costrizione o rilassamento. Dunque, gli Autori hanno concluso che le prime alterazioni età-dipendenti del profilo vasale si rendono evidenti solo in seguito ad un incremento della richiesta metabolica. Questi cambiamenti vasali, inoltre, potrebbero essere alla base del ridotto flusso ematico e dell'alterata interazione tra sangue e parete vasale.

A questo proposito è risultata anche particolarmente interessante l'indagine eseguita da Wong et al. (2003a) al fine di descrivere ed eventualmente associare determinate caratteristiche del microcircolo retinico di soggetti anziani non diabetici al processo aterosclerotico. Sono stati così selezionati 2050 pazienti con un'età compresa tra i 69 ed i 79 anni e sottoposti a fotografia retinica al fine di indagare la presenza e standardizzare il grado di eventuali alterazioni del microcircolo retinico quali la retinopatia (microaneurismi ed emorragie), il restringimento focale del calibro arteriolare o l'occlusione venosa in caso di incrocio artero-venoso. L'aterosclerosi e i suoi fattori di rischio sono stati analogamente valutati negli stessi pazienti in base a studi clinici e laboratoristici. Dall'analisi è emerso che la retinopatia presentava una prevalenza dell'8,3 %, il restringimento arteriolare focale una prevalenza del 9,6 % e l'occlusione venosa da incrocio artero-venoso una prevalenza del 7,7 %. Tutte queste lesioni sono risultate chiaramente connesse all'ipertensione, ma dopo correzione per età, sesso, etnia, pressione arteriosa e terapia anti-ipertensiva è emerso che la retinopatia è associata prevalentemente con la patologia coronarica, infarto miocardico, ictus, presenza di placca carotidea, ispessimento dell'intima e della media della carotide comune e delle carotidi interne. Al contrario non è emersa alcuna associazione tra restringimento arteriolare sia foca-

le che diffuso o l'occlusione venosa a livello degli incroci artero-venosi con alcun fattore connesso con la patologia aterosclerotica. Dunque gli Autori hanno concluso che le alterazioni del microcircolo retinico, frequenti nelle persone anziane, siano correlate all'ipertensione piuttosto che al processo aterosclerotico eccetto che nel caso della retinopatia (microaneurismi e emorragie retiniche) che ha invece mostrato una stretta correlazione con le manifestazioni più tipiche della patologia aterosclerotica. Dal precedente studio, come da numerosi altri sempre più recenti, si evince come ad oggi la retina rappresenti il sito elettivo per la valutazione del microcircolo (Patton et al., 2005). È infatti noto da tempo come le alterazioni della vascolarizzazione retinica possano rispecchiare variazioni precliniche del microcircolo sistemico, cerebrale o coronarico (Tedeschi-Reiner et al., 2005; Kwa, 2006) e possano dunque suggerire utili informazioni per la prevenzione di eventi clinicamente significativi.

Sulla base di ciò numerosi Autori hanno approfondito la relazione esistente tra il calibro dei vasi retinici e il rischio di insorgenza di importanti patologie locali e sistemiche quali la degenerazione maculare legata all'età, il glaucoma, il diabete mellito o la sindrome metabolica, l'ipertensione, la patologia coronarica, l'ictus e la loro mortalità. I numerosi studi condotti sino ad oggi hanno dimostrato come piccolissime variazioni del diametro dei vasi retinici siano una fattore di rischio per la patologia coronarica, nonché per l'ictus subclinico o manifesto e si possano anche mettere in relazione alla mortalità per questo evento, indipendentemente da ogni altro fattore di rischio (Wong et al., 2001, 2002a, 2003b; Duncan et al., 2002; Tedeschi-Reiner et al., 2005; Ikram et al., 2006a,b; Cooper et al., 2006). Nello *studio Rotterdam* (Ikram et al., 2006a), ad esempio, l'incremento del diametro delle venule retiniche è stato associato ad un maggior rischio di ictus, mentre

non è stata dimostrata un'analogia relazione con il diametro arteriolare. Fino ad oggi, inoltre, questi studi non hanno completamente chiarito le differenze individuabili tra le diverse sottopopolazioni (persone giovani o anziane, maschi o femmine, ipertese o non). Per risolvere queste incertezze Wang et al. (2007) hanno condotto uno studio al fine di valutare *quanto il diametro dei vasi retinici possa essere un indice di rischio per la patologia coronarica o l'ictus e predirne la mortalità*. Gli Autori hanno acquisito i dati dal *Beaver Dam Eye Study* in WI, USA e dal *Blue Mountains Eye Study* in Australia portando avanti lo studio in due diversi gruppi di persone, a loro volta suddivisi sulla base del sesso, dell'età e della presenza o meno di ipertensione. Sulla base della letteratura precedente, gli Autori hanno ipotizzato che la riduzione del calibro arteriolare e l'incremento di quello venulare dei vasi retinici siano relazionabili alla morte per causa cardiocircolatoria e come questa relazione sia più forte nelle persone più giovani (< 70 anni), nelle donne e nei soggetti che presentano altri importanti fattori di rischio cardiovascolari quali l'ipertensione (Langer et al., 1989; Benfante et al., 1992; Kronmal et al., 1993; Weverling-Rijnsburger et al., 1997; Wong et al., 2003b; Wang et al., 2006). Su questi pazienti è stata effettuata la misurazione dei diametri vasali con fotografie digitali retiniche. Gli Autori hanno concluso che l'incremento del diametro arteriolare così come la riduzione del diametro venulare non sono relazionabili alla mortalità per coronaropatia o ictus. Al contrario, *arterie ristrette di calibro o venule dilatate risultano correlate con l'incremento del rischio di mortalità per ictus nelle persone di media età (43-69 anni)*.

Come riportato, un aspetto particolarmente studiato della vascolarizzazione retinica è la relazione esistente tra la variazione dei *diametri sia arteriolarari che venulari, l'età e la pressione arteriosa del*

soggetto. Numerosi studi quali il *Blue Mountain Eye Study* (Wang et al., 2003), il *Beaver Dam Eye Study* (Wong et al., 2003c), l'*Atherosclerosis Risk in Communities Study* (Sharrett et al., 1999), il *Cardiovascular Health Study* (Wong et al., 2002b) e il *Rotterdam Study* (Ikram et al., 2004; 2005) hanno messo in evidenza una relazione inversamente proporzionale tra il diametro arteriolare e l'incremento dell'età e della pressione arteriosa. Alcuni studi hanno anche dimostrato come il diametro venulare sia inversamente proporzionale all'età e alla pressione arteriosa, sebbene con quest'ultimo parametro la relazione sia meno forte (Leung et al., 2003; Wong et al., 2003c; Ikram et al., 2004). Fino al lavoro di Kausbik et al. (2007), però, non erano stati effettuati studi che avessero come obiettivo quello di valutare separatamente i due parametri sopracitati (età e pressione arteriosa) e i loro effetti sul diametro dei vasi retinici per cui gli Autori si sono posti l'obiettivo di fare questa valutazione attraverso uno studio trasversale che ha coinvolto 3654 persone con più di 49 anni provenienti dalla regione di *Blue Mountain in Australia*. I diametri vasali arteriolarari e venulari sono stati calcolati attraverso fotografie retiniche digitali e sommati come *equivalente centrale retinico arteriolare (CRAE)* ed *equivalente centrale retinico venulare (CRVE)*. I risultati hanno permesso di dimostrare una *relazione inversamente proporzionale esistente tra diametro arteriolare e pressione arteriosa media* in tutti i gruppi di età esaminati, ma *più significativa nei soggetti con età inferiore ai 60 anni e progressivamente meno stretta con il procedere degli anni* (Fig. 18). *Al contrario, la pressione media è in relazione diretta con il diametro venulare nei soggetti con età < 80 anni* (Fig. 19). Questi risultati dimostrano quanto sia importante *la pressione arteriosa elevata quale fattore di vasocostrizione, specialmente nei soggetti con meno di 60 anni d'età e confermano la tendenza delle venule a dilatarsi piuttosto che a restringersi all'incremento dei valori pressori*.

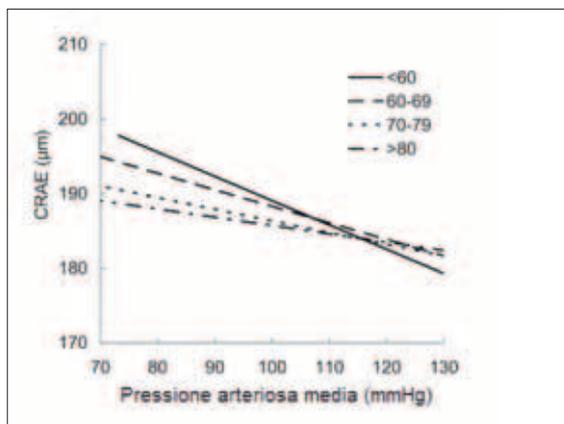


Fig. 18: Effetto della pressione arteriosa media sul diametro arteriolare (CRAE) per gruppi d'età (da Kaushik et al., 2007)

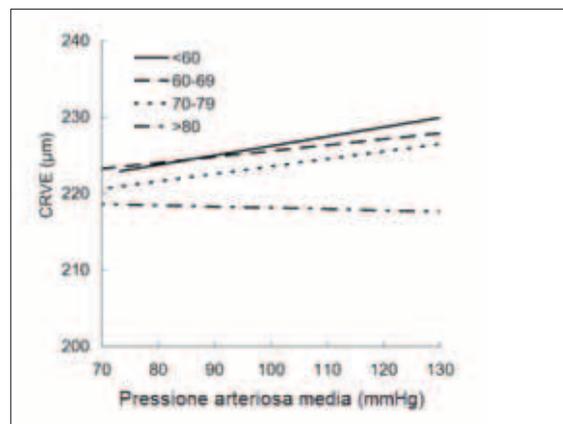


Fig. 19: Effetto della pressione arteriosa media sul diametro venulare (CRVE) per gruppi d'età (da Kaushik et al., 2007).

Questa conclusione è stata confermata anche da altri successivi studi tra cui un'indagine trasversale condotta da Sun et al. (2008) su 3280 persone asiatiche tra i 40 e gli 80 anni al fine di descrivere la relazione esistente tra calibro vasale e fattori di rischio cardiovascolari. Ne è emerso che il *calibro arteriolare retinico medio (CRAE)* è di $139,5 \pm 15,7 \mu\text{m}$ (DS), mentre quello venulare (CRVE) è di $219,3 \pm 22,2 \mu\text{m}$ (DS). Calibri arteriolari ridotti risultano associati a una pressione arteriosa media più elevata e al sesso maschile ($p < 0,001$ per entrambi), mentre diametri venulari aumentati risultano più frequenti nei soggetti più giovani, nei fumatori e in coloro che presentano un BMI alto, alti livelli di Hb glicosilata o bassi livelli di colesterolo HDL ($p = 0,012$ per il livello Hb glicosilata e $p < 0,001$ per tutti gli altri fattori). A conferma dello studio precedente anche qui è emerso che la relazione esistente tra pressione arteriosa e restringimento del calibro arteriolare retinico è più stretta nei soggetti più giovani.

Un altro studio più recente (Liew et al., 2008) ha in parte confermato i riscontri precedenti. Infatti, ha permesso di stabilire che i fattori sistemici riscontrati più comunemente in associazione alla *riduzione del CRAE* sono in ordine: *l'ipertensione, la ridu-*

zione dei livelli plasmatici di albumina, l'assunzione cronica di alcool e un BMI alto. I fattori più spesso associati a *dilatazione del calibro venoso (CRVE)* sono invece: *il fumo di sigaretta e l'ipertensione, seguiti dall'incremento del numero dei globuli bianchi, del BMI o delle LDL.* Non sono emerse differenze significative tra maschi e femmine, né tra soggetti di etnie diverse. Ciò conferma che il principale determinante del calibro vasale retinico è la pressione arteriosa e dunque dalla valutazione del *diametro di questi vasi è possibile ottenere un importante indice di rischio di patologie cardiovascolari.*

Un altro studio multietnico effettuato da Wong et al. (2006) ha avuto, invece, lo scopo di approfondire la relazione tra *calibro dei vasi retinici e i marker sistemici di infiammazione*, i quali possono essere considerati dei fattori di rischio cardiovascolari. Sono state inserite nello studio 5979 persone tra i 45 e gli 84 anni residenti negli Stati Uniti. Il calibro arteriolare medio è risultato di $144,1 \pm 14,4 \mu\text{m}$ (DS), mentre quello venulare di $214,0 \pm 22,2 \mu\text{m}$ (DS). Ancora una volta la *riduzione del calibro arteriolare* si è associata agli stessi fattori emersi dagli studi descritti in precedenza, cui si è aggiunto, però, anche l'aumentato livello di omo-

cisteina. Per ciò che concerne il *diametro venulare* gli Autori ne *dimostrarono un incremento*, non solo nei diabetici, nei fumatori, negli obesi e nei dislipidemicici, ma anche nei soggetti che presentavano un incremento della hsCRP (proteina C reattiva), del fibrinogeno, dell'IL-6, della sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1) e del PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1). Ne risulta, dunque, una evidente correlazione tra gli indici di infiammazione sistemica e calibro dei vasi retinici. E' importante sottolineare, inoltre, come in questo caso, nei pazienti ispanici e nei neri i diametri sia arteriolari che venulari abbiano avuto un maggior incremento rispetto ai cinesi o ai bianchi.

Come descritto, dunque, la *condizione arteriolare retinica* è oggi considerata un importante marker microvascolare del danno da invecchiamento, da ipertensione o infiammazione, ma sembra *anche coinvolta nella patogenesi del diabete mellito di tipo 2*, sebbene fino a qualche anno fa non fossero ancora disponibili dati provenienti da studi clinici prospettici. Il diabete mellito colpisce più di 15 milioni di persone negli Stati Uniti ed è una delle principali cause di morbidità o mortalità nelle persone di mezza età (Harris et al., 1998). Sebbene i fattori che caratterizzano il diabete mellito sono l'insulino-resistenza e l'iperglicemia, sembra che patologie del microcircolo possano contribuire allo sviluppo e alla progressione di questa malattia (Tooke, 1995; Hsueh et al., 1998). Tale ipotesi si basa sul riscontro di anomalie del microcircolo in pazienti con diabete mellito di tipo 2 (Laakso et al., 1992; Morris et al., 1995) o in persone ad alto rischio di svilupparlo, quali coloro che presentano alterata tolleranza al glucosio o i parenti di primo grado di pazienti affetti (Jaap et al., 1994, 1997; Caballero et al., 1999; Balletshofer et al., 2000). Wong et al. (2002c) hanno così analizzato in uno studio prospettico il *rapporto esistente tra il restrin-*

gimento arteriolare e lo sviluppo di diabete mellito. Dopo un follow-up di 3 anni e mezzo 291 degli esaminati (3,6%) hanno sviluppato diabete mellito. L'incidenza di questa patologia è risultata superiore in coloro che avevano un *rapporto artero-venoso (AVR) basso a livello basale*. Dopo aver preso in considerazione tutti gli altri fattori di rischio per lo sviluppo del diabete mellito quali la familiarità, la glicemia a digiuno, l'insulinemia, la pressione arteriosa, l'adiposità e l'attività fisica gli Autori hanno concluso che la riduzione del calibro arteriolare (cioè un basso AVR) risulta indipendente da ogni altro fattore di rischio. Questi risultati, ottenuti su persone di mezza età, avvalorano dunque l'ipotesi iniziale secondo la quale *alterazioni del microcircolo (incremento della resistenza arteriolare e riduzione del flusso microvascolare) possono giocare un ruolo importante nello sviluppo del diabete mellito, indipendentemente da tutti gli altri fattori di rischio noti*.

Nel 2006 fu condotto da Klein et al. il *Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy XX* con lo scopo di misurare il calibro dei vasi retinici in persone affette da diabete di tipo 2 per valutare il CRAE (Central-Retinal Artery Equivalent) e il CRVE (Central-Retinal Vein Equivalent). Gli Autori hanno dimostrato che il CRAE è indipendentemente associato all'età, alla pressione arteriosa media, allo stato di fumatore e alla pressione intraoculare. Il CRVE è correlato, sempre in maniera indipendente, agli stessi fattori cui si aggiungono però anche il numero di pacchetti di sigarette fumati all'anno, il BMI, la frequenza cardiaca e la gravità della retinopatia. La conclusione di questo studio è stata che nelle persone con diabete di tipo 2 le alterazioni del calibro dei vasi retinici sono correlate a molteplici fattori sia locali che sistemici e che la conoscenza di queste relazioni può portare ad una migliore comprensione delle precoci alterazioni del microcircolo retinico nel diabete. Infatti, *ampi lumi arteriosi e venosi sono correlati*

ad un alto rischio di progressione verso la retinopatia diabetica. Per tale ragione i pazienti possono essere monitorati utilizzando il CRAE e il CRVE.

L'anno seguente (2007) Klein et al. hanno pubblicato ulteriori risultati dello stesso studio (XXI) riportando la relazione tra il calibro arteriolare e venulare retinico e lo sviluppo di complicanze microvascolari e macrovascolari a lungo termine nelle persone affette da diabete di tipo 2. I parametri valutati sono stati l'incidenza e la progressione della retinopatia diabetica, della retinopatia proliferativa, dell'edema maculare, della neuropatia, della nefropatia, l'amputazione delle estremità inferiori e le patologie cardiache di natura ischemica tra cui l'infarto e la loro mortalità. Gli Autori hanno dimostrato che il riscontro di un basso CRAE è maggiormente associato ad amputazione delle estremità inferiori e a mortalità per infarto, ma non mostra una stretta correlazione con le altre complicanze valutate. Un alto CRVE, invece, risulta particolarmente correlato allo sviluppo di neuropatia diabetica e a infarto, in assenza di una relazione evidente con le altre patologie. Ciò dimostra, dunque, che il monitoraggio dei diametri vasali retinici può essere utile per la prevenzione di tali complicanze del diabete di tipo 2.

Risultati interessanti sono ancora emersi dal *Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA)* che Nguyen et al. (2008) hanno condotto con lo scopo di approfondire la relazione esistente tra il calibro dei vasi retinici e il diabete, la glicemia e la retinopatia diabetica. Lo studio si basa su 5.976 individui (bianchi, neri, ispanici e cinesi) residenti negli U.S. e privi di ogni patologia cardiocircolatoria clinicamente manifesta. Di questi 4.585 presentavano una normale glicemia a digiuno, 499 un'alterata glicemia a digiuno e 727 un diabete mellito in assenza di segni di retinopatia e 165 un diabete e segni di retinopatia. Dopo l'acquisizione delle foto della retina e la misurazione dei diametri vasali, gli Autori hanno osservato

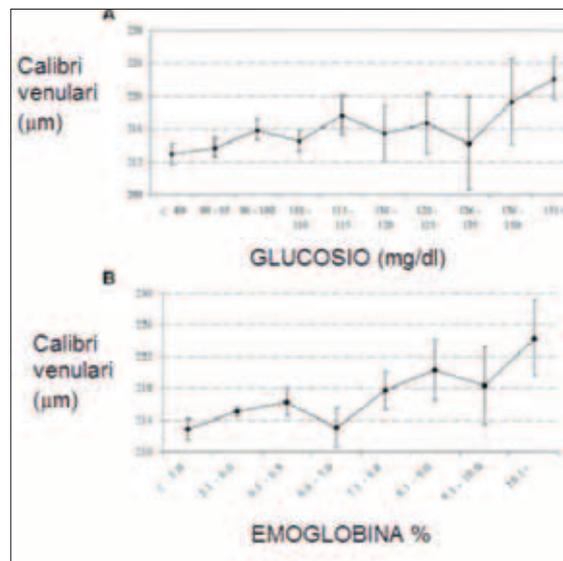


Fig. 20: Distribuzione del calibro venulare retinico (µm) rispetto alla glicemia a digiuno (A) e all'HbA1C (B). I dati sono dell'intera popolazione in studio (soggetti con e senza diabete) e sono aggiustati per età, sesso, etnia, pressione sistolica, BMI, colesterolo totale, trigliceridi, CRP, calibro arteriolare, fumo di sigaretta e centro di studio (da Nguyen et al., 2008)

che il calibro arteriolare era aumentato dai 143,8 µm nei soggetti con normale glicemia a digiuno ai 144,5 µm in quelli con alterata glicemia a digiuno, fino ad arrivare ai 146,1 µm nei diabetici. Allo stesso modo il calibro delle venule retiniche passava dai 214,4 µm dei pazienti con normale glicemia a digiuno, ai 216,7 µm in quelli con alterata glicemia a digiuno, ai 218 µm nei diabetici. Inoltre, i diametri venulari aumentavano progressivamente all'aumentare della glicemia a digiuno e dell'HbA1C (Fig. 20), considerando che, tra i pazienti diabetici, coloro che presentano segni di retinopatia possiedono un aumentato calibro venulare, ma non arteriolare. Un'altra informazione molto interessante ottenuta grazie a questo lavoro è stata l'osservazione di alcune diversità all'interno dei vari gruppi etnici. Infatti, l'associazione tra diametri arteriolari aumentati e diabete è risultata evidente esclusivamente nei soggetti di etnia bian-

ca, mentre l'evidenza di calibri venulari aumentati è tipica dei diabetici di etnia ispanica e cinese. In conclusione, da questo studio è emerso che nei diabetici i *diametri arteriolari e venulari retinici sono incrementati e sottolinea il concetto che queste alterazioni del calibro possono rivelare un precoce danno del microcircolo, tipico del diabete.*

Nel 2004, sempre Wong et al., hanno approfondito la relazione esistente tra segni microvascolari retinici e la *sindrome metabolica* (caratterizzata principalmente da ipertensione, iperglicemia, ipercolesterolemia e ipertensione) in pazienti di mezza età. Lo studio è stato effettuato su 11.265 persone tra i 49 ed i 73 anni e, dopo correzione per età, sesso, etnia, fumo di sigaretta e assunzione di alcool, gli Autori osservarono che le persone affette da sindrome metabolica presentavano, più frequentemente, rispetto alle persone non affette, alterazioni quali la retinopatia, l'occlusione venosa a livello di incroci artero-venosi e i restringimenti arteriolari sia focali che generalizzati. Già dal 2004, dunque, fu avvalorata l'ipotesi secondo cui determinate *alterazioni del microcircolo retinico potessero essere associate alla sindrome metabolica.*

Come accennato in precedenza, il calibro arteriolare e venulare retinico, ad oggi, non è stato messo in relazione esclusivamente a fattori di rischio e a patologie sistemiche, bensì anche a patologie oculari quali il glaucoma o la degenerazione maculare. Un esempio di ciò è rappresentato da un recente studio (*The Singapore Malay Eye Study*) di Jeganathan et al. (2008), i quali hanno indagato la relazione esistente tra degenerazione *maculare legata all'età* (AMD) e calibro vasale retinico in 3280 soggetti con età compresa tra i 40 e gli 80 anni. La prevalenza di AMD precoce o avanzata è risultata rispettivamente del 4,9% e dello 0,7%. Dopo la valutazione del microcircolo è emerso che il riscontro di un *calibro venulare aumentato*

è associato ad una maggiore prevalenza di *AMD in fase iniziale* (OR per un incremento del calibro venulare = 1,53). Questa associazione è rimasta significativa anche dopo aggiustamento per sesso, ipertensione, diabete, BMI e fumo. Tuttavia, in questo studio *non è emersa alcuna associazione tra calibro arteriolare e la AMD in fase iniziale o tra variazione, del valore, sia del calibro arteriolare che venulare, e la ADM avanzata.*

Per ciò che concerne il *glaucoma*, nel 2007 Wang et al. hanno condotto uno studio su 4439 persone di etnia cinese con più di 40 anni che furono a loro volta suddivise in due sottogruppi: uno rurale e uno urbano. Dalla fotografia del fundus sono stati misurati i diametri vasali al bordo del disco ottico e a distanza di 2 mm dallo stesso. I diametri arteriolari più ampi furono riscontrati a livello della regione temporale inferiore, seguita da quella temporale superiore, dalla nasale superiore e infine dalla regione nasale inferiore. Questo riscontro risultò del tutto indipendente da qualunque altro fattore quale l'età o il sesso, sebbene i diametri arteriolari nel complesso risultassero ridotti nel gruppo di età più avanzata. Gli occhi glaucomatosi con un danno del nervo ottico *mostravano una riduzione significativa del calibro arteriolare* ($p < 0,001$), mentre il diametro venulare risultò immutato in tale condizione.

Risultati alquanto discordanti erano emersi in precedenza quando Ikram et al. (2005) affrontarono questo tema sviluppando uno studio prospettico che potesse valutare se la riduzione del flusso ematico e del calibro arteriolare retinico, dimostrati nei pazienti affetti da glaucoma ad angolo aperto (OAG), fosse la causa o la conseguenza della perdita delle cellule gangliari. In passato, infatti, la misurazione del flusso plasmatico a livello dell'arteria oftalmica e delle arterie ciliari posteriori in pazienti affetti da AOG aveva mostrato una riduzione del flusso ematico dal 10 al 20 % rispetto ai soggetti di controllo della stessa età (Jonas et al. 1989; Papasta-

thopoulos e Jonas, 1995; Butt et al., 1997; Chung et al., 1999; Birinci et al., 2002; Fuchsjäger-Mayrl et al., 2004). Gli Autori si proposero di valutare l'esistenza di una relazione tra il calibro dei vasi retinici a livello di base (iniziale), l'incidenza dell'OAG e le alterazioni del disco ottico. In questo studio furono inserite 3469 persone, delle quali 74 svilupparono glaucoma nei successivi 6 anni e mezzo di follow-up. Valutando i loro diametri a livello iniziale e paragonandoli con il resto della popolazione è emerso che né il calibro arteriolare, né quello venulare retinico potevano considerarsi correlati in maniera significativa all'OAG o alle alterazioni del disco ottico. Neppure l'aggiustamento per i fattori di rischio cardiovascolari ha alterato questo risultato. Questi dati dimostravano dunque come non *visia un ruolo accertato del microcircolo retinico nella patogenesi dell'OAG.*

TECNICHE DI VALUTAZIONE DELLA CIRCOLAZIONE RETINICA

■ **Tecnica del campo blu endoptico (visione endoptica)**

Questa tecnica sfrutta il fenomeno della visione endoptica in modo da investigare le dinamiche dei leucociti nei vasi retinici perifoveolari (Riva e Petrig, 1980). Tale fenomeno è ben visibile quando viene osservata una sorgente di luce blu. In queste condizioni il soggetto in esame può osservare piccoli e numerosi corpuscoli luminosi attorno all'area del centro della fovea. Questo fenomeno è dato dalle diverse proprietà di assorbimento degli eritrociti e dei leucociti quando la retina viene illuminata da radiazioni a breve lunghezza d'onda. I globuli bianchi non assorbono tale luce al contrario dei globuli rossi; ciò risulta nella percezione di un corpuscolo luminoso quando passano i globuli

bianchi (Schmetterer e Garhofer, 2007). Al fine di quantificare il flusso sanguigno mediante la tecnica della visione endoptica, l'occhio viene illuminato con una luce di 430 nm e un campo simulato di particelle viene mostrato al soggetto in esame. Aggiustando e paragonando il numero e la velocità media delle particelle osservate nel campo simulato del soggetto viene fatta una stima del flusso cellulare perimaculare dei globuli bianchi (Schmetterer e Garhofer, 2007). Questa tecnica risulta così soggettiva e necessita di una buona cooperazione da parte del paziente in esame. Inoltre, non è ancora del tutto chiaro se il flusso leucocitario risulta proporzionale al flusso sanguigno retinico in condizioni cliniche (Fuchsjäger-Mayrl et al., 2002).

■ **Laser Doppler Velocimetria**

Un approccio al fine di misurare le velocità del flusso ematico nelle arteriole e venule retiniche è basato sulla *laser Doppler velocimetria (LDV)*. Questa tecnica usa lo spostamento Doppler della luce che è direttamente proporzionale alla velocità del sangue quanto il vaso viene illuminato da un laser.

Lo spettro della luce laser riflessa consiste di un range di spostamenti di frequenza che corrispondono alle velocità di flusso all'interno del vaso in esame (Riva et al., 1981). Il massimo spostamento di frequenza corrisponde alla massima velocità al centro del vaso. Usando un LDV bidirezionale è possibile ottenere una determinazione assoluta delle velocità massime del sangue nei vasi retinici (Riva et al., 1979). Dalla contemporanea misura del diametro dei vasi retinici può essere calcolato il flusso sanguigno retinico totale di un'area di sezione trasversale di un singolo vaso (Riva et al., 1985).

■ **Laser speckle**

Il *laser speckle* è stato utilizzato per sviluppare una nuova tecnica per la misurazione del flusso. Il feno-

meno del laser speckle si verifica quando il fondo oculare viene illuminato da una luce coerente ed è caratterizzato da un pattern rapidamente variabile causato dalla luce riflessa dalla superficie non liscia del fondo oculare. Il tasso di queste variazioni fornisce una stima della velocità del sangue e perciò può essere utilizzato nella quantificazione del flusso sanguigno retinico (Briers e Fercher, 1982). Questa metodica permette la valutazione (tramite un'analisi bidimensionale) della circolazione periferica a livello dell'iride, della coroide, della testa del nervo ottico (ONH) e la misurazione della velocità del flusso ematico nei vasi retinici in maniera quantitativa e assolutamente non invasiva. Consente, infatti, la valutazione del *normalized blur* (NB) o dello *square blur rate* (SBR) entrambi indici quantitativi della velocità ematica (Tamaki et al., 1995). Il calcolo del NB, che richiede meno tempo, è utilizzato principalmente per la valutazione della circolazione periferica. L'SBR, la cui misurazione richiede un tempo maggiore, risulta migliore per la valutazione della velocità del flusso ematico attraverso i vasi retinici. Questa tecnica può essere utile per lo studio dei meccanismi di autoregolazione della circolazione periferica oculare (Araie, 1999).

■ Tomografia ottica Doppler

Tra le nuove tecniche che permettono di valutare l'emodinamica oculare vi è la tomografia ottica Doppler che combina i principi del laser Doppler alla tomografia ottica coerente (optical coherence tomography, OCT) (vedi la tomografia a coerenza ottica nel capitolo "Invecchiamento della coroide"). Sono state sviluppate strumentazioni che permettono di misurare i profili di velocità nelle grandi arterie e vene retiniche usando approcci basati sul tempo (Yazdanfar et al., 2000; 2003) o sulla frequenza (Leitgeb et al., 2003; 2004; White et al., 2003) (vedi avanti).

■ Flussimetria laser Doppler, flouroangiografia, eco-color-doppler e oftalmoscopia a scansione laser (SLO)

Fare riferimento al capitolo "Invecchiamento della coroide"

■ Misurazione dei diametri dei vasi retinici

Il microcircolo è composto da vasi di diverso calibro. Vi sono le microarterie con un diametro inferiore ai 300 μm , le arteriole (< 40 μm), i capillari (< 10 μm), le venule (> 40 μm) e le microvene (< 300 μm). Tutte le tecniche sopra menzionate, esclusa la tomografia ottica Doppler, vengono limitate dal fatto che forniscono informazioni sulla velocità del sangue, ma non sul flusso sanguigno in quanto tale. Così, l'interpretazione dei risultati viene complicata dal fatto che risulta difficoltoso decidere se un aumento della velocità ematica è causata da un aumento del flusso sanguigno oppure da una vaso-costrizione all'interno del letto vascolare in studio. Perciò, la determinazione esatta del diametro dei vasi diventa cruciale per il calcolo del flusso sanguigno (Schmetterer e Garhofer, 2007).

Nell'*Atherosclerosis Risk in Communities Study* (ARIC Investigators. Hubbard et al., 1999) gli Autori hanno quantificato la dilatazione/costrizione delle arteriole retiniche basandosi sulla misurazione dei loro diametri grazie a foto digitali. In questo modo hanno scoperto come il grado di dilatazione arteriolare fosse strettamente correlato a molti altri fattori sistemici quali la pressione arteriosa o i marker dell'infiammazione. Questo processo vasale riflette l'ispessimento e l'iperplasia della media, nonché la ialinizzazione e la sclerosi dimostrate istologicamente (Wong et al., 2001). Poiché alterazioni simili del microcircolo, associate a specifici fattori di rischio quali l'ipertensione, sono state documentate in ogni parte dell'organismo (Baumbach e Heistad, 1989; Burchfiel et al.,

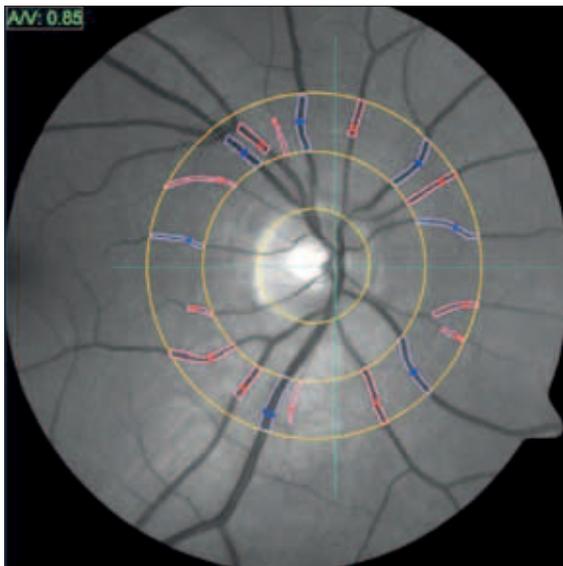


Fig. 21: Fotografia retinica digitalizzata per l'esecuzione della Static Vessel Analysis (SVA) con RVA della Imdos

1997), si può concludere che *le arteriole retiniche rispecchiano lo stato di tutte le arteriole sistemiche.*

La tecnica di misurazione del loro diametro prevede l'acquisizione di foto della retina dopo 5 minuti di adattamento al buio. Queste immagini vengono poi rese digitali grazie a scanner ad alta risoluzione. A questo punto vengono misurati i diametri di arteriole e venule che attraversano una specifica area che circonda il disco ottico (Fig. 21). I singoli valori dei diametri arteriosi e venosi vengono poi sommati e espressi come *rapporto artero-venoso (AVR)* (vedi oltre). Dunque, i metodi proposti per la valutazione dei diametri dei vasi retinici includono tecniche basate su immagini del fondo oculare e successiva analisi di tali immagini (Chen et al., 1994; Dumskyi et al., 1996).

In commercio esiste, tra gli altri, un sistema per la valutazione in tempo reale dei diametri dei vasi retinici, che utilizza i database dello studio ARIC che è l'*analizzatore dei vasi retinici* (Retinal Vessel Analyser, RVA) della Imedos (Jena, Germany) (Schmetterer e Garhofer, 2007). Questo sistema si basa su una macchina fotografica collegata a un

analizzatore computerizzato che permette la registrazione in tempo reale dei diametri delle arteriole e delle venule retiniche (Blum et al., 1999; Polak et al., 2000; Gugleta et al., 2007). L'RVA produce analisi continue e automatizzate dei vasi combinate con una correzione dei piccoli movimenti oculari. Grazie all'algoritmo adattabile usato per il calcolo della grandezza dei vasi (VesselMap 2-Z), tale sistema combina un'alta riproducibilità con un'alta risoluzione temporale e spaziale (Polak et al., 2000). In realtà, l'RVA comprende due tipi di analisi: un'analisi statica ed un'analisi dinamica dei vasi.

La prima o *Static Vessel Analysis* (SVA), valuta lo status dei vasi in un unico "momento temporale" ben definito producendo una sola immagine del fundus (Fig. 22a). La SVA può essere considerata il punto di partenza per l'analisi della microcircolazione retinica. In questo tipo di analisi vengono valutati tre indici partendo da un'unica immagine funduscopica:

- l'AVR (Arterial Venous Ratio) in accordo con lo studio ARIC
- CORMARS (Combined Retinal MicroAngiopathy Risk-Score)
- CRAE/CRVE (Central Retinal Artery/Central Vein Equivalent) che fornisce importanti informazioni per monitorare cambiamenti microvascolari attraverso il controllo della variazione del rapporto artero/venoso.

Questi valori sono tutti correlati a specifiche patologie o a fattori di rischio (Tab. 1) considerando che lo stato dei microvasi del fundus fornisce informazioni riferibili allo stato della microcircolazione in tutto il corpo. L'esame è inoltre molto semplice nella sua esecuzione e può essere eseguito in pochi minuti anche da personale tecnico addestrato. Il software della SVA può inoltre migliorare le performances di ogni sistema tradizionale di fundus imaging. Dunque, questo esame, pur rappresentando un complemento al tradizionale e

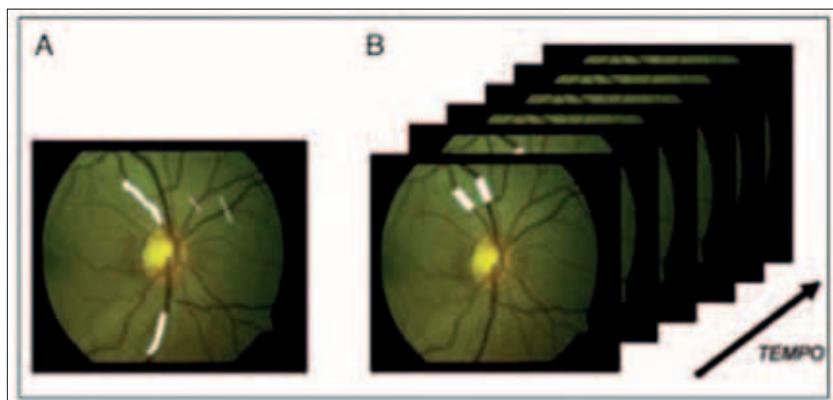


FIG. 22: Due diverse analisi che possono essere condotte con il RVA della Imedos. A = SVA con cui si ottiene una sola immagine, B = DVA con cui si visualizza una sequenza di immagini

soggettivo esame del fundus, permette anche una misurazione quantitativa dei rischi microvascolari (Tab. 2) di ictus o angina. Il limite della tecnica può essere invece la difficoltà nella lettura delle risposte e nella diagnosi differenziale.

L'AVR ridotto, in accordo con lo studio ARIC sopra menzionato (Tab. 3), è indice di restringimento delle arterie, di aumento della pressione e delle pulsazioni. Un AVR di 1 indica che i diametri arterioli e quelli venulari si eguagliano, mentre un AVR < 1 indica una costrizione arteriolare in quanto i diametri venulari variano generalmente molto poco (Hubbard et al., 1999; Sharrett et al., 1999). L'AVR consente di determinare i rischi di ictus; è un dato oggettivo e indipendente da ogni

altro fattore di rischio.

L'associazione tra AVR e CRAE con l'ipertensione nasce dai risultati ottenuti con lo studio Rotterdam (Ikram et al., 2005), prima riportati, da cui è emerso che il restringimento arterioso può precedere lo sviluppo di ipertensione sistemica.

Il Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (Klein et al., 2004), sempre come riportato, ha invece messo in evidenza come ampi lumi sia arteriosi che venosi siano correlati a un alto rischio di progressione di retinopatia diabetica. Per tale ragione i pazienti diabetici possono essere monitorati utilizzando il CRAE ed il CRVE. Il Beaver Dam Eye Study (Klein et al., 2006), anch'esso già riportato, ha messo in relazione alterazioni del microcircolo e la flogosi sistemica. Poiché la dilatazione venosa è risultata un marker di questo processo, a tale scopo si valuta il CRVE.

Il restringimento arteriolare a livello retinico rappresenta anche un importante fattore di rischio da utilizzare per la diagnosi precoce del glaucoma o per monitorare la terapia (Wang et al., 2007).

Anche il CORMARS fornisce importanti indicazioni sui rischi di microangiopatia a parità dell'AVR, come si evince dalla Tabella 4. Al CORMARS viene infatti attribuito un valore crescente da 0 a 5 e direttamente proporzionale al progressivo incremento del rischio di angina pectoris (Michestson et al., 2005).

MALATTIE E FATTORI DI RISCHIO	
ANGINA PECTORIS	CORMARS
ICTUS	AVR
IPERTENSIONE	AVR, CRAE
FATTORI DI RISCHIO VASCOLARI	CRAE, CRVE

TAB. 1: Malattie e fattori di rischio. Indicatori microvascolari che si possono analizzare e monitorare durante la terapia con l'analisi SVA

VARIAZIONE DEL LUME	RISCHI
Dilatazione arterio-venosa	Progressione Retinopatia Diabetica, indipendente dalla fase
Dilatazione Venosa	Sviluppi proliferativi in Retinopatia Diabetica Modificazione Sclerotizzante dei Vasi Infiammazione
Restringimento delle Arterie e Dilatazione delle Vene Riduzione dell'AVR	Sviluppo di Ipertensione
Restringimento delle Arterie	Aumento spessore interno della carotide Aumento della pressione sanguigna Glaucoma

TAB. 2: Alterazioni del microcircolo retinico in relazione a specifici rischi vascolari

La seconda metodica di analisi dell' RVA o *Dynamic Vessel Analysis* (DVA) della Imedos valuta lo status della funzionalità dei vasi in una "sequenza temporale" fornendo una sequenza di immagini (Fig. 22b) e permettendo quindi una diagnosi funzionale. Nella DVA, infatti, i diametri dei vasi vengono determinati non solo tramite l'acquisizione di un singolo fotogramma, ma anche monitorando la loro funzionalità nel tempo attraverso una ripresa video non-invasiva effettuata in tempo reale. Questa tecnica consente di valutare la vasomozione del circolo retinico e i suoi cambiamenti (vasocostrizione e vasodilatazione) durante la somministrazione di diversi stimoli quali la luce flicker, l'iperossiemia, lo stimolo isometrico e le variazioni della pressione intraoculare, fattori diversi che sollecitano altrettanti meccanismi di autoregolazione riportati nelle Tabelle 5, 6.

Le variazioni del calibro dei vasi arteriosi e venosi osservabili durante la DVA sono correlate ad altrettanti rischi o alterazioni vascolari (Tab. 7, 8). Il vantaggio di questa tecnica sta, dunque, nella possibilità di valutare eventuali disfunzioni del microcircolo in anticipo rispetto alla comparsa di anomalie a livello basale (valutabili con la SVA) o allo sviluppo di patologie conclamate.

La *stimolazione DVA "flicker"* induce il cervello ad avviare un complesso meccanismo di modifica del diametro dei vasi retinici, sia arteriosi che venosi verso la vasodilatazione e ha come target le cellule endoteliali dei vasi retinici.

La *somministrazione di ossigeno* crea uno stato di iperossiemia che induce vasocostrizione dei microvasi. Lo *stimolo isometrico o statico* (Hand grip Test) viene effettuato stringendo con la mano un dina-

<p>Rischio Alto</p>  <p>Rischio Basso</p>	Classe Aric	da	a	<p>Lume Arterioso fortemente ridotto</p> <p>Restringimento del lume Arterioso</p> <p>Arterie Normali</p>
	1	0,57	0,78	
	2	0,79	0,82	
	3	0,83	0,86	
	4	0,87	0,91	
5	0,92	1,22		

TAB. 3: AVR in accordo con l'ARIC study

<p>Alto Rischio</p>  <p>Basso Rischio</p>	CORMARS 5	AVR < 0,78	Segni di Angiopia; Iperensione, Diabete
	CORMARS 4	AVR < 0,78	Segni di Angiopia; Iperensione, no Diabete
	CORMARS 3	AVR < 0,78	Segni di Angiopia; no Iperensione, no Diabete
	CORMARS 2	AVR < 0,78	no Segni di Angiopia; Iperensione, no Diabete
	CORMARS 1	AVR < 0,78	no Segni di Angiopia; no Iperensione, no Diabete
	CORMARS 0	AVR > 0,78	

TAB. 4: CORMARS correlato ai rischi di angina pectoris (da Michestson et al., 2005)

mometro e applicando una forza variabile tra il 25 e il 50% della massima contrazione volontaria per la durata di 2-5 minuti. Lo sforzo isometrico produce un aumento sia della pressione sistolica che di quella diastolica, per un meccanismo riflesso a partenza da recettori muscolo-tendinei, che produce un'attivazione del sistema adrenergico. Le modifiche pressorie sono essenzialmente dovute a un aumento della portata cardiaca, determinato principalmente da un aumento della frequenza mentre le resistenze periferiche variano in misura minore. Tuttavia, questo tipo di risposta emodinamica sarebbe propria dei normotesi, mentre negli ipertesi vi sarebbe un aumento delle

resistenze periferiche. Interessante è il riscontro dei livelli ematici di endotelina-1, molecola che si pensa possa partecipare al determinismo della malattia ipertensiva in soggetti normotesi, ma figli di soggetti ipertesi.

Tale innalzamento prolungato dei livelli ematici di endotelina-1 è inducibile mediante Hand grip Test ed è considerato un marker precoce di futura malattia ipertensiva complicata da danno d'organo (Muratami et al., 1996; Manieri et al., 1998). Un ulteriore stimolo che può essere valutato è la risposta vasocostrittrice a un *aumento della pressione intraoculare*. È noto che per il sistema di autoregolazione dei vasi retinici non si dovrebbero

MECCANISMI DI AUTOREGOLAZIONE RILEVATI CON DVA
ACCOPPIAMENTO NEUROVASCOLARE (FLICKER TEST)
MECCANISMO MIOGENICO (EFFETTO BAYLISS)
MECCANISMO METABOLICO
MECCANISMO DI FLUSSO INDOTTO (ENDOTELIALE)

TAB. 5: Meccanismi di autoregolazione misurati con l'analisi DVA (Imedos)

CARATTERISTICHE TEMPORALI DI RISPOSTA VASCOLARE A VARI STIMOLI	
Stimolo	Risposta
FLICKER	Secondi
STIMOLO ISOMETRICO	Minuti
SOMMINISTRAZIONE DI OSSIGENO	Minuti
PRESSIONE INTRAOCULARE	Minuti

TAB. 6: Caratteristiche temporali di risposta vascolare a vari stimoli

VARIAZIONE INDOTTA DALLA DVA	RISCHI E PROBABILI ALTERAZIONI
Dilatazione di arterie e vene	Progressione della malattia diabetica indipendente dalla fase
Dilatazione della sola rete venosa	Sviluppo proliferativo della malattia diabetica Modificazione e sclerotizzazione della rete venosa Comparsa di flogosi infiammatoria
Contrazione di arterie e dilatazione vene Riduzione indice AVR	Comparsa e sviluppo di ipertensione
Contrazione della sola rete arteriosa	Inspessimento della parete interna della carotide, aumento della pressione sanguigna Comparsa di glaucoma

TAB. 7:
Correlazione tra malattie vascolari e la risposta flicker dell'analisi DVA (Imedos)

DEGENERAZIONE RETINICA TIPO 2	MAX COSTRIZIONE ARTERIOSA
Degenerazione retinica	Max dilatazione da Flicker
Glaucoma	Max dilatazione venosa da Flicker
Ipertensione	Max dilatazione arteriosa da Flicker
Diabete	Max dilatazione da Flicker
Disfunzioni vascolari	Max dilatazione da Flicker
BRVO	Alterato diametro delle vene

TAB. 8:
Relazione tra malattie, fattori di rischio e indicatori DVA

avere fenomeni vasocostrittori entro i 35 mmHg in soggetti normali. Ciò non esclude che i soggetti con disturbi dell'autoregolazione vadano incontro a fenomeni vasocostrittori con pressioni oculari mediamente poco elevate.

Non si esclude che altri test pressori possano essere eseguiti valutando la risposta retinica.

Queste variazioni del lume sono misurate in tempo reale e i loro parametri vengono confrontati con i dati di normalità di un apposito da-

tabase (ARIC) contenente i dati significativi di oltre 15.000 pazienti (25 immagini al secondo ad alta risoluzione).

Con entrambe le stimolazioni (SVA, DVA) si possono valutare i meccanismi di autoregolazione della rete artero/venosa quindi la loro capacità di dilatazione (funzione di riserva) e la loro capacità di contrazione (funzione di riserva).

In uno studio di Nagel et al. (2004) si è voluto constatare se l'età, la pressione del sangue e il

diametro dei vasi influenzassero la risposta alla luce flicker delle arterie. Sono stati inclusi nello studio 30 pazienti in buona salute e 15 con ipertensione arteriosa non trattata valutando con il RVA il diametro delle arteriole stesse. La luce e i periodici cambiamenti del suo colore e della sua intensità sono state all'origine degli stimoli sull'occhio. La luce flicker ha notevoli vantaggi sui metodi utilizzati in precedenza, come lo stimolo retinico, la standardizzazione dell'intensità dello stimolo, la semplicità nell'esecuzione, la velocità nel responso e un alto livello di accettabilità (Polak et al., 2002). In 26 soggetti con la pressione del sangue normale la luce flicker ha indotto una riduzione dei valori del $6.4 \pm 2.7\%$, le risposte diminuivano, ma non in maniera significativa nei soggetti in salute in età più avanzata. I pazienti con ipertensione hanno dato invece riduzioni del $2.2 \pm 2.5\%$. La risposta alla luce flicker infatti è risultata significativamente ridotta nei pazienti con ipertensione non trattata rispetto a quelli sani. Il diametro basale influenza l'ampiezza della risposta alla luce su un range che va dalle 70 alle 140 unità di misura. Infatti, sotto le 70 e sopra le 140 unità, non si avevano correlazioni tra la risposta alla luce flicker e il diametro arteriolare. Da questi risultati emerge che l'ipertensione non trattata sembra associata con una diminuita risposta alla luce flicker e se si sono avute normalizzazioni delle risposte sottoponendo i pazienti ipertesi a terapia antiipertensiva.

■ Oftalmoscopia digitale a scansione laser (SLO)

Tra i più recenti oftalmoscopi a scansione laser (per il quale si rimanda al capitolo "Invecchiamento della coroide) riportiamo in questo capitolo l'oftalmoscopio digitale SLO *Nidek-F10*" che unisce il principio della confocalità, come gli altri

SLO, al Retro Mode che lavora in maniera diametralmente opposta. Scopo di un percorso ottico confocale è infatti quello di eliminare in fase di registrazione la luce proveniente dai piani non a fuoco mediante un piccolo foro posizionato di fronte al sensore che lascia passare solamente la luce proveniente dai piani perfettamente a fuoco. In tal modo si trascura completamente tutta quella parte di luce riflessa irregolarmente dagli strati fuori fuoco anteriori e posteriori al piano focale e conosciuta come "Scattering".

Lo scopo del Retro-Mode è invece quello di catturare solamente la porzione di luce riflessa prodotta dai piani fuori fuoco anteriori e posteriori al piano focale. Si usa quindi un'apertura con uno stop centrale che blocca, in ricezione, la luce proveniente dai piani a fuoco. In Retro Mode si può scegliere se catturare la luce proveniente dai piani fuori fuoco anteriori o posteriori al piano focale. In particolare, lo scattering proveniente dai piani posteriori al piano focale include quella parte di luce infrarossa che raggiungendo gli strati più profondi si riflette naturalmente sulla barriera coroidesclera a causa del cambio di indice di rifrazione e che produce tale effetto di "retroilluminazione". Tale luce proveniente dal fondo riattraversa gli strati retinici in direzione postero-anteriore e viene ostacolata da eventuali patologie incontrate. Infatti, eventuali anomalie che fanno da ostacolo al ritorno della luce proveniente dal fondo e patologie come edema o drusen sono perfettamente visibili e meglio descritte anche senza midriasi né iniezione di tracciante.

Il Retro Mode è dunque in grado di rilevare precocemente anomalie retiniche e di individuare l'esatta estensione della patologia (Fig. 23).

Nidek F-10 può essere utilizzato per la valutazione ed il follow-up di svariate forme di retinopatie, come quelle genetiche, vascolari, infiammatorie, degenerative, infettive e traumatiche che qui di seguito elenchiamo:

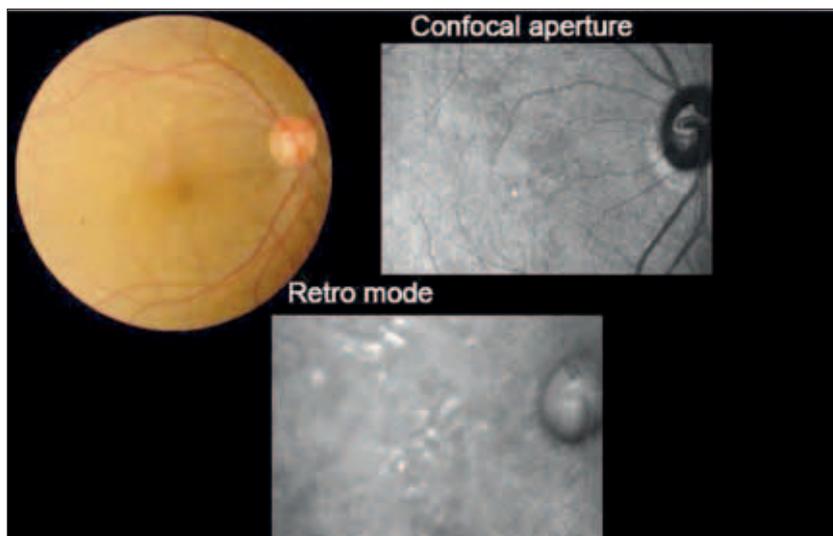


Fig. 23:
Retro Mode e AMD. Foto
ottenuta con OCT Nidek-F10

- *Occlusioni dei vasi retinici*
- *Degenerazione maculare legata all'età (Fig. 24)*
- *Degenerazione dell'epitelio pigmentato retinico*
- *Retinopatia diabetica*
- *Distacco dell'epitelio pigmentato retinico (Fig. 25)*
- *Vasculopatia polipoidale della coroide*
- *Ematomi sub maculari*
- *Proliferazione angiomatosa retinica*
- *Corioretinopatia sierosa centrale*
- *Fori maculari*
- *Neovascolarizzazione coroideale*
- *Distacco di retina*
- *Lesioni termiche post TTT*
- *Lesioni fotochimiche post PDT*
- *Atrofie*

Con la strumentazione SLO è inoltre possibile acquisire immagini in autofluorescenza, proprietà naturale delle cellule, senza la necessità dell'introduzione di tracciante, ma col solo utilizzo di un collirio midriatico. Per la valutazione delle fibre nervose nel glaucoma si può usare un laser verde o blu e infine si possono acquisire, con la tecnica di imaging DCO (Differential Contrast Ophthalmoscopy) le strutture del fundus attra-

verso un'elaborazione "live" delle immagini catturate (Fig. 26).

Il Nidek-F10 permette dunque l'osservazione della retina con diverse tecniche di illuminazione riassunte nella Figura 27 tra cui un'attenta osservazione dei vasi retinici dopo somministrazione di una bassissima dose di fluoresceina rispetto ad altri SLO. Combinando l'OCT con il laser doppler si esegue la tomografia ottica doppler prima riportata.

PRINCIPALI PATOLOGIE SENILI DEI VASI RETINICI

■ Le occlusioni arteriose retiniche

La sede del processo patologico determina le varianti anatomiche delle occlusioni arteriose retiniche: *occlusione dell'arteria centrale, occlusione di branca arteriosa retinica ed occlusione dell'arteria cilioretinica.*

Tra queste forme di occlusione, quella dell'arteria centrale si manifesta in circa il 57% dei casi, quella di branca nel 38% dei casi e quella dell'arteria cilioretinica nel 5% dei casi (Brown e Shields, 1979).

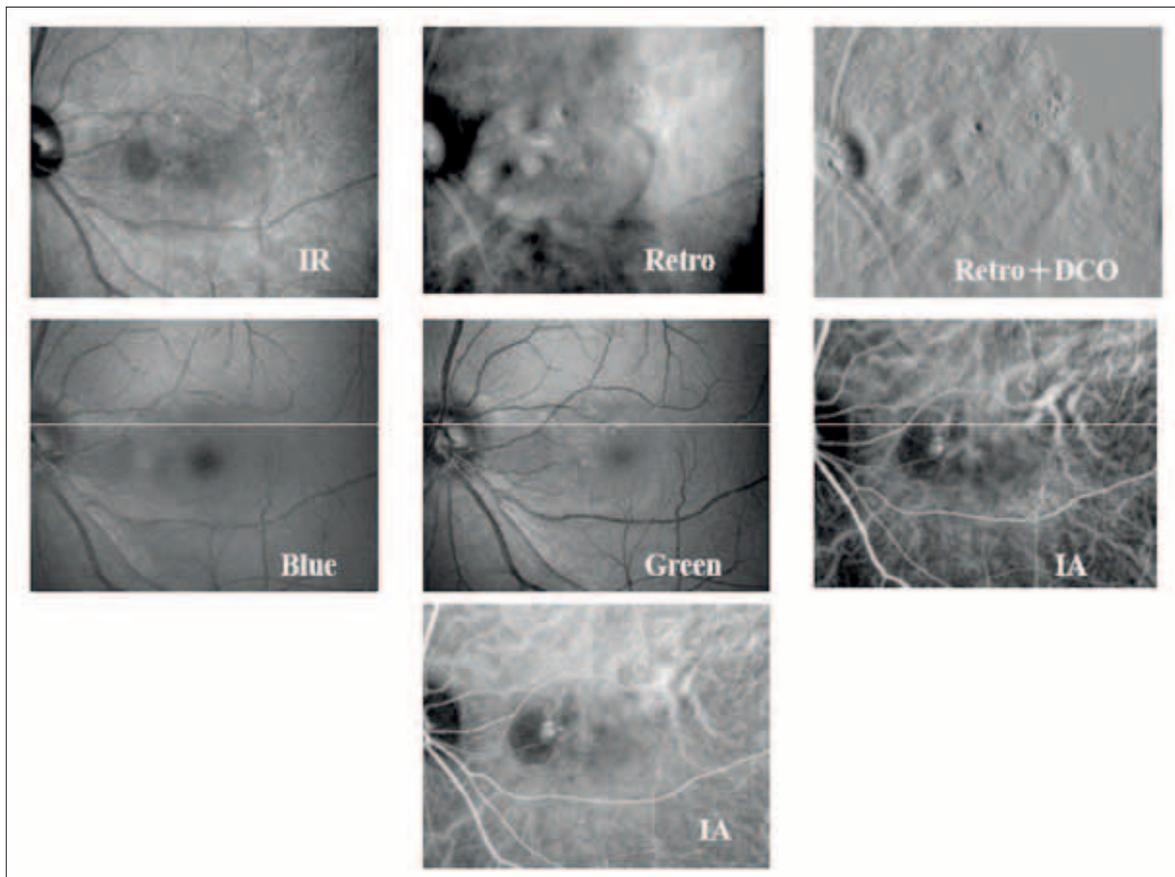


Fig. 24: Degenerazione maculare legata all'età. Foto ottenuta con OCT Nidek-F10

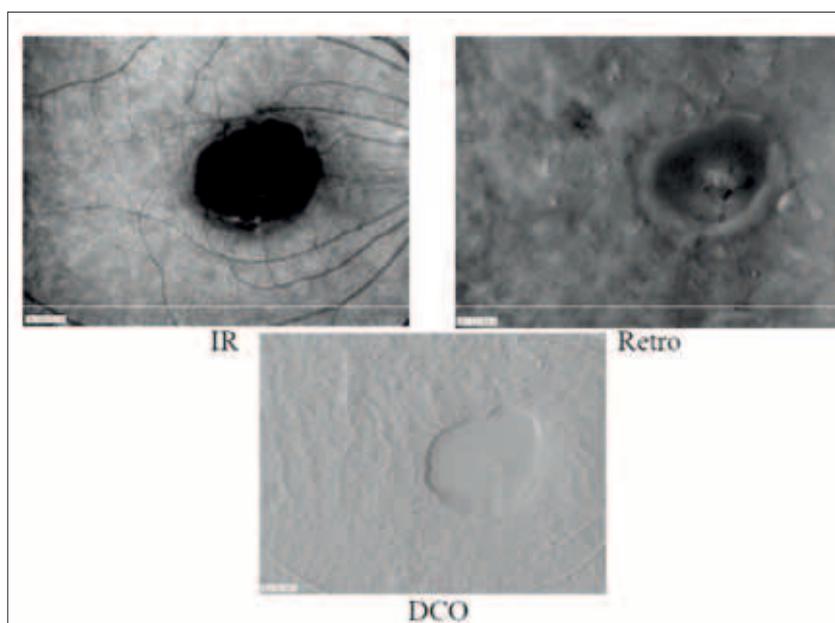


Fig. 25: Distacco dell'epitelio pigmentato retinico. Foto ottenuta con OCT Nidek-F10

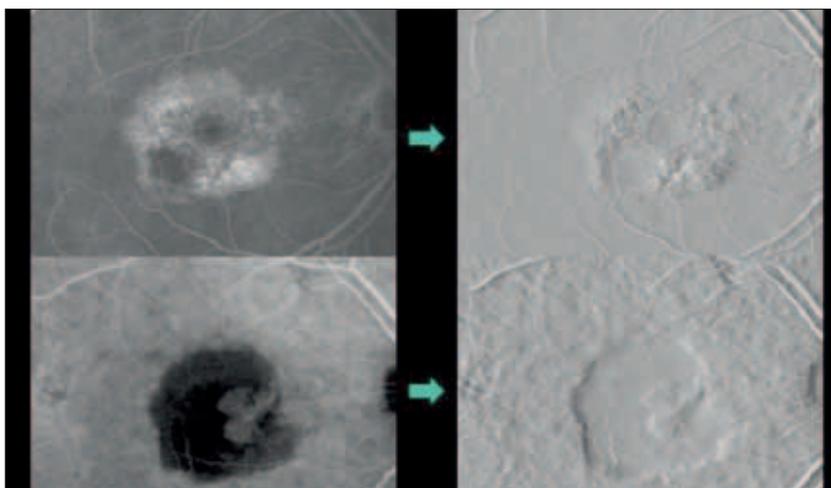


Fig. 26: Tecnica di imaging DCO. Foto ottenuta con OCT Nidek-F10

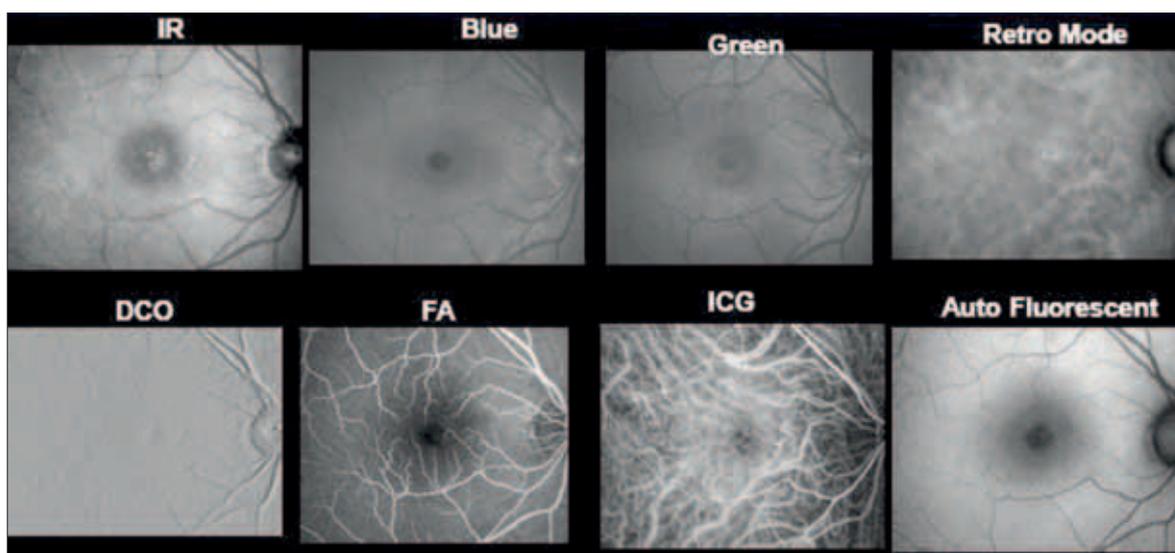


Fig. 31: Osservazione del fondo con le varie metodiche di illuminazione. Foto ottenuta con OCT Nidek-F10

OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CENTRALE DELLA RETINA

I dati sull'incidenza dell'occlusione dell'arteria centrale della retina non sono facilmente disponibili.

La patologia si riscontra più frequentemente negli anziani, ma può essere osservata anche nei bambini; l'età media di esordio è l'inizio della settima decade. Gli uomini sono colpiti più frequentemente delle donne e in circa l'1-2% dei casi il coinvolgimento è bilaterale (Karjalainen, 1971; Gold, 1977; Brown et al., 1981; Brown e Magargal, 1982).

FISIOPATOLOGIA

In molti casi è impossibile determinare l'esatto processo fisiopatologico responsabile dell'occlusione dell'arteria centrale della retina. Come cause più frequenti vengono indicate l'embolia, la trombosi intraluminale, l'emorragia al di sotto di una placca aterosclerotica, le vasculiti, lo spasmo, il collasso circolatorio, l'aneurisma dissecante e la necrosi ipertensiva arteriosa. Le cause dell'occlusione di un'arteria retinica in pazienti al di sotto dei 30 anni

spesso sono diverse da quelle che si trovano nei soggetti di età maggiore (Brown et al., 1981).

Le cause dell'occlusione dell'arteria centrale della retina sono intimamente collegate ai fattori di rischio sistemici. Le patologie sistemiche che più comunemente predispongono ad un'occlusione dell'arteria centrale retinica sono l'emicrania, le anomalie della coagulazione, le patologie cardiologiche, i traumi e le emoglobinopatie a cellule falciformi; l'ipertensione arteriosa sistemica è stata trovata in circa due terzi dei pazienti colpiti da occlusione e il diabete mellito è presente in circa un quarto (Brown e Magargal, 1982).

L'osservazione, quindi, di un'occlusione arteriosa retinica merita un'attenta valutazione sistemica completa al fine di ricercare fattori eziologici sistemici.

Uno studio di corte condotto da Hayreh et al. ha dimostrato tale principio valutando le alterazioni oculari e sistemiche più frequentemente associate sia all'occlusione dell'arteria centrale della retina che all'occlusione arteriosa di branca. Dallo studio è emerso come la prevalenza di diabete mellito, di ipertensione arteriosa, di patologie cardiache di natura ischemica, di eventi cerebrovascolari e dell'abitudine al fumo sia nettamente superiore nei pazienti con occlusione arteriosa rispetto alla popolazione di controllo.

Come detto in precedenza, l'embolia rappresenta la principale causa di questo disturbo. Il tipo più comune di embolo è quello giallo brillante di colesterolo (*placche di Hollenhorst*); si ritiene che nella maggior parte dei casi questo tipo di embolo insorga dai depositi aterosclerotici delle carotidi, ma può anche originare dall'arco aortico, dall'arteria oftalmica o perfino dalla più prossimale arteria centrale della retina (Gold, 1977). Gli emboli di colesterolo sono spesso piccoli e possono ostruire non completamente le arterie retiniche; frequentemente sono asintomatici. Dunque, la presenza di placche a livello carotideo ha in linea di massima

un'importanza più significativa rispetto al grado di stenosi raggiunto. Hayreh et al. (2009) hanno a questo proposito evidenziato la presenza di stenosi carotidea maggiore o uguale al 50% del lume nel 31% dei pazienti affetti da occlusione dell'arteria centrale della retina e nel 30% di quelli con occlusione arteriosa di branca, mentre la prevalenza di placche carotidiche risultava ancor più significativa (nel 71% dei primi e nel 66% dei secondi).

Gli emboli calcifici originano di solito dalle valvole cardiache, sono meno frequenti di quelli di colesterolo, ma tendono ad essere di dimensioni maggiori e a determinare, quindi, ostruzioni più gravi (Gold, 1977). I trombi di fibrina e piastrine possono essere transitori e causare amaurosi fugaci, ma si possono osservare anche nell'ostruzione dell'arteria centrale della retina senza altri tipi di emboli.

Come fattori di rischio oculari vengono indicate alcune anomalie, quali le drusen del nervo ottico e gli inginocchiamenti delle arterie prepapillari (Brown et al., 1981).

DIAGNOSI CLINICA

I pazienti con occlusione acuta dell'arteria centrale della retina riferiscono un'improvvisa perdita dell'acuità visiva non accompagnata da dolore, che compare in pochi secondi; in alcuni casi è presente un'anamnesi positiva per amaurosi fugaci.

Nel 90% dei casi al primo controllo l'acuità visiva degli occhi colpiti da occlusione dell'arteria centrale della retina varia dalla conta delle dita alla percezione della luce; raramente si ha assenza di percezione luminosa (Brown e Magargal, 1982).

Circa il 25% degli occhi con occlusione acuta dell'arteria centrale della retina ha un'evidente arteria cilioretinica che rifornisce parte del fascio papillomaculare; se solo una parte del fascio è risparmiata, la risultante acuità visiva non è di solito superiore a 2/10. In circa il 10% dei pazienti l'arteria cilioretinica salva la foveola, nel qual caso l'80%

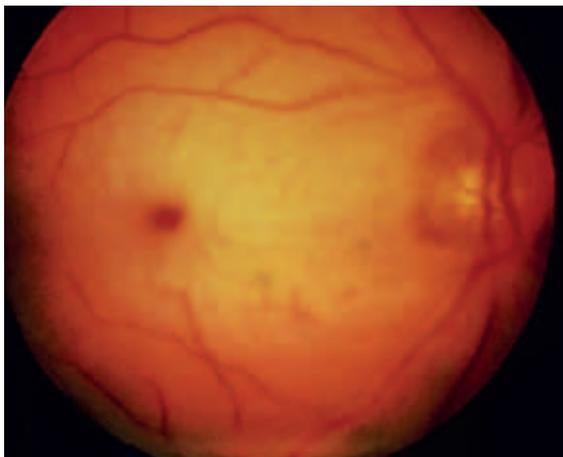


Fig. 28: Occlusione dell'arteria centrale; evidenziabile la caratteristica macchia rosso ciliegia

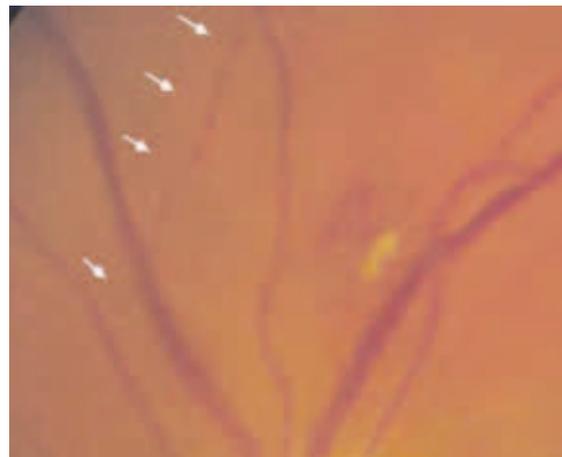


Fig. 29: Fenomeno del boxcarring

degli occhi presenta un miglioramento dell'acuità visiva fino a 4/10 o più entro 2 settimane, diversamente può rimanere soltanto una piccola isola di visione centrale, recuperando, in alcuni casi, una quota sorprendente di campo visivo periferico.

Entro pochi secondi dall'occlusione dell'arteria centrale della retina insorge un difetto pupillare afferente (Brown e Shields, 1981).

Durante le fasi iniziali dell'occlusione il fondo appare normale, ma il difetto pupillare è ancora presente, a meno che l'occlusione non si sia risolta spontaneamente. Nella fase acuta la retina superficiale al polo posteriore diviene opaca ed assume un aspetto giallo-biancastro, tranne che nella regione foveolare, dove è presente una *macchia rosso ciliegia* (Fig. 28), le arterie retiniche sono spesso sottili, mentre le vene possono apparire di calibro variabile. Nei casi di grave occlusione la segmentazione della colonna ematica si può osservare sia nelle arterie che nelle vene (boxcarring) (Fig. 29).

Questa macchia si sviluppa perché la retina in questa regione è estremamente sottile e consente la visione del sottostante epitelio pigmentato retinico (EPR) e della coroide.

Nella maggior parte dei casi l'opacizzazione si risolve nel giro di 4-6 settimane, lasciando di solito il disco ottico pallido, i vasi retinici ristretti ed evidente assenza dello strato delle fibre nervose a livello della papilla ottica.

Se è presente una rubeosi iridea nel momento in cui si ha l'occlusione, si dovrebbe prendere in considerazione la presenza di una concomitante ostruzione dell'arteria carotide; in questi casi l'aumento della pressione intraoculare dovuto alla presenza della rubeosi iridea, indotta dall'ostruzione della carotide, può superare la pressione di perfusione nell'arteria centrale della retina e predisporre alla sua occlusione.

ANGIOGRAFIA RETINICA

La fluoroangiografia retinica (Fig. 30) può rivelare un ritardo nel tempo di riempimento arterioso, ma il segno che si osserva più frequentemente con questo esame è un ritardo nel tempo di transito artero-venoso retinico (Brown e Magargal, 1982). L'impregnazione tardiva del disco ottico è variabile, mentre rara è l'impregnazione dei vasi retinici. Di solito il circolo coroideale negli occhi con occlusione dell'arteria centrale della retina si riem-



Fig. 30: Immagine fluorangiografica di occlusione dell'arteria centrale della retina.

pie normalmente (Brown e Magargal, 1982). La circolazione retinica ha una forte propensione al ripristino del flusso in seguito ad occlusione acuta dell'arteria centrale della retina, pertanto possono persistere il restringimento arterioso e la riduzione visiva, con una fluoroangiografia normale dopo un tempo variabile dal fatto acuto (Gold, 1977).

DECORSO CLINICO

In passato si pensava che l'incidenza della rubeosi iridea dopo occlusione dell'arteria centrale della retina fosse del 1-5%, ma studi più recenti hanno invece dimostrato che è del 20%, simile a quella osservata nella trombosi della vena centrale della retina. In uno studio prospettico alcuni Autori hanno trovato che il 18,2% degli occhi con occlusione acuta sviluppa una rubeosi iridea in un tempo medio di 4-5 settimane, con un range di 1-15 settimane (Perraut e Zimmermann, 1959; Hayreh e Podhajsky, 1982; Duker e Brown, 1988; Duker et al., 1991). La fotocoagulazione laser panretinica è efficace nel far regredire la neovascolarizzazione dell'iride in circa il 65% dei casi (Duker e Brown, 1988).

In seguito ad occlusione acuta dell'arteria centrale della retina è stata osservata anche una neova-

scolarizzazione del disco ottico, che si manifesta nel 2-3% dei casi (Duker e Brown, 1989). Come nel caso della neovascolarizzazione iridea, quando i neovasi a livello della papilla ottica sono già presenti al momento dell'occlusione dell'arteria centrale della retina si dovrebbe sospettare una occlusione pregressa dell'arteria carotide.

TRATTAMENTO DELLE OCCLUSIONI ARTERIOSE RETINICHE

Contemporaneamente alla somministrazione della terapia topica, per ipotizzare l'occhio, andrebbe eseguita una valutazione sistemica del paziente affetto; in particolare, nei pazienti di età superiore a 55 anni, in cui non sono obiettivamente riscontrabili emboli all'oftalmoscopia, si dovrebbe effettuare una determinazione urgente della velocità di eritrosedimentazione (VES) per ricercare un'arterite a cellule giganti. In questo caso si procede con un trattamento con corticosteroidi sistemici, anche se questa terapia raramente aiuta il recupero visivo dell'occhio colpito.

Per dislocare un embolo ostruente si può tentare un massaggio oculare, in rari casi questa manipolazione può dare dei risultati positivi, oppure provocare aumenti ripetuti della pressione per 10-15 secondi, seguiti da improvvisi cali (Ffytche, 1974). Alcuni Autori in alcuni casi hanno proposto l'uso di una miscela di ossigeno ed anidride carbonica (95% ossigeno e 5% anidride carbonica) o la paracentesi della camera anteriore come trattamento dell'occlusione acuta dell'arteria centrale della retina (Augsburger e Magargal, 1980). Non è chiaro, però, se quest'ultimo trattamento porti ad un miglioramento della capacità visiva rispetto al naturale decorso della malattia (Atebara et al., 1995). Questa manovra determina un'improvvisa riduzione della pressione intraoculare nella speranza che la pressione di perfusione dietro l'ostruzione spinga l'embolo; in genere si rimuovono 0,1-0,4 ml di umor acqueo. Per indurre una riduzione

relativamente rapida della pressione intraoculare si può anche usare acetazolamide (inibitore dell'anidraasi carbonica) per via endovenosa (Ffytche, 1974). Segnalato in letteratura il possibile, seppur limitato, trattamento con sostanze fibrinolitiche (Leydhecker et al., 1978; Schmidt et al., 1992); nell'occlusione centrale della retina non sono utilizzati, invece, gli anticoagulanti sistemici (Gold, 1977). E' stato riportato come la nitroglicerina sublinguale, un potente farmaco vasodilatatore, in alcuni casi possa ristabilire il flusso ematico (Kurtzky, 1990; Charness e Liu, 1991).

Una nuova tecnica chirurgica per la rimozione di un embolo potrebbe divenire l'approccio più efficace per il trattamento dell'occlusione arteriosa retinica. Gli altri metodi, infatti, compreso Nd:YAG laser embolysis hanno mostrato un'efficacia limitata e un numero estremamente alto di complicazioni. Nell'Ocular Surgery News (2008) è riportato uno studio pilota condotto da Garcia-Arumi senza gruppi di controllo su un numero limitato di pazienti (11 occhi) affetti da occlusione arteriosa retinica da meno di 36 ore. Questo approccio chirurgico si basa sulla valutazione di precedenti esperienze condotte con successo. Nel 1990 Peyman et al. effettuarono la rimozione chirurgica di un embolo da un paziente con occlusione arteriosa retinica da 60 ore. L'acuità visiva migliorò dal semplice conteggio delle dita delle mani a 20/200. Nel 2000 Tang sviluppò una tecnica di incannulazione chirurgica dell'arteria centrale della retina in un uomo di 68 anni con occlusione da 30 ore. L'acuità visiva migliorò fino a 20/25 in 4 mesi. La tecnica utilizzata da Garcia-Arumi prevede la rimozione dell'embolo in seguito all'esecuzione di una dissezione longitudinale della parete anteriore del vaso. Questo procedimento risulta piuttosto difficoltoso a causa dell'intenso sanguinamento che termina rapidamente non appena viene rimosso l'embolo. La risoluzione dell'occlusione è stata possibile in 9 pazienti su 11 ed in 7

casi è stata ottenuta la riperfusione arteriolare. I risultati ottenuti con questa tecnica mostrano un miglioramento dell'acuità visiva da 20/400 prima dell'intervento a 20/60 nel postoperatorio. Nei casi di riperfusione si raggiungono anche i 20/30. Ovviamente è necessario a questo punto creare un trial multicentrico al fine di valutare la praticabilità, la sicurezza e l'efficacia di questo tipo di intervento, con la creazione di strumenti appositi.

OCCLUSIONE ARTERIOSA DI BRANCA

Le cause dell'occlusione arteriosa di branca sono sovrapponibili a quelle dell'arteria centrale, quindi, anche in questa forma la valutazione del paziente dal punto di vista sistemico risulta essere di fondamentale importanza. Nei casi in cui l'ostruzione si verifica a livello di una biforcazione arteriosa è più probabile che la causa sia embolica rispetto a quando il vaso viene ostruito in un altro punto del suo decorso.

Quando la foveola non è completamente circondata da pallore retinico, la prognosi visiva negli occhi con occlusione arteriosa di branca è di solito abbastanza buona, infatti, circa l'80% degli occhi recupera una capacità visiva di 5/10 o più, pur residuando difetti del campo visivo (Brown e



Fig. 31: Occlusione arteriosa di branca

Magargal, 1981).

All'esame oftalmoscopico un'occlusione arteriosa di branca appare come una regione localizzata di pallore della retina superficiale e lo sbiancamento è più evidente al polo posteriore lungo il vaso ostruito; oltre il 90% delle occlusioni arteriose di branca interessa i vasi temporali (Brown e Shields, 1979) (Fig. 31).

La neovascolarizzazione dell'iride in seguito ad occlusione di branca è molto rara, invece, occasionalmente si può osservare una neovascolarizzazione del segmento posteriore; si possono inoltre sviluppare circoli collaterali artero-arteriosi che sono patognomici di questa forma di occlusione arteriosa. Poiché la prognosi visiva è sostanzialmente migliore rispetto a quella dell'occlusione dell'arteria centrale della retina non si effettua una terapia aggressiva, a meno che non siano interessati i capillari periferoveolari. E' stata proposta la terapia laser per obliterare gli emboli, ma la sua utilità clinica è ancora da valutare (Dutton e Craig, 1989). Ancora non è certo se lo spostamento periferico di un embolo retinico mediante manipolazione in corso di vitrectomia via pars plana potrà avere applicabilità clinica.

OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CILIORETINICA

Le arterie cilioretiniche si possono osservare oftalmoscopicamente nel 20% degli occhi e mediante fluoroangiografia nel 32% circa (Justice e Lehmann, 1976); in una sequenza fluorangiografica normale si riempiono di solito insieme al circolo coroideale, 1-2 secondi prima del riempimento delle arterie retiniche.

Dal punto di vista oftalmoscopico, l'occlusione di un'arteria cilioretinica appare come un'area di pallore retinico superficiale lungo il decorso del vaso. Sono state descritte tre varianti cliniche: l'occlusione isolata dell'arteria cilioretinica, l'occlusione cilioretinica associata a trombosi della vena centrale della retina e l'occlusione dell'arteria ciliore-

tinica associata ad otticopatia ischemica anteriore (Schatz et al., 1991).

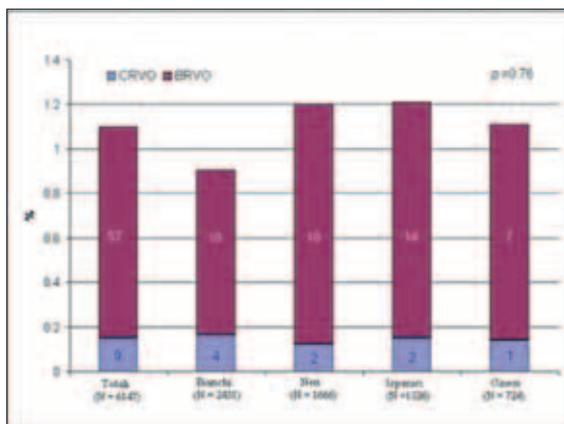
L'occlusione isolata dell'arteria cilioretinica di solito ha una buona prognosi visiva: il 90% degli occhi colpiti migliora fino a un visus di 5/10 o più, con il 60% che recupera 10/10 di visus.

L'occlusione cilioretinica associata a trombosi della vena centrale della retina comprende anche più del 40% dei casi di occlusione dell'arteria cilioretinica. La trombosi venosa generalmente è di tipo non ischemico e quindi non porta di solito a rubeosi iridea e a glaucoma neovascolare (Schatz et al., 1991). In presenza di una trombosi della vena centrale della retina di tipo ischemico è possibile che un'occlusione cilioretinica non venga diagnosticata.

Nel gruppo di occhi con occlusione cilioretinica associata ad otticopatia ischemica anteriore, la prognosi visiva è solitamente abbastanza sfavorevole (da 1/20 fino ad assenza di percezione luminosa), principalmente per il danno al nervo ottico. Si osserva un rigonfiamento iperemico o pallido del disco ottico in associazione ad un pallore retinico superficiale, lungo il decorso dell'arteria cilioretinica ostruita.

Il rigonfiamento acuto pallido della papilla ottica è suggestivo di un'arterite a cellule giganti come agente eziologico e, rispetto a un rigonfiamento iperemico, è di solito associato a un deficit visivo maggiore. Non è sorprendente che l'occlusione dell'arteria cilioretinica e l'otticopatia ischemica anteriore avvengano insieme, poiché entrambe sembrano essere manifestazioni di insufficienza ciliare posteriore (Hayreh, 1963; Henkind et al., 1970). Questa variante comprende circa il 15% di tutte le occlusioni dell'arteria cilioretinica.

Le indagini sistemiche in caso di occlusione cilioretinica sono simili a quelle che si effettuano in caso di occlusione dell'arteria centrale della retina. Di solito non si pratica terapia nei casi di occlusione



TAB. 9: Prevalenza dell'occlusione venosa retinica nel Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) (da Cheung et al., 2008)

dell'arteria cilioretinica isolata o associata a trombosi venosa; nei casi in cui è associata ad otticopatia ischemica anteriore si dovrebbe indagare sulla possibilità che si tratti di un'arterite a cellule giganti.

Le occlusioni venose retiniche

Dal punto di vista anatomico si possono distinguere tre forme diverse di occlusioni venose: l'occlusione della vena centrale della retina (OVCR), l'occlusione di branca (OVRB) e l'emioclusione della vena centrale della retina (EOVCR). Quest'ultima viene distinta dalla OVCR anatomicamente poiché coinvolge soltanto l'emisfero retinico superiore o quello inferiore ed è pertanto considerata una variante patologica di questa forma, come dimostrerebbero i comuni fattori di rischio in questi due tipi di occlusioni (Appiah e Trempe, 1989 a,b). Responsabili della comparsa di questo quadro sarebbero o la variazione anatomica congenita della vena centrale con presenza di un duplice tronco oppure l'eventualità per cui la vena comincia ad occludersi a livello del disco ottico. L'eziologia delle occlusioni venose retiniche rimane ancora incerta. Ciononostante, numerosi sono stati i fattori di rischio, sia sistemici che

locali, presi in considerazione (isolatamente o in associazione tra loro) da numerosi Autori come possibili fattori coinvolti nello sviluppo di tale patologia (Klein et al., 2000; Wong et al., 2005; Chua et al., 2005). In passato diversi studi hanno indicato l'ipertensione e i cambiamenti arteriolari retinici ad essa conseguenti come i più importanti fattori di rischio per lo sviluppo di tale patologia (Mitchell et al., 1996; Klein et al., 2000; Wong et al., 2005; Cugati e Wang, 2006). Tuttavia sino ad oggi pochi studi hanno valutato l'associazione esistente tra questa patologia e quelli che possono essere considerati come i "nuovi" fattori di rischio cardiovascolare quali i biomarker dell'infiammazione (ad esempio la PCR), la disfunzione endoteliale (sICAM-1) o l'aterosclerosi subclinica (valutata tramite la misurazione dello spessore della parete della carotide e dal quantitativo di calcio). Uno studio di Cheung et al. del 2008 si è proposto come scopo quello di descrivere la prevalenza dell'occlusione venosa retinica in una popolazione multi-etnica costituita da bianchi, neri, ispanici e cinesi e di valutare la sua associazione con alcuni fattori di rischio cardiovascolari "tradizionali" quali la pressione arteriosa, il fumo, il diabete, la dislipidemia e "nuovi" quali per l'appunto l'infiammazione, le disfunzioni ematologiche o endoteliali e l'aterosclerosi subclinica. 6147 persone sono state dunque sottoposte a fotografie retiniche e alla valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari attraverso l'anamnesi, le indagini laboratoristiche e quelle strumentali.

L'occlusione venosa si è manifestata con una prevalenza del 1,1 % (0,9 % OVRB e 0,2 % OVCR) e senza particolari differenze tra le diverse etnie esaminate (Tab. 9). Questa patologia è risultata maggiormente e indipendentemente associata a fattori quali l'ipertensione (OR 2,06), l'anzianità (OR 1,34), l'ipertrigliceridemia (OR 1,98), le disfunzioni renali (OR 1,85), l'occlusione venosa in sede di incrocio artero-venoso (OR 4,01) e il

restringimento arteriolare focale (4,38). Non si sono invece evidenziate associazioni significative tra la stessa patologia e l'aterosclerosi o i marker dell'infiammazione nè con le disfunzioni endoteliali o quelle della coagulazione.

OCCLUSIONE DELLA VENA CENTRALE DELLA RETINA (OVCR) ED EMIOCCLUSIONE DELLA VENA CENTRALE DELLA RETINA (EOVCR)

EPIDEMIOLOGIA

Un ampio studio di popolazione in Israele ha indicato un'incidenza, nell'arco di quattro anni, di occlusione della vena centrale della retina di 2,14 casi per 1000 individui di età superiore ai 40 anni e di 5,36 casi per 1000 individui oltre i 64 anni. In Australia, nel "The Blue Mountains Eye Study" (Mitchell et al., 1996), la prevalenza di occlusione venosa centrale ha oscillato tra il 7‰ negli individui tra i 49 e 60 anni e il 46 ‰ in quelli oltre gli 80 anni. Dunque, l'età rappresenta uno dei più importanti fattori predisponenti. Non sono note, per l'occlusione della vena centrale della retina, particolari predisposizioni etniche, mentre è nota una certa maggiore incidenza nel sesso maschile, con oltre il 90 % dei casi diagnosticato dopo i 50 anni. Il rischio di recidiva occlusiva è stimato nel 2,5% per la retina ipsilaterale e nel 11,9% per quella controlaterale.

CLASSIFICAZIONE CLINICA

E' di Hayreh la classificazione clinica delle occlusioni venose, in cui vengono distinte nella OVCR e nella EOVCR una forma lieve, *non ischemica* (75% dei casi), da stasi venosa, e una forma grave, *ischemica* (25% dei casi), definita *emorragica* in cui sono possibili gravi complicanze neovascolari (glaucoma neovascolare, rubeosis iridis, neovascolarizzazione retinica e della papilla) che rendono la prognosi di questa forma più infau-
sta della prima (Hayreh, 1976; 1983; Hayreh et

al., 1983). Una classificazione più recente è stata proposta dal Central Vein Occlusion Study Group (CVOS): una forma *perfusa* (*perfused*) se alla fluorangiografia risultano aree retiniche non perfuse con estensione minore di dieci diametri papillari, una forma *non perfusa* (*nonperfused*) se l'estensione supera i dieci diametri papillari e una forma *indeterminata* nel caso in cui le emorragie intraretiniche non consentano una valutazione angiografica (The Central Vein Occlusion Study Group, 1993).

FISIOPATOLOGIA

I meccanismi fisiopatologici proposti che più frequentemente provocherebbero l'occlusione della vena centrale sono la stasi venosa conseguente a compressione esterna sulla parete vasale a livello della lamina cribrosa, l'alterazione infiammatoria o degenerativa primitiva della parete vasale e, infine, la formazione di trombi (Klien e Olwin, 1956; Klein, 1966).

Il fenomeno trombotico, come per la compressione, avverrebbe con maggior frequenza a livello della lamina cribrosa, dove la conformazione anatomica e lo stretto contatto con l'arteria centrale aumenterebbero la turbolenza del flusso ematico. Secondo Green la formazione dei trombi rappresenta la principale causa delle OVCR (Green, 1985).

La possibile causa infiammatoria delle OVCR si verifica, secondo alcuni Autori, con maggior frequenza nei giovani con patologie del connettivo; resta, comunque da chiarire il meccanismo eziopatologico dell'infiammazione nel causare l'occlusione (Quinlan et al., 1990; Walters e Spalton, 1990); la malattia infiammatoria potrebbe provocarla attraverso un'endoflebite con infiltrazione linfocitaria della parete venosa, come in caso di TBC o sifilide (Ballantatyne e Michaelson, 1947).

La degenerazione della parete venosa, caratterizzata da una proliferazione intramurale e da un distacco dell'endotelio, potrebbe essere favorita da

alcuni fattori di rischio come l'ipertensione arteriosa e il diabete mellito. L'aumento di spessore e la sclerosi dell'arteria centrale della retina indotte dall'ipertensione, faciliterebbero la formazione di trombi, la cui presenza nell'area della lamina cribrosa è stata confermata da studi istopatologici, condotti su occhi enucleati precedentemente colpiti da occlusione della vena centrale (Green et al., 1981). In diversi studi è stata segnalata una prevalenza del 60% di ipertensione arteriosa nella OVCR (McGrath et al., 1978; Zegarra et al., 1979; Quinlan et al., 1990). Elman et al. nel 1990 hanno osservato nella loro ricerca che il 45% dei pazienti affetti da OVCR aveva una storia positiva per ipertensione sistemica contro il 35% del gruppo di controllo.

Dati meno significativi sono stati ottenuti confrontando la prevalenza del diabete nei diversi gruppi (Elman et al., 1990); comunque, il diabete avrebbe un ruolo importante nel favorire la formazione dell'occlusione, come indicato da altri Autori, seppure con dati di prevalenza differenti (McGrath et al., 1978; Zegarra et al., 1979; Zegarra et al., 1983). Inoltre, è stato segnalato come i soggetti trattati con insulina o antidiabetici orali abbiano un rischio doppio di sviluppare una OVCR rispetto ai soggetti non trattati (Green et al., 1981).

Anche i cambiamenti emodinamici osservati in molte patologie sistemiche costituiscono importanti fattori di rischio nelle occlusioni venose, principalmente di tipo ischemico, come l'insufficienza cardiaca, l'enfisema polmonare, le malattie febbrili debilitanti, gli stati di shock, le disprotidemie e l'aumento della viscosità ematica che si osserva nella policitemia, nella leucemia, nella talassemia e nella macroglobulinemia di Waldenstrom (McGrath et al., 1978; Ring et al., 1976; Dodson et al., 1982; Trope et al., 1983); in particolare, è stato evidenziato un aumento dell'indice di eritrosedimentazione nelle donne (The Eye

Disease Case-Control Study Group, 1996) ed un aumento statisticamente significativo dell'emato-crito e della viscosità del plasma in entrambe le forme di OVCR (Arend et al., 1996). Un aumento della viscosità ematica è stato osservato anche dopo uso di contraccettivi orali, infatti, un altro fattore di rischio correlato all'età è rappresentato dalla produzione degli estrogeni. Essi infatti, nelle giovani donne aumentano il rischio di malattie tromboemboliche e quindi anche di OVCR mentre nelle donne in menopausa riducono il rischio di trombosi del 70% (Davidson, 1976; Stowe et al., 1978; McGrath et al., 1978).

I farmaci antiandrogeni (estroprogestinici) favorirebbero l'occlusione della vena centrale mediante tre meccanismi d'azione: l'aumento dell'aggregabilità piastrinica, l'alterazione del sistema fibrinolitico e l'iperplasia dell'endotelio vasale (Zaoui et al., 2000).

Altro dato di riscontro è il significativo aumento del livello di endotelina-1 (ET-1) nel plasma dei pazienti con OVCR rispetto al gruppo di controllo; questo peptide vasoattivo svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del flusso ematico retinico inducendo una vasocostrizione. Tale incremento è risultato particolarmente significativo nella forma ischemica (Iannaccone et al., 1998). Come noto anche la riduzione della concentrazione locale di monossido di azoto (NO) provoca una vasocostrizione arteriolare, evento secondario che si verifica rapidamente dopo un'occlusione di branca nell'area di non perfusione.

Disturbi dell'emostasi (funzione piastrinica e coagulazione) possono essere collegati a deficit della proteina C o della proteina S, resistenza alla proteina C attivata, anormalità della -tromboglobulina ed altre anormalità della funzione piastrinica. La proteina C, una proteasi serinica vitamina K dipendente, e la proteina S, un cofattore della proteina C attivata, inibiscono la cascata coagulativa e la formazione del coagulo partecipando alla degra-

dazione dei fattori V e VIII attivati (Va e VIIIa). I deficit congeniti (autosomici dominanti) di questi fattori, insieme a quelli dell'antitrombina III (AT III), sono i deficit più frequenti tra pazienti con OVCR e rispettivamente 2,5-4% e 1-5%.

Anche la possibile relazione fra resistenza alla proteina C attivata (APCR), quasi sempre legata ad una mutazione puntiforme (un solo aminoacido) del fattore V di Leiden e OVCR in giovani adulti è stata oggetto di studio; tale resistenza nei pazienti colpiti da OVCR sarebbe risultata solo nel 4,7% del gruppo esaminato (Gottlieb et al., 1998), discostandosi da quanto precedentemente descritto da altri Autori, i quali riportavano percentuali maggiori, fino al 36%, in pazienti di età inferiore a 45 anni (Doothe et al., 1995; Ie et al., 1995; Larsson et al., 1996). La resistenza della proteina C nella popolazione generale è del 2-7%.

Il deficit familiare di AT III, una proteasi serinica α_2 glicoproteica, inibitrice della trombina e dei fattori della coagulazione attivati IXa, Xa, XIa e XIIa, è presente nel 2-3% dei pazienti giovani con OVCR. Livelli circolanti elevati di -tromboglobulina e fattore IV piastrinico, proteine specifiche degli granuli delle piastrine, vengono rilevati significativamente aumentati rispetto ai controlli. Queste proteine sono rilasciate nel plasma durante l'aggregazione piastrinica e rappresentano un marker di esaltata attivazione piastrinica in vivo in soggetti con OVCR, anche se risultano aumentate in soggetti iperlipidemici e diabetici.

Un'altra possibile associazione è stata indicata nei giovani adulti con OVCR bilaterale e una ridotta attività dell'enzima 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi; tale deficit provoca un moderato aumento della omocisteina nel sangue con un conseguente effetto tossico sull'endotelio vasale (Loewenstein et al., 1997). Nei pazienti di età inferiore ai 50 anni con occlusione arteriosa o venosa, l'incidenza dell'iperomocisteinemia è del 21% dei casi. E' stata riscontrata inoltre, una ridotta

attività dell'enzima cistationina- -sintetasi (stima della prevalenza 1,4% della popolazione generale). Tale condizione, autosomica recessiva, predispone alle occlusioni venose ed alle arteriopatie aterosclerotiche, già in giovane età.

Particolare interesse è stato rivolto al possibile coinvolgimento della sindrome da anticorpi antifosfolipidi nel provocare occlusioni vascolari retiniche; questa sindrome, individuata nel 1987, è caratterizzata dalla presenza di anticorpi anticardiolipina e/o di un anticoagulante circolante di tipo antiprotrombinasi e dal riscontro clinico di trombosi arteriose o venose e/o aborti spontanei ripetuti. Comunque il riscontro di questi anticorpi è stato riscontrato solo nel 5% delle occlusioni venose retiniche, quindi potrebbe agire come fattore supplementare favorente l'insorgenza associata agli altri fattori di rischio (Glacet et al., 1984). L'iperlipoproteinemia favorisce la trombogenesi inibendo l'attivazione del plasminogeno a plasmina ed interferendo così con i controlli della produzione intravascolare di trombina. Tale condizione è presente nel 30% dei pazienti, spesso associata ad attivazione accelerata del fattore VII ed ad elevati livelli circolanti di fibrinogeno o inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI).

Altri Autori hanno osservato l'insorgenza di una OVCR di tipo ischemico in alcune patologie neurologiche quali il glioma del nervo ottico, in casi di papilledema per compressione della vena centrale della retina da parte della testa del nervo ottico, di neurite ottica, nella sindrome della sella vuota maggiormente associata alla forma non ischemica, secondo un meccanismo tuttora sconosciuto (Howland e Ellis, 1966; Galvin e Sander, 1980; Duker et al., 1989; Battaglia et al., 1995). La patologia oculare maggiormente implicata nell'insorgenza della OVCR è il glaucoma cronico semplice che si presenta con una prevalenza percentuale che varia a secondo degli Autori dall'11 al 42-43% (Braendstrup, 1952; Vannas e Tarkka-

Patologie oculari :
<ul style="list-style-type: none">• Glaucoma primario ad angolo aperto o ad angolo chiuso• Anormalità anatomiche ("drusen" del nervo ottico)• Malformazioni arterovenose congenite della retina
Patologie sistemiche vascolari:
<ul style="list-style-type: none">• Ipertensione• Diabete mellito• Fattori predisponenti a malattie cardiovascolari (iperlipoproteinemia familiare di tipo II, iperlipoproteinemia, omocistinuria eterozigote con iperomocisteinemia)• Condizioni di ipercoagulabilità secondarie a patologie sistemiche (AIDS, neoplasie maligne, soprattutto cancro polmonare)
Discrasie ematiche:
<ul style="list-style-type: none">• Sindromi da iperviscosità : policitemia vera, trombocitemia essenziale, leucemie e linfomi, paraproteinemie e disproteinemie (mieloma multiplo, crioglobulinemie)
Disturbi dell'emostasi (funzione piastrinica e coagulazione):
<ul style="list-style-type: none">• Deficit della proteina C o della proteina S, resistenza alla proteina C attivata, anomalie della tromboglobulina e altre anomalie della funzione piastrinica
Lupus anticoagulante
Anticorpi anticardiolipinici
<ul style="list-style-type: none">• Anti-proteina C• Anti- proteina S• Anti- trombina III (AT III)
Vasculiti e malattie autoimmuni:
<ul style="list-style-type: none">• Sifilide• Sarcoidosi
Lupus eritematoso sistemico e altre collagenopatie autoimmuni
Ipercoagulabilità secondaria all'impiego di anticontraccettivi orali
Altre condizioni talora associate a ipercoagulabilità secondaria :
<ul style="list-style-type: none">• Traumi cranici chiusi

TAB.10:

Condizioni oculari e sistemiche che possono associarsi ad occlusione della vena centrale della retina

nen, 1960; Bertelsen, 1961; Dreyden, 1965). In uno studio del 1997 è stata riscontrata un'incidenza del 4.2% delle occlusioni venose retiniche in pazienti affetti da glaucoma, risultando così 7 volte maggiore rispetto alla popolazione generale; la più alta incidenza è stata individuata fra i pazienti con glaucoma cronico semplice (Hirota et al., 1997). L'ipertono oculare modificherebbe l'emodinamica della vena centrale della retina nel passaggio attraverso la lamina cribrosa con possibili alterazioni endoteliali della parete vasale (Ap-

piah, 1989; Sanborn et al., 1994). Secondo altri, invece, la distorsione della lamina cribrosa con le conseguenti modifiche circolatorie sarebbe imputabile ad un elevato rapporto cup/disk (> 0.5) riscontrato in 14 dei 18 pazienti glaucomatosi colpiti da occlusione venosa (Hirota et al., 1997). Anche la sindrome pseudoesfoliativa può essere considerata un fattore di rischio per la OVCR e la OVRB come dimostra uno studio in cui è stata riscontrata una prevalenza del 6.9% nel primo tipo di occlusione e del 6% nel secondo tipo.

Gli stessi Autori hanno inoltre evidenziato la presenza di altre forme di glaucoma nel 27% dei pazienti con OVCR e nel 20% di quelli colpiti da occlusione di branca (Cursiefen et al., 1997).

In antitesi a quanto detto finora esisterebbero, invece, fattori che svolgerebbero un ruolo protettivo nei confronti di questa patologia come l'esercizio fisico e un moderato consumo di alcool (The Eye Disease Case-Control Study Group, 1996); un alto livello di colesterolo HDL ridurrebbe il rischio nei confronti delle OVRB (The Eye Disease Case-Control Study Group, 1998), mentre un aumento dei valori delle lipoproteine a bassa densità (LDL) è stato osservato sia nella OVCR che nella OVRB rispetto ai gruppi di controllo, anche se non è stata dimostrata una correlazione fra alti livelli di questa lipoproteina e forme gravi di occlusioni (Ribeauudeau-Saindelle et al., 1998). In conclusione, possiamo affermare come l'eziopatogenesi di queste forme sia multifattoriale (Tab. 10) e che in presenza di un soggetto colpito da occlusione venosa bisogna intervenire terapeutamente il più rapidamente possibile e in modo specifico così da salvaguardare la funzione visiva gravemente compromessa.

DIAGNOSI CLINICA

Il *quadro oftalmoscopico* delle due forme appare diverso, mostrando nella forma non perfusa vaste emorragie che infarciscono tutta la retina con numerosi essudati cotonosi ed in quella perfusa, invece, un aspetto meno grave con emorragie superficiali puntiformi e a fiamma maggiormente evidenti al polo posteriore (Fig. 32).

Quindi, rispetto a quelle ischemiche, le forme non ischemiche sono più benigne per l'assenza di rischio neovascolare nel segmento anteriore, se non in caso di pre-esistente ischemia oculare o di retinopatia diabetica.

Le *forme non ischemiche* possono presentarsi con visus ben conservato, anche se in un 40% dei casi

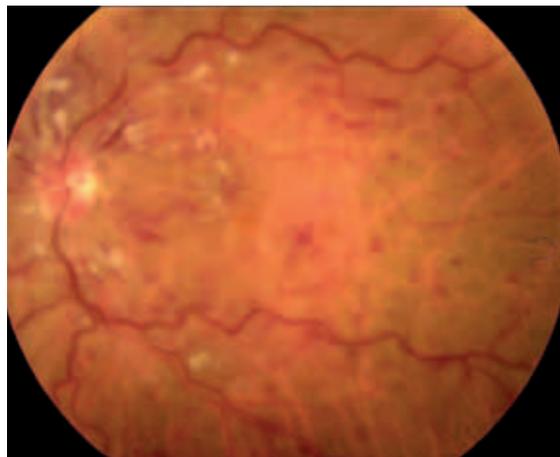


Fig. 32: Occlusione della vena centrale della retina

l'acuità visiva può ridursi ad 1/10 o anche più, scarsi noduli cotonosi (segno di modesta ischemia retinica) e non frequenti emorragie retiniche e assenza di disturbi pupillari afferenti. L'evoluzione è variabile: circa un 10% dei casi va verso il recupero della visione senza ulteriori complicazioni; un 30% dei casi va verso una forma ischemica entro 6-12 mesi, specie nei soggetti anziani. Un'ulteriore percentuale dei casi presenta, come complicanza, l'edema maculare cronico con o senza essudati (evoluzione della degenerazione maculare cistoidale), responsabile di scotomi centrali permanenti, l'atrofia ottica, la modifica di pigmentazione della macula e i fori maculari.

Le *occlusioni della vena centrale della retina di tipo ischemico* evidenziano una elevata incidenza di neovascolarizzazioni (espressione dei fattori di crescita), di solito nel segmento anteriore (iride, angolo con o senza glaucoma neovascolare, 8-10% di tutte le forme di occlusione) e soprattutto nei primi mesi dopo la diagnosi. Meno frequentemente avremo come sede di neovascolarizzazione il disco ottico e la retina.

Le *forme ischemiche*, direttamente diagnosticate come tali, piuttosto che come evoluzione di precedenti forme non ischemiche, provocano gravi

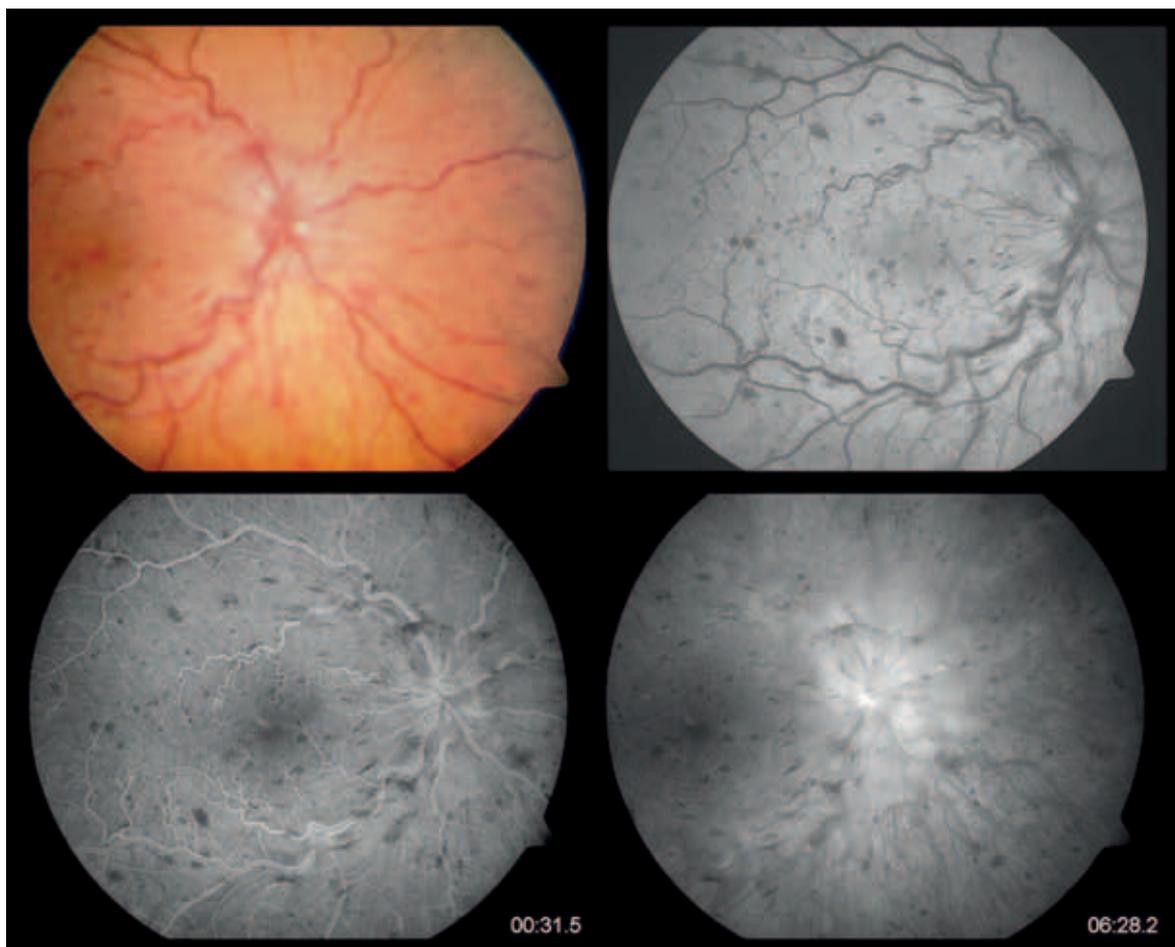


Fig. 33: Quadro fluorangiografico di un'occlusione della vena centrale della retina.

perdite dell'acuità visiva (inferiore ad 1/10) in oltre il 90 % dei casi, il visus può infatti ridursi alla sola percezione della luce con scotoma centrale e assoluto e difetti alla perimetria di Goldmann. Delle tre isoptere I-2, I-4 e V-4, la percezione di I-4 e V-4 è variabile, mentre non è mai apprezzata la I-2. Nelle forme non ischemiche, di contro, la perimetria periferica è normale con I-4 e V-4 e in ogni caso l'isoptera I-2 è visibile. Un altro aspetto, relativo a queste forme, è la presenza di disturbi pupillari afferenti con immediata midriasi paradossa e gravi alterazioni elettroretinografiche. L'ERG appare essere una delle tecniche

più specifiche e sensibili per la diagnosi di questa patologia. In associazione alla ricerca del difetto pupillare afferente relativo, è in grado di discriminare tra forme ischemiche e non ischemiche nel 97% dei casi, considerando che le onde "a" e "b" sono generate rispettivamente dalla retina esterna ed interna, ed è quest'ultima a ridursi nelle forme ischemiche.

Non ultimo, all'esame del fondo oculare va ricercata la presenza di shunt ottico-ciliari sulla papilla, che se presenti, sono un ottimo segno prognostico, indice di una efficace circolazione compensatoria tra vasi retinici e coroideali.

ANGIOGRAFIA RETINICA

Nelle occlusioni venose la fluorangiografia riveste indubbiamente un ruolo fondamentale nel confermare la diagnosi clinica, fornendo, inoltre, informazioni necessarie per una precisa classificazione e valutazione della gravità del caso con possibilità di prevedere un'evoluzione verso complicanze neovascolari e il conseguente esito funzionale.

Il tipico aspetto delle OVCR mette in evidenza un ritardo della perfusione venosa, conseguenza di un tempo di transito artero-venoso rallentato; caratteristici della forma ischemica sono i territori di non perfusione capillare retinica, evidenziabili come aree ipofluorescenti (Fig. 33). Ricordiamo come a volte la reale estensione delle aree ischemiche possa essere nascosta dalle imponenti emorragie preretiche (effetto maschera).

L'evidente modifica del calibro vasale e l'aumento della permeabilità sono comuni, invece, a entrambe le forme di OVCR. La diffusione del colorante (fluoresceina) dai capillari con fenomeno conseguente di iperfluorescenza tardiva, espressione angiografica dell'edema retinico, assume al polo posteriore il caratteristico aspetto a "petalo di fiore" dell'edema maculare cistoide (EMC). La dilatazione dei vasi epipapillari rendono ragione della iperfluorescenza della papilla nelle fasi tardive.

DECORSO CLINICO

La possibile evoluzione della forma non ischemica in quella ischemica (Magargal et al., 1982), secondo il CVOS, si verificherebbe nel 33 % dei casi entro tre anni dall'episodio occlusivo (The Central Vein Occlusion Study Group, 1997) e la progressione dell'area ischemica e la comparsa delle altre complicanze si presenterebbe con maggiore frequenza verso il quarto mese (The Central Vein Occlusion Study Group, 1993). E' proprio al fine di ridurre la percentuale delle complicanze che il CVOS e altri Autori hanno sottolineato l'importanza di eseguire un attento esame gonioscopico dell'angolo per

escludere la presenza di neovasi, avendo dimostrato che questi possono presentarsi anche in assenza di neovascolarizzazione della papilla (The Central Vein Occlusion Study Group, 1995; Browning et al., 1998). Il trattamento laser panfotocoagulativo induce una regressione della neovascolarizzazione angolare in una percentuale compresa fra il 23 ed il 60% e riduce anche la possibile evoluzione in un glaucoma neovascolare (The Central Vein Occlusion Study Group, 1995; Magargal et al., 1981;1982; Evans et al., 1993; Brooks e Gillies, 1990), complicanza che si verifica nel 40-60% dei pazienti con OVCR non trattati (Magargal et al., 1981; 1982; Hayreh et al., 1983).

La neovascolarizzazione conseguente all'ischemia sarebbe stimolata da un mediatore angiogenico, il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) prodotto dalle cellule della retina neurosensoriale presenti nell'area non perfusa, che in stato ipossico indurrebbe la proliferazione di specifiche cellule endoteliali (Pe'er et al., 1998).

In presenza di un tessuto compromesso, anche il fattore di crescita fibroblastico (bFGF) che viene rilasciato può giocare un ruolo nella modificazione patologica, inducendo una proliferazione di cellule endoteliali. I risultati ottenuti in uno studio sperimentale suggeriscono che esista un sistema di regolazione tra il VEGF e il bFGF (Hartnett et al., 1999).

OCCLUSIONE VENOSA RETINICA DI BRANCA (OVRB)

FISIOPATOLOGIA

Così come nelle OVCR anche nelle occlusioni di branca il trombo è considerato il primum movens del danno, comparando di contro, più frequentemente a livello degli incroci artero-venosi (Frangieh et al., 1982); nonostante sia stato dimostrato istologicamente che a questi livelli non ci sia un reale schiacciamento dell'arteria sulla vena (Seitz, 1964). L'ipertensione arteriosa rappresenta un importante fattore di rischio e infatti secondo

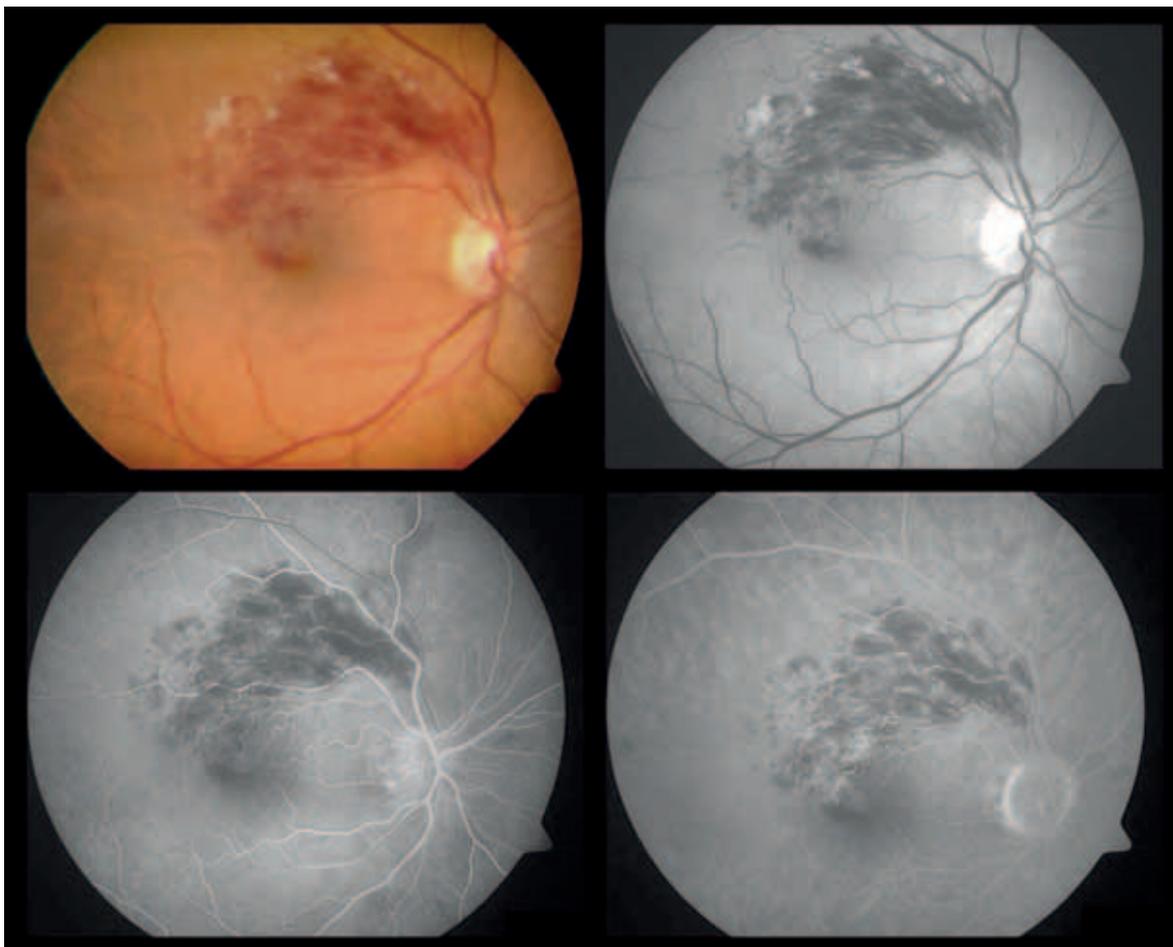


Fig. 34: Quadro fluorangiografico di un'occlusione venosa retinica di branca

uno studio del Eye Disease Case-Control Study Group (The Eye Disease Case-Control Study Group, 1996), avrebbe una prevalenza maggiore nelle occlusioni di branca rispetto alla OVCR, confermando quanto già evidenziava Appiah in due casi controllo (Appiah e Trente, 1989; Appiah e Greenidge, 1987); l'ipertensione arteriolare agirebbe a livello degli incroci artero-venosi, sede più frequente, come abbiamo detto, della formazione dei trombi.

L'età media dei pazienti colpiti da questa forma è maggiore di quella riscontrata nella OVCR.

La possibile influenza di altri fattori di rischio come glaucoma, lipoproteine plasmatiche e iper-

viscosità ematica è stata affrontata nel paragrafo della OVCR.

DIAGNOSI CLINICA

Il quadro funzionale in questa forma è molto variabile, potendo riscontrare un'acuità visiva piena fino ad un suo marcato deterioramento; è raro un visus di motu manu. Questa variabilità è giustificata dal fatto che diversi distretti retinici possono essere colpiti; ovviamente, maggiore sarà l'interessamento del polo posteriore minore sarà il visus residuo. Il territorio di drenaggio della branca occlusa presenta le caratteristiche emorragie superficiali e profonde, essudati cotonosi, edema retini-

co e marcata dilatazione e tortuosità delle vene a monte dell'occlusione (Fig. 34).

Quindi, il decorso clinico delle occlusioni di branca varia notevolmente in funzione della grandezza e della localizzazione della vena colpita con differenti conseguenze funzionali, che risultano essere tanto più gravi quanto più l'occlusione è vicina alla papilla ottica.

ANGIOGRAFIA RETINICA

Ovviamente anche nelle occlusioni di branca questo esame assume importanza decisiva al fine di individuare con precisione tutta l'area coinvolta ed indicare la possibile evoluzione verso complicanze neovascolari, valutando l'estensione delle aree ischemiche presenti (Fig 34).

Il ritardo del riempimento venoso a monte dell'occlusione rispetto ai distretti normalmente perfusi è il reperto normalmente evidenziabile nelle OVRB; la porzione di retina drenata dalla vena occlusa risulterà ovviamente edematosa, coinvolgendo in alcuni casi l'area maculare (EMC).

TRATTAMENTO DELLE OCCLUSIONI VENOSE RETINICHE

Il trattamento delle occlusioni venose, particolarmente difficile e controverso, deve essere considerato sempre un'urgenza e mirato a preservare il massimo della acuità visiva del paziente colpito. Molto si è discusso sulla efficacia della terapia medica, di quella parachirurgica con argon laser e di quella chirurgica.

TERAPIA MEDICA

La terapia sistemica con *fibrinolitici* (urochinasi, streptochinasi) pur evidenziando risultati interessanti deve essere intrapresa con molte precauzioni per le possibili complicazioni generali e la comparsa di massive emorragie vitreali.

I farmaci *antiaggreganti* si sono dimostrati utili nella gestione delle OVCR nei pazienti con au-

mento dell'aggregazione piastrinica, diabetici e iperlipidemici (Dodson et al., 1983).

Altri pazienti colpiti da occlusione venosa possono essere trattati con *anticoagulanti*: eparina, nella fase acuta, e coumadin, a scopo profilattico; l'uso di questi farmaci è indicato nei soggetti con valori normali di antitrombina III, dato che l'eparina agisce solo in presenza di questo fattore, potenziandone il meccanismo inibitorio sulla coagulazione (Ririe et al., 1979; Nachman e Silverstein, 1993). Nella pratica clinica sono molto utilizzate le eparine a basso peso molecolare che presentano un effetto anticoagulante uguale all'eparina non frazionata con un rischio emorragico probabilmente minore, una migliore biodisponibilità e un tempo di dimezzamento più lungo.

Come per i farmaci fibrinolitici, anche il coumadin può causare un aumento delle emorragie retiniche e vitreali.

Secondo Hayreh i farmaci anticoagulanti e antiaggreganti sono controindicati nella OVCR perché non solo non hanno un valore terapeutico, ma sarebbero decisamente dannosi (Hayreh, 1999).

Alcuni studi hanno suggerito che l'uso dell'*emodiluizione* sia utile nell'OVCR non ischemica nel miglioramento dell'acuità visiva, basandosi sull'assunto che i pazienti con occlusioni venose hanno un aumento della viscosità ematica. Nella forma ischemica questa terapia avrebbe risultati contraddittori (Hansen et al., 1989; Wolf et al., 1994).

La causa primaria di diminuzione dell'acuità visiva nella OVCR non ischemica è l'edema maculare. Per questo motivo in un gruppo ristretto, ma definito di pazienti si è rivelato utile il trattamento con *terapia steroidea sistemica*, con risoluzione dell'edema maculare e miglioramento del visus durante la terapia. Questo trattamento può rivelarsi particolarmente utile nei pazienti giovani, in cui l'eziopatogenesi infiammatoria è la più frequente (Hayreh, 1999).

L'OVCR è dunque tra le principali cause di edema maculare insieme alla retinopatia diabetica e

alle uveiti croniche. Per far fronte a queste problematiche è oggi disponibile la *terapia steroidea intravitreale con desametasone (ozurdex)*. Questo farmaco, che ha mostrato potenti capacità antiangiogenetiche, esplica un'azione diretta sulle cellule endoteliali e un'azione indiretta di inibizione della migrazione e attivazione dei macrofagi, dei mastociti e di altre cellule infiammatorie che rilasciano fattori di crescita angiogenici. Inibisce inoltre il ricambio della matrice extracellulare vascolare con conseguente alterazione endoteliale e morte cellulare. Quanto all'effetto sull'edema maculare, in realtà, al di là delle prove cliniche il meccanismo d'azione è al momento solo ipotizzato. Conosciamo l'effetto antinfiammatorio degli steroidi che interferiscono con la cascata dell'acido arachidonico, i cui prodotti (prostaglandine) sono responsabili della rottura della barriera ematoretinica interna. Questa azione può spiegare l'efficacia del farmaco nell'EMC postchirurgico e postuveitico. Per gli altri casi sono due le ipotesi: che lo steroide riduca la permeabilità capillare retinica migliorando l'efficacia o aumentando il numero delle tight junctions endoteliali, oppure che inibisca la via metabolica del VEGF, responsabile di un'azione pro-edemigena e pro-neovascolare. L'unico rischio reale, a parte un ipertono che in poco tempo si risolve, è l'endoftealmite settica, molto pericolosa a causa della natura del vitreo (che costituisce un ottimo supporto e nutrimento per molte specie batteriche) e della difficoltà di penetrazione endovitrea di molti farmaci antibiotici. La migliore terapia dell'endoftealmite settica rimane dunque la prevenzione, che viene eseguita sia mediante antibiotico-terapia sistemica e locale che mediante una accurata preparazione del campo sterile, motivo per cui le somministrazioni del farmaco vengono eseguite esclusivamente in camera operatoria.

Nel caso la problematica della occlusione venosa possa indurre una neoangiogenesi, allora si pre-

vedono anche dei farmaci *anti-VEGF intravitreali* (il più utilizzato ad è sono il Ranibizumab). Come detto in precedenza, infatti, il VEGF è uno dei più importanti promotori dell'angiogenesi e dell'edema: induce le cellule endoteliali a lisare la membrana basale, a migrare e a riprodursi. La sua secrezione da parte dell'epitelio pigmentato retinico è inoltre stimolata dalle cellule infiammatorie quali i macrofagi richiamati nella sede della lesione. Si viene pertanto a determinare un circolo vizioso. Molti trials clinici hanno dimostrato il reale beneficio clinico della terapia anti-angiogenica che, attraverso l'inibizione dei VEGF, blocca la genesi neovascolare della patologia e tende a far regredire i nevasi e l'edema maculare con conseguente miglioramento del quadro clinico e sintomatologico.

L'edema maculare refrattario è una forma di edema che non risponde adeguatamente alle terapie normalmente in uso, con perdita dell'acuità visiva. Può verificarsi in condizioni quali l'occlusione della vena centrale retinica, la retinopatia diabetica o dopo impianto di lente intraoculare (IOL). In assenza di terapia efficace, la perdita di visione può progredire e divenire permanente. La terapia intravitreale con farmaci anti-VEGF (Pegaptanib sodico e Ranibizumab) si sta rivelando molto efficace anche nel ridurre le raccolte di liquido sottoretinico che si formano in seguito a fenomeni ischemici come le trombosi. Per lo stesso motivo vengono utilizzati anche nella retinopatia diabetica, per contrastare l'edema maculare.

Il *pegaptanib sodico* è un aptamero, vale a dire un piccolo frammento di RNA sintetico, con conformazione tridimensionale e altamente specifica, che legandosi al VEGF₁₆₅, l'isoforma di VEGF più implicata nella neovascolarizzazione sottoretinica, le impedisce il legame con il proprio recettore e la conseguente formazione di vasi anomali e l'aumento della permeabilità vascolare. Pertanto questo farmaco potrebbe essere usato in tutte quelle

malattie caratterizzate da crescita anomala di vasi e aumentata permeabilità vascolare come ad esempio la AMD, la retinopatia diabetica, le occlusioni venose retiniche e i tumori. Gli aptameri hanno il vantaggio di non stimolare di solito la risposta immunologica.

Il *ranibizumab* è un frammento anticorpale che lega e blocca tutte le forme di VEGF-A (VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₁₀) nello spazio extracellulare. Rispetto al bevacizumab (vedi avanti) è una molecola più piccola che ha delle proprietà peculiari quali il piccolo raggio e il minor peso molecolare (48 kD) che giustificano la maggior capacità di penetrare tutti gli strati della retina e quindi di diffondere nello spazio sottoretinico dopo somministrazione intravitreale.

Il *bevacizumab* è un anticorpo monoclonale murino umanizzato anti VEGF-A (prodotto tramite la tecnica del DNA ricombinante), come il ranibizumab, con elevata attività antiangiogenica e anti-edemigena, nato in terapia oncologica per contrastare lo sviluppo di neovascolarizzazioni patologiche nel carcinoma metastatizzato del colon-retto; gli effetti collaterali sono riferiti pressoché esclusivamente all'utilizzo sistemico: ipertensione arteriosa, proteinuria, tromboembolia arteriosa, ritardo della cicatrizzazione delle ferite, eventi emorragici, perforazioni gastrointestinali. L'utilizzo intraoculare, che è off-label e non è rimborsabile dal servizio sanitario nazionale, prevede dosi bassissime e una distribuzione sistemica quasi insignificante, pertanto il rischio di queste complicanze nell'uso intraoculare è assolutamente basso, ma presente, per cui comunque vengono attualmente esclusi dal trattamento, per prudenza, pazienti particolarmente a rischio per patologie sistemiche di natura ischemica. Nel 2009, Jaissle et al. hanno condotto uno studio al fine di valutare l'efficacia del trattamento intravitreale a lungo termine con bevacizumab in occhi con edema maculare riconducibile ad occlusione venosa retinica di branca (OVRB). 23 occhi non

precedentemente trattati sono stati sottoposti ad iniezioni intravitreali di bevacizumab 1,25 mg e seguiti per 1 anno. I parametri presi in considerazione sono l'acuità visiva (AV) e lo spessore centrale retinico (CRT). Dallo studio è emerso un aumento dell'AV media di circa 3.0 linee rispetto ai valori basali a 48 settimane, accompagnato da un decremento del 39 % del CRT medio. Il numero medio di nuove iniezioni nei primi 6 mesi di follow up è stato di 1,6 e solo di 0,8 nei 6 mesi successivi. Dunque, iniezioni intravitreali ripetute di bevacizumab mostrano un significativo beneficio in termini di AV e di CRT. Inoltre, il numero di iniezioni necessarie al fine di mantenere tale effetto si riduce progressivamente nel corso del tempo. Tuttavia, tale trattamento si dimostra solo leggermente più efficace rispetto alla fotocoagulazione laser.

TERAPIA PARACHIRURGICA

Una intensa *fotocoagulazione laser* al fine di creare una anastomosi corioretinica è stata tentata da alcuni Autori per superare l'occlusione e facilitare il deflusso venoso. Tale trattamento viene indicato in quei pazienti in cui sia presente una progressiva perdita del visus e la tendenza alla trasformazione dalla forma non ischemica in quella ischemica; il trattamento delle forme non perfuse è sconsigliato (McAllister e Constable, 1995).

TERAPIA CHIRURGICA

Buoni risultati sono stati ottenuti da alcuni Autori nelle OVRB dopo *incisione della guaina comune* fra arteria e vena e decompressione di quest'ultima con miglioramento del visus a otto mesi dopo risoluzione dell'edema maculare e delle emorragie (Osterloh e Charles, 1988; Opremack e Bruce, 1999).

Interessante, a nostro parere, risulta la proposta di Donati et al. di somministrare localmente con microiniezione preretinica *sostanze capaci di liberare monossido di azoto*, come il nitroprussiato di sodio, nelle ore successive all'occlusione al fine di contri-

buire al ripristino del diametro arteriolare con conseguente miglioramento del flusso e dell'ossigenazione dell'area ischemica (Donati et al., 1998).

Un'altra tecnica chirurgica è stata proposta per il trattamento delle OVCR: l'incannulamento con *iniezione dell'attivatore del plasminogeno tissutale (rt-PA)* in una branca peripapillare della vena centrale retinica, dopo vitrectomia, in pazienti con severa compromissione dell'acuità visiva (Weiss, 2000). I risultati di questa tecnica devono essere studiati ed ampliati, visto il numero esiguo di pazienti trattati (otto); resta inoltre da stabilire, come riportato dagli Autori, il tempo più idoneo per ripristinare la perfusione al fine di ottenere il miglior recupero funzionale con minori complicazioni. Anche in questa tecnica la complicanza principale è rappresentata dalle emorragie conseguenti all'incannulazione.

GESTIONE DELLE COMPLICANZE

Come anticipato, le comuni complicanze delle occlusioni venose sono l'edema maculare cistoide (EMC) e la neovascolarizzazione (glaucoma neovascolare, rubeosis iridis, neovascolarizzazione retinica e della papilla).

Il *trattamento laser fotocoagulativo a griglia nell'edema maculare* non migliora l'acuità visiva nei pazienti trattati, secondo il CVOS, pur migliorando il quadro angiografico; i dati ottenuti dallo studio consiglierebbero questo trattamento nei pazienti con età inferiore ai 65 anni (The Central Vein Occlusion Study Group, 1995). Il trattamento a griglia nella OVRB provoca un incremento dell'ossigenazione retinica con vasocostrizione, abbassamento della pressione intravasale e conseguente riduzione dell'edema maculare (Arnarsson e Stefansson, 2000).

Il CVOS raccomanda, inoltre, un rapido *trattamento laser panretinico* al primo riscontro di neovascolarizzazione iridea e/o angolare (importanza della gonioscopia) al fine di impedire un suo

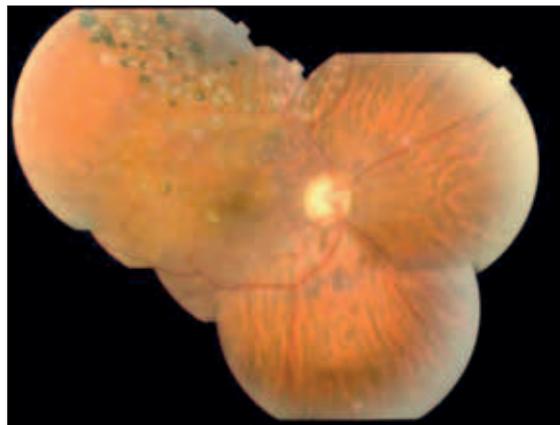


Fig. 35: Fotocoagulazione laser.

sviluppo ed indurre una regressione dei neovasi; di contro non avrebbe indicazione il trattamento profilattico prima della comparsa dei neovasi (The Central Vein Occlusion Study Group, 1995) (Fig. 35). Ricordiamo, infatti, come il trattamento laser panfotocoagulativo induca una regressione della neovascolarizzazione angolare in una percentuale compresa fra il 23 ed il 60 % e riduca anche la possibile evoluzione in un glaucoma neovascolare (The Central Vein Occlusion Study Group, 1995; Magargal et al., 1981; 1982; Evans et al., 1993; Brooks e Gillies, 1990), complicanza che si verifica nel 40-60% dei pazienti con OVCR non trattati (Magargal et al., 1981; 1982; Hayreh et al., 1983).

Nel caso in cui la IOP salga molto e non venga controllata con la terapia medica (farmaci ipotensivi oculari o inibitori dell'anidraasi carbonica per via sistemica) si può aggiungere una *ciclocrioterapia graduata*. La ciclocrioterapia va effettuata per la prima volta in un settore di 90° sul corpo ciliare e, se dopo una settimana la IOP è ancora alta, viene eseguita anche sui 90° adiacenti, per un totale di 180°. In alcuni casi sono necessarie ciclocrioterapie ripetute per mantenere la IOP sotto controllo. Una ciclocrioterapia graduata in un certo lasso di tempo di solito non si associa con ptisi del bulbo.

Un nuovo approccio nei confronti di questa problematica è rappresentato dalla *ciclofotocoagulazione con laser a diodi (CFC)* che rappresenta un metodo semplice, efficace e sicuro per il controllo della IOP. Il trattamento prevede un approccio transclerale (CFCTS) o endoscopico (CFCE). Questa metodica risulta più rapida ed economica delle altre tecniche utilizzate per la riduzione della IOP, sebbene spesso sia necessarie più sedute per ottenere un risultato soddisfacente che si evidenzia comunque nel medio e breve termine.

■ **La sindrome ischemica oculare**

La sindrome ischemica oculare include tutti i segni ed i sintomi tipici dell'insufficienza vascolare cronica. I riscontri più frequenti a livello del segmento anteriore sono l'infiammazione, la cataratta avanzata e la neovascolarizzazione dell'iride (in quest'ultimo caso la prognosi è peggiore). I segni tipici del segmento posteriore, invece, sono il restringimento delle arterie retiniche, la dilatazione delle vene (che non diventano però più tortuose), emorragie retiniche a punto-e-macchia, gli essudati cotonosi e la neovascolarizzazione, secondaria alla ridotta perfusione e all'ipossia. Gli studi istologici evidenziano infatti la perdita delle cellule endoteliali e dei periciti nei vasi della periferia retinica. Il polo posteriore presenta invece un rapporto normale di 1:1 tra i periciti e le cellule endoteliali.

L'etiologia più comune di questa patologia è l'aterosclerosi con formazione di placche uni o bilaterali a livello della biforcazione della carotide comune. In accordo con ciò da numerosi studi è emerso che i fattori di rischio per l'aterosclerosi quali l'ipertensione ed il diabete sono più frequenti nei soggetti affetti da tale patologia rispetto ai gruppi di controllo. Nella sua patogenesi sono da prendere in considerazione, però, anche le patologie occlusive a livello dell'arco aortico, dell'arteria oftalmica, dell'arteria centrale della retina e delle

arterie ciliari. Sembra, inoltre, che un altro processo coinvolto sia quello di natura infiammatoria (vasculitica), tanto che spesso la sindrome ischemica oculare si associa ad arterite a cellule giganti o all'arterite di Takayasu.

La reale incidenza di questa patologia non è tuttora ben definita, sebbene si stima che circa il 5 % dei pazienti con stenosi carotidee avanzate presenti sindrome ischemica oculare. Il rapporto tra uomini e donne è di 2:1 ed il range d'età è compreso tra i 50 e gli 80 anni, sebbene la massima incidenza sia tra i 65 ed i 68 anni. Inoltre, è emerso un dato molto significativo che riguarda la mortalità di questi pazienti: circa il 40% dei soggetti affetti da tale patologia muore nei 5 anni successivi alla diagnosi. La causa principale di morte è rappresentata da patologia cardiaca, seguita da ictus ed infarto.

I sintomi d'esordio possono includere l'amaurosi fugace, il dolore e la perdita della visione sia brusca che graduale. Quest'ultimo è sicuramente il sintomo principale per basare la diagnosi, sebbene vi sia un 10 % circa di pazienti che non mostrano complicanze di natura visiva. Il dolore si manifesta in circa il 40 % dei casi, mentre una storia di amaurosi fugace è presente nel 9-15 % dei soggetti affetti da sindrome ischemica oculare, la quale deve essere sempre sospettata nei pazienti anziani con ipotonia, uveiti asimmetriche, cataratta o retinopatia.

Le indagini strumentali di supporto per la diagnosi di questa patologia sono l'angiografia con fluoresceina, il color doppler, l'angiografia con risonanza magnetica e l'angiografia carotidee.

Il trattamento prevede a livello oculare diverse soluzioni quali la fotocoagulazione panretinica al fine di ridurre la neoangiogenesi a livello dell'iride, del nervo ottico e della retina, la somministrazione di steroidi intravitreali in caso di edema maculare citoidico, la ciclodiatomia e la ciclocrioterapia. Oltre a ciò spesso si ricorre alla terapia chirurgica per il trattamento della placca aterosclerotica a livello carotideo.

BIBLIOGRAFIA

Adamis A., Shima D.: The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*, 2005;25:111-118

Alon T., Hemo I., Itin A., Pe'er J., Stone J., Keshet E.: Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.*, 1995;1:1024-1028

Appiah A.P., Greenidge K.C.: Factors associated with retinal vein occlusion in Hispanics. *Ann. Ophthalmol.*, 1987; 19: 307-312

Appiah A.P., Trempe C.L.: Differences in contributory factors among hemispherical, central and branch retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1989; 96: 364-366

Appiah A.P., Trempe C.L.: Risk factors associated with branch vs central retinal vein occlusion. *Ann. Ophthalmol.*, 1989; 21: 153-157

Araie M.: In vivo measurement of ocular circulation with the laser speckle method-development of apparatus and application in ophthalmological research. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1999;103:871-909

Arend O., Remky A., Young F., et al. Role of reholologic factors in patients with acute central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1996; 103: 80-86

Arnarsson A., Stefansson E.: Laser treatment and the mechanism of edema reduction in Branch Retinal Vein Occlusion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000; 41: 877-879

Ashton N., Cook C.: Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels. Preliminary report. *Br. J. Ophthalmol.*, 1954;38:433-440

Atebara N.H., Brown G.C., Cater J.: Efficacy of anterior chamber paracentesis and Carbogen in treating acute nonarteritic central retinal artery occlusion. *Ophthalmology*, 1995; 102: 2029-2034

Augsburger J.J., Magargal L.E.: Visual prognosis following treatment of acute central retinal artery obstruction. *Br. J. Ophthalmol.*, 1980; 64: 913-917

Ballantatyne A.J., Michaelson J.C.: Some aspect of disease affecting the retinal veins. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.*, 1947: 59-81

Balletshofer B.M., Rittig K., Enderle M.D., et al.: Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation*, 2000;101:1780-1784

Battaglia Parodi M., Ramovecchi P., Ravalico G.: Primary empty sella syndrome and central retinal vein occlusion. *Ophthalmologica*, 1995; 209: 106-108

Baumbach G.L., Heistad D.D.: Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*, 1989;13:968-972

Benfante R., Reed D., Frank J.: Do coronary heart disease risk factors measured in the elderly have the same predictive roles as in the middle aged. Comparisons of relative and attributable risks. *Ann. Epidemiol.*, 1992;2:273-282

Bertelsen T.I.: The relationship between primary thrombosis in the retinal veins and primary glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, 1961; 39: 603-613

Birinci H., Danaci M., Oge I., Erkan N.D.: Ocular blood flow in healthy and primary open-angle glaucomatous eyes. *Ophthalmologica*, 2002;216:434-437

Blum M., Bachmann K., Wintzer D. Et al.: Noninvasive measurement of the Bayliss effect in retinal autoregulation. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1999;237:296-300

Braendstrup P.: Thrombosis of the central vein and primary glaucoma. *Nord Med.*, 1952;48:1668

Brazitikos P.D., Puomaras C.J., Munoz J.L., Tacopoulos M.: Microinjection of L-lactate in the preretinal vitreous induces segmental vasodilatation in the inner retina of miniature pigs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1993;34:1744-1752

Briers J.D., Fercher A.F.: Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1982;22:255-259

Brooks A.M.V., Gillies W.E.: The development and management of neovascular glaucoma. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.*, 1990;18:179-185

Brown G.C., Shields J.A.: Cilioretinal arteries and retinal arterial occlusion. *Arch. Ophthalmol.*, 1979;97:84-92

Brown G.C., Magargal L.E., Shields J.A.: Retinal arterial obstruction in children and young adults. *Ophthalmology*, 1981;88:18-25

Brown G.C., Shields J.A.: Amaurosis fugax secondary to presumed cavernous hemangioma of the orbit. *Ann. Ophthalmol.*, 1981;13:1205-1209

Brown G.C., Magargal L.E.: Central retinal artery obstruction and visual acuity. *Ophthalmology*, 1982; 89:14-19

Brown G.C., Moffat K., Cruess A.: Cilioretinal artery obstruction. *Retina*, 1983;3:182-187

Brown S.M., Jampol L.M.: New concepts of regulation of retinal vessel tone. *Arch. Ophthalmol.*, 1996;114:199-204

Browning D.J., Scott A.Q., Christopher B.P., Warnock J., Zhang Z.: The risk of missing angle neovascularization by omitting screening gonioscopy in acute central vein occlusion. *Ophthalmology*, 1998;105:776-784

- Burchfiel C.M., Tracy R.E., Chyou P.H., Strong J.P.:** Cardiovascular risk factors and hyalinization of renal arterioles at autopsy: the Honolulu Heart Program. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997;17:760-768
- Bursell S.E., Clermont A.C., Shiba T., King G.L.:** Evaluating retinal circulation using video fluorescein angiography in control and diabetic rats. *Curr. Eye Res.*, 1992;11:287-295
- Bursell S.E., Clermont A.C., Oren B., King G.L.:** The in vivo effect of endothelins on retinal circulation in nondiabetic and diabetic rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1995;36:596-607
- Bursell S.E., Clermont A.C., Kinsley B.T., Simonson D.C., Aiello L.M., Wolpert H.A.:** Retinal blood flow changes in patients with insulin-independent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1996;37:886-897
- Bussolino F., Mantovani A., Persico G.:** Molecular mechanism of blood vessels formation. *TIBS*, 1998;22:251-256
- Butt Z., O'Brien C., McKillop G., Aspinall P., Allan P.:** Color Doppler imaging in untreated high- and normal-pressure open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1997;38:690-696
- Caballero A.E., Arora S., Saouaf R. et al.:** Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999;48:1856-1862
- Chakravarthy U., Gardiner T.A., Anderson P., Archer D.B., Trimble E.R.:** The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc. Res.*, 1992;43:241-254
- Chan-Ling T., Gock B., Stone J.:** The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1995;36:1201-1214
- Charness M.E., Liu G.T.:** Central retinal artery occlusion in giant cell arteritis: treatment with nitroglycerin. *Neurology*, 1991; 41: 1698-1699
- Chen H.C., Patel V., Wiek J.:** Vessel diameter changes during the cardiac cycle. *Eye*, 1994; 8:97-103
- Cheung N., Klein R., Wang J.J., Cotch M.F., Islam A.F., Klein B.E., Cushman M., Wong T.Y.:** Traditional and novel cardiovascular risk factors for retinal vein occlusion: the multiethnic study of atherosclerosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:4297-302
- Chua B., Kifley A., Wong T.Y., Mitchell P.:** Homocysteine and retinal vein occlusion: a population-based study. *Am. J. Ophthalmol.*, 2005;139:181-182
- Chung H.S., Harris A., Kagemann L., Martin B.:** Peripapillary retinal blood flow in normal tension glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.*, 1999;83:466-469
- Clermont A.C., Aiello L.P., Mori F., Aiello L.M., Bursell S.E.:** Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for VEGF in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 1997;124:433-446
- Cooper L.S., Wong T.Y., Klein R., Sharrett A.R., Bryan R.N., Hubbard L.D., Couper D.J., Heiss G., Sorlie P.D.:** Retinal microvascular abnormalities and MRI-defined subclinical cerebral infarction: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke*, 2006;37:82-86
- Cugati S., Wang J.J., Rochtchina E., Mitchell P.:** Ten-year incidence of retinal vein occlusion in an older population: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol.*, 2006;124:726-732
- Cursiefen C., Händel A., Schönherr U., Naumann G.O.H.:** Das pseudo exfoliationssyndrom bei patientent mit retinaler venenast-und zentralvenenthrombose. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd*, 1997; 211: 17-21
- Darland D.C., Massingham L.J., Smith S.R., Piek E., Saint-Geniez M., D'Amore P.A.:** Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.*, 2003, 264:275-288
- Davidson S.I.:** Reported adverse effects of oral contraceptives on the eye. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.*, 1976; 91: 561-574
- Dhote R., Bachmeyer C., Horrellou M.H., Toulon P., Christoforov B.:** Central retinal vein thrombosis associated with resistance to activated protein C. *Am. J. Ophthalmol.*, 1995; 120: 388-389
- Dodge A.B., Hechtman H.B., Shepro D.:** Microvascular endothelial-derived autocooids regulate pericyte contractility. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1991;18:180-188
- Dodson P.M., Galton D.J., Hamilton A.M. et al.:** Retinal vein occlusion and the prevalence of lipoprotein abnormalities. *Br. J. Ophthalmol.*, 1982; 66: 161-164
- Dodson P.M., Westwick J., Marks G., Kakkar V.V., Galton D.J.:** Beta-thromboglobulin and platelet factor 4 levels in retinal vein occlusion. *Br. J. Ophthalmol.*, 1983; 67: 161-164
- Dohi Y., Kojima M., Sato K., Luscher T.F.:** Age-related changes in vascular smooth muscle and endothelium. *Drugs Aging*, 1995;7:278-291
- Donati G., Kapetanios A.D., Tsacopoulos M., Pournaras C.J.:** NO-donneurs et occlusion veineuse de branche. 104^e Congr. Soc. Franç. Ophtalmol.. Paris 17-21 mai 1998

- Dorrell M.I., Aguilar E., Friedlander M.:** Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002;43:3500-3510
- Dreher B., Robinson S.R.:** Development of the retinofugal pathway in birds and mammals: evidence for a common 'timetable'. *Brain Behav. Evol.*, 1988;31:369-390
- Dryden R.M.:** Central retinal vein occlusion and chronic simple glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, 1965; 73: 659-633
- Duker J.S., Brown G.C.:** Iris neovascularization associated with obstruction of the central retinal artery. *Ophthalmology*, 1988; 95: 1244-1249
- Duker J.S., Brown G.C.:** Neovascularization of the optic disc associated with obstruction of the central retinal artery. *Ophthalmology*, 1989; 96: 87-91
- Duker J.S., Brown G.C.:** The efficacy of panretinal photocoagulation for neovascularization of the iris after central retinal artery obstruction. *Ophthalmology*, 1988; 95: 1244-1249
- Duker J.S., Sergott R.C., Savino P.J., Bosley T.M.:** Optic neuritis with secondary retinal venous stasis. *Ophthalmology*, 1989; 96: 475-480
- Duker J.S., Sivalingam A., Brown G.C., Reber R.:** A prospective study of acute central retinal artery obstruction. The incidence of secondary ocular neovascularization. *Arch. Ophthalmol.*, 1991; 109: 339-342
- Dumaskyj M.J., Aldnington S.J., Dore C.J.:** The accurate assessment of changes in retinal vessel diameter using multiple frame echocardiography synchronised fundus photography. *Curr. Eye Res.*, 1996; 15:625-632
- Duncan B.B., Wong T.Y., Tyroler H.A., Davis C.E., Fuchs F.D.:** Hypertensive retinopathy and incident coronary heart disease in high risk men. *Br. J. Ophthalmol.*, 2002;86:1002-1006
- Dutton G.N., Craig G.:** Treatment of a retinal embolus by photocoagulation. *Br. J. Ophthalmol.*, 1989; 73: 580-581
- Elman M.J., Kaur Bhatt A., Quinlan P.M., Enger C.:** The risk of systemic vascular diseases and mortality in patients with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1990; 97: 1543-1548
- Evans K., Wishart P.K., McGalliard J.N.:** Neovascular complications after central retinal vein occlusion. *Eye*, 1993; 7: 520-524
- Evans D.W., Harris A., Danis R.P., Arend O., Martin B.J.:** Altered retrobulbar vascular reactivity in early diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, 1997;81:279-282
- Feke G.T., Tagawa H., Yoshida A., Goger D.G., Weiter J.J., Buzney S.M. et al.:** Retinal circulatory changes related to retinopathy progression in insulin-independent diabetes mellitus. *Ophthalmology*, 1985;92:1517-1522
- Ferrara N., Davis-Smyth T.:** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 1997;18:4-25
- Ferrara N.:** Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.*, 1999;56:794-814
- Ferrari A.U., Radaelli A., Centola M.:** Invited review: aging and the cardiovascular system. *J. Appl. Physiol.*, 2003;95:2591-2597
- Ffytche T.J.:** A rationalization of treatment of central retinal artery occlusion. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.*, 1974; 94: 468-479
- Flammer J., Pache M., Resink T.:** Vasospasm, its role in the pathogenesis of diseases with particular reference to the eye. *Prog. Retin Eye Res.*, 2001;20:319-349
- Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L.:** Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995;376:66-70
- Frangieh G.T., Green W.R., Barraquer-Somers E., et al.:** Histopathologic study of nine branch vein occlusion. *Arch. Ophthalmol.*, 1982;100:1132-140
- Frayser R., Hickam J.:** Effect of vasodilator drugs on the retinal blood flow in man. *Arch. Ophthalmol.*, 1965;73:640-642
- Fruttiger M.:** Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002;43:522-527
- Fuchsjager-Mayrl G., Malec M., Polska E. Et al.:** Effects of granulocyte colony stimulating factor on retinal leukocyte and erythrocyte flux in the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002;43:1520-1524
- Fuchsjager-Mayrl G., Wally B., Georgopoulos M. et al.:** Ocular blood flow and systemic blood pressure in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004;45:834-839
- Funatsu H., Yamashita H., Noma H., Shimizu E., Yamashita T., Hori S.:** Stimulation and inhibition of angiogenesis in diabetic retinopathy. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 2001;45:577-584
- Galvin R., Sander M.D.:** Peripheral retinal haemorrhages with papilloedema. *Br. J. Ophthalmol.*, 1980;64:262-266
- Gariano R., Gardner T.:** Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, 2005;438:960-966
- Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N.:** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.*, 1998;273:13313-13316
-

- Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D., Belsholtz C.:** VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.*, 2003;161:1163-1177
- Glacet Bernard A., Nazanine B., Chretien P. et al.:** Antiphospholipid antibodies in retinal vein occlusions. *Arch. Ophthalmol.*, 1984;112:790-795
- Gold D.:** Retinal arterial obstruction. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, 1977; 83: 392-408
- Gottlieb J.L., Blice J.P., Mestichelli B., Konkle B.A., Benson W.E.:** Activated protein C resistance, factor V Leiden, and central retinal vein occlusion in young adults. *Arch. Ophthalmol.*, 1998;116:577-579
- Green W.R., Chan C.C., Hutchins G.M., Terry J.M.:** Central retinal veins occlusion: a prospective histopathologic study of 29 eyes in 28 cases. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 1981;79:371-422
- Green W.R.:** Retina. In: Spenser W.H. (Eds.), *Ophthalmic pathology: An Atlas and Textbook*, 3 ed. Philadelphia, Saunders W.B., 1985;pp.589
- Grunwald J.E., Riva C.E., Sinclair S.H., Brucker A.J., Petrig B.L.:** Laser Doppler velocimetry study of retinal circulation in diabetes mellitus. *Arch. Ophthalmol.*, 1986;104:991-996
- Grunwald J.E., Riva C.E., Baine J., Brucker A.J.:** Total retinal volumetric blood flow rate in diabetes patients with poor glycemic control. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1992;33:356-363
- Grunwald J.E., Dupont J., Riva C.E.:** Retinal haemodynamics in patients with early diabetes mellitus. *Br. J. Ophthalmol.*, 1996;80:327-331
- Haefflinger I.O., Zschauer A., Anderson D.R.:** Relaxation of retinal pericytes contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1994;35:991-997
- Hansen L.L., Wiek J., Widerholt M.:** A randomised prospective study of treatment of non-ischaemic central retinal vein occlusion by isovolaemic haemodilution. *Br. J. Ophthalmol.*, 1989; 73: 895-899
- Harris M.I., Flegal K.M., Cowie C.C. et al.:** Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*, 1998;21:518-524
- Hart W.M.:** Adler's physiology of the eye. St. Louis, Mosby Year Book, 1992; pp.198-227
- Hartnett M.E., Garcia C.M., D'Amore P.A.:** Release of bFGF, an endothelial cell survival factor, by osmotic shock. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999;40:2945-2951
- Hayreh S.S.:** The cilio-retinal arteries. *Br. J. Ophthalmol.*, 1963; 47: 71-89
- Hayreh S.S.:** Segmental nature of the choroidal vasculature. *Br. J. Ophthalmol.*, 1975;59:631-648
- Hayreh S.S.:** So called "central retinal vein occlusion" I. Pathogenesis, terminology, clinical features. *Ophthalmologica*, 1976; 172: 1-13
- Hayreh S.S., Podhajsky P.:** Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. II. Occurrence in central and branch retinal artery occlusion. *Arch. Ophthalmol.*, 1982;100:1585-1596
- Hayreh S.S.:** Classification of central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1983;90:458-474
- Hayreh S.S., Rojas P., Podhajsky P., et al.:** Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion III. Incidence of ocular neovascularization with retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1983;90:488-506
- Hayreh S.S.:** Central Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmol. Clin. Nord. Am.*, 1999;11(2):77-115
- Hayreh S.S., Podhajsky P.A., Zimmerman M.B.:** Retinal Artery Occlusion. *Ophthalmology*, 2009;116:1928-1936
- Henkind P., Charles N.C., Pearson J.:** Fisiopathology of ischemic optic neuropathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 1970; 69: 78-90
- Hill D. W.:** The regional distribution of retinal circulation. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 1977;59:470-475
- Hirschi K.K., D'Amore P.A.:** Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.*, 1996;32:687-698
- Hirota A., Mishima H.K., Kiuchi J.:** Incidence of retinal vein occlusion at the glaucoma clinic of Hiroshima University. *Ophthalmologica*, 1997; 211: 288-291
- Holmgaard K., Aalkjaer C., Lambert J.D.C., Bek T.:** N-Methyl-D-Aspartic acid causes relaxation of porcine retinal arterioles through an adenosine receptor-dependent mechanism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49:4590-4594
- Hovland K.R., Ellis P.P.:** Hemorrhagic glaucoma with optic nerve glioma. *Arch. Ophthalmol.*, 1966; 75: 806-809
- Hsueh W.A., Law R.E.:** Diabetes is a vascular disease. *J. Investig. Med.*, 1998;46:387-390
- Hubbard L.D., Brothers R.J., King W.N., et al. for the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators:** Methods for evaluation of retinal microvascular abnormalities associated with hypertension/sclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ophthalmology*, 1999;106:2269-2280
- Hughes S., Yang H., Chan-Ling T.:** Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000;41:1217-1228

- Hughes S., Chan –Ling T.:** Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004;45:2795-2806
- Iannaccone A., Letizia C., Pazzaglia S., Vingolo E.M., Clemente G., Pannarale M.R.:** Plasma endothelin-1 concentrations in patients with retinal vein occlusions. *Br. J. Ophthalmol.*, 1998; 82: 498-503
- Ikram M.K., de Jong F.J., Vingerling J.R. et al.:** Are retinal arteriolar or venular diameters associated with markers for cardiovascular disorders? The Rotterdam Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004;45:2129–134
- Ikram M.K., Witteman J.C., Vingerling J.R., Breteler M.M., Hofman A., de Jong P.T.:** Retinal vessel diameters and risk of hypertension. *The Rotterdam Study. Hypertension*, 2005;47:189-194
- Ikram M.K., de Jong F.J., Bos M.J., Vingerling J.R., Hofman A., Koudstaal P.J., de Jong P.T., Breteler M.M.:** Retinal vessel diameters and risk of stroke: the Rotterdam Study. *Neurology*, 2006a;66:1339–1343
- Ikram M.K., de Jong F.J., Van Dijk E.J., Prins N.D., Hofman A., Breteler M.M., de Jong P.T.:** Retinal vessel diameters and cerebral small vessel disease: the Rotterdam Scan Study. *Brain*, 2006b;129:182–188
- Ikram M.K., de Voogd S., Wolfs R.C., Hofman A., Breteler M.M., Hubbard L.D., de Jong P.T.:** Retinal vessel diameters and incident open-angle glaucoma and optic disc changes: the Rotterdam study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005;46:1182-1187
- Ishida S., Yamashiro K., Usui T., Kaji Y., Ogura Y., Hida T., Honda Y., Oguchi Y., Adamis A.P.:** Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nature Med.*, 2003;9:781-788
- Izumi N., Nagaoka T., Sato E., Sogawa K., Kagokawa H., Takahashi A., Kawahara A., Yoshida A.:** Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:4595-4603
- Jaap A.J., Hammersley M.S., Shore A.C., Tooke J.E.:** Reduced microvascular hyperaemia in subjects at risk of developing type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1994;37:214-216
- Jaap A.J., Shore A.C., Tooke J.E.:** Relationship of insulin resistance to microvascular dysfunction in subjects with fasting hyperglycaemia. *Diabetologia*, 1997;40:238-243
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim Av., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J.:** Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 2001;292:468-472
- Jackson W. F.:** Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, 2000;35:173-178
- Jaissle G.B., Leitritz M., Gelisken F., Ziemssen F., Bartz-Schmidt K.U., Szurman P.:** One year results after intravitreal bevacizumab therapy for macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Grafe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2009;247:27-33
- Jeganathan V.S., Kawasaki R., Wang J.J., Aung T., Mitchell P., Saw S.M., Wong T.Y.:** Retinal vascular caliber and age-related macular degeneration: The Singapore Malay Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.*, 2008 ;46:954-959
- Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Awartz M., Fukumura D., Jain R.K., Alitalo K.:** Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 1997;276:1423-1425
- Jonas J.B., Nguyen X.N., Naumann G.O.:** Parapapillary retinal vessel diameter in normal and glaucoma eyes. I. Morphometric data. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989;30:1599–1603
- Justice J. Jr., Lehmann R.P.:** Cilioretinal arteries. A study based on review of stereo fundus photographs and fluorescein angiographic findings. *Arch. Ophthalmol.*, 1976; 94: 1355-1358
- Karjalainen K.:** Occlusion of the central retinal artery and retinal branch arterioles. *Acta Ophthalmol.*, 1971; 109(Suppl.):S11-S96
- Kaushik S., Kifley A., Mitchell P., Wang J.J.:** Age, Blood Pressure, and Retinal Vessel Diameter: Separate Effects and Interaction of Blood Pressure and Age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007;48:557-561
- Kawasaki T., Kitsukawa T., Bekku Y., Matsuda Y., Sanbo M., Yagi T., Fujisawa H.:** A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 1999;121:4895-4902
- Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D.T.:** *Science*, 1989;246: 1306-1309
- Keyt B.A., Berleau L.T., Nguyen H.V., Chen H., Heinsohn H., Vandlen R., Ferrara N.:** The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.*, 1996;271:7788-7795
- Kitsukawa T., Shimono A., Kawakami A., Kondoh H., Fujisawa H.:** Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*, 1995;121:4309-4318
- Klagsbrun M., D'Amore P.:** Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1996;7:259-270

- Klagsbrun M., Moses M.A. Molecular angiogenesis. Chem. Biol., 1999;6:**R217-R224
- Klein R., Klein B.E., Moss S.E., Meuer S.M.:** The epidemiology of retinal vein occlusion: the Beaver Dam Eye Study. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 2000;98:133-141
- Klein R., Klein B.E., Moss S.E., Wong T.Y., Hubbard L., Cruickshanks K.J., Palta M.:** The relation of retinal vessel caliber to the incidence and progression of diabetic retinopathy: XIX: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 2004;122:76-83
- Klein R., Klein B.E. et al.:** Are inflammatory factors related to retinal vessel caliber?: The Beaver Dam Eye Study. *Arch. Ophthalmol.*, 2006;124:87-94
- Klein R., Klein B.E., Moss S.E., Wong T.Y., Sharrett A.R.:** Retinal vessel calibre and microvascular and macrovascular disease in type 2 diabetes: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XX. *Ophthalmology*, 2006;113:1488-1498
- Klein R., Klein B.E., Moss S.E., Wong T.Y.:** Retinal vessel calibre and microvascular and macrovascular disease in type 2 diabetes: XXI: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology*, 2007;114:1884-1892
- Klien B.A., Olwin J.H.:** A survey of the pathogenesis of retinal venous occlusion. Emphasis upon choice of therapy and analysis of the therapeutic results in fifty-three patients. *Arch. Ophthalmol.*, 1956; 56: 207-247
- Klien B.A.:** Sidights on retinal venous occlusion. *Am. J. Ophthalmol.*, 1966; 61: 25-36
- Kotliar K. E., Vilser W., Nagel E., Lanzi I.M.:** Retinal vessel reaction in response to chromatic flickering light. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2004; 242:377-392
- Kotliar K. E., Mucke B., Vilser W., Schilling R., Lanzi I. M. Effect of aging on retinal artery blood column diameter measured along the vessel axis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2008;49:**2094-2102
- Kronmal R. A., Cain K.C., Ye Z., Omenn G.S.:** Total serum cholesterol levels and mortality risk as a function of age. A report based on the Framingham data. *Arch. Intern. Med.*, 1993;153:1065-1073
- Kuritzky S.:** Nitroglycerin to treat acute loss of vision. *N. Engl. J. Med.*, 1990; 323: 1428
- Kwa V.I.:** Our eyes: windows to our souls or crystal balls? *Lancet Neurol.*, 2006;5:108-110
- Laakso M., Edelman S.V., Brechtel G., Baron A.D.:** Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes*, 1992;41:1076-1083
- Lamb F. S., Volk K. A., Shibata E. F.:** Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. *Circ. Res.*, 1994;75:742-750
- Langer R.D., Ganiats T.G., Barrett-Connor E.:** Paradoxical survival of elderly men with high blood pressure. *Br. Med. J.*, 1989;298:1356-1357
- Large W. A., Wang Q.:** Characteristics and physiological role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 1996;271:C435-C454
- Larsson J., Olafsdottir E., Bauer B.:** Activated protein C resistance in young adults with central retinal vein occlusion. *Br. J. Ophthalmol.*, 1996; 80: 200-202
- Leitgeb R., Schmetterer L., Dexler W. Et al.:** Real-time assessment of retinal blood flow with ultrafast acquisition by color Doppler Fourier domain optical coherence tomography. *Optics Express*, 2003;11:3116-3121
- Leitgeb R.A., Schmetterer L., Hitzengerger C.K. et al.:** Real-time measurement of in vitro flow by Fourier-domain color Doppler optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 2004;29:171-173
- Leung H., Wang J.J., Rochtchina E. et al.:** Relationships between age, blood pressure and retinal vessel diameters in an older population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003;44:2900-2904
- Levy A.P., Levy N.S., Wegner S., Goldberg M.A.:** Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 1995;270:13333-13340
- Leydhecker W., Krieglstein G.K., Brunswig D.:** Indications and limitations of fibrinolytic therapy for central retinal artery occlusion. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 1978; 172: 43-46
- Liew G., Sharrett A.R., Wang J.J., Klein B.E., Mitchell P., Wong T.Y.:** Relative importance of systemic determinants of retinal arteriolar and venular calibre: the atherosclerosis risk in communities study. *Arch. Ophthalmol.*, 2008;126:1404-1410
- Loewenstein A., Winder A., Goldstein M., Lazar M., Eldor A.:** Bilateral retinal vein occlusion associated with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am. J. Ophthalmol.*, 1997; 124: 840-841
- Magargal L.E., Brown G.C., Augsburger J.J., Donoso L.A.:** Efficacy of panretinal photocoagulation in preventing neovascular glaucoma following ischemic central retinal vein obstruction. *Ophthalmology*, 1982; 89: 780-784.
- Magargal L.E., Brown G.C., Augsburger J.J., Parrish R.K. II. Neovascular glaucoma following ischemic central retinal vein obstruction. Ophthalmology, 1981; 88:** 1095-101
- Magargal L.E., Donoso L.A., Sanborn G.E.:** Retinal ischemia and risk of neovascularization following central retinal vein obstruction. *Ophthalmology*, 1982; 89: 1241-1245

- Mamluk R., Gechtman Z., Kutcher M.E., Gasiunas N., Gallagher J., Klagsbrun M.:** J. Biol. Chem., 2002;227:24818-24825
- Mc Allister I.L., Constable I.J.:** Laser-induced chorioretinal venous anastomosis for treatment of nonischemic central retinal vein occlusion. Arch. Ophthalmol., 1995; 113: 456-462
- McGahon M. K., Dawicki J. M., Scholfield C. N., McGeown J. G., Curtis T. M.:** A-type potassium current in retinal arteriolar smooth muscle cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2005;46:3281-3287
- McGahon M. K., Dawicki J. M., Arora A., et al.:** Kv 1,5 is a major component underlying the A-type potassium current in retinal arteriolar smooth muscle. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2007;292:H1001-H1008
- McGahon M. K., Needham M. A., Scholfield C. N., McGeown J. G., Curtis T. M.:** Ca-Activated Cl Current in Retinal Arteriolar Smooth Muscle. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2009;50:364-371
- McGrath M.A., Wechsler F., Hunyor A.B.L., et al.:** Systemic factors contributory to retinal vein occlusion. Arch. Intern. Med., 1978; 138: 216-220
- Mendinos E., Petropoulos I.K., Mangioris G., Papadopoulou D.N., Stangos A.N., Pournaras C.J.:** Lactate-induced retinal arteriolar vasodilation implicates neuronal nitric oxide synthesis in minipigs. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2008;49:5060-5066
- Michelson G., Groh M., Groh M.J., Baleanu D., Harazny J., Horstmann R., Kolominsky-Rabas P.:** Telemedical-supported screening of retinal vessels ("talking eyes"). Klin. Monatsbl. Augenheilkd, 2005;222:319-325, 2005
- Mitchell P., Smith W., Chang A.:** Prevalence and associations of retinal vein occlusion in Australia. The Blue Mountains Eye Study. Arch. Ophthalmol., 1996;114:1243-1247
- Morris S.J., Shore A.C., Tooke J.E.:** Responses of the skin microcirculation to acetylcholine and sodium nitroprusside in patients with NIDDM. Diabetologia, 1995;38:1337-1344
- Nachman R.L., Silverstein I.:** Hypercoagulable states. Ann. Intern. Med., 1993; 119: 819-827
- Nagel E., Vilser W., Lanzi I. Age blood pressure, and vessel diameter as factors influencing the arterial retinal flicker response. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2004;45:1486-1492**
- Neufeld G., Cohen T., Shraga N., Lange T., Kessler O., Herzog Y.:** The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. Trends Cardiovasc. Med., 2002;12:13-19
- Ng Y.S., Krilleke D., Shima D.:** VEGF function in vascular pathogenesis. Exp. Cell Res., 2006;312:527-537
- Nguyen T.T., Wang J.J., Sharrett A.R., Islam F.M., Klein R., Klein B., Cotch M.F., Wong T.Y.:** Relationship of Retinal Vascular Caliber With Diabetes and Retinopathy: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Diabetes Care, 2008;31:544-549
- Ohh M., Park C.W., Ivan M., Hoffman M.A., Kim T.Y., Huang L.E., Pavletich N., Chau V., Kaelin W.G.:** Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. Nature Cell Biol., 2000;2:423-427
- Opremack E.M., Bruce R.A.:** Surgical decompression of branch retinal vein occlusion via arteriovenous crossing sheathotomy - A prospective review of 15 cases. Retina, 1999;19:1-5
- Osterloh E.M., Charles S.:** Surgical decompression of branch retinal vein occlusion. Arch. Ophthalmol., 1988; 106: 1469-1471
- Papastathopoulos K.I., Jonas J.B.:** Focal narrowing of retinal arterioles in optic nerve atrophy. Ophthalmology, 1995;102:1706-1711
- Patel V., Rassam S., Newso R., Wiek J., Kohner E.:** Retinal blood flow in diabetic retinopathy. B.M.J., 1992;305:678-683
- Patton N., Aslam T., MacGillivray T., Pattie A., Deary I.J., Dhillon B.:** Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease: a rationale based on homology between cerebral and retinal microvasculatures. J. Anat., 2005;206:319-348
- Pe'er J., Folberg R., Itin A., Gnessin H., Hemo I., Keshet E.:** Vascular endothelial growth factor upregulation in human central retinal vein occlusion. Ophthalmology, 1998; 105: 412-416
- Perraut L.E., Zimmerman L.E.:** The occurrence of glaucoma following occlusion of the central retinal artery. A clinicopathologic report of six cases with a review of the literature. Arch. Ophthalmol., 1959; 61: 845-865
- Pescosolido N., Imperatrice B.:** Il fondo oculare nel soggetto iperteso. Esame affidabile per la diagnosi dell'ipertensione sistemica? Argomenti di oftalmologia 13. Canelli (AT), Fabiano Ed., 2008
- Pierce E.A., Foley E.D., Smith L.E.:** Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. Arch. Ophthalmol., 1996;114:1219-1228
- Polak K., Dorner G., Kiss B. et al.:** Evaluation of the Zeiss retinal vessel analyser. Br. J. Ophthalmol., 2000;84:1285-1290

- Polak K., Petternel V., Luksch A. et al.:** Effect of endothelin and BQ123 on ocular blood flow parameters in healthy subject. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001;42:2949-2956
- Polak K., Schmetterer L., Riva C.E. Influence of flicker frequency on flicker-induced changes of retinal vessel diameter. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002;43:2721-2726**
- Polak K., Luksch A., Frank B., Jandrasits K., Polska E., Schmetterer L.:** Regulation of human retinal blood flow by endothelin-1. *Exp. Eye Res.*, 2003;76:633-640
- Provis J.M., Leech J., Diaz C.M., Penfold P.L., Stone J., Keshet E.:** Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp. Eye Res.*, 1997;65:555-568
- Quinlan P.M., Elman M.J., Kaur Bhatt A., et al.:** The natural course of central retinal vein occlusion. *Am. J. Ophthalmol.*, 1990;110:118-123
- Rankin E.B. Higgins DF, Walisser JA, Johnson RS, Bradfield CA, Haase VH:** Inactivation of the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) suppresses von Hippel-Lindau disease-associated vascular tumors in mice. *Mol. Cell Biol.*, 2005;25:3163-3172
- Resch H., Karl K., Weigert G., Wolzt M., Hommer A., Schmetterer L., Garhofer G.:** Effect of dual endothelin receptor blockade on ocular blood flow in patients with glaucoma and healthy subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009;50:358-363
- Rhie F.H., Christlieb A.R., Sandor T., Gleason R.E., Rand L.I., Shah S.T. et al.:** Retinal vascular reactivity to norepinephrine and angiotensin II in normals and diabetics. *Diabetes*, 1982;31:1056-1060
- Ribeauudeau-Saindelle F., Glacet-Bernard A., Lelong F., Coscas G., Soubrane G.:** Occlusion veineuse rétinienne et lipoprotéine (a). *J. Fr. Ophthalmol.*, 1998;21:245-250
- Ring C.P., Pearson T.C., Sanders M.D. et al.:** Viscosity and retinal vein thrombosis. *Br. J. Ophthalmol.*, 1976;60:397-410
- Ririe D.G., Cosgriff T.M., Martin B.:** Central retinal vein occlusion in a patient with familial antithrombin III deficiency: Case report. *Ann. Ophthalmol.*, 1979;11:1841-1845
- Risau W.:** Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 1997;386:671-647
- Riva C.E., Fekete G.T., Eberli B., Benary V.:** Bidirectional LDV system for absolute measurement of blood speed in retinal vessels. *Appl. Opt.*, 1979;18:2301-2306
- Riva C.E., Petrig B.:** Blue field entoptic phenomenon and blood velocity in the retinal capillaries. *J. Opt. Soc. Am.*, 1980;70:1234-1238
- Riva C.E., Grunwald J.E., Sinclair S.H., O'Keefe K.:** Fundus camera based retinal LDV. *Appl. Opt.*, 1981;20:117-120
- Riva C.E., Grunwald J.E., Sinclair S.H. et al.:** Blood velocity and volumetric flow rate in human retina vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1985;26:1124-1132
- Sanborn G.E., Magargal L.E., Jeager E.A.:** Venous occlusive disease of the retina. In: Tasman W., e Jeager E.A. (Eds.), *Duane's Clinical Ophthalmology*. Philadelphia, Lippincott Williams Wilkins, 1994;3:pp.1-29
- Sandercoe T.M., Geller S.F., Hendrickson A.E., Stone J., Provis J.M.:** VEGF expression by ganglion cells in central retina before formation of the foveal depression in monkey retina: evidence of developmental hypoxia. *J. Comp. Neurol.*, 2003;462:42-54
- Schatz H., Fong A.C.O., McDonald H.R.:** Cilioretinal artery occlusion in young adults with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1991;98:594-601
- Schmidt D., Schumacher M., Wakhloo A.K.:** Microcatheter urokinase infusion in central retinal artery occlusion. *Am. J. Ophthalmol.*, 1992;113:429-434
- Schmidt M., Flamme I.:** The in vivo activity of vascular endothelial growth factor isoforms in the avian embryo. *Growth factors*, 1997;15:183-197
- Seitz R.:** The crossing phenomenon. In: *The retinal vessels*. St Louis, CV Mosby, 1964;pp.20-74
- Shalaby F., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L.:** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995;376:62-66
- Sharrett A.R., Hubbard L.D., Cooper L.S., et al.:** Retinal arteriolar diameters and elevated blood pressure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1999;150:263-270
- Shih S.C., Ju M., Liu N., Mo J.R., Ney J.J., Smith L.E.:** Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003;100:15859-15864
- Sinclair A., Hughes A., Sever P.:** Effect of nifedipine and gluceryl trinitate on retinal blood flow in normal subjects. *J. Hum. Hypertens.*, 1993;7:339-401
- Small K.W., Stefansson E., Hatchell D.L.:** Retinal blood flow in normal and diabetic dogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1987;28:672-675
- Soker S., Gollamudi-Payne, Fidler H., Charnahelli H., Klagsbun M.:** Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J. Biol. Chem.*, 1997;272:31582-31588

- Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M.:** Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998;92:735-745
- Stone J., Itin A., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T., Keshet E.:** Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.*, 1995;15:4738-4747
- Stork S., Feelders R.A., Van den Beld A.W. et al.** Prediction of mortality risk in the elderly. *Am. J. Med.*, 2006;119:519-525
- Stowe G.C., Zarkov I.N., Albert D.M.:** Central retinal vascular occlusion associate with oral contraceptives. *Am. J. Ophthalmol.*, 1978; 86: 798-780
- Sun C., Liew G., Wang J.J., Mitchell P., Saw S.M., Aung T., Tai E.S., Wong T.Y.:** Retinal vascular caliber, blood pressure, and cardiovascular risk factors in an Asian population: The Singapore Malay Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:1784-1790
- Tamaki Y., Araie M., Kawamoto E., Eguchi S., Fujii H.:** Non-contact, two-dimensional measurement of tissue circulation in choroids and optic nerve head using speckle phenomenon. *Exp. Eye Res.*, 1995;60:373-383
- Tayyari F., Venkataraman S.T., Gilmore E.D., Wong T., Fisher J., Hudson C.:** The relationship between retinal vascular reactivity and arteriolar diameter in response to metabolic provocation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009;50:4814-4821
- Tedeschi-Reiner E., Strozzi M., Skoric B., Reiner Z.:** Relation of atherosclerotic changes in retinal arteries to the extent of coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, 2005;96:1107-1109
- The Central Vein Occlusion Study Group:** A randomized clinical trial of early panretinal photocoagulation for ischemic central vein occlusion. *Ophthalmology*, 1995; 102:1434-444
- The Central Vein Occlusion Study Group:** Baseline and early natural history report. *Arch. Ophthalmol.*, 1993; 101: 1087-1095
- The Central Vein Occlusion Study Group:** Evaluation of grid pattern photocoagulation for macula edema in central vein occlusion. *Ophthalmology*, 1995; 102: 1425-1433
- The Central Vein Occlusion Study Group:** Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion. *Arch. Ophthalmol.*, 1997; 115: 486-491
- The Eye Disease Case-Control Study Group.** Risk factors for hemiretinal vein occlusion: comparison with risk factors for central and branch retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1998; 105: 765-771
- The Eye Disease Case-Control Study Group:** Risk factors for central retinal vein occlusion. *Arch. Ophthalmol.*, 1996; 114: 545-554
- Tooke J.E.:** Microvascular function in human diabetes: a physiological perspective. *Diabetes*, 1995;44:721-726
- Tooke J.E.:** Methodologies used in the study of the microcirculation in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.*, 1993;9:57-70
- Torring M. S., Holmgaard K., Hesselund A., Aalkjaer C., Bek T.:** The vasodilating effect of acetazolamide and dorzolamide involves mechanisms other than carbonic anhydrase inhibition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009;50:345-351
- Trope G.E., Lowe G.D.O., McArdle B.M., Douglas J.T. et al.:** Abnormal blood viscosity and haemostasis in long-standing retinal vein occlusion. *Br. J. Ophthalmol.*, 1983;67:137-142
- Tsacopoulos M., David M.:** The effect of arterial pCO₂ on relative blood flow. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1973;12:335-347
- Uemura A., Kusuhara S., Katsuta H., Nishikawa S.:** Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation. *Exp. Cell Res.*, 2006;312:676-683
- Vannas S., Tarkkanen A.:** Retinal vein occlusion and glaucoma: Tonographic of its prognostic significance. *Br. J. Ophthalmol.*, 1960; 44: 583-589
- Waltenberger J., Claesson Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin C.H.:** *J. Biol. Chem.*, 1994;269:26988-26995
- Walters R.F., Spalton D.J.:** Central retinal vein occlusion in people aged 40 years or less: a review of 17 patients. *Br. J. Ophthalmol.*, 1990;74: 30-35
- Wang J.J., Mitchell P., Leung H., Rohtchina E., Wong T.Y., Klein R.:** Hypertensive retinal vessel wall signs in a general older population: The Blue Mountains Eye Study. *Hypertension*, 2003;42:534-541
- Wang J.J., Liew G., Wong T.Y., Smith W., Klein R., Leeder S., Mitchell P.:** Retinal vascular calibre and the risk of coronary heart disease-related mortality. *Heart*, 2006;92:1583-1587
- Wang J.J., Liew G., Klein R., Rohtchina E., Knudtson M.D., Klein B., Wong T.Y., Burlutsky G., Mitchell P.:** Retinal vessel diameter and cardiovascular mortality: pooled data analysis from two older population. *Eur. Heart J.*, 2007;28:1984-1992
- Wang S., Xu L., Wang Y., Wang Y., Jonas J.B.:** Retinal vessel diameter in normal and glaucomatous eyes: the Beijing eye study. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2007;35:800-807

- Weiss J.N.:** Retinal surgery for treatment of Central Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmic. Surg. Lasers*, 2000; 31:162-165
- Weverling-Rijnsburger A.W., Blauw G.J., Lagaay A.M., Knook D.L., Meinders A.E., Westendorp R.G.:** Total cholesterol and risk of mortality in the oldest old. *Lancet*, 1997;350:1119-1123
- White B., Pierce M., Nassif N. et al.:** In vivo dynamic human retinal blood flow imaging using ultra-high-speed spectral domain optical coherence tomography. *Optics Express*, 2003;11:3490-3497
- Wickremasinghe S.S., Rogers S.L., Gillies M.C., Zhu M., Wong T.Y.:** Retinal vascular caliber changes after intravitreal triamcinolone treatment for diabetic macular edema. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:4707-4711
- Wolf S., Arend O., Bertram B., et al.:** Hemodilution therapy in central retinal vein occlusion: One-year results of a prospective randomized study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1994; 232: 33-39
- Wong T.Y., Klein R., Couper D.J., Cooper L.S., Shahar E., Hubbard L.D., Wofford M.R., Sharrett A.R.:** Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet*, 2001a;358:1134-1140
- Wong T.Y., Klein R., Klein B.E.K., Tielsch J.M., Hubbard L.D., Nieto F.J.:** Retinal microvascular abnormalities and their relations with hypertension, cardiovascular diseases and mortality. *Surv. Ophthalmol.*, 2001b;46:59-80
- Wong T.Y., Klein R., Sharrett A.R., Duncan B.B., Couper D.J., Tielsch J.M., Klein B.E., Hubbard L.D.:** Retinal arteriolar narrowing and risk of coronary heart disease in men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA*, 2002a;287:1153-1159
- Wong T.Y., Hubbard L.D., Klein R., et al.:** Retinal microvascular abnormalities and blood pressure in older people: the Cardiovascular Health Study. *Br. J. Ophthalmol.*, 2002b;86:1007-1013
- Wong T.Y., Klein R., Sharrett R., Schmidt M.I., Pankow J.S., Couper D.J., Klein B., Hubbard L.D., Duncan B.B., for the ARIC Investigators:** Retinal Arteriolar Narrowing and Risk of Diabetes Mellitus in Middle-aged Persons. *JAMA*, 2002c;287:2528-2533
- Wong T.Y., Klein R., Sharrett A.R., Manolio T.A., Hubbard L.D., Marino E.K., Kuller L., Burke G., Tracy R.P., Polak J.F., Gottdiener J.S., Siscovick D.S.:** The prevalence and risk factors of retinal microvascular abnormalities in older persons: The Cardiovascular Health Study. *Ophthalmology*, 2003a;110:658-666
- Wong T.Y., Klein R., Nieto F.J., Klein B.E., Sharrett A.R., Meuer S.M., Hubbard L.D., Tielsch J.M.:** Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: a population-based case-control study. *Ophthalmology*, 2003b;110:933-940
- Wong T.Y., Klein R., Klein B.E., Meuer S.M., Hubbard L.D.:** Retinal vessel diameters and their associations with age and blood pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003c;44:4644-4650
- Wong T.Y., Duncan B.B., Golden S.H., Klein R., Couper D.J., Klein B.E., Hubbard L.D., Sharrett A.R., Schmidt M.T.:** Associations between the metabolic syndrome and retinal microvascular signs: The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004;45:2949-2954
- Wong T.Y., Larsen E.K., Klein R., et al.:** Cardiovascular risk factors for retinal vein occlusion and arteriolar emboli: the Atherosclerosis Risk in Communities & Cardiovascular Health studies. *Ophthalmology*, 2005;112:540-547
- Wong T.Y., Islam F.M., Klein R., Klein B.E., Cotch M.F., Castro C., Sharrett A.R., Shahar E.:** Retinal vascular caliber, cardiovascular risk factors, and inflammation: the multiethnic study of atherosclerosis (MESA). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006;47:2341-2350
- Yazdanfar S., Rollins A.M., Izatt J.A.:** Imaging and velocimetry of the human retinal circulation with color Doppler optical coherence tomography. *Optics Letters*, 2000; 25:1448-1450
- Yazdanfar S., Rollins A.M., Izatt J.A.:** In vivo imaging of human retinal flow dynamics by color Doppler optical coherence tomography. *Arch. Ophthalmol.*, 2003; 121:235-239
- Yildiz O.:** Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007;1100:353-360
- Yu D.Y., Cringle S.J., Alder V.A., Su E.N., Yu P.K.:** Intraretinal oxygen distribution and choroidal regulation in the avascular retina of guinea pigs. *Am. J. Physiol.*, 1996;270:H965-H973
- Zaoui M., Cordebar B., Naoun-Hubert I., Sommer S., Rozot P.:** Occlusion de la veine centrale de la rétine sous anti-androgènes. *J. Fr. Ophtalmol.*, 2000; 23: 42-44
- Zegarra H., Gutman F.A., Conforto J.:** The natural course of central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 1979; 86: 19-31
- Zegarra H., Gutman F.A., Zakov N., et al.:** Partial occlusion of the central retinal vein. *Am. J. Ophthalmol.*, 1983; 96: 330-337

Capitolo 3

Invecchiamento della coroide

INTRODUZIONE

La coroide è la tunica intermedia dell'occhio posta tra lo strato fibroso più esterno, che ha funzione di supporto e quello neurale più interno (la retina) che provvede alla funzione visiva. Questa appare come una membrana rosso-marrone che si estende dall'ora serrata al nervo ottico. Tale colore si deve alla presenza di cellule pigmentate (melanociti) e di vasi sanguigni. Lo spessore della coroide normalmente va dai 90-100 μm in prossimità dell'ora serrata ai 300 μm al polo posteriore, ma questi va-

lori si modificano con l'invecchiamento in seguito alla sclerosi vasale e al decremento del contenuto di collagene della membrana (Olver, 1990).

La coroide è composta da quattro strati che sono dall'esterno all'interno (Fig. 1):

- Lo strato sopracoroideale o lamina fusca: composto da fibre elastiche ed elementi sincinziali con nuclei ovali e appiattiti immersi in uno strato di fini lamelle collagene. Nelle lacune tra le lamelle decorrono i nervi e le arterie ciliari posteriori lunghe, strutture che, diversamente dalle arterie ciliari posteriori brevi e dalle vene vortuose, non attraversano la lamina fusca. In questo

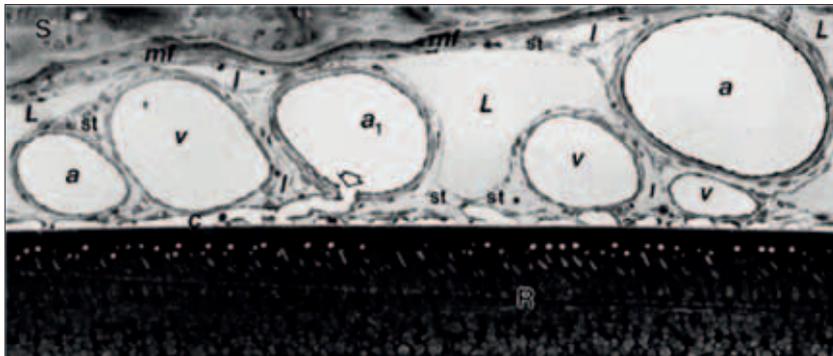


Fig. 1:

Microscopia ottica di una sezione di coroide. S sclera, mf membrana fusca, st tessuto di sostegno trabecolare, R retina, a arteriole, v venule, L ampie lacune, l piccole lacune. Una delle arteriole (a1) si apre in un piccolo vaso nella coriocapillare (c) (da De Stefano e Mugnaini, 1997)

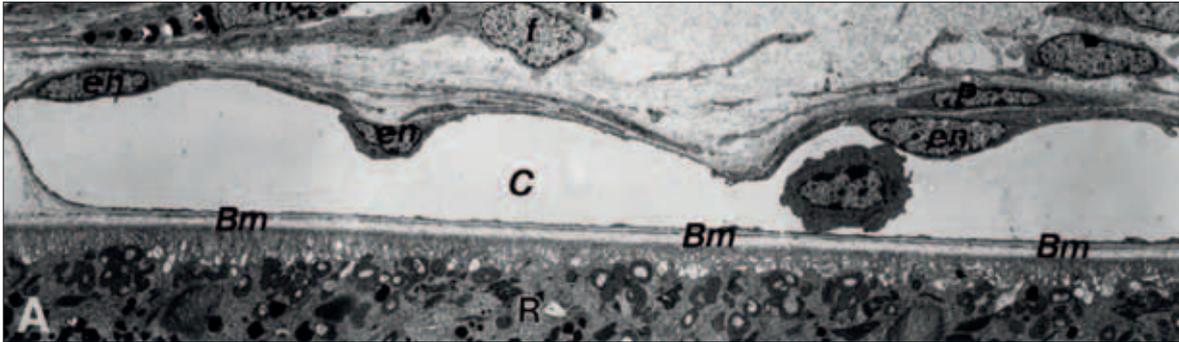


Fig. 2: Microscopia elettronica della corioid capillare (C lume capillare). Capillare disteso sulla membrana di Bruch (Bm). Dalla parte opposta 3 nuclei di cellule endoteliali (en). P pericita, f fibroblasto, mc melanocita (da De Stefano e Mugnaini, 1997)

strato sono presenti anche melanociti giganti il cui citoplasma è ricco di granuli.

- Lo stroma corioideale: composto da fibre collagene, sottili fibre elastiche, fibrociti, grandi melanociti stellati ricchi di granuli di pigmento, macrofagi e vasi. Questi ultimi sono disposti in tre strati:

1. Il più esterno o *strato di Haller* che contiene vasi di calibro maggiore
2. Lo strato intermedio o *di Sattler* che contiene vasi di medio calibro

3. Il più interno o la *corioid capillare*, nota anche come membrana di *Ruysch*.

- La *corioid capillare*: composta da un intreccio di capillari con lume ampio, endotelio sottilissimo e assenza di periciti (Fig. 2). Le cellule endoteliali hanno delle particolarità in quanto quelle poste in prossimità della membrana di Bruch presentano sulla parete cellulare rivolta verso la membrana stessa alcuni pori ricoperti da un diaframma di circa 3 nm di spessore, mentre quelle dei capillari più esterni evidenziano un citoplasma ricco di

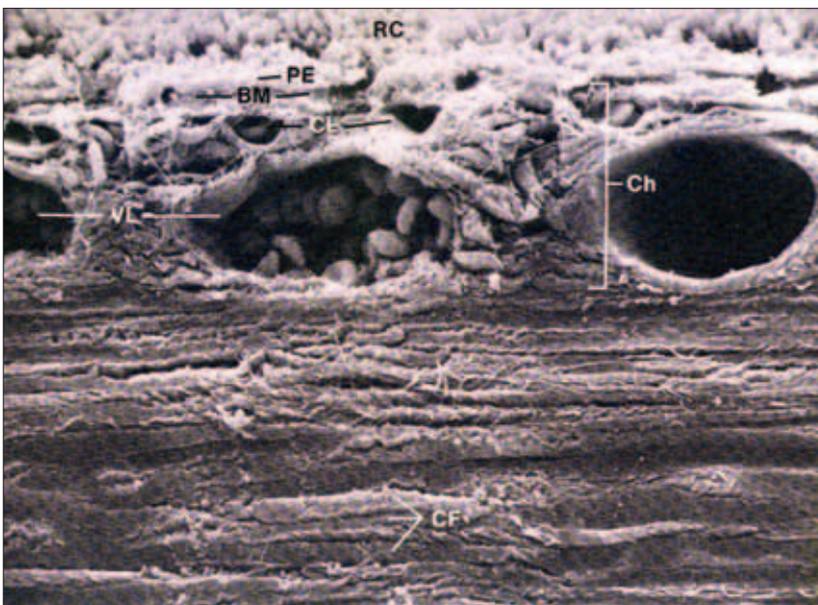


Fig. 3: Microscopia elettronica che mette in evidenza la membrana di Bruch (BM), la corioid capillare (CL) e l'epitelio pigmentato della retina (PE) (da Kurkinen et al., 1997)

vescicole. Lo spessore di questo strato varia dai 10 ai 30 μm . I capillari sono disposti a formare dei lobuli, ognuno supportato da una propria irrorazione terminale e quindi funzionalmente indipendenti.

■ La *lamina vitrea o membrana di Bruch* (BM): è una sottile (2-4 μm) lamina elastica mucoproteica posta tra lo strato metabolicamente attivo dell'epitelio pigmentato retinico (EPR) e la coriocapillare, che è la fonte di nutrimento per l'EPR (Fig. 3). La porzione di questa membrana che volge verso la corioide è di origine mesodermica, mentre quella che volge verso l'EPR ha origine endodermica. Questa lamina può, inoltre, essere divisa ulteriormente in 5 strati (Fig. 3):

1. Lo strato corioideale esterno che consiste delle cellule endoteliali della coriocapillare e la sua membrana basale
2. Una zona esterna di collagene (OCZ)

3. Uno strato di fibre elastiche fenestrate
4. Una zona interna di collagene (ICZ)
5. La membrana basale dell'EPR.

SISTEMA VASCOLARE COROIDEO

La corioide riceve il suo apporto ematico dalle arterie ciliari anteriori e dalle arterie ciliari posteriori brevi e lunghe (Fig. 4).

I vasi coroidei, oltre che alla corioide stessa, al corpo ciliare e all'iride, forniscono nutrimento alla parte esterna (circa 130 micron di spessore) della retina, comprendente l'epitelio pigmentato, lo strato dei coni e bastoncelli e lo strato nucleare esterno e inoltre a tutto lo spessore della retina nella regione della fovea (Hayreh, 1975) (Fig. 5). Al contrario di quello che si osserva nella maggior parte del sistema vascolare corporeo, nella corioide vene e arterie non decorrono parallele. L'arteria

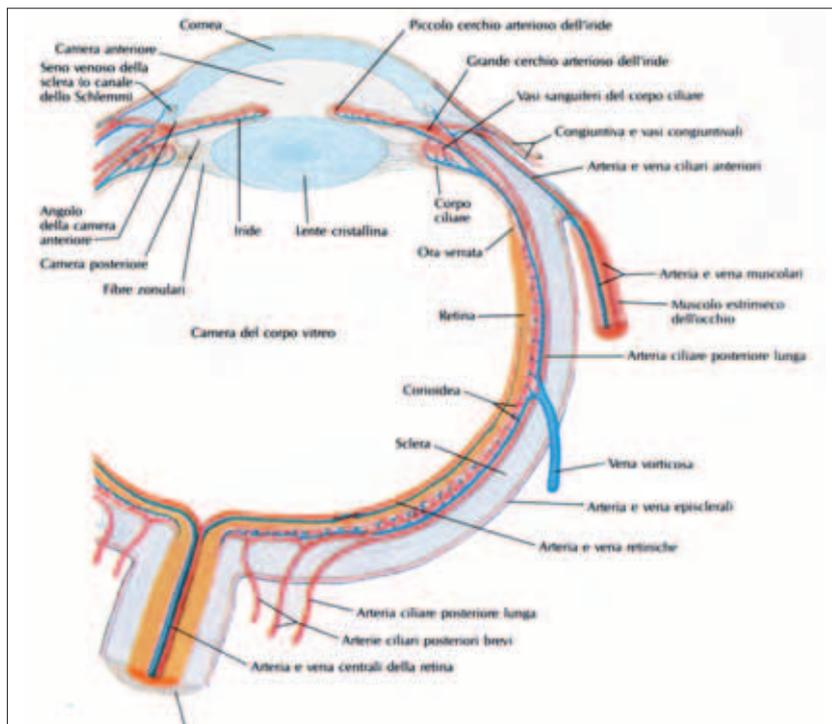


FIG. 4:
Vascularizzazione dell'occhio

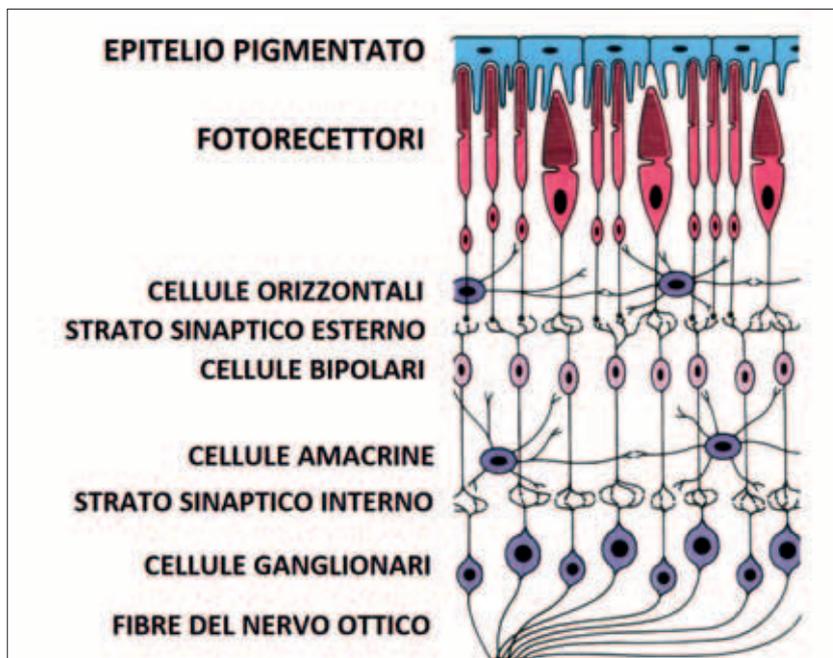


Fig. 5: Struttura della retina

oftalmica, la prima branca dell'arteria carotide interna, si divide nelle arterie ciliari posteriori laterale e mediale (Hayreh, 1975); occasionalmente è presente anche un'arteria ciliare posteriore anomala. Prima di giungere alla sclera ogni arteria ciliare si divide in un'arteria ciliare posteriore lunga (ACPL) e in un numero variabile (da 15 a 20) di arterie ciliari posteriori brevi (ACPB). Le ACPL attraversano la sclera a una distanza di 3-4 mm dal nervo ottico e si spingono orizzontalmente verso l'ora serrata, dove si dividono ulteriormente per rifornire di ossigeno e nutrienti la regione sopraequatoriale dello strato coriicapillare, il corpo ciliare e l'iride (Fig. 4). Le ACPB, invece, penetrano nella sclera e percorrono una distanza molto breve nello spazio sovracoroideale prima di entrare nella coroide peripapillare, dove si diramano per provvedere al nutrimento della porzione posteriore della coriicapillare sottoequatoriale (Fig. 6). Le ACPB, inoltre, rappresentano la via preferenziale per il supporto ematico della testa del nervo ottico e, dunque, possono essere considerate come la componente più importante per la vascolarizza-

zione oculare e della testa del nervo stesso. Questa è la ragione per la quale alterazioni a carico di queste arterie possono provocare diversi disordini con perdita di gradi differenti dell'acuità visiva. La porzione anteriore della coriicapillare sottoequatoriale è invece irrorata dai vasi provenienti dall'arteria ciliare anteriore (ACA); tale arteria, infatti, dopo aver "accompagnato" i muscoli retti ed essere penetrata nei corpi ciliari, prima di fornire il grande circolo irideo invia a tale porzione della coriicapillare un numero di ramificazioni compreso tra 8 e 20.

Il drenaggio venoso della coriicapillare avviene principalmente attraverso il sistema delle vene vorticosi, ma anche tramite le vene ciliari anteriori, che decorrono appunto nei corpi ciliari. Lo studio dei vasi dello strato coriicapillare, condotto con il metodo fluoroangiografico, ha rivelato che ogni arteriola coroidea terminale rifornisce un settore indipendente di tale strato e che il drenaggio venoso avviene a partire alla periferia di ognuno di tali settori. Ogni settore è funzionalmente unito a quello vicino, ma non ci sono anastomosi tra

settori adiacenti. Possiamo quindi immaginare lo strato coriocalpillare come un mosaico formato da aree di tessuto che vengono irrorate indipendentemente le une dalle altre e i cui bordi sono formati dalle vene (Hayreh, 1975a) (Fig. 7).

La particolare organizzazione delle arterie ciliari, nell'uomo come nei primati in genere, fa sì che in tali animali traumi a carico delle ACP non causino l'ischemia dell'intero globo oculare (Kazuhisa Sugiyama et al., 1999).

Infatti, l'occlusione delle ACP indotta sperimentalmente nelle scimmie e l'occlusione spontanea osservata nei pazienti con arterite a cellule giganti, causano infarti segmentali a livello del plesso coroideo. Questo conferma la distribuzione segmentale delle ACP nella coroide e l'assenza di anastomosi tra loro stesse o con le ACA (Hayreh e Baines, 1972 a.b.c; Hayreh 1974a.b, 1975a, 1983a, 1985, 1990 a.b, 1996, 2001; Hayreh e Chopdar 1982; Ducournau, 1979; Hayreh et al., 1998). Allo stesso modo quando l'ACA è occlusa durante interventi chirurgici sui muscoli retti, le ACP non riforniscono di sangue la porzione anteriore dell'uvea (Hayreh e Scott 1978; Verdi e Hayreh 1987).

Esistono, inoltre, molteplici zone spartiacque che separano i territori di distribuzione di due differenti arterie ciliari terminali (sia anteriori che posteriori) (Fig. 8). Queste zone risultano particolarmente sensibili al danno ischemico qualora vi sia un calo nella pressione di perfusione del letto vascolare di una o più arterie terminali (Stern e Ernest, 1974; Ernest et al., 1976; Torczynski e Tso, 1976; Hayashi e Laey, 1985; Giuffrè, 1989; Giovannini et al., 1994; Ross et al., 1998; Sato et al., 2000; Ito et al., 2001; Oto et al., 2002). Le aree spartiacque giocano un ruolo importante nelle neuropatie ottiche su base ischemica (in quanto lo stesso nervo ottico giace all'interno di una di queste aree), nonché nello sviluppo delle lesioni ischemiche nel complesso (Fig. 9).

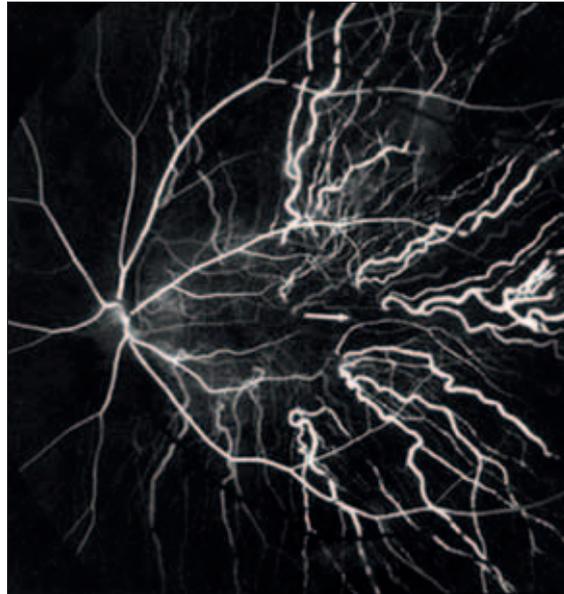


Fig. 6: Angiogramma di un occhio sano che mostra i siti di ingresso delle ACPB ed il loro percorso nella coroide. Freccia = il centro della regione maculare (da Hayreh, 2004)

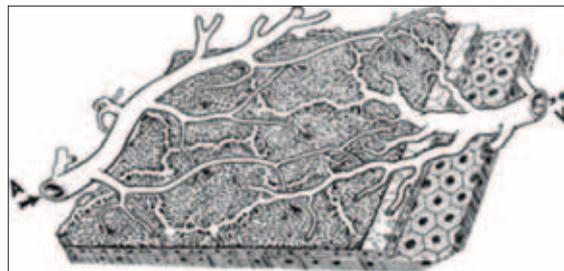


Fig. 7: Rappresentazione schematica della coriocalpillare. A = arteriole coroideali, V = vene coroideali (da Hayreh, 1975a)

La regolazione del flusso sanguigno coroideale è sotto il controllo del sistema nervoso simpatico (Alm et al, 1970); il volume di sangue contenuto nei vasi è talmente elevato da poter soddisfare completamente la domanda di ossigeno da parte della retina e, si pensa, da mantenere costante la temperatura retinica (Auker et al, 1982; Parver et al, 1980). Tuttavia, una riduzione del flusso ematico coroideale, causata ad esempio dal diabete

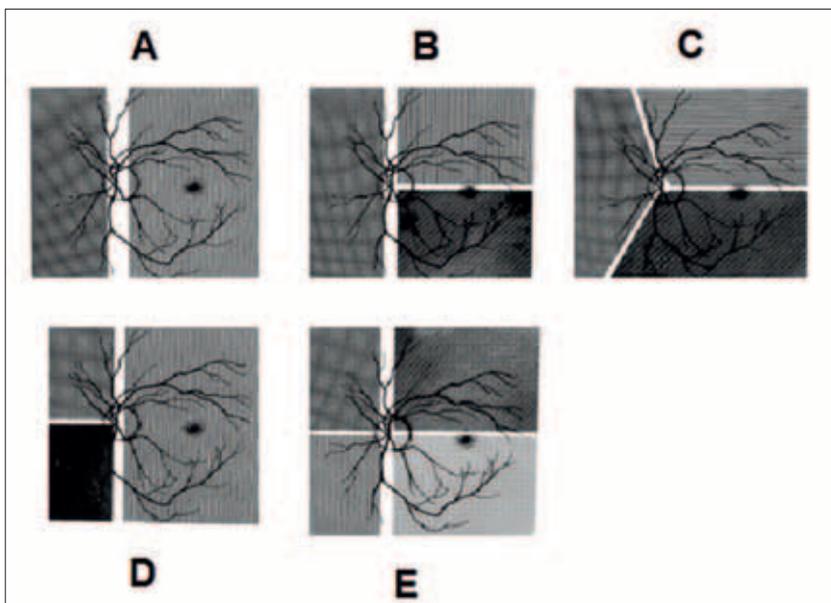


Fig. 8:
Rappresentazione schematica di alcune possibili localizzazioni di zone spartiacque tra le ACP in occhio di sinistra. A = due ACP, B-C-D = tre ACP in differenti combinazioni, E = quattro ACP (da Hayreh, 2004)

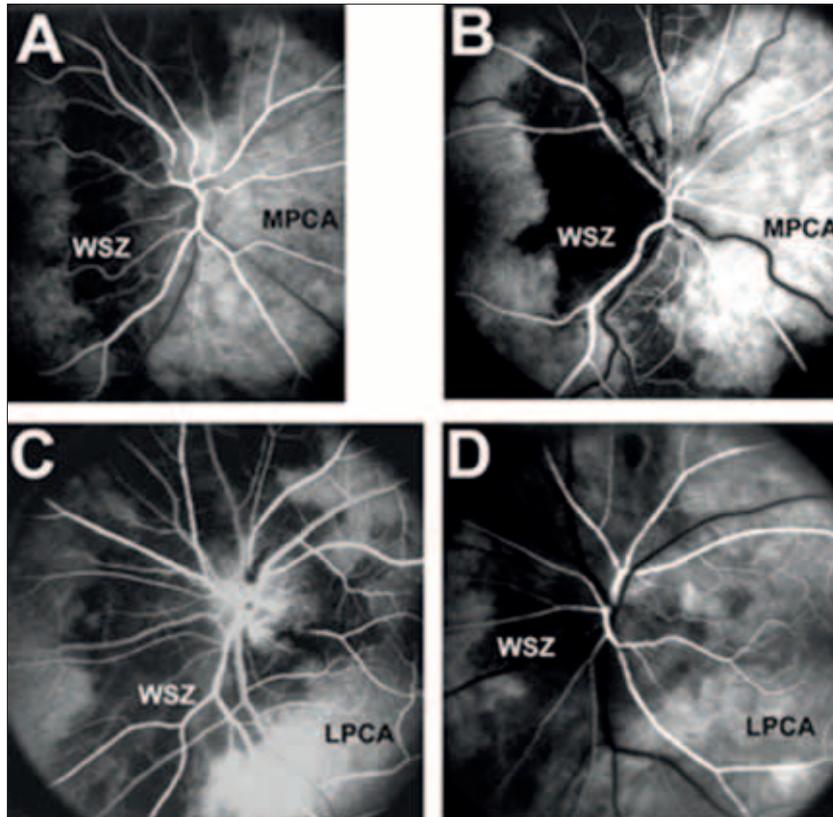
mellito o da patologie cardiovascolari ipertensive, può causare edema retinico.

Le vene che drenano la coroide si svuotano all'interno di 4-6 vene vorticosi all'equatore. Studi condotti da Hayreh sui primati sottoposti ad occlusione delle vene vorticosi ha mostrato che ogni quadrante della coroide è drenato in modo del tutto indipendente da una singola vena vorticosa (Hayreh e Bauines, 1973). All'angiografia le risultanti zone spartiacque formano delle aree a forma di croce disposte orizzontalmente attraverso il nervo ottico e la fovea e verticalmente attraverso la regione papillomaculare. Uno studio condotto da Mori et al. (in cui le fasi venose erano analizzate con l'angiografia) ha evidenziato come in un gruppo di soggetti sani il 50 % di essi presentavano un drenaggio venoso asimmetrico a livello della macula. Nei due terzi degli esaminati la direzione del drenaggio era principalmente supero-temporale, mentre negli altri casi questo risultava essere preferenzialmente infero-temporale o superonasale. Sembra, inoltre, che la direzione principale del drenaggio venoso coroideale dipenda dalla chiusura della breccia

embrionale, che avviene in modo asimmetrico (Keisuke, 2004).

La coroide è fondamentale per la nutrizione della retina tanto che apporta circa il 70% di ossigeno e glucosio a essa necessari. Questa struttura è dunque caratterizzata da un alto flusso plasmatico ($1800 \mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$) che è circa 10 volte quello della retina. Questo è regolato dal sistema nervoso autonomo attraverso fibre adrenergiche che si estendono solo fino alla lamina cribrosa. Il flusso ematico a livello coroideale dipende principalmente da tre fattori: pressione intraoculare, pressione arteriosa media e resistenza periferica. La coroide, inoltre, non è in grado di autoregolarsi, quindi ogni incremento della pressione intraoculare non viene compensata da cambiamenti pressori dei vasi coroideali. Il sangue viene poi drenato attraverso il sistema venoso che forma una sorta di anello costituito da venule postcapillari, utile per un outflow rapido ed efficace. Questa complessa struttura vascolare ha molteplici funzioni tra cui:

- Il trasporto di nutrienti agli strati posti al di sopra quali la membrana di Bruch, l'epitelio

**Fig. 9:**

Angiogramma del fondo con fluoresceina che mostra esempi di zone spartiacque in 4 occhi con neuropatia ottica ischemica anteriore. WSZ = zona spartiacque, LPCA = arterie ciliari posteriori laterali, MPCA = arterie ciliari posteriori mediali. A = coinvolgimento della regione temporale della regione temporale fino al disco ottico, B = coinvolgimento della regione temporale del disco ottico e coroide peripapillare temporale adiacente, C = coinvolgimento dell'intero disco ottico e della coroide peripapillare, D = coinvolgimento della porzione nasale del disco ottico e la coroide peripapillare nasale adiacente (da Hayreh, 2004)

pigmentato della retina e il neuroepitelio della stessa.

- La dissipazione del calore prodotto dalla retina durante le reazioni fotochimiche e metaboliche (Parver et al., 1980).

L'*autoregolazione* è la proprietà di un letto vascolare di modificarsi al fine di mantenere costante il flusso di sangue nel rispettivo distretto, indipendentemente da variazioni della pressione di perfusione. La *coroide* è da sempre stata considerata come un distretto privo di meccanismi di autoregolazione. Nonostante queste premesse c'è da dire che dagli studi più recenti si evince come la coroide sia *in grado di mantenere costante il suo flusso nonostante piccole riduzioni della pressione di perfusione oculare* (OPP) (Riva et al., 1997; Findl et al., 1997). Sebbene non siano state ancora comprese completamente

le modalità di regolazione del flusso coroideale in risposta a variazioni della pressione di perfusione oculare (OPP) *si ipotizza un meccanismo miogeno, neurogeno e metabolico per la regolazione del calibro delle sue arteriole.*

La *teoria miogena* presuppone che un abbassamento della pressione trasmurale determini un rilassamento delle cellule muscolari lisce inducendo un incremento del diametro vasale tale da mantenere costante la tensione murale. Studi significativi in tal senso, per adesso limitati ai conigli, dimostrano come questo meccanismo sia coinvolto nel processo di autoregolazione del flusso coroideale (Kiel and Shepherd, 1992; Kiel and van Heuen, 1995). Un *coinvolgimento nervoso*, invece, è stato ipotizzato in seguito all'osservazione che le arteriole della coroide, al contrario di quelle retiniche, presentano una ricca innervazione autonoma,

sia simpatica che parasimpatica (Ehinger, 1966; Ruskell, 1971; Cioffi et al., 2002; Lütjen-Drecoll, 2006). In molte specie animali si è dimostrato che una stimolazione delle fibre simpatiche, molte delle quali nell'uomo contengono il *neuropeptide Y* (Stone, 1986), inducono una riduzione del flusso (Alm and Bill, 1970; Alm 1977; Kawarai and Koss, 1998; Steinle et al., 2000). Da ciò si è ipotizzato che queste fibre possono esercitare un ruolo protettivo sulla coroide onde evitare una eccessiva perfusione durante incrementi della pressione sistemica (Bill and Linder, 1976). Però, interpretare questo come un meccanismo di autoregolazione risulta per molti erroneo poiché la regolazione nervosa non rappresenta una proprietà intrinseca dello stesso tessuto.

In questo contesto risultano particolarmente interessanti gli studi di Riva et al. (1997) i quali, basandosi sulle variazioni del flusso coroideale (ChBF) durante un progressivo aumento della pressione intra-oculare (IOP) hanno ipotizzato una regolazione nervosa del flusso stesso durante il contemporaneo abbassamento della OPP, pur non escludendo del tutto un meccanismo miogeno.

Al di là di queste prospettive, da sempre il flusso coroideale è stato considerato strettamente associato al pH ematico (meccanismo metabolico) e a parametri pressori (in particolare alla OPP). I rapporti tra ChBF e OPP, IOP, MAP (pressione arteriosa media) sono stati ampiamente affrontati da Polska et al. (2007) i quali hanno ipotizzato che il ChBF potesse dipendere non solo dalla OPP ma anche dalla MAP e dalla IOP. Lo studio si è prefisso di indagare le variazioni della OPP durante un aumento della IOP in associazione all'incremento della MAP indotto dall'esercizio fisico (in particolare squatting) e durante incrementi progressivi della IOP indotti con il metodo della suction cup. L'esperimento, dunque, ha avuto il presupposto di esaminare la regolazione del ChBF durante cambiamenti combinati della

IOP e della MAP al fine di verificare l'ipotesi come la regolazione del ChBF dipenda sì dalle variazioni della OPP, ma anche da come queste variazioni siano indotte. Considerando che la OPP risulta essere $(MAP - IOP)$ e cioè $MAP = PD - (Ps - Pd) / 3$ si è visto che l'esercizio fisico ha indotto un incremento significativo della MAP (dal + 29% al + 33%) e della frequenza del polso (da + 38% al + 50%) durante lo squatting, in cui si registrava anche un piccolo, ma significativo incremento della IOP, potenziato dall'applicazione della suction cup. Queste variazioni della IOP e della MAP, ovviamente, inducono alterazioni anche della OPP. Per quanto riguarda il ChBF, l'esercizio fisico ne ha causato un aumento del 9,2% rispetto ai suoi valori basali mentre al contrario, il progressivo e forzato incremento della IOP, ne ha indotto un decremento proporzionale.

Da tali studi si evince quindi come un abbassamento della OPP, indotto da un incremento progressivo della IOP, senza alcuna alterazione della MAP, induce un abbassamento del ChBF. Il ChBF risulta, quindi, indipendente dalla MAP, ma limitatamente ai valori pressori sistemici indotti, nella sperimentazione, dall'esercizio fisico. È importante sottolineare, inoltre, come la riduzione del ChBF è, in proporzione, inferiore rispetto all'abbassamento della OPP che l'ha determinato. Ciò fa presupporre una riduzione delle resistenze arteriolari della coroide tramite vasodilatazione. Questi risultati concordano pienamente con i dati forniti da Riva et al. (1997) indicanti meccanismi di autoregolazione nella coroide durante un decremento progressivo della OPP. Gli stessi risultati possono accordarsi anche con la teoria miogena se si assume che un incremento della IOP sia associata ad una riduzione della OPP, ma anche ad un aumento del gradiente pressorio transmurale. Il più importante risultato ottenuto in questo studio è stato il riscontro che il ChBF è regolato meglio durante incrementi della MAP indotti dall'esercizio fisico piuttosto che durante decrementi della OPP

indotti sperimentalmente per aumento della IOP. Questo è stato confermato grazie all'osservazione che alla stessa OPP, il flusso coroideale è regolato meglio a basse piuttosto che ad alte IOP. Tali risultati concordano anche con i primi dati ottenuti in studi sui conigli, sebbene siano stati effettuati con metodiche diverse (Kiel and Shepherd, 1992). Come abbiamo visto, infatti, il ChBF si abbassa durante un incremento della IOP per riduzione della OPP. Quando, invece, la OPP aumenta in conseguenza dell'esercizio fisico, l'incremento della pressione trasmurale a livello delle arteriole coroideali instaura una risposta di vasocostrizione e una maggiore capacità di regolazione.

Da tutto ciò si evince che almeno nella coroide subfoveale il flusso dipende maggiormente dalla IOP piuttosto che dalla pressione sistemica. Quindi si presume che nei pazienti con glaucoma che presentano OPP simili, il ChBF sia inferiore in coloro che mostrano una maggiore IOP. Poiché una IOP elevata è uno dei più importanti fattori di rischio per il glaucoma questi risultati possono rappresentare un punto di connessione tra la teoria pressoria e quella vascolare dell'eziologia del glaucoma.

Oltre che nella retina, anche a livello coroideale si è dimostrato di particolare importanza uno specifico mediatore: l'NO (Koss, 1998; Schmetterer e Polak, 2001). Questo non è caratteristico esclusivamente della specie umana (Luksch et al., 2000), ma è stato riscontrato come mediatore in tale processo anche in altre specie quali topi (Koss, 1998) e gatti (Mann et al., 1995). L'NO, infatti, modula il ChBF basale e la sua autoregolazione in risposta a cambiamenti della OPP (Kiel, 1999; Luksch et al., 2003), a ipercapnia (Schmetterer et al., 1997a), all'insulina (Schmetterer et al., 1997b) e ad altre sostanze vasodilatatrici (Haefliger et al., 2001).

Più recentemente (2009) Simader et al. hanno condotto uno studio al fine di valutare se il *sistema argininal/NO possa giocare un ruolo nella regolazione del flusso ematico coroideale* durante le riduzioni

della pressione di perfusione oculare (OPP). Lo studio si è articolato in 3 giorni nei quali veniva praticata ai soggetti un'infusione endovenosa di N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), fenilefrina o placebo. Contemporaneamente veniva incrementata in maniera progressiva la pressione intraoculare tramite la coppetta di suzione. Venivano dunque valutati il ChBF (tramite flussimetria a laser Doppler), la pressione arteriosa media e la IOP. I dati ottenuti da questa indagine hanno confermato i riscontri precedenti secondo i quali la coroide presenta delle capacità di autoregolazione durante la riduzione della OPP. Questo studio ha infatti dimostrato come il sistema L-arginina/NO giochi un ruolo importante nel mantenimento della tono vascolare basale, tuttavia non sembra coinvolto nella risposta coroideale vasodilatatoria che si sviluppa durante gli incrementi della IOP.

Molti studi hanno recentemente evidenziato come *nella transizione dalla luce al buio si rilevi una riduzione del flusso coroideale*. La causa di questo abbassamento non è ancora chiara, ma si ipotizza possa essere correlata a specifici impulsi nervosi.

Uno studio in questo ambito è stato condotto da Huemer et al. (2007). L'ipotesi iniziale è che sia l'agonista degli α -recettori (fenilefrina) sia la L-NMMA (monometil-L-arginina), inibitore della ossido nitrico sintetasi (NOS), potessero alterare la risposta del ChBF nella transizione dalla luce al buio.

Prima della somministrazione delle molecole una transizione luce/buio riduceva il ChBF subfoveale dal $16\% \pm 4\%$ al $20\% \pm 5\%$ in associazione a un abbassamento dell'ampiezza della pulsazione del fondo (FPA) dall' $11\% \pm 3\%$ al $13\% \pm 4\%$.

All'accensione della luce tutti i parametri dell'emodinamica oculare tornavano ai valori basali e in queste condizioni *nè la fenilefrina nè il placebo* erano in grado di modificare il ChBF basale o FPA.

Queste molecole non erano in grado di influire in maniera significativa neanche sui cambiamenti

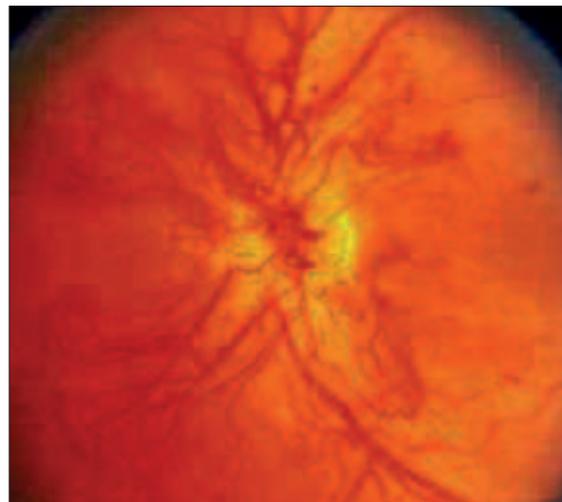


Fig. 10: Immagini di fondo oculare di pazienti affetti da retinopatia diabetica. A = forma non proliferante, B = forma proliferante

che gli stessi parametri manifestavano al passaggio luce/buio.

La somministrazione della *L-NMMA*, invece, riduceva non solo il ChBF basale (del $20,5\% \pm 5,9\%$) e l'ampiezza della pulsazione del fondo (del $21,5\% \pm 4,8\%$) ma abbassava ancor di più le loro variazioni in risposta alla transizione luce/buio ($-6,2\% \pm 3,2\%$ per il ChBF e $-4,2\% \pm 2,4\%$ per l'FPA).

L'NO è dunque coinvolto anche in questo processo di transizione luce/buio.

Tuttavia, poiché la *L-NMMA* è un inibitore non specifico della NOS e non sono a disposizione per l'uomo inibitori selettivi delle NOS, non è ancora chiaro se l'NO in questione sia di origine endoteliale piuttosto che neuronale.

Si deve considerare anche che la *L-NMMA* induce un aumento della pressione sistemica media per la sua attività di vasocostrizione a livello periferico, ma questo effetto non sembra influire sui cambiamenti del flusso coroideale indagati in tale studio in quanto la fenilefrina, che induce effetti del tutto paragonabili a quelli della *L-NMMA* sui valori sistemici non influenza i parametri del flusso coroideale durante la transizione luce/buio, a conferma che i due fenomeni non sono correlati.

Sulla base di questo studio appare invece chiaro come *la riduzione fisiologica del flusso coroideale al buio dipenda da una minore vasodilatazione arteriolare associata a una minore produzione di NO.*

La circolazione oculare è regolata al fine di mantenere un'adeguato apporto ematico alla retina e per garantirne l'omeostasi a ogni stimolo fisiologico. È quindi fondamentale comprendere i fisiologici meccanismi di regolazione della circolazione oculare in condizioni di ipossia, ipercapnia o di incremento acuto della PA sistemica. Tuttavia è ormai noto come *molti altri fattori possano influenzare il flusso plasmatico oculare come ad esempio l'incremento della temperatura tissutale.* Nagaoka nel 2006 ha appunto studiato la relazione esistente tra flusso oculare retinico (RBF), flusso coroideale (ChBF) e incremento della temperatura tissutale. A tal fine ha esposto 10 volontari sani per 10 minuti a una luce, analizzando in seguito il RBF in arteria e vena retinica e il ChBF a livello foveale con la *velocimetria laser doppler* e la *flussimetria laser doppler* rispettivamente. Da questa valutazione è emerso come l'incremento della temperatura aumenti il RBF sia a livello arterioso che venoso, ma allo stesso tempo riduce il ChBF nella

regione foveale. Si è ipotizzato, dunque, che il ChBF possa contribuire al mantenimento della temperatura retinica in risposta al riscaldamento oculare.

Negli ultimi anni, inoltre, sono stati condotti numerosissimi studi al fine di valutare la presenza di alterazioni del flusso ematico coroideale nelle diverse condizioni patologiche. Tra questi risulta molto interessante quello condotto dallo stesso Nagaoka et al. (2004) al fine di dimostrare la presenza di alterazioni del ChBF nella regione foveale in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (Fig. 10). Lo studio prevedeva l'esecuzione di una flussimetria laser doppler in 70 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 e in 36 soggetti sani (gruppo di controllo) oltre che di una tomografia a coerenza ottica (OCT) per la misurazione dello spessore foveale. I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi:

1. 33 pazienti senza retinopatia diabetica (NDR)
2. 20 pazienti con retinopatia diabetica non proliferativa e senza edema maculare (NPDR/MO-)
3. 17 pazienti con retinopatia diabetica non proliferativa ed edema maculare (NPDR/MO+)

Dalle misurazioni è emerso come nei pazienti diabetici si sviluppi una significativa riduzione del ChBF della regione foveale, in particolar modo in coloro che presentano edema maculare.

Anche Takahashi et al. (2008) hanno condotto uno studio sullo stesso argomento per valutare il ChBF a livello foveale in pazienti con una severa retinopatia diabetica e sottoposti a fotocoagulazione panretinica (PRP). Sono stati misurati con la flussimetria laser doppler la velocità ematica coroideale (CBVel), il volume ematico coroideale (CBVol) e il ChBF a 17 pazienti prima e un mese dopo aver eseguito quattro sessioni di PRP. Dai risultati è emerso come la PRP possa incrementare il ChBF nella regione foveale di soggetti affetti da severa retinopatia diabetica. È stato inoltre ipotizzato che ciò possa dipendere dalla vasodilatazione dei coriocapillari della regione foveale.

TECNICHE DI VALUTAZIONE DEL FLUSSO COROIDEALE

Le tecniche qui riportate non si devono considerare nettamente separate da quelle di valutazione del flusso retinico; alcune comprendono i due flussi.

■ Il polso oculare

Il *polso* oculare, legato al ciclo cardiaco, può essere utilizzato per valutare il flusso ematico oculare pulsatile. Il polso oculare deriva infatti dall'ingresso di una quantità di sangue nell'occhio durante la sistole, per lo più a livello coroideale e pertanto di pertinenza delle ciliari posteriori che irrorano anche il nervo ottico. La tecnica sfrutta la conversione del polso tonometrico in un polso volumetrico, che moltiplicato per la frequenza cardiaca ci dà il flusso oculare pulsatile. Sebbene le limitazioni di questa tecnica siano molteplici, può comunque fornire un indice di flusso ematico oculare. Sono stati proposti due approcci. Il primo è un approccio pneumotometrico basato sull'osservazione che esistono variazioni della pressione intraoculare (IOP) durante il ciclo cardiaco. La massima variazione della IOP durante il ciclo cardiaco è chiamata *ampiezza del polso* (Langham et al., 1989; Silver et al., 1989). Uno pneumotometro modificato connesso ad un computer registra l'onda oculare pulsatile e può calcolare il polso oculare. Il secondo approccio permette di misurare il polso oculare attraverso il calcolo delle distanze tra la cornea e la retina durante il ciclo cardiaco (Schmetterer et al., 1995; 1996). Questo fenomeno è chiamato *pulsazione del fondo oculare* (*ocular fundus pulsation*) e la variazione massima della distanza durante il ciclo cardiaco è chiamata *ampiezza della pulsazione del fondo* (*fundus pulsation amplitude, FDA*). La maggiore limitazione di queste tecniche è la mancanza dell'informazione sulla componente non pulsatile del flusso sanguigno oculare (Schmetterer e Garhofer, 2007).

■ L'Eco-color Doppler

L' *Eco-color Doppler* (ECD) ci consente di valutare la velocità del flusso dell'arteria oftalmica, dell'arteria centrale della retina e delle arterie ciliari posteriori brevi (nasale e temporale) nonché la morfologia del tracciato con un'alta attendibilità dei risultati. Il color Doppler è una metodica che trae la sua importanza dal fatto che l'uso del modulo colore consente la visualizzazione simultanea del flusso ematico, anche di vasi di calibro esiguo, sovrapposta all'immagine bidimensionale. L'analisi spettrale Doppler permette la valutazione quantitativa del flusso ematico nei vasi e fornisce informazioni diagnostiche chiare, in tempo reale, non ottenibili con altre tecniche diagnostiche non invasive. Infatti, utilizzando una sonda ad ultrasuoni e sfruttando l'equazione di Doppler e la correlata modificazione delle frequenze riflesse, *si può calcolare la velocità del sangue in un vaso*. Nota la velocità si può estrapolare il flusso ematico nei vasi esplorati, in particolare nell'arteria centrale della retina che irrorava le cellule ganglionari e lo strato delle fibre nervose, nelle arterie ciliari posteriori da cui originano i rami per lo strato laminare e prelaminare della papilla e nell'arteria oftalmica che fornisce il sangue a tutto il bulbo. L'onda flussimetrica fornita dal Doppler ad analisi spettrale esprime le variazioni della velocità del sangue durante il ciclo cardiaco. L'onda presenta una prima fase ascendente, la *velocità di picco sistolica* (*peak systolic velocity, PSV*) in quanto termina in un picco che rappresenta la velocità massima raggiunta dal sangue (Schmetterer e Garhofer, 2007). Quanto maggiore sarà l'accelerazione del sangue a opera della contrazione miocardica tanto maggiore sarà la sua velocità e quindi la rapidità della fase anacrotica. Al picco segue una fase discendente, più lenta, la *velocità di picco diastolica* (*end diastolic velocity, EDV*) (Schmetterer e Garhofer, 2007). Questa velocità è condizionata dalle resistenze che

il sangue incontra nel suo progredire: quanto più queste saranno elevate tanto più rapida sarà la decelerazione del sangue e quindi tanto più rapidamente diminuirà la velocità diastolica del flusso e viceversa. L'ampiezza dello spettro esprime, invece, il volume di corpuscolatura ematica in esame. La *velocità media dell'onda sisto-diastolica* (*mean flow velocity, MFV*) rappresenta la velocità media del sangue durante un ciclo cardiaco completo (Schmetterer e Garhofer, 2007). Un suo aumento, però, non sempre esprime un reale aumento del flusso in quanto potrebbe verificarsi contemporaneamente una riduzione del diametro vasale. È possibile così calcolare l'*indice di resistenza* (*resistive index, RI*) come $(PSV-EDV)/PSV$ (Schmetterer e Garhofer, 2007). Tuttavia non è ancora del tutto chiaro se l'RI rappresenti una misura adeguata della resistenza vascolare retinica (Polska et al., 2004). Un'importante limitazione dell'ECD è che non fornisce nessuna informazione quantitativa sul diametro vasale quindi il calcolo del flusso ematico totale non può essere effettuato con questo metodo (Schmetterer e Garhofer, 2007), tuttavia permette di studiare la resistenza al flusso nei vari distretti ematici bulbari e di apprezzarne dunque le variazioni in risposta ad agenti terapeutici.

■ La flussimetria con laser Doppler

La *flussimetria con laser Doppler* (*LDF*) permette, tra l'altro, la *misurazione del ChBF nella regione sub-foveale* del fundus. Questa tecnica è stata ampiamente applicata per lo studio della regolazione del flusso coroidale in risposta ai diversi stimoli fisiologici (come le diverse concentrazioni di gas respiratori, le variazioni della pressione sistemica e della OPP, le transizioni buio-luce) nei soggetti normali. Le misurazioni del ChBF in condizioni patologiche quali diabete mellito, degenerazione maculare legata all'età e glaucoma, invece, indicano spesso alterazioni nella risposta del ChBF a

incrementi della pressione sistemica (Riva, 2006). La LDF è una tecnica in cui la luce laser non viene diretta verso un vaso retinico, ma verso un tessuto vascolarizzato privo di vasi sanguigni visibili. La teoria su cui si basa la LDF è stata sviluppata per la misura del flusso del sangue nella pelle (Bonner e Nossal, 1990). Fibre ottiche in contatto con il tessuto vengono usate per l'illuminazione laser e la rilevazione della luce diffusa. Queste fibre sono separate da una distanza di 0.25-1 mm e tale separazione permette un ottimo compromesso rispetto al *signal-to-noise* ratio e la profondità del volume del tessuto campionato dalla luce laser. Nell'applicazione della LDF all'occhio un sistema di fibre come quello della pelle non può essere utilizzato senza un intervento chirurgico. È stata però messa a punto una tecnica per la misurazione non invasiva del flusso sanguigno oculare. Un sistema ottico viene montato su di una fundus camera. Questo sistema permette di dirigere il fascio laser su qualunque punto del polo posteriore dell'occhio. Un altro sistema viene utilizzato per focalizzare la luce laser diffusa dai globuli rossi sul fotosensore. Inoltre, un'area del fondo (30°) viene illuminata da una luce la cui sorgente è una lampada al tungsteno con un filtro redfree allo scopo di osservare e posizionare il laser. La luce diffusa che emerge dalla pupilla viene raccolta da una fibra ottica con un'apertura di 400 μm che viene posizionata sul piano dell'immagine retinica (piano che corrisponde al film fotografico su cui viene impressa la foto del fondo) e dalla fibra ottica giunge al detector. A causa dell'ingrandimento della fundus camera, la proiezione dell'apertura della fibra ottica sul piano retinico ha un diametro di circa 160 μm e viene orientata sul punto di focalizzazione del raggio laser (Schmetterer e Garhofer, 2007). Valori relativi del flusso sanguigno vengono calcolati come il prodotto della velocità e del volume. Confronti interindividuali dei dati LDF sono difficoltosi a causa delle variazioni considerevoli

dell'assorbimento, diffusione e riflessione della luce incidente sul tessuto che a loro volta influenzano la penetrazione nel tessuto stesso (Schmetterer e Garhofer, 2007). Questa tecnica permette anche una valutazione quantitativa del flusso in discrete aree (100 mm x 100 mm) nel distretto microcircolatorio tuttavia non vengono misurate frequenze Doppler maggiori di 2000-4000 Hz, essa non è così idonea alla misura della velocità del sangue nelle arteriole e venule della retina dove la velocità dei globuli rossi (molto più di un mm/sec) dà luogo a frequenze Doppler superiori a questa frequenza massima. Inoltre, le misure nella retina potrebbero risentire del contributo della sottostante coriocapillare (Strenn et al., 1997). Per valutare il *flusso sanguigno retinico* mediante questa analisi lo strumento più utilizzato è l'*Heidelberg Retina Flowmeter (HRF)* grazie al programma AFFPIA (automatic full field perfusion image analysis) che consente la creazione di una mappa molto dettagliata del flusso ematico di una porzione di tessuto delle dimensioni di 2.7 x 0.7 mm. L'area analizzata è suddivisa in 64 linee ognuna delle quali è composta da 256 punti ed in ogni punto l'intensità della luce è misurata 128 volte consecutivamente prima di passare al punto successivo. Tutti i dati devono essere sottoposti a un'analisi matematica (di Fourier) che permette di identificare il contributo di ogni frequenza alla variazione totale di intensità della luce e di calcolare un numero che è proporzionale alla concentrazione di globuli rossi in movimento, parametro chiamato *volume*, e un secondo numero proporzionale al numero di globuli rossi, identificato come *flow*. Un terzo parametro, chiamato *velocity*, è ottenuto con il rapporto tra flow e volume, ed esprime la velocità dei globuli rossi. Tutti questi valori sono calcolati in unità arbitrarie non confrontabili con quelli ottenuti con altre metodiche. La presentazione dei risultati avviene con la visualizzazione dell'immagine di riflettività del tessuto

e di mappe di perfusione bidimensionali, in cui la brillantezza di ogni pixel esprime il valore flow, volume e velocità: maggiore è il volume misurato e più brillante è l'immagine. Per questa ragione i vasi ematici più grandi, in cui il flusso ematico è maggiore, appaiono come la porzione più brillante dell'intera immagine, mentre le aree a più bassa perfusione appaiono più scure (Michelson et al., 1996; 1998). Il programma AFFPIA presenta una buona riproducibilità intraosservatore della misurazione del flusso sanguigno retinico.

Il flusso sanguigno retinico è stato calcolato nel lavoro di Scrimieri et al. (2006) nelle sezioni superiore e inferiore e ciascuna sezione è stata ulteriormente divisa in tre aree retina temporale, retina nasale ed area del bordo papillare. Il coefficiente di variazione AFFPIA delle misurazioni del flusso variava dall'1 al 7.3% nell'area temporale, dall'1.5% al 10% nell'area nasale e dal 2 a 30% nell'area del bordo papillare. Quando lo stesso osservatore ha analizzato la stessa immagine cinque volte (riproducibilità intraosservatore intrainimmagine), il coefficiente variava dallo 0.5 al 5% nell'area temporale, dallo 0.1 al 5.3% nell'area nasale e dallo 0.5 al 28% nell'area del bordo papillare. Quindi, è stata trovata una buona riproducibilità intraosservatore della misurazione del flusso sanguigno retinico, in particolare la riproducibilità nelle aree temporale e nasale era significativamente migliore rispetto a quella del bordo papillare.

Uno strumento utile allo stesso scopo è il *flussimetro Canon laser Doppler* (Canon Laser Doppler blood flowmeter, CLDF – Canon; Tokio, Japan) che combina la misura della velocità ematica ottenuta con la velocimetria laser Doppler e un sistema di valutazione del diametro dei vasi retinici (Feke et al., 1987). Questa tecnica permette di calcolare il flusso sanguigno retinico in $\mu\text{l}/\text{min}$ basato sul principio di Poiseuille sui vasi selezionati con un'alta riproducibilità (Guan et al., 2003).

■ Angiografie

L'angiografia con *fluoresceina sodica* è utilizzata principalmente per l'indagine dei vasi retinici. Infatti, la barriera emato-retinica previene in condizioni normali il libero passaggio di sostanze anche di piccolo peso molecolare dal torrente circolatorio ai tessuti. Giunzioni intercellulari strette sono presenti sia a livello dell'endotelio dei capillari retinici che tra le cellule dell'epitelio pigmentato. I vasi della coriocapillare, al contrario, presentano ampie fenestrature parzialmente permeabili anche a molecole della grandezza dell'albumina. Questa particolare condizione spiega gli aspetti angiografici che comunemente si riscontrano. Com'è noto, la *fluoresceina sodica* iniettata per via endovenosa si lega per buona parte alle proteine plasmatiche. La prima comparsa del colorante si ha generalmente nel circolo coroideale. All'iniezione dei vasi coroideali segue la diffusione della fluoresceina nel tessuto coroideale che pertanto guadagna una diffusa e intensa fluorescenza. I vasi retinici sono successivamente iniettati e non essendo la loro parete permeabile alla fluoresceina risultano molto ben visibili sullo sfondo specie nella zona maculare dove il contrasto risulta maggiore. Anche sulla testa del nervo ottico la fluorescenza permette un'agevole visualizzazione della rete capillare superficiale mentre risulta più difficoltosa la visualizzazione della rete capillare profonda (Schmetterer e Garhofer, 2007). Attraverso l'iniezione del colorante fluorescente si può così misurare il tempo impiegato dal colorante per passare attraverso la circolazione retinica. Il tempo medio della circolazione retinica, definito come la differenza tra i tempi venosi ed arteriosi, è usato come misura della velocità del flusso sanguigno retinico (Schmetterer e Garhofer, 2007). In alternativa, il tempo di passaggio artero-venoso, definito come il tempo tra la prima apparizione del colorante in una arteria retinica e nella vena corrispondente, è

stato usato per misurare le velocità di flusso ematico retinico (Wolf et al., 1989). Questi approcci sono stati adattati usando la videoangiografia (Preussner et al., 1983; Wolf et al., 1989) e l'oftalmoscopia a scansione laser (SLO) (Tanaka et al., 1991; Wolf et al., 1991). Quest'ultimo metodo si basa sull'impiego della sorgente luminosa laser che, essendo monocromatica, con coerenza spaziale e brillantezza, permette una precisa visualizzazione dei particolari retinici e quindi una migliore risoluzione spaziale. Un piccolo spot laser viene così proiettato sulla retina e rapidamente spostato orizzontalmente e verticalmente operando quindi una scansione dell'area inquadrata. L'immagine riflessa risulta nitida e contrastata e caratterizzata da una risoluzione tale da visualizzare i singoli globuli rossi transitanti nei capillari retinici.

Questo strumento permette di catturare 25 immagini al secondo ed è molto efficace nello studio angiografico del nervo ottico e della zona periotica. In ogni caso, la tecnica angiografica presenta alcune limitazioni che devono essere considerate nell'interpretazione dei risultati. Primariamente, tale tecnica è basata sull'assunzione che tutto il sangue di un'area rifornita da una specifica arteria è drenata dalla vena corrispondente, il che potrebbe non essere vero in tutti i casi, specialmente in pazienti con patologie vascolari. Inoltre, la velocità del flusso sanguigno maculare è stata quantificata mediante l'analisi dei punti iper- ed ipofluorescenti nel momento in cui vengono visualizzati nei capillari perifoveolari che rappresentano rispettivamente i leucociti e gli eritrociti (Wolf et al., 1991; Arend et al., 1999).

Questo approccio richiede tuttavia un'eccellente qualità delle immagini altrimenti non è possibile identificare in modo inequivocabile i punti iper- ed ipofluorescenti nelle immagini consecutive.

L'angiografia al verde di indocianina (ICG) (Fig. 11) prevede l'utilizzo di un computer per l'ana-



Fig. 11: Immagine ottenuta con angiografia al verde di indocianina (ICG)

lisi delle immagini ottenute con un sistema ICG videocamera. Il picco massimo nello spettro di assorbimento della ICG misurato con la spettrofotometria è a 780 nm, ma scivola fino a 805 nm dopo l'interazione della stessa con le proteine sieriche. Per questo è stato sviluppato un sistema ICG video con due fonti di luce, una a 780 nm per le fasi iniziali di riempimento e uno a 805 nm per le fasi più tardive (Yoneya, 2004). Questa sostanza si lega rapidamente e quasi totalmente alle proteine plasmatiche. La macromolecola risultante non attraversa, se non in minime percentuali, le fenestrate della coriocapillare. I limiti di questa metodica stanno nella bassa efficienza luminosa del colorante che offre delle immagini meno contrastate e meno dettagliate rispetto alla fluoresceina, ma permette lo studio della circolazione coroidale (Scheider et al., 1993; Guyer et al., 1994; Ito et al., 2001).

■ La tomografia a coerenza ottica

La tomografia a coerenza ottica (OCT) è una tecnica di imaging, non invasiva, che fornisce immagini-

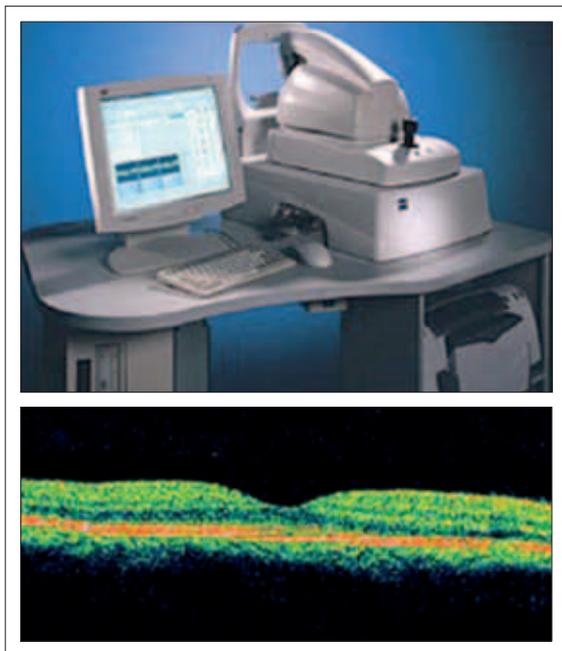


Fig. 12: A = OCT, B = Sezione tomografica della regione maculare in condizioni normali con l'OCT III

ni ad alta risoluzione di sezioni della retina umana in vivo, permettendo la diagnosi, la stadiazione e il follow-up di numerose affezioni retiniche. L'OCT è quindi un esame semplice, rapido, non invasivo e altamente riproducibile, ma è limitato dalla presenza di qualsiasi opacità dei mezzi diottrici e dalla miopia. Sono disponibili attualmente diversi strumenti con caratteristiche diverse. In questa prima parte faremo riferimento all'*OCT Standard (III)* che è un *OCT Time domain status*. L'*OCT Time domain* funziona tramite una tecnica di misurazione ottica chiamata interferometria a bassa coerenza. Il principio di funzionamento dell'interferometria è simile a quello dell'ecografia, differenziandosi per il fatto di sfruttare la riflessione di onde luminose da parte delle diverse strutture oculari piuttosto che la riflessione delle onde acustiche. La caratteristica principale consiste nel fatto che la velocità della luce è quasi un milione di volte più veloce di quella del suono, consentendo la misurazione di strutture e distanze (potere di risoluzio-

zione longitudinale) dell'ordine di $10\ \mu\text{m}$, contro i 100-150 degli ultrasuoni. Un'altra caratteristica importante è che l'interferometria ottica, a differenza degli ultrasuoni, non richiede alcun contatto fisico con il tessuto esaminato. L'*OCT Time domain* proietta sulla retina un fascio di lunghezza d'onda nel vicino infrarosso (820 nm) generato da un diodo superluminescente; confronta quindi i tempi di propagazione dell'eco della luce riflessa dalla retina con quelli relativi allo stesso fascio di luce riflesso da uno specchio di riferimento posto a distanza nota. Benché la luce riflessa dalla retina sia composta da echi multipli, la distanza percorsa dagli stessi viene determinata tramite la variazione della distanza dallo specchio di riferimento che risulta in movimento. L'interferometro *OCT Time domain* rileva elettronicamente, raccoglie, elabora e memorizza gli schemi di ritardo degli echi provenienti dalla retina. I tomogrammi vengono visualizzati in tempo reale utilizzando una scala in falsi colori che rappresenta il grado di riflettività dei tessuti posti a diversa profondità: i colori scuri (blu e nero) rappresentano zone a minima riflettività ottica, mentre i colori chiari come il rosso e il bianco definiscono zone molto riflettenti. Infine, il sistema memorizza le scansioni selezionate, permettendone la successiva elaborazione, tra cui la possibilità di correggere l'effetto dei movimenti oculari longitudinali (ma non di quelli trasversali). Le immagini tomografiche ottenute con l'*OCT time domain* permettono uno studio sia di tipo qualitativo che quantitativo del tessuto retinico, con la possibilità di dirigere la scannerizzazione direttamente verso la zona di interesse grazie alla contemporanea osservazione della retina. Dal punto di vista qualitativo su ogni scansione si può effettuare un'analisi della morfologia e del grado di riflettività degli strati retinici. Per quanto riguarda la valutazione quantitativa lo strumento permette di misurare lo spessore della retina, che può anche essere rappresentato in mappe di spessore.

Nella sezione tomografica della regione maculare in condizioni normali si visualizza la caratteristica struttura retinica a strati con la depressione foveale (Fig. 12). La superficie di separazione vitreo-retinica appare ben definita, grazie al contrasto tra l'assenza di riflettività del vitreo e l'elevata riflettività dello strato delle fibre nervose più superficiali. Gli strati retinici intermedi possiedono un modesto grado di riflettività. I fotorecettori, che hanno una disposizione longitudinale, sono otticamente poco riflettenti e appaiono come una banda scura che separa la neuroretina dal complesso epitelio pigmentato-coriocapillare di elevata riflettività. Qualche debole *segnale di riflettività proviene anche dagli strati più profondi della coroide e della sclera*, soprattutto nei casi di assottigliamento o atrofia del tessuto retinico. Ad oggi questa tecnica trova il suo massimo impiego come esame complementare alla fluorangiografia e alla fotografia del fondo oculare per lo studio delle patologie retiniche, ma si sta sempre più sostituendo a queste tecniche soprattutto per quanto riguarda la stadiazione e il follow-up delle alterazioni dell'interfaccia vitreo-retinica, dei fori maculari, dell'edema maculare secondario a retinopatia diabetica, dell'occlusione della vena centrale della retina, delle uveiti, della fibrosi pre-retinica o post-intervento di cataratta, nella valutazione del distacco del neuroepitelio in corso di coriorretinopatia sierosa centrale (CSC) e degenerazione maculare legata all'età (AMD) di tipo essudativo. Liakopoulos et al. (2008) hanno condotto uno studio su 66 persone con neovascolarizzazione coroideale subfoveale (NVC) associata ad AMD. Nella AMD neovascolare possono osservarsi tramite l'angiografia con fluoresceina diversi patterns di neovascolarizzazione coroideale e lo scopo di questo studio era proprio quello di valutare la capacità dell'OCT di evidenziare anch'esso le differenze presenti tra i quadri di NVC identificabili con l'angiografia. Ne è emerso che l'angiografia e l'OCT forniscono in-

formazioni complementari riguardo le lesioni da NVC. L'analisi quantitativa delle immagini OCT permette infatti una migliore comprensione delle caratteristiche anatomiche delle lesioni NVC definite angiograficamente.

Leung et al. (2008) hanno invece condotto uno studio al fine di paragonare le misurazioni dello spessore maculare ottenute con il *"Time domain OCT"* e con lo *"Spectral domain OCT"* (ultimo nato in cui lo specchio di riferimento è fisso) il cui potere di risoluzione è di 3 μm e di valutare la loro ripetibilità e la loro concordanza. Sono state perciò effettuate 3 misurazioni consecutive con entrambe le modalità su occhi sani di 35 soggetti. Sono stati poi messi a confronto lo spessore maculare totale e regionale calcolati con le 2 metodiche. Bassa variabilità delle misurazioni è emersa con entrambe le strumentazioni OCT, ma la *"spectral domain OCT"* ha mostrato una maggiore ripetibilità. Le misurazioni dello spessore maculare effettuate con le 2 differenti metodiche non sono risultate comunque intercambiabili tra loro in quanto non esattamente concordanti.

Un interessante studio di Fingler et al. del 2008 ha valutato la capacità dell' OCT Spectral domain di esaminare i vasi retinici e coroideali nel topo in vivo riuscendo a sviluppare una tecnica per migliorare il contrasto delle immagini OCT. In tal modo è stato possibile ottenere delle immagini a contrasto di fase che permettono la *visualizzazione tridimensionale della vascolarizzazione retinica e coroideale in vivo*.

Più recentemente, Wang et al. (2009) hanno condotto uno studio utilizzando il *Doppler Fourier-domain optic coherence tomography* (FD-OCT) (OCT Spectral) al fine di valutare il flusso retinico totale in occhi sani. In 10 soggetti, tra i 35 e i 69 anni, sono state effettuate 4 paia di scansioni circolari (completate in 2 secondi) che comprendevano tutti i vasi retinici. Il flusso è stato misurato sommando quello dei rami venosi ed è stata ottenuta una media di 45,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ senza differen-

ze significative tra l'emisfero retinico superiore e inferiore. Dunque, la doppia scansione circolare con FD-OCT rappresenta un metodo rapido e riproducibile per la *misurazione del flusso retinico totale*, permettendo di ottenere valori all'interno del range precedentemente stabilito con la flussimetria con laser doppler.

L'OCT è stato utilizzato anche da Rim Sung et al. (2009) al fine di valutare gli effetti dell'età sullo *strato delle fibre nervose della retina, sulla macula e sulla testa del nervo ottico* di soggetti sani. Sono stati inclusi nello studio 226 occhi. Gli Autori hanno dimostrato come lo spessore dello strato delle fibre nervose della retina si riduca significativamente con l'età eccetto che nel quadrante temporale e alle ore 8-10, aree in cui le differenze nella misurazione non si sono dimostrate significative. La massima riduzione è stata invece riscontrata nel quadrante superiore e a ore 1 (superiore nasale). Per ciò che concerne la macula, anche a questo livello si è osservata una progressiva riduzione dello spessore all'aumentare dell'età, significativa in ogni settore eccetto che a livello foveale centrale. L'area del disco, invece, rimane costante nel corso degli anni, ma aumenta la cup area e diminuisce la rim area, entrambe in maniera statisticamente significativa.

Un esempio di FD-OCT è rappresentato dall'*OCT Optovue* con il quale è attualmente possibile valutare in vivo anche lo spessore coroidale e misurarne l'assottigliamento che si verifica nel corso dell'invecchiamento (vedi oltre).

Lo stesso è attualmente possibile anche con lo *Spectralis OCT Heidelberg*, uno Spectral domain OCT, sebbene tale valutazione risulti più indaginosa.

Margolis e Spaide (2009) hanno eseguito uno studio pilota al fine di indagare la corioide di soggetti sani tramite *Enhanced depth imaging optical coherence tomography* (EDI OCT). Lo scopo era quello di misurare lo *spessore della corioide* in diversi punti e valutare

il suo assottigliamento in relazione all'età. Gli Autori hanno dimostrato come lo spessore coroidale vari topograficamente; infatti, il valore massimo è stato misurato a livello subfoveale (media di 287 μm) con un brusco decremento a livello nasale (media di 145 μm a 3 mm dalla fovea). L'età è stata correlata in maniera significativa alla riduzione dello spessore coroidale in tutti i punti di misurazione (vedi oltre). Tale assottigliamento potrebbe dimostrarsi significativo nella genesi di alcune condizioni patologiche età-correlate (vedi oltre).

Ad oggi è stato sviluppato un *sistema OCT ultra-veloce* in grado di effettuare 249.000 scansioni assiali al secondo utilizzando un fascio luminoso con una lunghezza d'onda di 1060 nm. Srinivasan et al. (2008) hanno condotto uno studio per valutare la capacità di questa metodica di effettuare una campionatura ad alta densità della retina, della corioide e della testa del nervo ottico riuscendo ad ottenere delle immagini tridimensionali in alta definizione sia di retina che di nervo ottico normale. Si è osservato come sia le immagini del fundus che le *visualizzazioni in 3D*, prodotte con una maggiore densità di pixel, presentano minori artefatti dovuti al movimento rispetto alle tecniche OCT standard. Inoltre, la maggiore penetrazione del fascio luminoso migliora la visualizzazione della corioide, della lamina cribrosa e della sclera. Questa metodica rappresenta dunque un importante passo avanti rispetto alle OCT standard se si considera che riduce la velocità di acquisizione delle immagini di 5-10 volte rispetto agli OCT attualmente in commercio e migliora la risoluzione dell'immagine. Inoltre, la combinazione di una maggiore lunghezza d'onda del fascio luminoso e velocità di esecuzione rendono *eccellente la visualizzazione della corioide, della sclera e della lamina cribrosa*.

Recentemente, è stato messo a punto lo *Spectral Adaptive optics-optical OCT* (AO-OCT) che ha permesso una migliore valutazione della microstruttura retinica grazie alla combinazione di una

elevata risoluzione laterale della AO con una elevata risoluzione assiale dell'OCT, ottenendo una elaborazione in 3D ad alta risoluzione. Oggi è dunque possibile valutare, per la prima volta in vivo, strutture che non erano visibili con l'OCT o con l'AO da soli (il mosaico in 3D dei fotorecettori, la microvascolarizzazione, le immagini dettagliate dei danni retinici). L'attuale AO-OCT utilizza una tecnologia spectral-Fourier-domain.

■ L'oftalmoscopia a scansione laser

L'*oftalmoscopia a scansione laser (SLO)* della *Rodenstock*, oggi in disuso, permette di effettuare una scansione del fondo oculare con un pennello laser a una risoluzione di 10 micron e di riceverne il riflesso in modo da presentarlo su uno schermo video ricostruendo per punto l'immagine con una frequenza di 25 immagini al secondo. Rispetto all'oftalmoscopia tradizionale che utilizza tutta l'apertura pupillare per la proiezione della luce, solo 0,9 mm della pupilla del paziente, corrispondenti al diametro del raggio laser, sono utilizzati per l'illuminazio-

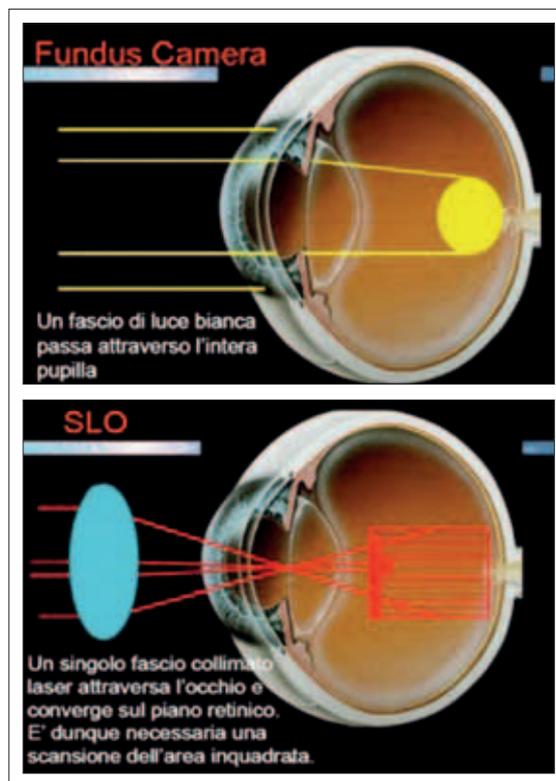


Fig. 13: A = Principio di funzionamento di una Fundus camera, B = Principio di funzionamento di un SLO

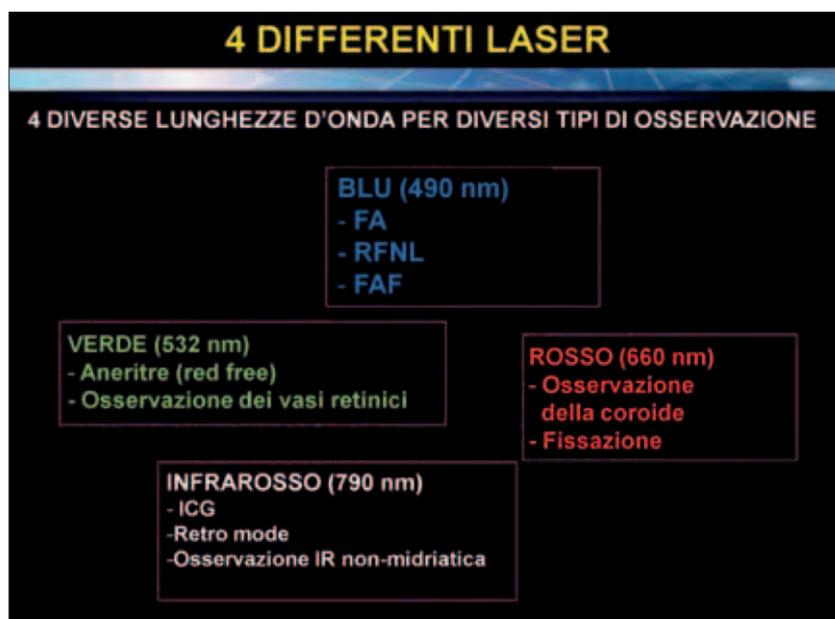


Fig. 14: Quattro differenti lunghezze d'onda per diversi tipi di osservazione

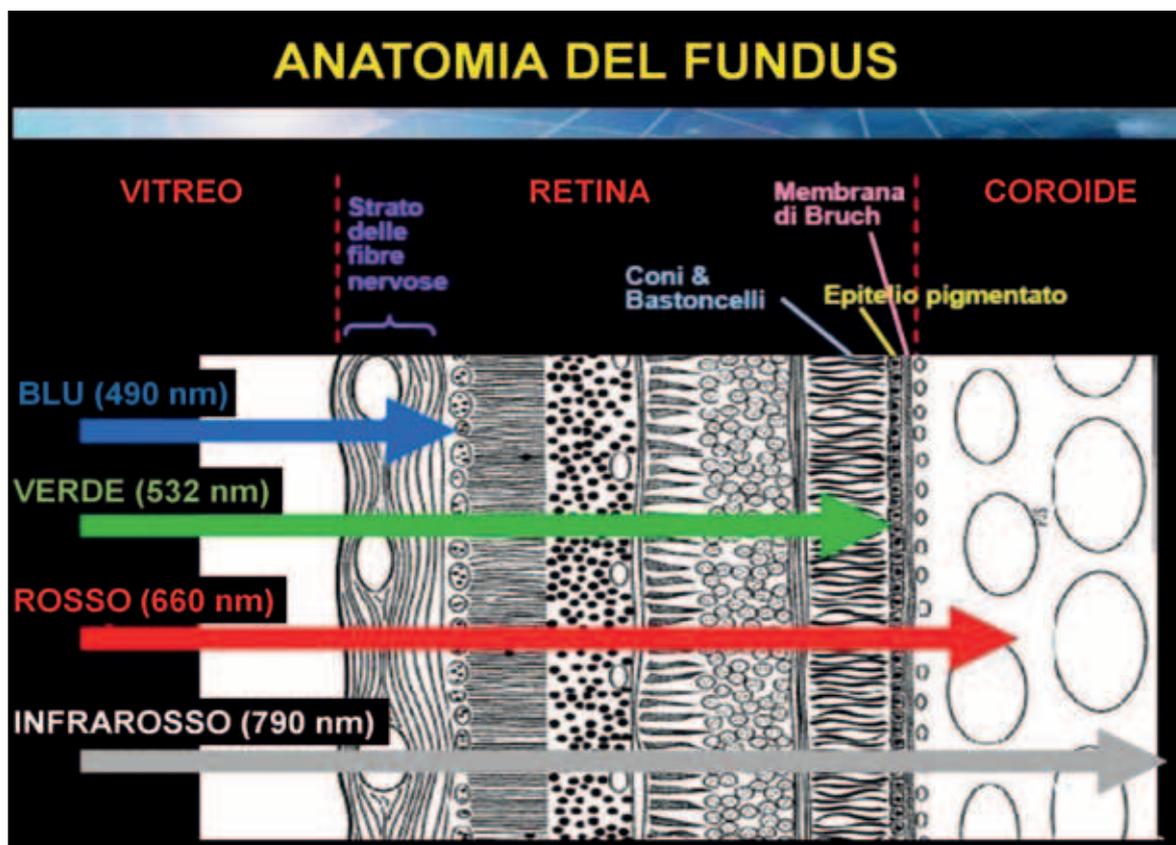


Fig. 15: Rappresentazione schematica illustrante l'esplorazione dei diversi strati retinici tramite quattro diverse lunghezze d'onda laser dell'SLO

ne e la rimanente area è disponibile per la raccolta della luce. Inoltre, i suoi livelli di luce sono minori di 70 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ contro 100.000 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ dell'oftalmoscopio indiretto e 4.000.000 di $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ del fluorangiografo. L'SLO reca un minimo disturbo al paziente durante l'esame e ciò ovvia al problema dell'elevata illuminazione proiettata sul fondo oculare dai primi visuscopi. L'SLO permette, dunque, l'esecuzione di una ripresa dinamica del circolo corio-retinico necessitando di una minore quantità di mezzo di contrasto (fluoresceina sodica o verde di indocianina) e di sorgenti luminose di ridotta intensità e anche di effettuare l'esame di microperimetria utile al fine di valutare e monitorare correttamente la fissazione, la sensibilità maculare e i rapporti delle lesioni patologiche con le normali strutture retiniche in modo tale da

programmare al meglio un eventuale trattamento con laser o chirurgico.

Nidek F-10 e l'HRA-2 Heidelberg Engineering sono innovativi oftalmoscopi digitali a scansione laser (SLO) che consentono l'osservazione in tempo reale del fondo dell'occhio senza utilizzo di invasivi flash a ogni acquisizione e con un elevato comfort per il paziente. Permettono un'accurata osservazione della retina e degli strati di cui è composta mediante l'utilizzo di radiazioni laser. Eseguono angiografie retiniche sia con fluoresceina che con indocianina e coniugano facilità di utilizzo e innovative modalità di acquisizione garantendo immagini nitide e dettagliate del fundus e del sistema vascolare retinico e corioideale. La scansione laser produce immagini di qualità e con un livello di dettaglio forse superiore

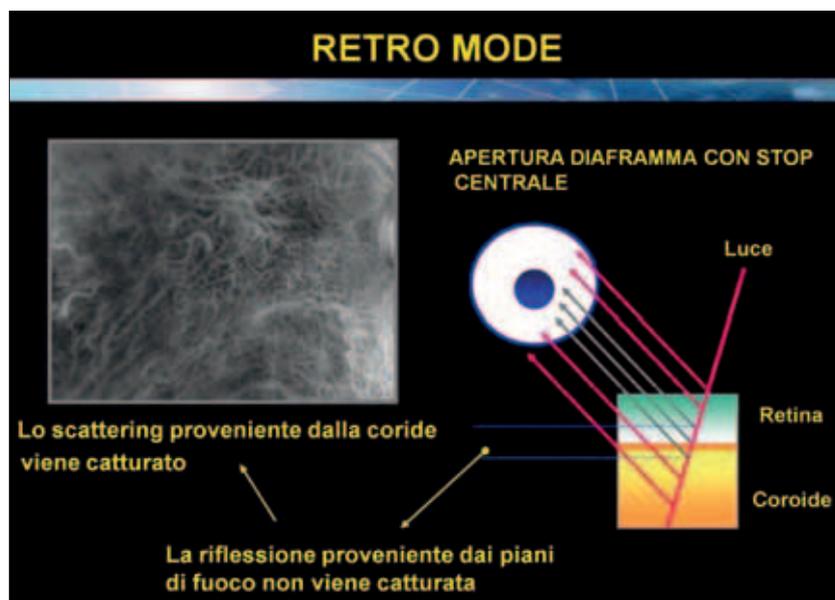


Fig. 16:
Principio di funzionamento
della tecnica di imaging
Retro Mode

agli oftalmoscopi tradizionali (Fundus camera TRC-50DX Topcon, VX-101 Kowa, CR-DGi Canon) che utilizzano flash di luce bianca e appositi filtri (Fig. 13). I vantaggi dei laser SLO risiedono nella confocalità: un piccolo foro davanti al sensore permette la registrazione solo della luce proveniente dai piani a fuoco bloccando la luce riflessa dagli altri strati e lo scattering. Riveste quindi importanza l'apertura del diaframma. L'F-10 rispetto all'HRA-2 presenta 5 valori di apertura del diaframma consentendo così una regolazione della profondità di campo. La peculiarità di F-10 consiste nell'utilizzo di 4 tipi di laser per le diverse applicazioni (Blu, Verde, Rosso e Infrarosso) (Fig. 14) che raggiungono i diversi strati retinici (Fig. 15) e consentono la valutazione morfologica delle strutture del fundus e la rilevazione di numerose patologie con elevato dettaglio. Mediante laser Blu è possibile eseguire angiografie alla fluoresceina (FA) e mediante laser infrarosso angiografie all'indocianina (ICG). Grazie all'altissima sensibilità dello strumento la quantità di tracciante necessaria per ottenere immagini a elevato contrasto è estremamente bassa (a partire da 0.5 cc per l'osservazione delle fasi precoci della perfusione, 1 cc per fasi intermedie e

tardive). L'F-10 cattura flussi di immagini del fundus con frame rate fino a 26 fps indipendentemente dall'ampiezza del campo inquadrato. Questa caratteristica è molto importante durante le fasi precoci (30 s) per un'accurata osservazione della perfusione del tracciante e la rapida individuazione di patologie retiniche. Un particolare percorso ottico e un'apertura confocale disassata rendono possibile ottenere una retroilluminazione della retina che fornisce immagini uniche delle patologie osservate e permette un'osservazione non-invasiva della circolazione coroideale molto vicina a quella consentita dagli esami ICG. A queste caratteristiche si associa la possibilità di osservazione del fundus mediante l'esclusiva tecnica DCO (differential contrast ophthalmoscopy) che permette una migliore distinzione delle strutture osservate e la possibilità di osservazione del fundus mediante l'esclusiva tecnica Retro-Mode, che grazie alla riflessione del laser infrarosso da parte della barriera coroide-sclera genera una retroilluminazione innovativa che permette l'osservazione degli strati più profondi della retina e della circolazione coroidale (Fig. 16-17). Permette inoltre l'acquisizione di immagini in autofluorescenza.

Confronto tra SLO sul mercato			
	SLO (Rodenstock)	HRA 2 (Heidelberg)	F-10 (Nidek)
Light source (wavelength)	488nm	488nm	490nm
	514nm	760nm	532nm
	633nm	785nm	660nm
	780nm	870nm	790nm
Aperture	Confocal : 4	Confocal : 1	Confocal : 5
	Indirect : 2	Indirect : 0	Indirect : 3
Resolution	512x512	384x384 ~ 1536x1536	640x480 ~ 1600x1200
Frame rate	30 fps	16 ~ 5 fps	26 ~ 10 fps

TAB. 1:
Confronto tra i diversi SLO presenti sul mercato

Tutte le immagini catturate del fundus inquadrano un campo di forma rettangolare con diagonale pari a 40°, oppure 60° con l'apposito adattatore ottico. Alcune cellule presenti nel RPE contengono una particolare sostanza, lipofuscina, che diventa fluorescente se stimolata con della luce dell'opportuna lunghezza d'onda (blu 480 nm ca). Questa è la cosiddetta *auto-fluorescenza*. Qualsiasi alterazione fisiologica e/o patologica nelle cellule o nella struttura del RPE produce variazioni nelle caratteristiche delle

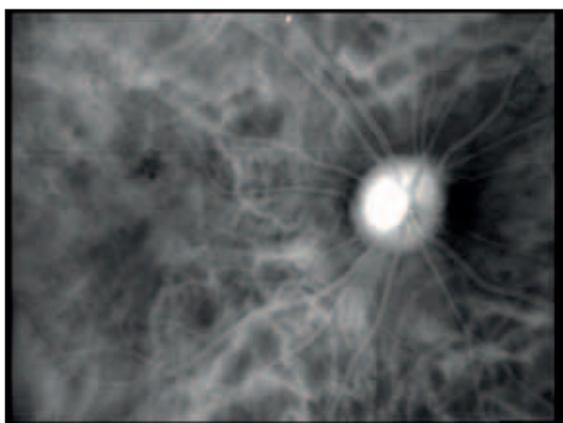


Fig. 17: *Imaging Retro Mode della circolazione coroideale in un occhio normale*

immagini in auto-fluorescenza. F-10 sfrutta questa naturale proprietà delle cellule per osservare in modo non-invasivo il fundus e infatti l'osservazione in auto-fluorescenza non richiede l'iniezione di tracciante, ma solamente l'utilizzo di gocce midriatiche.

Nella Tabella 1 viene riportato il confronto tra i 3 tipi di SLO presenti sul mercato.

Attualmente non sono disponibili metodi per la misurazione accurata dello spessore coroideale nell'occhio umano in vivo. Gli ultrasuoni ad alta frequenza permettono la valutazione dello spessore coroideale negli occhi animali con una ragionevole accuratezza, tuttavia, date le dimensioni dell'occhio umano, la dispersione energetica che si svilupperebbe preclude l'applicazione in sicurezza di questa tecnica sul segmento posteriore dell'occhio umano in vivo. Inoltre, come detto in precedenza, sebbene la valutazione del segmento oculare posteriore negli ultimi anni è stata rivoluzionata dall'introduzione della OCT, tale metodica non si è dimostrata pienamente efficiente nella valutazione della struttura coroideale per l'attenuazione del segnale che si verifica a causa dell'epitelio pigmentato retinico (EPR). Ciò non si-

gnifica che future modifiche alla metodologia OCT non possano fornire la possibilità di una migliore valutazione coroideale attraverso questa tecnica. Brown et al. hanno condotto molto recentemente (2009) uno studio nel quale hanno utilizzato l'*interferometria a coerenza parziale* (PCI) per valutare lo spessore della coroide umana in vivo e per constatare eventuali fluttuazioni giornaliere dello stesso parametro. L'interferometria a coerenza parziale fornisce delle misurazioni quantitative dettagliate delle strutture oculari posteriori con la simultanea valutazione della lunghezza assiale. Nell'uomo, così come nei pulcini, il segnale riflesso della PCI proveniente dalla parete oculare posteriore consiste in picchi multipli. Nei pulcini la fonte anatomica di tali picchi è stata valutata rimuovendo progressivamente gli strati più esterni della parete; da questa valutazione è emerso che la superficie sclerale interna genera uno specifico picco alla PCI, allo stesso modo si comporta l'interfaccia EPR/membrana di Bruch. Dalla misurazione di questi due robusti picchi si rende possibile la valutazione precisa dello spessore coroideale, nonché le fluttuazioni giornaliere di questo stesso parametro. Brown et al. (2009) sono infatti riusciti a dimostrare la presenza di più di una fluttuazione giornaliera dello spessore coroideale. Per la nota importanza che la coroide assume nella funzionalità retinica e per il suo ipotetico ruolo sulla crescita oculare sono necessari miglioramenti delle attuali metodiche cliniche per la misurazione dello spessore coroideale e lo sviluppo di nuove tecniche.

INVECCHIAMENTO COROIDEALE

■ Introduzione

Studiando il fisiologico processo di invecchiamento oculare sono state sino ad ora descritte e documentate numerose alterazioni a carico di alcuni strati coroideali tali da causare dei disturbi. La co-

roide rappresenta inoltre il bersaglio principale di alcune patologie oculari legate all'invecchiamento. Lo studio istologico su cadavere ha permesso di constatare come nei soggetti giovani vi sia, a livello coroideale, un numero più elevato di nuclei cellulari rispetto ai soggetti più anziani, a significare probabilmente la presenza di un infiltrato infiammatorio (particolarmente nei neonati sia a termine che non). Inoltre, con l'invecchiamento, a livello della membrana di Bruch appaiono numerosi depositi piccoli, omogenei e focali, conosciuti come drusen, circondati da epitelio pigmentato degenerato e talvolta calcifico. Sempre allo stesso livello possono anche riscontrarsi depositi granulari, probabile risultato di fenomeni di degenerazione lipidica. Oltre a ciò molti cambiamenti si manifestano anche a livello dell'endotelio delle pareti vasali, oltre che sulle superfici sia endoteliale che epiteliale della membrana di Bruch. In entrambi i casi il processo di invecchiamento porta ad un aumento dello spessore delle stesse membrane. Questo fenomeno a livello della membrana di Bruch interessa principalmente lo strato collagene esterno (Killingsworth, 1987). Dunque, si può concludere, che le alterazioni anatomiche della membrana di Bruch legate all'invecchiamento sono il progressivo accumulo di detriti e di depositi lipidici, nonché le alterazioni della matrice extracellulare.

■ Accumulo di detriti

Al di sotto dell'epitelio pigmentato possono riscontrarsi tre tipi di depositi: drusen, depositi basali lineari e basali laminari (Sarks, 1976; Freeney-Burns e Ellersieck, 1985; Green e Enger, 1993). Le *drusen*, visibili con l'oftalmoscopio, sono depositi extracellulari localizzati tra la membrana basale dell'epitelio pigmentato della retina e la zona collagene interna della membrana di Bruch. La loro struttura è molto simile a quella dei depositi aterosclerotici (Fig. 18).

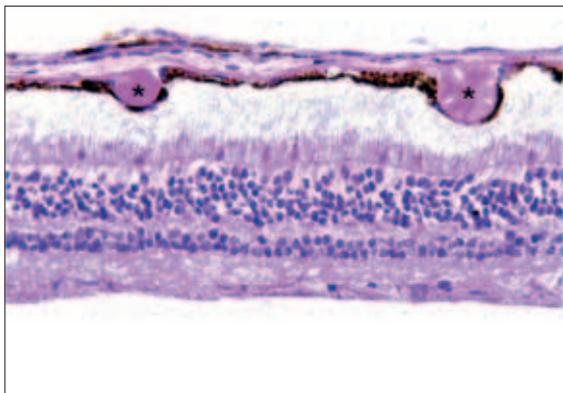


Fig. 18: Sezione istologica che mostra dei drusen (asterisco) tra l'epitelio pigmentato della retina e la membrana di Bruch in un paziente con degenerazione maculare senile (da Gregory et al., 2008)

I *depositi basali lineari*, definiti così da Green e Enger, formano un sottile strato membranoso al di sotto dell'EPR. Sharks et al. (1999) sostengono che siano costituiti da materiale derivante dalla membrana basale dell'EPR e che non possono attraversare lo strato collagene interno (Loeffler e Lee, 1986; Curcio e Millican, 1999).

L'ultima tipologia di depositi è rappresentata da quelli *basali laminari*, composti principalmente da collagene e disposti all'interno della membrana basale dell'epitelio pigmentato. Con l'età questi accumuli di detriti si ingrandiscono fino a coinvolgere tutto lo strato collagene della membrana basale (Curcio e Millican, 1999).

Ogniuno di questi depositi può rappresentare prodotti di scarto derivanti dall'alterazione dell'EPR (Burns e Feeney-Burns, 1980; Ishibashi et al., 1986; El Baba et al., 1986; Young, 1987), nonché il risultato delle disfunzioni endoteliali a livello della coriocapillare (Friedman et al., 1963).

■ Depositi lipidici

Con l'invecchiamento si assiste ad un incremento esponenziale del numero dei depositi lipidici

all'interno della membrana di Bruch. Nei pazienti d'età inferiore ai 60 anni questi depositi contengono piccole particelle circolari e solide e si trovano dispersi su tutti gli strati di collagene. Nei soggetti più anziani, invece, tali depositi lipidici arrivano ad occupare più di un terzo della zona interna di collagene, fino a formare un vero e proprio strato lipidico posto esternamente alla membrana basale dell'EPR. Poiché all'interno di queste strutture è stato possibile accertare la presenza di colesterolo esterificato e non, tali depositi sono stati paragonati ai depositi aterosclerotici vasali (Haimovici et al., 2001; Lakatta e Levy, 2003).

■ Alterazioni della matrice extracellulare

Sia a livello arterioso che corioideale si assiste con l'invecchiamento all'incremento della sintesi di collagene, il quale risulta anche meno solubile rispetto al normale (Karwatowski et al., 1995; Barnes e Farndale, 1999). Inoltre, le fibre della membrana elastica incrementano il loro numero e tra le stesse si depositano piccoli cristalli a punta di spillo (Sarks, 1976). La membrana di Bruch va progressivamente incontro a calcificazione e frammentazione, con riduzione della sua elasticità.

■ Alterazioni dell'angiografia al verde di indocianina (ICG) correlate all'età

L'ICG angiografia permette lo studio dinamico della circolazione corioideale (Fig. 19). Paragonando gli angiogrammi di soggetti appartenenti a diversi gruppi d'età sono state individuate alcune differenze tra soggetti giovani e quelli più anziani. Nei giovani il riempimento arteriolare comincia nella regione subfoveale e si estende radialmente verso la periferia del fondo oculare. Nella regione maculare, inoltre, il sistema corioideale appare fine, tortuoso e pluriramificato. La regione spar-

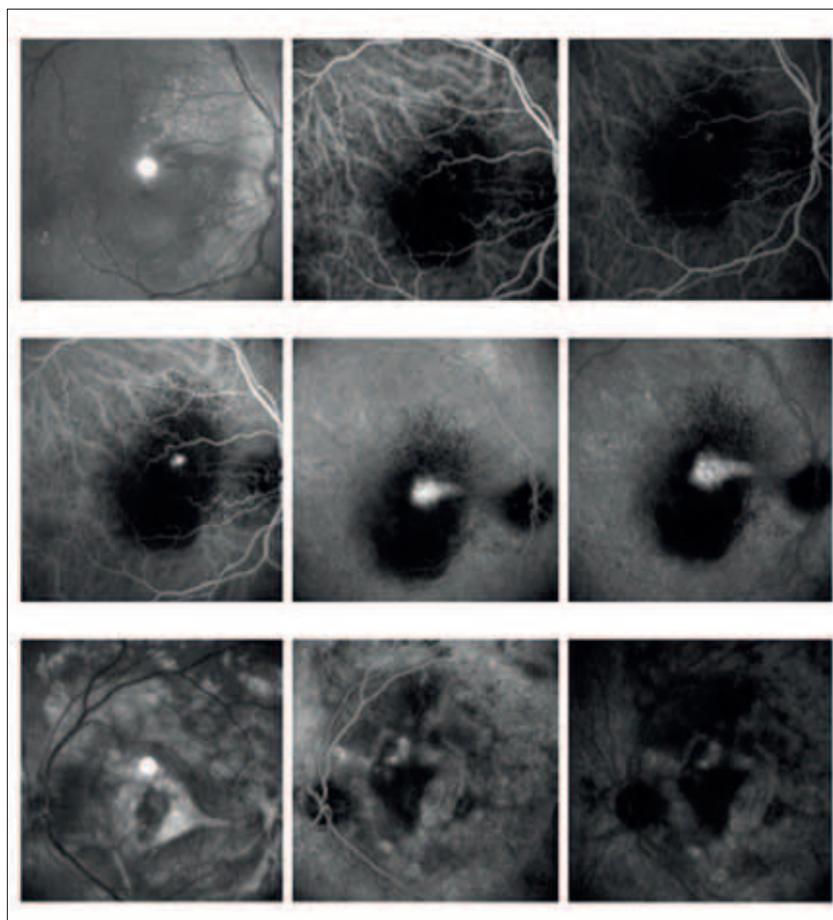


Fig. 19:
Angiogrammi di angiografia
con verde di indocianina (ICG)

tiacque attraversa il nervo ottico e risulta chiaramente individuabile.

Con il passare degli anni al polo posteriore cominciano ad apparire aree di ipofluorescenza, con una riduzione dell'intensità della fluorescenza arteriolare complessiva. Le arteriole coroideali appaiono assottigliate e più tortuose, con una riduzione del numero dei rami collaterali. La zona spartiacque appare, inoltre, più difficile da identificare.

Gli studi sul flusso condotti con il laser doppler oltre a confermare questi riscontri hanno permesso anche di constatare che con il passare degli anni si assiste ad una progressiva riduzione del volume ematico coroideale (Grunwald et al., 1998). Il flusso ematico oculare può essere studiato attra-

verso vari metodi; tra questi l'ultrasonografia con Color Doppler oltre a non essere affatto invasiva e a non richiedere alcun contrasto è una tecnica di semplice esecuzione che permette istantaneamente di ottenere tre tipi di informazioni:

1. *la morfologia del tessuto*
2. *la visualizzazione dei vasi*
3. *l'emodinamica vasale.*

Questa metodica, infatti, oltre a fornire specifiche informazioni morfologiche, fornisce dati precisi circa il flusso plasmatico oculare quali la velocità di picco sistolico, la velocità telediastolica, la velocità media e l'indice di resistenza. Riscontri comuni nella senescenza sono la depigmentazione e l'atrofia della coroide periferica. Quest'ultima, che si presenta spesso anche a livello peripapillare si associa spesso a fibrosi,

ialinizzazione e occlusione dei vasi coroideali, in particolare quelli a livello coriocalpillare.

Infine, è importante sottolineare come l'ICG angiografia sia utile per identificare gli aneurismi delle arterie coroideali, che appaiono come focali dilatazioni sacciformi. Diversi meccanismi quali l'ipertensione, l'aterosclerosi e l'invecchiamento sono implicati nella loro patogenesi (Ring e Fujino, 1967; Robertson, 1973; Raab et al., 1988). Diversi studi hanno tipicamente rilevato la presenza di aneurismi a livello di aree di atrofia coroideale con riduzione della perfusione (Sarks, 1973; Pauleikhoff, 1990; McLeod e Luty, 1994).

PATOLOGIE COROIDEALI SENILI

■ Atrofia coroideale età-dipendente

L'atrofia coroideale età-dipendente rappresenta una nuova entità clinica. Generalmente la coroide non viene menzionata tra le strutture coinvolte nella perdita dell'acuità visiva (eccetto che come causa di neovascolarizzazione coroideale CNV). Recentemente è stato sviluppato un metodo per ottenere immagini a profondità potenziata (EDI) con lo *spectral-domain OCT* che permettono di valutare le strutture e lo spessore della coroide (Spaide et al., 2008). L'EDI OCT è stato utilizzato da Margolis e Spaide (2009) al fine di misurare lo spessore della coroide di occhi sani senza problemi visivi attribuibili alla macula.

Gli Autori hanno dimostrato come lo spessore coroideale subisca un progressivo decremento di circa 16 μm per decade di vita. Il più basso spessore coroideale subfoveale riscontrato (su 54 occhi studiati) è stato di 159 μm , tuttavia nel gruppo di pazienti con AMD o altri sintomi visivi lo spessore risultava nettamente inferiore rispetto al grup-

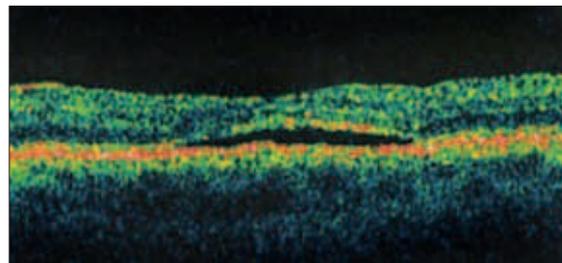


Fig. 20: Corioretinopatia sierosa centrale con tomografia a coerenza ottica (OCT). A livello dell'EPR si osserva un falda di liquido (distacco sieroso)

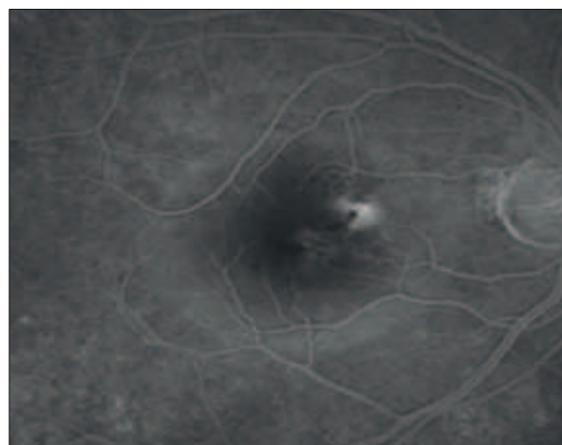


Fig. 21: Fluorangiografia in episodio acuto di corioretinopatia sierosa centrale

po di soggetti sani.

In alcuni di questi pazienti sono stati identificati problemi maculari o dell'EPR non significativi, mentre in altri sono state diagnosticate CNV e atrofia a carta geografica. Poiché il riscontro di coroidi così notevolmente assottigliate è avvenuto principalmente in occhi di pazienti anziani con disturbi visivi insorti recentemente si pensa che queste alterazioni siano acquisite: entità di questo genere prendono il nome di *atrofia coroideale età-dipendente*. Spaide (2009) ha eseguito uno studio al fine di identificare le caratteristiche di questa nuova entità clinica. Sono stati indagati 28 occhi di 17 pazienti con età media di 80,6 anni. Lo spessore subfoveale medio era di 69,8 μm , con un ulterio-

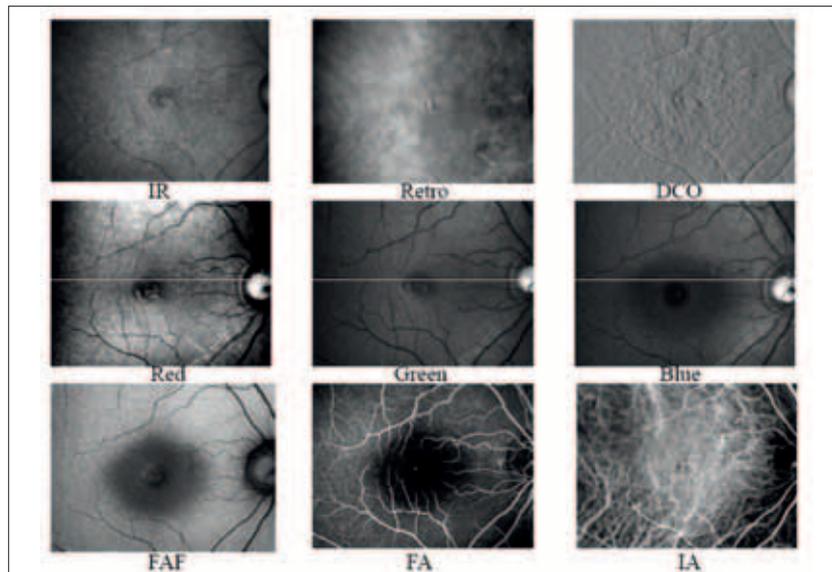


FIG. 22:
*Corioretinopatia sierosa
 centrale con oftalmoscopia
 digitale a scansione laser
 (SLO, Nidek-F10)*

re decremento a livello nasale. Di questi occhi 18 non presentavano segni di ADM, ma mostravano alterazioni della pigmentazione a livello maculare (che possono simulare una AMD precoce) derivate probabilmente dalla corioide e una rarefazione dei vasi coroideali sotto la macula. Nei restanti 10 occhi fu diagnosticata una AMD, in 6 un glaucoma con atrofia peripapillare. L'atrofia coroideale età-dipendente, dunque, colpisce tipicamente i soggetti anziani presentandosi con alterazioni del polo posteriore che possono mimare o essere associate ad alterazioni tipiche della AMD. I pazienti con atrofia coroideale età dipendente, inoltre, presentano un maggior rischio di sviluppare glaucoma.

■ Corioretinopatia sierosa centrale

La corioretinopatia sierosa centrale è una patologia che colpisce principalmente individui oltre i 50 anni di età ed è caratterizzata dal depositarsi di liquido, non adeguatamente drenato dal sistema linfatico coroideo, tra l'epitelio pigmentato retinico e la neuroretina a livello della macula (fig. 20). Inoltre, nelle fluorangiografie dei pazienti affetti da

corioretinopatia sierosa centrale, sono state riscontrate dilatazioni delle vene e aumento della permeabilità dei vasi coroideali, con conseguente diminuzione del flusso sanguigno (Kitaya et al., 2003) (Fig. 21). La Figura 22 mostra un occhio affetto da corioidopatia sierosa centrale esaminato con oftalmoscopia digitale a scansione laser *Nidek F-10*.

■ Degenerazione maculare legata all'età

La degenerazione maculare legata all'età (Fig. 23), che rappresenta la principale causa di cecità nei paesi industrializzati, è una patologia degenerativa e progressiva che colpisce i fotorecettori, l'epitelio pigmentato retinico, membrana di Bruch e la corioide. Non si conoscono le cause che portano all'insorgenza della degenerazione maculare legata all'età, anche se sono state formulate delle ipotesi che suggeriscono l'interazione tra predisposizione genetica (Yoshida et al, 2000) e l'insieme di tutti quei fattori ambientali, come il fumo di sigarette, una dieta povera di antiossidanti e cofattori minerali e l'ipertensione arteriosa sistemica, che comportano la produzione di radicali dell'ossigeno (Franck et al, 1999).

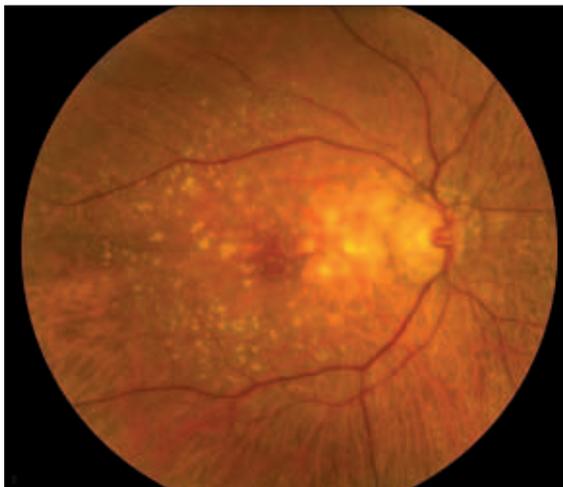


Fig. 23: Fondo oculare di un soggetto con DMLE

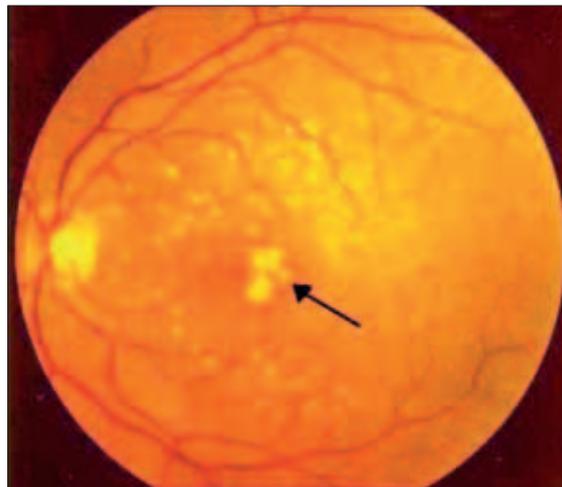


Fig. 24: Drusen, depositi extracellulari tra membrana basale dell'epitelio pigmentato della retina e zona collagene interna della membrana di Bruch

Vengono classificate due principali forme di degenerazione maculare legate all'età: la *forma secca* (*atrofica* o *non essudativa*) e la *forma umida* (*essudativa* o *neovascolare*). La *forma secca*, il tipo più comune (90% dei casi), è caratterizzata da depositi bianco-giallastri (drusen), nella membrana di Bruch (Guyer, 1997) e dovuti, come detto, all'incapacità da parte delle cellule dell'epitelio pigmentato di eliminare i detriti cellulari provenienti dal segmento esterno dei fotorecettori (Fig. 24). Oltre a ciò si osserva un'alterazione della pigmentazione dell'EPR e atrofia. Gli individui affetti presentano una perdita progressiva della visione, dovuta alla morte dei fotorecettori e delle cellule dell'epitelio pigmentato (Stewart, 2002).

Meno comune (10% dei casi), ma più grave (è responsabile del 90% dei casi di grave calo visivo per maculopatia) è invece la *forma essudativa*. Tale forma, oltre a presentare le stesse caratteristiche della forma atrofica, è anche associata allo sviluppo di nuovi vasi a livello coriocalpillare (choroidal neovascularization CNV) che perforano la membrana di Bruch e si accrescono negli spazi subretinici (for-

ma classica) e/o al di sotto dell'EPR (forma occulta) per la liberazione di citochine proangiogeniche (Guerin et al., 2006) (Fig. 25). Questi nuovi vasi, che risultano senza membrana basale, possono andare facilmente incontro a rottura comportando la perdita di siero e di sangue e quindi la formazione di importanti essudati o emorragie, oppure possono modificare il tessuto circostante, provocare fenomeni di cicatrizzazione, distruggere la macula (Guyer, 1997; Neely e Gardner, 1998; Stewart, 2002), indurre un distacco del neuroepitelio (Fig. 26) o dell'EPR, compromettendo seriamente la capacità visiva del paziente.

■ Coroidopatia serpiginosa

La coroidopatia serpiginosa è un'inflammazione della porzione interna della coroide e dell'epitelio pigmentato retinico. La conseguenza principale di tale patologia è la neovascolarizzazione della coroide causata da uno squilibrio tra fattori di crescita (quali il VEGF) e fattori anti-angiogenici; la formazione di una membrana neovascolare nella regione sottostante la coroide, in particolare nel-

la regione maculare e intorno al disco ottico, può provocare la perdita della vista (Fig. 27).

■ Disordini circolatori delle arterie ciliari posteriori (PCA)

Diversi disordini circolatori a livello delle PCA possono insorgere in corso di patologie sistemiche come diabete, aterosclerosi e ipertensione. Tali anomalie sono state riprodotte nei primati con l'occlusione delle stesse arterie o l'induzione dell'ipertensione maligna (Hayreh 1974, 1985; Kishi et al., 1985; Hayreh et al., 1986; Loeffler et al., 1994).

In caso di *occlusione di una branca delle PCA* che perfonde regioni periferiche della coroide l'angiografia evidenzia difetti di forma triangolare nel territorio di distribuzione della specifica arteria. La localizzazione, nonchè l'estensione del danno dipendono dalla sede dell'occlusione.

Le sindromi triangolari provocate da *occlusione delle arterie ciliari posteriori brevi* coinvolgono generalmente aree più piccole ed irregolari, ma nel caso in cui queste confluiscono tra loro possono condurre all'atrofia dell'intero quadrante.

LESIONI ISCHEMICHE ACUTE DELLA COROIDE EQUATORIALE

L'aspetto e le caratteristiche delle lesioni ischemiche della coroide dipendono dalla localizzazione dell'arteria coinvolta, dalla gravità dell'ischemia e dal grado di evoluzione della lesione stessa (Hayreh 1974a, 1975b, 1980, 1983b, 1985). Le lesioni più recenti appaiono di colore bianco a causa della mancata perfusione dell'EPR e della retina. Dopo una o due settimane cominciano ad assumere un colorito grigiastro e a divenire granulari. L'analisi istologica rivela una necrosi coagulativa dell'EPR e della retina esterna associata al danneggiamento della barriera emato-retinica, che generalmente, anche nel caso di lesioni molto estese, riacquista la

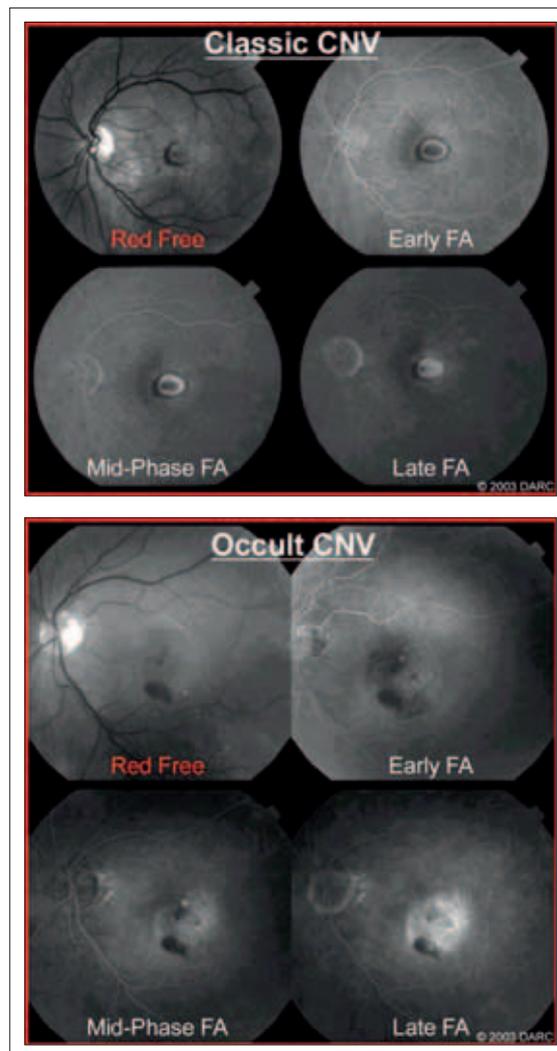


Fig. 25: Da DARC digital angiography reading centre. Immagini di neovascolarizzazione coroideale (CNV). A = CNV classica, B = CNV occulta

sua funzionalità dopo circa tre mesi. La fluoroangiografia evidenzia nelle fasi acute una ipofluorescenza causata dal difetto di riempimento vasale, più tardivamente, invece, queste lesioni corioretiniche risultano iperfluorescenti. Le occlusioni delle ACPL producono ampi infarti corioideali (Hayreh 1974a, 1983b, 1985). Come detto, tali lesioni sono principalmente di forma triangolare e localizzate alla periferia del fondo oculare, con la base volta verso l'equatore e l'api-

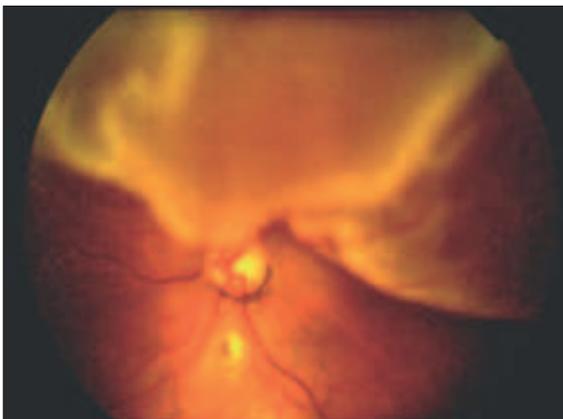


Fig. 26: Stadio evoluto di una degenerazione maculare legata all'età con neovascolarizzazione coroideale



Fig. 27: Coroidopatia serpiginosa

ce verso il polo posteriore (Hayreh 1974a, 1975b, 1985, 1990, 1996). Le occlusioni a carico delle arteriole terminali della coroide si manifestano, invece, come piccole lesioni focali e circolari dovute ad infarti dei lobuli della coriocapillare.

Forme gravi di ischemia possono provocare veri e propri infarti della coroide, della coriocapillare e della retina esterna, mentre ischemie medie o moderate possono indurre disfunzioni dell'EPR con possibile passaggio di liquidi dalla coroide alla retina inducendone il distacco, similmente a quanto accade nella coroidopatia ipertensiva e nell'eclampsia.

LESIONI ISCHEMICHE DELLA COROIDE MACULARE

I rami temporali dell'ACPB distale irrorano la coroide maculare. Queste arterie, suddividendosi in numerosissimi rami terminali, fanno sì che si vengano a creare un numero elevatissimo di zone spartiacque. Per questa ragione la coroide maculare rappresenta una delle zone a maggior rischio per danno ischemico. Quindi è ragionevole aspettarsi che questo tipo di lesioni si localizzino più frequentemente a livello maculare.

I pazienti con aterosclerosi si presentano spesso con una degenerazione pigmentata reticolare nella regione equatoriale che rappresenta la zona spartiacque tra il territorio di distribuzione delle arterie ciliari anteriori e quelle posteriori (Ernest et al., 1976).

Coroidopatia ipertensiva

Il letto vascolare coroideo non possiede una barriera emato-oculare a causa della presenza delle numerose fenestrature a livello capillare. Oltre a ciò, come precedentemente spiegato, questo sistema non presenta un perfezionato meccanismo di autoregolazione, dunque risponde passivamente sia ai cambiamenti della pressione intraoculare (IOP), sia a variazioni della pressione di perfusione.

Il danno coroideale indotto dall'ipertensione si sviluppa in quanto, in assenza di barriera, l'aumento pressorio induce la formazione di un trasudato plasmatico contenente angiotensina II e altri vasoconstrictori che agiscono dunque a livello coroideale. La successiva vasocostrizione dei vasi induce ischemia, prima a livello coroideale, poi nell'EPR. Il danno di quest'ultima struttura distrugge la barriera esistente tra sangue e retina esterna e può condurre al distacco della neuroretina.

Le lesioni ischemiche dell'EPR sono classificate come *acute* o *degenerative*. Quelle acute sono principalmente maculari e associate a distacchi focali di retina. Dopo due o tre settimane queste lesioni evolvono inevitabilmente nella forma degenerativa e, con

Nicola Pescosolido

il passare del tempo, tendono a confluire ampliando l'area di atrofia dell'EPR con alterata pigmentazione. Per ciò che riguarda il distacco di retina, questo può essere focale o totale, localizzato a livello maculare (dove può assumere un aspetto pseudocisti-

co) e/o peripapillare e/o periferico.

Il liquido subretinico risulta inizialmente limpido, ma diviene progressivamente più torbido e raramente proteinaceo. Può inoltre svilupparsi fibrosi subretinica.

Bibliografia

Alm A., Bill A.: Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiol. Scand.*, 1970;80:19-28

Alm A.: The effect of sympathetic stimulation on blood flow through the uvea, retina and optic nerve in monkeys (*Macaca irus*). *Exp. Eye Res.*, 1977;25:19-24

Arend O., Harris A., Martin B.J. et al.: Scanning laser ophthalmoscopy-based evaluation of epipapillary velocities: method and physiologic variability. *Surv. Ophthalmol.*, 1999;44(Suppl.1):S3-S9

Auker C.R., Parver L.M., Doyle T., Carpenter D.O.: Choroidal blood flow. Ocular tissue temperature as a measure of flow. *Arch. Ophthalmol.*, 1982;100:1323-1326

Bames M.J., Farndale R.W.: Collagens and atherosclerosis. *Exp. Gerontol.*, 1999;34:513-525

Bill A., Linder J.: Sympathetic control of cerebral blood flow in acute arterial hypertension. *Acta Physiol. Scand.*, 1976;96:114-121

Bonner R., Nossal R.: Principles of Laser-Doppler flowmetry. In: Shepherd A.P., Öberg P.A. (Eds.), *Developments in Cardiovascular Medicine: Laser-Doppler Blood Flowmetry*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1990; Vol. 107: pp.73-92

Brown J. S., Flitcroft D. I., Ying G., Francis E. L., Schmid G. F., Quinn G. E., Stone R. A.: In vivo human choroidal thickness measurements: evidence for diurnal fluctuations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009;50:5-12

Burns R.P., Feeney-Burns L.: Clinico-morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 1980;78:206-225

Cioffi G.A., Grandstam E., Alm A.: Ocular circulation. In: Kaufman P.L., Alm A. (Eds.), *Alder's Physiology of the Eye*. 10th. ed. St. Louis, Mosby, 2002;pp.747-817

Curcio C.A., Millican C.L.: Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 1999;117:329-339

De Stefano M.E., Mugnaini E.: Fine Structure of the Choroidal Coat of the Avian Eye. Vascularization, supporting tissue and innervation. *Anat. Embryol.*, 1997;195:393-418

Ducoumau D.: Systematisation vasculaire de la choroïde. Lyon, France: Association Corporative des Etudiants en Medecine de Lyon, 1979;pp.17-22

Ehinger B.: Ocular and orbital vegetative nerves. *Acta Physiol. Scand.*, 1966;268(Suppl.):S1-S35

El Baba F., Green W.R., Fleischmann J., Finkelstein D., de la Cruz Z.C.: Clinicopathologic correlation of lipidization and detachment of the retinal pigment epithelium. *Am. J. Ophthalmol.*, 1986;101:576-583

Ernest J.T., Stem W.H., Archer D.B.: Submacular choroidal circulation. *Am. J. Ophthalmol.*, 1976;81:574-582

Feeney-Burns L., Ellersieck M.R.: Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane. *Am. J. Ophthalmol.*, 1985;100:686-697

Feke G.T., Goger D.G., Tagawa H. et al.: Laser Doppler technique for absolute measurement of blood speed in retinal vessels. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1987;34:673-680

Findl O., Strenn K., Wolzt M. et al.: Effects of changes in intraocular pressure on human ocular haemodynamics. *Curr. Eye Res.*, 1997;16:1024-1029

Fingler J., Readhead C., Schwartz D.M., Fraser S.E.: Phase-contrast OCT imaging of transverse flows in the mouse retina and choroid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:5055-5059

Frank R.N., Amin R.H., Puklin J.E.: Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 1999;127:694-709.

Friedman E., Smith T.R., Kuwabara T.: Senile choroidal vascular patterns and drusen. *Arch. Ophthalmol.*, 1963;69:220-230

Friedman E., Smith T.R., Kuwabara T., Beyer C.: Choroidal vascular patterns in hypertension. *Arch. Ophthalmol.*, 1964;71:842-850

Giovannini A., Mariotti C., Ripa E., Scassellati Sforzolini B., Tittarelli R.: Choroidal filling in age-related macular degeneration: indocyanine green angiographic findings. *Ophthalmologica*, 1994;208:185-191

Giuffre G.: Main posterior watershed zone of the choroid: variations of its position in normal subjects. *Doc. Ophthalmol.*, 1989;72:175-180

Green W.R., Enger C.: Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmernian Lecture. *Ophthalmology*, 1993;100:1519-1535

Grunwald J.E., Hariprasad S.M., DuPont J.: Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch. Ophthalmol.*, 1998;116:150-154

Guan K., Hudson C., Flanagan J.G.: Variability and repeatability of retinal blood flow measurements using the Canon Laser Blood Flowmeter. *Microvasc. Res.*, 2003;65:145-151

Guerin E., Hiscott P., Damato B.: Choroidal neovascular membrane in a series of cases of malignant melanoma of the choroid. *Acta Ophthalmol. Scand.*, 2006;84:323-327

- Guyer D.R., Yannuzzi L.A., Slakter J.S. et al.:** Digital indocyanine green videoangiography of central serous chorioretinopathy. *Arch. Ophthalmol. Scand.*, 1994;112:1057-1062
- Haefliger I.O., Flammer J., Beny J.L., Luscher T.F.:** Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2001;20:209-225
- Haimovici R., Gantz D.L., Rumelt S., Freddo T.F., Small D.M.:** The lipid composition of drusen, Bruch's membrane, and sclera by hot stage polarizing light microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001;42:1592-1599
- Hayashi K., de Laey J.J.:** Indocyanine green angiography of submacular choroidal vessels in the human eye. *Ophthalmologica*, 1985;190:20-29
- Hayreh S.S., Baines J.A.B.:** Occlusion of the posterior ciliary artery I. Effects on choroidal circulation. *Br. J. Ophthalmol.*, 1972a;56:719-735
- Hayreh S.S., Baines J.A.B.:** Occlusion of the posterior ciliary artery II. Chorio-retinal lesions. *Br. J. Ophthalmol.*, 1972b;56:736-753
- Hayreh S.S., Baines J.A.B.:** Occlusion of the posterior ciliary artery III. Effects on the optic nerve head. *Br. J. Ophthalmol.*, 1972c;56:754-764
- Hayreh S.S., Baunies J.A.:** Occlusion of the vortex veins: an experimental study. *Br. J. Ophthalmol.*, 1973;57:217-238
- Hayreh S.S.:** Anterior ischaemic optic neuropathy I. Terminology and pathogenesis. *Br. J. Ophthalmol.*, 1974a;58:955-963
- Hayreh S.S.:** Anterior ischaemic optic neuropathy II. Fundus on ophthalmoscopy and fluorescein angiography. *Br. J. Ophthalmol.*, 1974b;58:964-980
- Hayreh S.S.:** Segmental nature of the choroidal vasculature. *Br. J. Ophthalmol.*, 1975a;59:631-648
- Hayreh S.S.:** Anterior Ischemic Optic Neuropathy. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1975b
- Hayreh S.S., Scott W.E.:** Fluorescein iris angiography II. Disturbances in iris circulation following strabismus operation on the various recti. *Arch. Ophthalmol.*, 1978;96:1390-1400
- Hayreh S.S.:** Acute choroidal ischaemia. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.*, 1980;100:400-407
- Hayreh S.S., Chopdar A.:** Occlusion of the posterior ciliary artery V. Protective influence of simultaneous vortex vein occlusion. *Arch. Ophthalmol.*, 1982;100:1481-1491
- Hayreh S.S.:** Physiological anatomy of the choroidal vascular bed. *Int. Ophthalmol.*, 1983a;6:85-93
- Hayreh S.S.:** Macular lesions secondary to choroidal vascular disorders. *Int. Ophthalmol.*, 1983b;6:161-170
- Hayreh S.S.:** Inter-individual variation in blood supply of the optic nerve head: its importance in various ischemic disorders of the optic nerve head, and glaucoma, low-tension glaucoma and allied disorders. *Doc. Ophthalmol.*, 1985;59:217-246
- Hayreh S.S., Servais G.E., Viridi P.S.:** Fundus lesions in malignant hypertension VI. Hypertensive choroidopathy. *Ophthalmology*, 1986;93:1383-1400
- Hayreh S.S.:** Anterior ischaemic optic neuropathy: differentiation of arteritic from nonarteritic type and its management. *Eye*, 1990a;4:25-41
- Hayreh S.S.:** In vivo choroidal circulation and its watershed zones. *Eye*, 1990b;4:273-289
- Hayreh S.S.:** Acute ischemic disorders of the optic nerve: pathogenesis, clinical manifestations and management. *Ophthalmol. Clin. North Am.*, 1996;9:407-442
- Hayreh S.S., Podhajsky P.A., Zimmerman B.:** Ocular manifestations of giant cell arteritis. *Am. J. Ophthalmol.*, 1998;125:509-520
- Hayreh S.S.:** The blood supply of the optic nerve head and the evaluation of it: myth and reality. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2001;20:563-593
- Hayreh S.S.:** Posterior Ciliary Artery Circulation in Health and Disease The Weisenfeld Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004;45:749-757
- Huemer K., Garhöfer G., Aggermann T., Kolodjaschna J., Schmetterer L., Fuchsjäger-Mayrl G.:** Role of Nitric Oxide in Choroidal Blood Flow. Regulation during Light/Dark Transitions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007;48:4215-4219
- Ishibashi T., Sorgente N., Patterson R., Ryan S.J.:** Aging changes in Bruch's membrane of monkeys: an electron microscopic study. *Ophthalmologica*, 1986;192:179-190
- Ito Y.N., Mori K., Young-Duvall J., Yoneya S.:** Aging changes of the choroidal dye filling pattern in indocyanine green angiography of normal subjects. *Retina*, 2001;21:237-242
- Karwatowski W.S., Jeffries T.E., Duance V.C., Albon J., Bailey A.J., Easty D.L.:** Preparation of Bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens. *Br. J. Ophthalmol.*, 1995;79:944-952
- Kazuhisa S., Zhao-Bin G., Chizuru K., Tetsura Y., Yoshiaky K.:** Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999;40:3084-3090
- Kawarai M., Koss M.C.:** Sympathetic vasoconstriction in the rat anterior choroid is mediated by alpha 1-adrenoreceptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998;363:35-40

- Keisuke M.:** Asymmetry of choroidal venous vascular patterns in the human eye. *Ophthalmology*, 2004;111:507-512
- Kiel J.W., Shepherd A.P.:** Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 1992;33:2399-2410
- Kiel J.W., van Heuen W.A.:** Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 1995;36:579-585
- Kiel J.W.:** Modulation of choroidal autoregulation in the rabbit. *Exp. Eye Res.*, 1999;69:413-429
- Killingsworth M.C.:** Age-related components of Bruch's membrane in the human eye. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1987;225:406-412
- Kishi S., Tso M.O.M., Hayreh S.S.:** Fundus lesions in malignant hypertension I. A pathologic study of experimental hypertensive choroidopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 1985;103:1189-1197
- Kitaya N., Nagaoka T., Hikichi T., Sugawara R., Fukui K., Ishiko S., Yoshida A.:** Features of abnormal choroidal circulation in central serous chorioretinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, 2003;87(6):709-712
- Koss M.C.:** Role of nitric oxide in maintenance of basal anterior choroidal blood flow in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 1998;39:559-564
- Lakatta E.G., Levy D.:** Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a 'set up' for vascular disease. *Circulation*, 2003;107:139-146
- Langham M.E., Farrell R.A., O'Brien V. et al.:** Blood flow in the human eye. *Acta Ophthalmol.*, 1989;191(Suppl.):S9-S13
- Leung C. K., Cheung C. Y., Weinreb R. N., Lee G., Lin D., Pang C. P., Lam D. S. C.:** Comparison of macular thickness measurements between time domain and spectral domain optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:4893-4897
- Liakopoulos S., Ongchin S., Bansal A., Msutta S., Walsh A. C., Updike P.G., Sadda S. R.:** Quantitative optical coherence tomography findings in various subtypes of neovascular age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:5048-5054
- Loeffler K.U., Lee W.R.:** Basal linear deposit in the human macula. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1986;224:493-501
- Loeiller K.U., Hayreh S.S., Tso M.O.M.:** The effects of simultaneous occlusion of the posterior ciliary artery and vortex veins. *Arch. Ophthalmol.*, 1994;112:674-682
- Luksch A., Polska E., Imhof A. et al.:** Role of NO in choroidal blood flow regulation during isometric exercise in healthy humans. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 2003;44:734-739
- Lütjen-Drecoll E.:** Choroidal innervation in primate eyes. *Exp. Eye Res.*, 2006;82:357-361
- Mann R.M., Riva C.E., Stone R.A., Barbes G.E., Cranston S.D.:** Nitric oxide and choroidal blood flow regulation. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.*, 1995;36:925-930
- Marcuello M.B., Torròn F-B., Pérez O.S., Ruiz M.O., Ferrer N.E., Honrubia L.F.M. Serpiginous choroiditis:** clinical evolution and treatment. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2004;5
- Margolis R., Spaide R.F.:** A pilot study of enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroids in normal eyes. *Am. J. Ophthalmol.*, 2009;147:811-815
- McLeod D.S., Lutty G.A.:** High-resolution histologic analysis of the human choroidal vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1994;35:3799-3811
- Michelson G., Schmuss B., Langhans M.J., Harazny J., Groh M.J.M.:** Principles, validity, and reliability of scanning laser doppler flowmetry. *J. Glaucoma*, 1996;5:99-105
- Michelson G., Weizenbach J., Pal I., Harazny J.:** Automatic full field analysis of perfusion images gained by scanning laser doppler flowmetry. *Br. J. Ophthalmol.*, 1998;82:294-1300
- Nagaoka T., Kitaya N., Sugawara R., Yokota H., Mori F., Hikichi T., Fujio N., Yoshida A.:** Alteration of choroidal circulation in the foveal region in patients with type 2 diabetes. *Br. J. Ophthalmol.*, 2004;88:1060-1063
- Nagaoka T.:** Physiological mechanism for the regulation of ocular circulation. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 2006;110:872-878
- Neely K.A., Gardner T.W.:** Ocular neovascularization. *Am. J. Pathol.*, 1998;153:665-670
- Olver J.M.:** Functional anatomy of the choroidal circulation. *Eye*, 1990;4:262-272
- Oto S., Yilmaz G., Cakmakci S., Aydin P.:** Indocyanine green and fluorescein angiography in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Retina*, 2002;22:187-191
- Parver L.M., Auker C., Carpenter D.O.:** Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. *Am. J. Ophthalmol.*, 1980;89:641-646
- Pauleikhoff D.:** Aging of Bruch's membrane: histological, morphologic and clinical correlation. *Proc. Int. Soc. Eye Res.*, VI, 1990;337:101
-

- Polska E., Polak K., Luksch A. et al.:** Twelve hour reproductibility of choroidal blood flow parameters in healthy subjects. *Br. J. Ophthalmol.*, 2004;88:533-537
- Pescosolido N., Imperatrice B.:** Il fondo oculare nel soggetto iperteso. Esame affidabile per la diagnosi dell'ipertensione sistemica? *Argomenti di Oftalmologia* 13. Canelli (AT), Fabiano Editore, 2008
- Preussner P.R., Richard G., Darrelmann O. Et al.:** Quantitative measurement of etinal blood flow in human beings by application of digital image-processing methods to television fluorescein angiograms. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1983;221:110-112
- Raab M.F., Gagliano D.A., Teske M.P.:** Retinal arterial macroaneurysms. *Surv.Ophthalmol.*, 1988;33:73-96
- Rim Sung K., Wallstein G., Bilonick R.A., Townsend K.A., Ishikawa H., Kagemann L., Noecker R.J., Fujimoto J.G., Schuman J.S.:** Effect of age on optical coherence tomography measurements of healthy retinal nerve fibres layer, macula, and optic nerve head. *Ophthalmology*, 2009;116:1119-1124
- Ring H.G., Fujino T.:** Observations on the anatomy and pathology of the choroidal vasculature. *Arch. Ophthalmol.*, 1967;78:431-444
- Riva C.E., Titze P., Hero M., Petrig B.L.:** Effect of acute decreases of perfusion pressure on choroidal blood flow in humans. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 1997;38:1752-1760
- Riva C.E.:** Sub-foveal choroidal blood flow by LDF: measurement and application to the physiology and pathology of the choroidal circulation. *Bull Soc. Belge Ophthalmol.*, 2006;302:185-194
- Robertson D.M.:** Macroaneurysms of the retinal arteries. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, 1973;77:55-67
- Ruskell G.L.:** An ocular parasympathetic nerve pathway of facial nerve origin and its influence on intraocular pressure. *Exp. Eye Res.*, 1970;10:319-330
- Ross R.D., Barofsky J.M., Cohen G., Baber W.B., Palao S.W., Gitter K.A.:** Presumed macular choroidal watershed vascular Hlling, choroidal neovascularization, and systemic vascular disease in patients with age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 1998;125:71-80
- Sarks S.H.:** Senile choroidal scleriosis. *Br. J. Ophthalmol.*, 1973;57:98-109
- Sarks S.H.:** Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br. J. Ophthalmol.*, 1976;60:324-341
- Sarks S.H., Arnold J.J., Killingsworth M.C., Sarks J.P.:** Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, 1999;83:358-68
- Sato Y., Tomita G., Onda E., Goto Y., Oguri A., Kitazawa Y.:** Association between watershed zone and visual field defect in normal tension glaucoma. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 2000;44:39-45
- Scheider A., Nasemann J.E., Lund O.E.:** Fluorescein and indocyanine green angiographies of central serous choroidopathy by scanning laser ophthalmoscopy. *Am. J. Ophthalmol.*, 1993;115:50-56
- Schmetterer L., Lexer F., Unfried C. et al.:** Topical measurement of fundus pulsations. *Opt. Eng.*, 1995;34:711-716
- Schmetterer L., Wolzt M., Salomon A. et al.:** Effect of isoproterenol, phenylephrine, and sodium nitroprusside on fundus pulsations in healthy volunteers. *Br. J. Ophthalmol.*, 1996;80:217-223
- Schmetterer L., Findl O., Strenn K. et al.:** Role of NO in the O₂ and CO₂ responsiveness of cerebral and ocular circulation in humans. *Am. J. Physiol.*, 1997a;273:R2005-R2012
- Schmetterer L., Müller M., Fasching P. et al.:** Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. *Diabetes*, 1997b;46:1868-1874
- Schmetterer L., Polak K.:** Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2001;20:823-847
- Schmetterer L., Garhofer G.:** How can blood flow be measured? *Surv. Ophthalmol.*, 2007;52(Suppl.2):S134-S138
- Scrimieri F., Iester M., De Feo F., Bagnis A., Zimbelli A., Vittone P., Calabria G.:** Riproducibilità intraosservatore dell'analisi del flusso della retina peripapillare mediante Heidelberg Retina Flowmeter. *Ottica Fisiopat.*, 2006;11:309-315
- Silver D.M., Farrell R.A., Langham M.E. et al.:** Estimation of pulsatile ocular blood flow from intraocular pressure. *Acta Ophthalmol.*, 1989;191(Suppl.): S25-S29
- Simader C., Lung S., Weigert G., Kolodjaschna J., Fuchsjaeger-Mayrl G., Schmetterer L., Polska E.:** Role of NO in control of choroidal blood flow during a decrease in ocular perfusion pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009;50:372-377
- Spaide R.F.:** Age-related choroidal atrophy. *Am. J. Ophthalmol.*, 2009;147:801-810
- Spaide R.F., Koizumi H., Pozzoni M.C.:** Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *Am. J. Ophthalmol.*, 2008;146:496-500
- Srinivasan V. J., Adler D. C., Chen Y., Gorczyńska I., Huber R., Duker J. S., Schuman J. S., Fujimoto J. G.:** Ultrahigh-speed optical coherence tomography for three-dimensional and en face imaging of retina and optic nerve head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008;49:5103-5110