

# L'endotelio nell'imaging corneale

di Amedeo Lucente

## Introduzione

La tecnologia strumentale caratterizza ogni campo della medicina. L'oftalmologia, con ancora maggior evidenza, nella diagnosi delle patologie oculari si serve dell'aiuto tecnologico come indispensabile e complementare supporto. Lo studio della cornea era ristretto, fino a pochi anni or sono, alla lampada a fessura, strumento simbolo dell'oculista che individua e caratterizza la nostra attività clinica. Lo studio delle alterazioni retiniche e l'*imaging* delle patologie del segmento posteriore, molto affascinanti iconograficamente, hanno posto per lungo tempo in un secondo piano l'iconografia strumentale della cornea e del segmento anteriore.

La tecnologia OCT - rivolta inizialmente allo studio della retina - è stata il vero elemento innovativo diagnostico più positivamente sconvolgente degli ultimi venti anni nel panorama dell'oftalmologia mondiale. All'inizio essenzialmente retinica, ha messo in ombra le innovazioni strumentali riguardanti la cornea e la camera anteriore, che parimenti si sono sviluppate con grande qualità tecnologica. Tutto ciò che le industrie ci propongono è sviluppato per le crescenti esigenze scientifiche e cliniche ma, anche, per più congrui ritorni economici di mercato. Gli OCT sono stati, e ancora rappresentano, il principale impegno/business delle più importanti case costruttrici ed il loro successo è stato scientifico ed economico. Il business per gli OCT negli USA nel 2010 è stato di 250 milioni di \$ e si prevede nel 2017 di 650 milioni di \$, con investimenti per 30-60 milioni di \$/anno delle case costruttrici. La chirurgia refrattiva ha favorito lo sviluppo di tutta una serie di strumenti: dalla topografia di superficie della cornea alla microscopia endoteliale speculare, dalla pachimetria ottica e a contatto alla microscopia confocale e, infine, alle indagini corneali e della camera anteriore per mezzo della tecnologia Scheimpflug e OCT. La nascita di numerose società scientifiche per lo studio della cornea conferma la crescente rivalutazione per la superficie oculare e, se sommiamo i congressi nazionali e internazionali, l'interesse per il segmento anteriore supera quasi quello per la retina. Le Società monotematiche

aderenti alla SOI che s'interessano di cornea e di superficie oculare sono:

**A.I.C.C.E.R.:** Associazione Italiana di Chirurgia della Cataratta e Refrattiva;

**S.I.Co.M.:** Società Italiana di Contattologia Medica;

**S.I.C.S.S.O.:** Società Italiana Cellule Staminali e Superficie Oculare;

**S.I.Tra.C.:** Società Italiana Trapianto di Cornea;

**S.I.D.S.O.:** Società Italiana di Dacriologia e Superficie Oculare.

Dal giugno del 2009 è nata **EuCornea**, European Society of Cornea & Ocular Surface Disease Specialists, con sede a Dublino, per promuovere le relazioni, le conoscenze scientifiche e le competenze pratiche tra gli specialisti della cornea in Europa. Il promotore e primo presidente di questa nuova fondazione è il prof. Vincenzo Sarnicola, già presidente S.I.C.S.S.O. Come si può intuire il fermento scientifico per il segmento anteriore è ben testimoniato e non meno rilevante delle patologie retiniche.

## Le tecnologie e gli strumenti

La strumentazione oggi disponibile per lo studio della cornea allarga spesso il raggio d'azione a tutto il segmento anteriore, offrendo immagini della camera anteriore, dell'angolo camerulare, del cristallino e della camera posteriore, con una ricchezza d'informazioni, di dati anatomici e fisiologici impensabili negli anni passati. Se si esclude la microscopia speculare endoteliale e confocale, che tratteremo subito dopo, l'imaging offerto dalle Scheimpflug Camera e dagli OCT per il segmento anteriore evidenzia ogni dettaglio anatomo-istologico, con assoluta dovizia di particolari, indispensabile per le diagnosi differenziali e ormai imprescindibile per la chirurgia refrattiva. Alla visione della camera anteriore alcuni strumenti associano l'indagine topografica della superficie corneale anteriore e posteriore, con i profili dello spessore di tutta la cornea: mi riferisco essenzialmente al Pentacam dell'Oculus, al Sirius della CSO e al Galilei G2 della Ziemer Ophthalmology. L'associa-

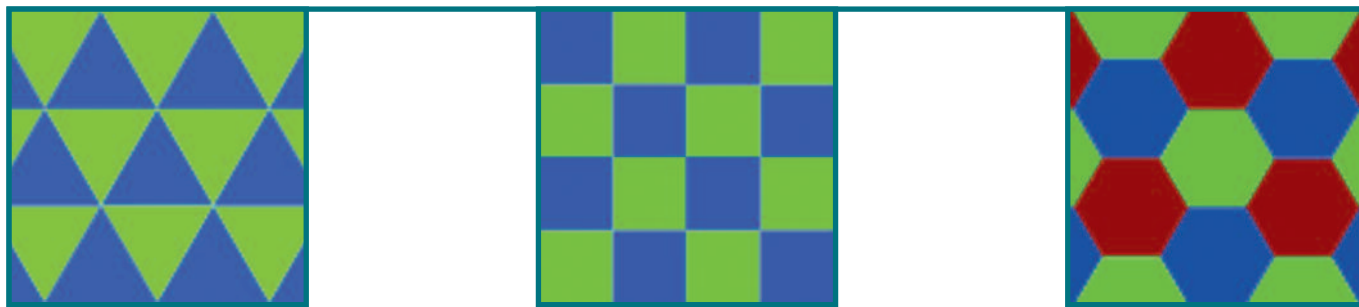


Fig. 1 - Se si impone l'utilizzo di un solo poligono regolare per tutta la tassellatura, abbiamo tre configurazioni possibili; la misura degli angoli del tassello dovrà essere un divisore intero di 360°; andranno bene solo il triangolo equilatero (60°), il quadrato (90°) e l'esagono regolare (120°).

zione topo-aberrometrica e pachimetrica punto per punto rende meglio correlabile il dato rifrattivo corneale con quello anatomico. L'immagine della camera anteriore per mezzo di una o più Scheimpflug Camera consente, infatti, la visione del profilo corneale per intero, da bianco a bianco, con tutti i dati anatomici che ne conseguono. Alla tecnologia Scheimpflug si contrappone, per così dire, quella Tomografica. Tutti gli OCT Spectral in commercio permettono di indagare il segmento anteriore. Gli OCT da camera anteriore permettono una visione strutturale dei tessuti esaminati, mentre i profili ed i volumi sono meglio indagati dalle Scheimpflug. Entrambe le tecnologie non permettono una visione della camera posteriore e del corpo ciliare, possibile con UMB. La molteplicità di offerta tecnologica, con più strumenti che eseguono la stessa indagine, magari con qualche particolare in più, a volte può confondere anche l'oculista più esperto che deve investire in questa strumentazione, sempre più affascinante ed oltremodo esplicativa, ma non certamente a basso costo. In quest'articolo parlerò della microscopia endoteliale perché è l'esame a noi più vicino per frequenza di richiesta, e della microscopia confocale, per la stretta parentela che lega queste due metodiche. Le tecnologie bi e tridimensionali della camera anteriore, molto sviluppate tecnologicamente, pur essendo iconograficamente affascinanti non permettono lo studio istologico-citologico della cornea, come invece è possibile con la microscopia confocale e, per il solo endotelio, con la speculare.

### La microscopia endoteliale

Lo studio dell'endotelio corneale per mezzo della microscopia speculare consiste nell'analisi morfologica e numerica delle cellule endoteliali. La diffusione di questi strumenti, essenzialmente i microscopi endoteliali non contact, è cominciata su larga scala con l'utilizzo della facoemulsificazione nell'intervento di cataratta. A dispetto d'interventi chirurgici svolti correttamente, ci si trovava casualmente nel post-operatorio con cornee

opache ed edematose, senza alcuna apparente spiegazione. Ci s'interrogava sulle possibili cause di tali gravi insuccessi, e la conoscenza dello stato dell'endotelio corneale diventò essenziale e imprescindibile. La causa di quegli "inspiegabili" edemi era dovuta spesso alle soluzioni usate in camera anteriore durante l'infusione-aspirazione, o alla scarsa sterilità nel manipolare le lenti intraoculari, più che allo stato funzionale dell'endotelio pre-operatorio. I microscopi endoteliali non a contatto o speculari trovarono da allora sempre più larga diffusione e oggi sono usati nella preparazione dell'intervento di cataratta, in chirurgia rifrattiva, nelle patologie corneali senza opacizzazione stromale, nel seguire i trapianti corneali e nei portatori di lenti a contatto. Nella stampa degli esami di tutti gli strumenti in commercio si trova sempre un rilievo pachimetrico dell'area indagata, in sostanza della zona pupillare, (*mediamente nei vari strumenti: 02x05 mm di area fotografata, ingrandimento di 150x, distanza di lavoro di 20-30 mm*).

I dati che offrono i printout di stampa indicano il numero di cellule per millimetro quadro, la variabilità dell'area delle cellule con un minimo e massimo, la loro esagonalità e alcuni parametri: il CV o COV "Coefficient of variation of cell size", l'AVG o media delle aree di tutte le cellule e la SD o deviazione standard delle aree cellulari. Com'è noto lo spessore della cornea è mediamente di 535 micron al centro (Doughty e Zaman, 2000), cresce circa del 23% verso la periferia, l'epitelio è meno del 10% del suo spessore (Holden e coll, 1982; Patel e coll. 2001), mentre l'endotelio, monostratificato, misura circa 5 micron, con 500-600 mila cellule esagonali alla nascita. La superficie della cornea è mediamente 1,3-1,4 cm<sup>2</sup>, cioè 130-140 mm<sup>2</sup>: essendo circa 3000-4000 x mm<sup>2</sup> le cellule nell'infanzia x 130-140 mm<sup>2</sup> si hanno in tutto ± 390000-560000 cellule. Alcuni parametri mostrati dalla microscopia endoteliale non contact, descrittivi dell'area delle cellule endoteliali, presi singolarmente sono di difficile comprensione. Vediamoli in particolare.

Il CV, *coefficiente di variabilità o deviazione standard relativa (RDS)*, individua il rapporto tra  $SD/AVG$  cioè tra due indici statistici. La deviazione standard  $SD$ , (standard deviation, scarto quadratico medio, radice quadrata della varianza), è statisticamente un indice di dispersione, indice raffinato che ci indica lo scarto rispetto ad una “norma”, lo scostamento medio dei dati intorno al valore atteso, in questo caso la media aritmetica delle aree cellulari trovate ( $AGV$ ).

In sostanza il CV è anch'esso una deviazione standard, più specifico della  $SD$ , relativo alla media aritmetica  $AGV$ , indipendente dall'unità di misura adottata. Troviamo elencati i seguenti parametri:

- A) **CD** densità cellulare per  $mm^2$ .
- B) **HEX** coefficiente di esagonalità o di poligonalità delle cellule (%).
- C) **CV** coefficiente di variabilità come rapporto tra  $SD/AVG$  (%).
- D) **MAX** dimensioni della cellula maggiore in micron quadrati.
- E) **MIN** dimensioni della cellula minore in micron quadrati.
- F) **SD** deviazione standard delle dimensioni cellulari.
- G) **AGV** media delle dimensioni cellulari in micron quadrati.
- H) **T** spessore corneale in micron.
- I) **N** numero di cellule selezionate per la conta.

Il valore normale di CV è 0.32, vale a dire che il 32% delle cellule esaminate per campo può avere una superficie variabile da quella standard: più alto è questa percentuale e maggiore è il polimegatismo endoteliale. È noto che le cellule endoteliali non hanno capacità riproduttiva e che la loro densità diminuisce con l'età. A differenza delle cellule epiteliali, dove sono presenti “*Corneal Stem Cells*” nelle nicchie del limbus a partenza dalle *Palizzate di Vogts*, e sporadicamente nella cornea centrale, cellule con caratteristiche clonogenetiche identiche alle staminali, (*Olocloni, Paracloni, Meracloni*), nell'endotelio non sono state individuate pool di cellule con potenzialità rigenerative, per cui la densità cellulare decresce lentamente da 3000-4000 a circa 2000 cellule per  $mm^2$  col progredire dell'età. Note sono pure le funzioni di pompa di queste cellule per la normale trasparenza dello stroma corneale, ma ancor oggi non tutto è chiaro; come basse densità cellulari, anche sotto le 500 cellule per  $mm^2$ , possano permettere la stessa tra-

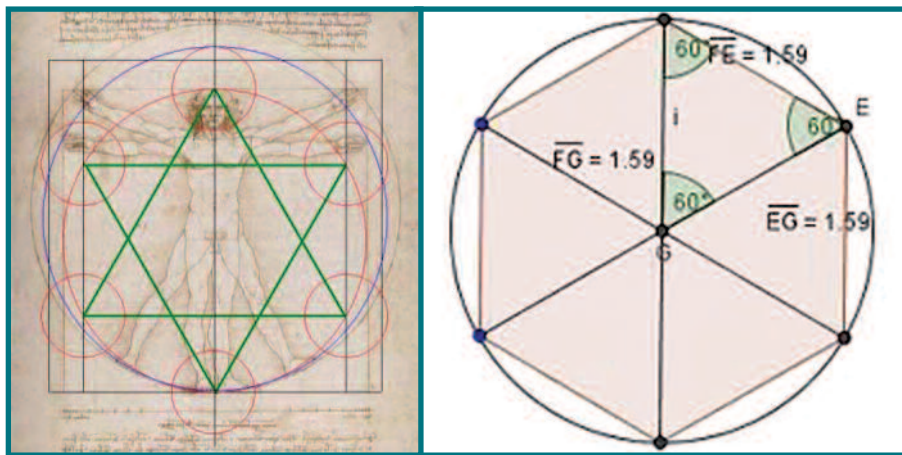


Fig. 2 - Figura vitruviana di Leonardo; esagono regolare

sparenza di densità normali, perlomeno all'osservazione con la lampada a fessura. Sicuramente la supplenza funzionale delle cellule endoteliali è notevole e normalmente utilizzata solo al minimo: quando il numero complessivo delle cellule scende sotto un valore soglia, presumibilmente sotto le  $500 \times mm^2$  ( $500 \times 140 \text{ mm}^2 \pm = \text{area endotelio} = 70000 \text{ cellule c.a.}$ ), si perde la normale trasparenza e compare un edema da insufficienza endoteliale. Basta solo un 5-6% di contenuto di acqua in più nello stroma per avere un edema clinicamente significativo. Le cellule endoteliali, non potendosi moltiplicare, col tempo perdono la loro perfetta forma geometrica, aumentando la superficie cellulare, essenzialmente a carico del citoplasma; tale fenomeno è noto come *Polimegatismo* (da poli=molti e megatos=dimensioni).



Fig. 3 - Favo d'api. Notare la forma perfettamente esagonale delle cellette.

La perdita della loro originale forma esagonale è nota come *Polimorfismo* o *Pleiomorfismo* (da poli=molti e/o pleio=più e morfo= forma). *Polimegatismo* e *Polimorfismo* vanno sempre di pari passo; trovare alterati questi due parametri vuol dire, in linea di massima, una cellularità non pienamente fisiologica. Il *Polimegatismo* è individuato, nel printout dei microscopi endoteliali, dal parametro di variabilità CV, mentre il *Polimorfismo* da *HEX*, *grado di Esagonalità* o *Coefficiente di Forma*. Sono parametri morfometrici espressi entrambi in percentuale (%), ritenuti da molte ricerche come l'indice più sensibile di funzionalità cellulare, rispetto alla pura *Densità Cellulare (CD)*.

Anche in questo caso vale più la qualità funzionale che la quantità numerica, almeno fino ad un certo punto.



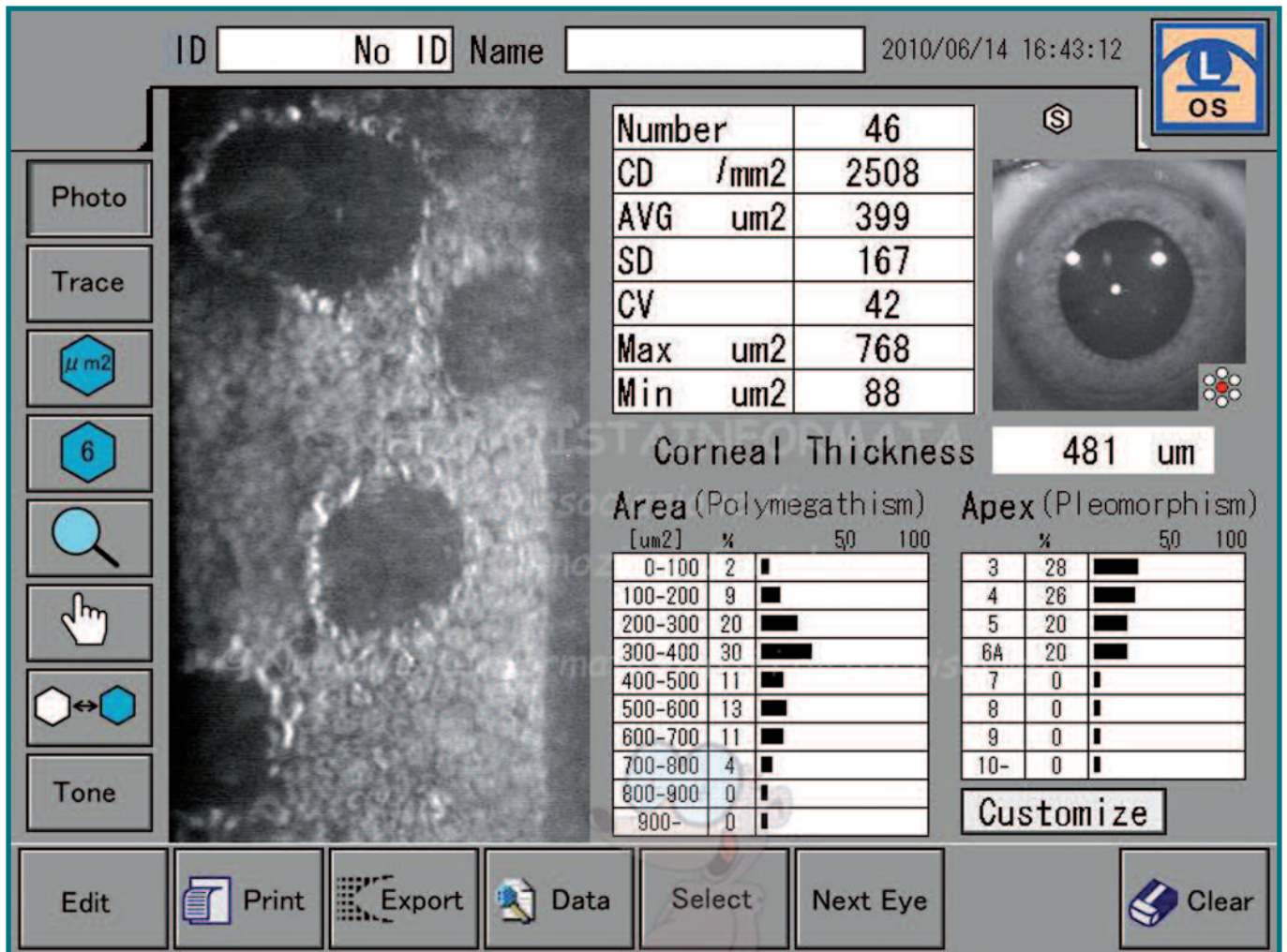


Fig. 4 - Grandi gutte endotheliali

Un alterato rapporto di CV e HEX, anche se marcato, non deve far pensare tout court ad un imminente scompenso corneale, che potrebbe diventare certo dopo un intervento di cataratta. La prognosi sulla sopravvivenza e sulla efficienza biologica delle cellule endotheliali è quanto mai imprevedibile. L'insulto chirurgico gioca sempre un ruolo di primo piano, con diminuzione variabile del numero delle cellule endotheliali ed alterazioni della loro forma. Si potrebbe, in un certo senso, misurare la "delicatezza" dell'atto chirurgico facendo una conta differenziale tra il pre ed il post chirurgia della cataratta, a parità di tutti gli altri bioparametri; possibilità teoriche di studio, scaturite ed elaborate da un punto di vista clinico-speculativo, certamente da eseguire come protocollo nell'attività clinico-chirurgica. La forma esagonale delle cellule endotheliali probabilmente risponde a criteri termodinamici ed entropici, ancora da capire compiutamente. Una prima testimonianza strutturale dell'endotelio corneale risale ai disegni schematici di Vogt riportati nel suo Atlante di Biomicroscopia (1921). In assenza di un microscopio endotheliale è possibile avere una prima visione del mosaico endotheliale già al-

l'esame alla lampada a fessura, specialmente in assenza di alterazioni corneali e del film lacrimale, in soggetti giovani e particolarmente nelle aree corneali temporali, con adeguati ingrandimenti (30-40 x). L'esercizio quotidiano nel ricercare il mosaico endotheliale porta ad aumentare le personali capacità cliniche, ad intuire lo stato fisio-patologico di questo strato cellulare già ad una prima osservazione, con l'approssimazione dovuta all'esperienza individuale ed ai limiti posti dallo strumento. Spesso, dopo un primo sguardo biomicroscopico, si richiede un esame strumentale più approfondito, per la visione di gutte o di disomogeneità delle cellule endotheliali. Com'è noto l'esagono regolare (*da esa=sei e gono=angolo*) ha sei lati uguali e sei angoli congruenti, con ampiezza di 120°; inoltre è composto di sei triangoli equilateri con il vertice in comune, e il suo lato è uguale al raggio della circonferenza circoscritta, con aree quasi sovrapponibili (fatta pari a 1 l'area del cerchio, 0.907 sarà l'area dell'esagono inscritto). In geometria piana gli esagoni con i quadrati e i triangoli equilateri sono le uniche figure idonee per coprire porzioni di piano senza lasciare spazi vuoti e senza sovrapporsi (fenomeno

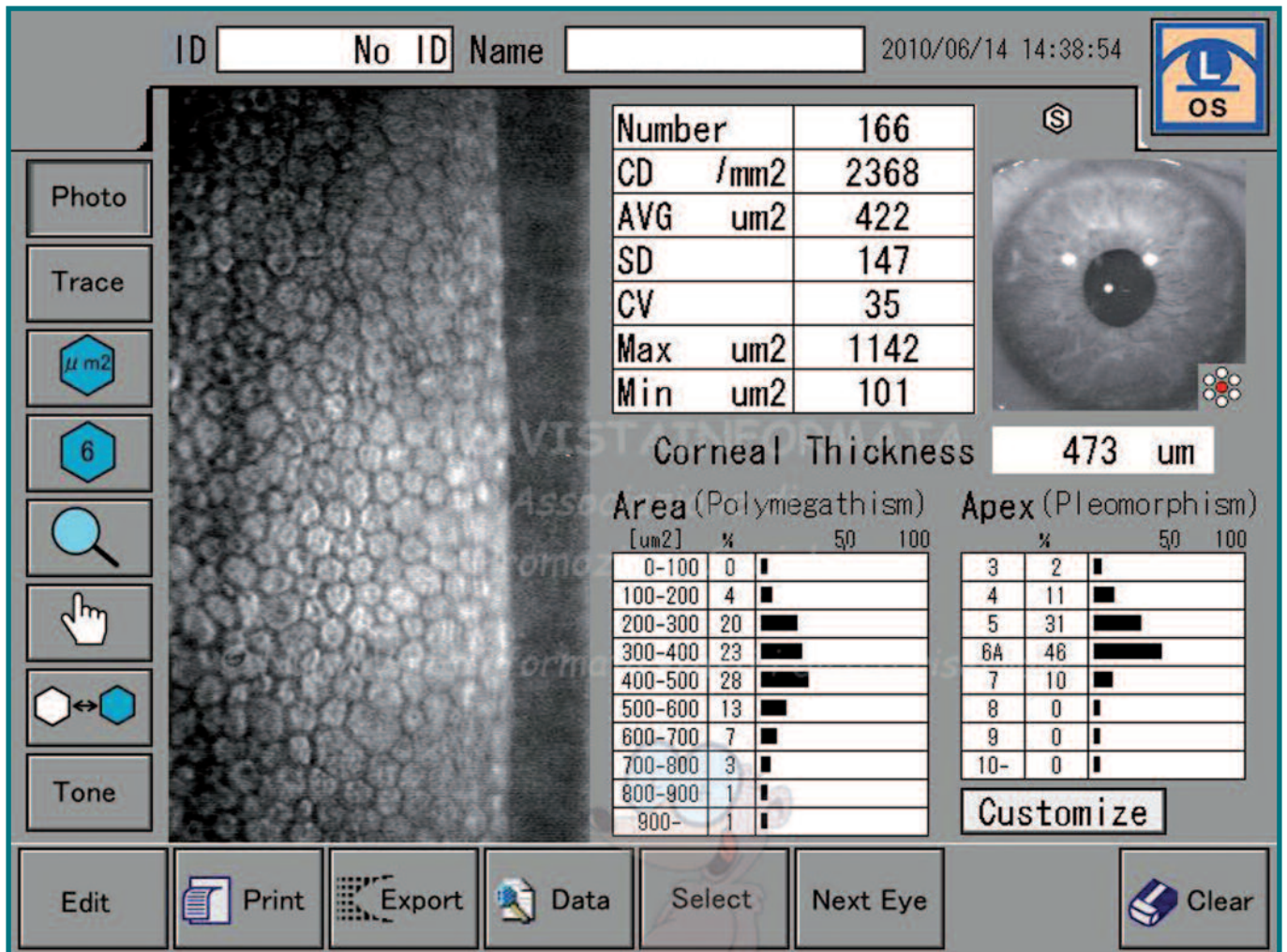


Fig. 5 - Endotelio senza gutte

conosciuto come *tassellazione* o *tassellatura* o *pavimentazione*); le figure piane in geometria sono anche dette "tasselli" (Fig. 1). L'architettura esagonale per la sua perfezione è stata studiata da matematici e zoologi. A questo proposito lo scienziato Renè Antoine De Réaumur evidenziò la forma esagonale come unità di misura del sistema metrico decimale, affermatosi nel XVIII secolo e, nell'Uomo vitruviano di Leonardo, le figure geometriche regolari che si possono disegnare, circoscrivono un esagono come figura più interna e centrale (Fig. 2). Numerosi sono stati inoltre gli studi sui favi delle api per la loro forma tipicamente esagonale (Fig. 3); esagonale è anche la forma delle viti per il bloccaggio meccanico, per la migliore possibilità di avvvitamento, con il minor dispendio di energia e per l'omogenea distribuzione delle forze trasmesse.

In citologia la forma triangolare e quadrata è poco o niente rappresentata, permette pochi scambi intercellulari e soprattutto non consente, in caso di apoptosi o morte di un'unità biologica, lo scivolamento di una cellula nello spazio occupato da quella vicina senza provocare soluzione di continuità. Come s'intuisce la natura

aveva poche scelte nella forma del mosaico endoteliale: l'esagono risponde meglio di tutti gli altri poligoni alle caratteristiche geometriche e biologiche di una popolazione cellulare perenne in lenta diminuzione negli anni, che deve ricoprire perfettamente una determinata superficie biologica. Normalmente l'esagonalità è pari al 60% nei soggetti normali non portatori di lenti a contatto. Questo significa che fisiologicamente si trovano cellule eptagonali o pentagonali nel mosaico endoteliale per un 40% dell'intera popolazione. Com'è stato riferito, le cellule diminuiscono di numero (circa 0.6% l'anno) ed aumentano di dimensioni, e questa alterazione subisce un'accelerazione dopo un intervento di cataratta, anche ben condotto. Si ritiene che una diminuzione di 200-400 cellule per mm<sup>2</sup>, circa del 10%, sia compatibile con un atto chirurgico ben condotto. Una deplezione maggiore è indice di procedure intraoperatorie non corrette, escludendo le cataratte dense e dure, che comportano comunque stress eccessivo per l'endotelio corneale, anche con chirurghi molto esperti. La conversione dalla faco alla ECCE, in alcuni casi selezionati, permette di evitare complicanze le più dispa-



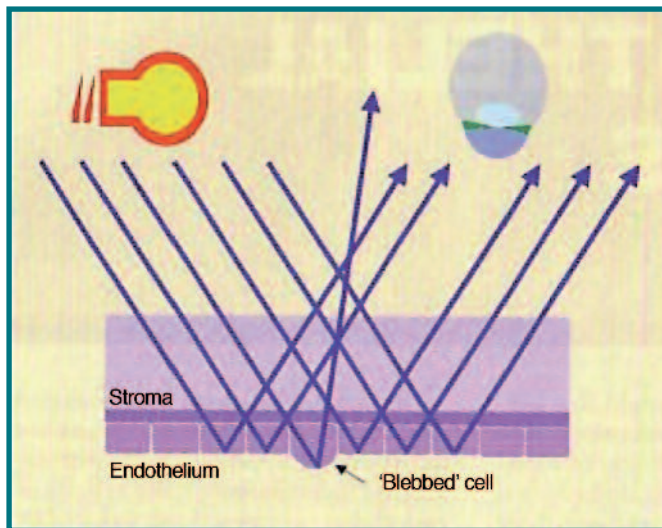


Fig. 6 - Ottica geometrica della riflessione dell'endotelio corneale normale e di una cellula edematosa (bleb) (Nathan Efron. "Contact Lens Complication". 2004 Butterworth-Heinemann.)

rate, ma non migliora la sopravvivenza delle cellule endoteliali, come dimostrato in numerose ricerche. Il goal della chirurgia della cataratta è avere cornee trasparenti ed un visus ottimale subito dopo l'intervento, con minime diminuzioni delle cellule endoteliali, proporzionale alla durezza delle opacità del cristallino.

Con gli anni anche la membrana di Descemet, struttura acellulare costituita principalmente da collagene di tipo VIII, diverso da quello stromale, sintetizzata dalle cellule endoteliali, aumenta di spessore di oltre 10 volte, passando da 3 micron a 30-40 micron nell'anziano. Questo aumento di spessore dovrebbe essere considerato, oltre tutto, come fattore d'errore nel rilievo tonometrico, non solo per il dato pachimetrico, in aumento negli anni, ma anche per il conseguente irrigidimento del modulo elastico della cornea.

Questi due dati possono entrambi determinare un falso aumento del tono oculare rilevato, motivo in più per considerare la pachimetria e l'elasticità corneale in generale (o l'isteresi in particolare), come parametri essenziali nella valutazione del paziente iperteso e/o glaucomatoso. La distribuzione delle perdite cellulari e l'aumento della loro superficie assumono caratteri differenti se dovuti all'invecchiamento oppure a condizioni patologiche.

La redistribuzione cellulare dovuta all'età è maggiormente omogenea, quasi mimetizzata nella molteplicità della sconfinata pavimentazione esagonale, mentre per cause patologiche è meno omogenea, con la comparsa di grandi cellule con una superficie molte volte quella originaria, e con una densità che può scendere fino a 1000 cellule o meno per  $\text{mm}^2$ . Normalmente l'area me-

dia delle cellule endoteliali è di 200-300  $\mu^2$  in soggetti giovani; si possono trovare cellule con aree anche di 1500-2500  $\mu^2$  in cornee patologiche, ma ancora trasparenti. Tutto dipende dal numero totale di cellule morfologicamente non alterate superstiti. Un polimegatismo (CV) così esasperato si trova specialmente nelle cheratoplastiche di vecchia data, dove non è raro trovare cornee ancora chiare con densità (CD) di 500 cellule per  $\text{mm}^2$  (Fig. 4 e 5).

### I buchi neri o Blebs

Una citazione a parte meritano i "buchi neri" o "Blebs". Scoperti nel 1977 da Zantos e Holden, furono descritti come piccole aree scure, non riflettenti, che compaiono nel mosaico endoteliale dopo l'uso di Lac. Sono, in effetti, cellule endoteliali edematose, ripiene di acqua, incapaci di riflettere la luce in modo speculare, apparendo perciò come dei buchi neri. La deformazione di queste cellule avviene posteriormente, verso la camera anteriore: la Descemet ne limita l'espansione verso lo stroma mantenendo, di fatto, immutata la loro forma verso l'esterno, mentre la parete cellulare trova poca o nulla resistenza verso la camera anteriore, ripiena di acqua. La loro superficie diventa così globosa e questo cambiamento non permette l'osservazione al microscopio endoteliale, determinando una non riflessione, un effetto buco nero, "cellula bleb" (Fig. 6).

Bisogna subito dire che il fenomeno Blebs è largamente reversibile, come dimostrato da Nathan Efron nel 2001, confermando le osservazioni di Zantos e Holden. La comparsa di buchi neri è quasi immediata all'applicazione delle Lac sia morbide sia rigide già dopo 10' dall'inserimento; altrettanto rapida è la loro scomparsa dopo 60', con un picco massimo a 30'.

Il fattore scatenante di questa degenerazione idropica cellulare si ritiene sia lo shift del pH stromale, dovuto alla produzione di biossido di carbonio-acido lattico, per la glicolisi attivata dall'ipossia secondaria alle Lac (Holden 1985), relativamente reversibile.

Da più studi sembra ormai certo che l'entità della risposta alle Lac sia inversamente proporzionale al valore di trasmissibilità (Dk/t) della lente nei confronti dell'ossigeno.

La "sindrome da intolleranza alle lenti a contatto" produce, com'è noto, una soggettiva riduzione dell'acuità visiva, fotofobia e edema stromale all'applicazione della Lac. In questi casi si è dimostrato un disordine del mosaico corneale endoteliale con gradi elevati di polimegatismo, che persiste dopo molto tempo negli ex-portatori. Si potrebbe, in un certo senso, riconoscere un ex-portatore di Lac dal suo CV, essendo la tassellazione endoteliale stabile nei portatori di lac da breve tempo. Maggiori

dimensioni cellulari con aumento del polimegatismo si riscontrano solo nei portatori di lungo termine.

### Le Gutte

Un altro breve accenno si deve fare sulle gutte endoteliali. L'endotelio corneale con l'età si altera e la perdita delle cellule, oltre a determinare Polimorfismo e Polomegatismo, provoca un ispessimento della membrana di Descemet (Jean Descemet 1732-1811) che, se è concentrato in piccole aree, si caratterizza con formazioni istologiche dette gutte o corpi di Hassall-Henle. Normalmente sono dislocate in aree corneali periferiche e si possono ritrovare con grande frequenza dopo i quaranta anni (in più del 70%). Se centrali, possono essere uno dei segni della Distrofia di Fuchs, che si manifesta tardivamente e, solo di raro in infanzia, particolarmente nel sesso femminile, bilateralmente, anche se si riscontra spesso una cornea più coinvolta dell'altra.

Prima di arrivare alla cheratopatia bollosa terminale, che portava questi pazienti al trapianto corneale a tutto spessore, il quadro clinico della Fuchs si caratterizza per un diffuso ispessimento della Descemet (spesso 20-30 micron) con edema stromale secondario, fino alle formazione di micro bolle epiteliali.

Nelle fasi iniziali le gutte sono l'elemento patologico principale, diffuse su tutta l'area endoteliale e, all'esame speculare, appaiono come buchi neri di varia dimensione, facendo acquistare all'endotelio un aspetto tarlato, a vetro battuto. Oggi al trapianto a tutto spessore non si arriva più. Le nuove tecniche di cheratoplastica endoteliale DSAEK/DSEK permettono di risolvere prima e meglio questa patologia. In sostanza ciò che noi chiamiamo gutte (dal latino guttae= goccia) sono aree di endotelio senza cellule, con addensamento della Descemet e della lamina basale, che appaiono come aree nere all'esame microscopico endoteliale ed alla lampada a fessura.

### La Microscopia Confocale

Il microscopio confocale nasce negli anni cinquanta. Le basi teoriche della strumentazione sono state attuate da *Marvin Lee Minsky*, (nato a New York 1927) che si è dedicato, tra l'altro, a studi sull'intelligenza artificiale, suo principale campo d'applicazione. I primi microscopi progettati con tecnologia *CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)*, furono costruiti in Inghilterra all'inizio degli anni novanta e commercializzati dalla ditta BioRad da prototipi costruiti nel *MRC Laboratory of Molecular Biology di Cambridge* su progetti di *W. Bradshaw Amos*, iniziati dieci anni prima. Lo strumento opera come un normale microscopio ottico, ma la risoluzione finale è molto aumentata. Attraverso due diaframmi



Fig. 7 - Modulo Rostok per HRT 3 Heidelberg Engineering; HRT 3; Immagini di sezioni corneali dall'epitelio all'endotelio all'HTR 3

(*pinholes*) per la luce emessa e per quella riflessa, s'impediscono al massimo le dispersioni e le interferenze dovute sia alla luce di eccitamento, che viene concentrata sull'area campione, sia alla luce riflessa dagli altri piani, con l'eliminazione di perdite di nitidezza. Il termine confocale descrive appunto la caratteristica di questo

microscopio: il punto d'osservazione e la fonte d'illuminazione sono focalizzati su un unico punto "common focal point".

Tale peculiarità fa ridurre le riflessioni di luce dalle zone vicine al punto d'osservazione,

"chiacchierio" in mi-

croscopia, con aumento della risoluzione e dell'ingrandimento. Si ottiene così una visione cellulare e in parte intracellulare, senza arrivare alla visione degli organuli intracellulari, mitocondri o nucleolo. Esistono due modalità di microscopia confocale in oftalmologia: a luce bianca ed a luce laser. Quella a luce bianca è utilizzata dal *Confoscan 4.0*, (Nidek Technologies, Italy), mentre quella a luce laser è usata dal *HRT3-Rostock con Cornea Module* (Heidelberg Eng., Germany) (Fig. 7 e 8).

Il Confoscan 4 della Nidek è uno strumento dedicato allo studio della cornea, il primo commercializzato ed ideato a tale fine. Permette un ingrandimento di 800-1000X, su un'area d'immagine di 300-400 micron di lato con lenti 40X, acquisite da una telecamera ad alta risoluzione. Permette di studiare la cornea in tutti i suoi strati, sezionandola "a fettine" di pochi micron, dall'endotelio all'epitelio, con acquisizione dei valori pachimetrici di ogni strato indagato, per mezzo di un gel viscoso trasparente interposto tra la probe e la cornea. Maggiore è la riflettività dello strato corneale, migliore è la qualità dell'immagine finale, per cui l'endotelio, che è a maggior riflettività, è fortemente evidenziato, mentre lo stroma si nota con minor dettaglio.

L'HRT è uno strumento della Heidelberg Eng., multifunzione, con la possibilità di avere tre moduli. Nell'ultima versione l'HRT 3 può avere:

- il *modulo glaucoma* con il Glaucoma Probabilità Score (GPS) che permette di evidenziare l'evoluzione del danno delle fibre ottiche nel tempo;
- il *modulo retina*, che permette di quantificare lo spessore per settori del polo posteriore della retina;
- il *modulo cornea* che è un vero microscopio confocale.

L'HRT utilizza una sorgente laser a diodo Elio-Neon a 670 nm, fornendo sezioni di cornea di 10 micron di spessore.

La differenza sostanziale tra le due tecnologie consiste nel fatto che l'utilizzo di una sorgente laser permette d'indagare anche le zone periferiche e limbari della cor-



Fig. 8 - Confoscan 4 Nidek

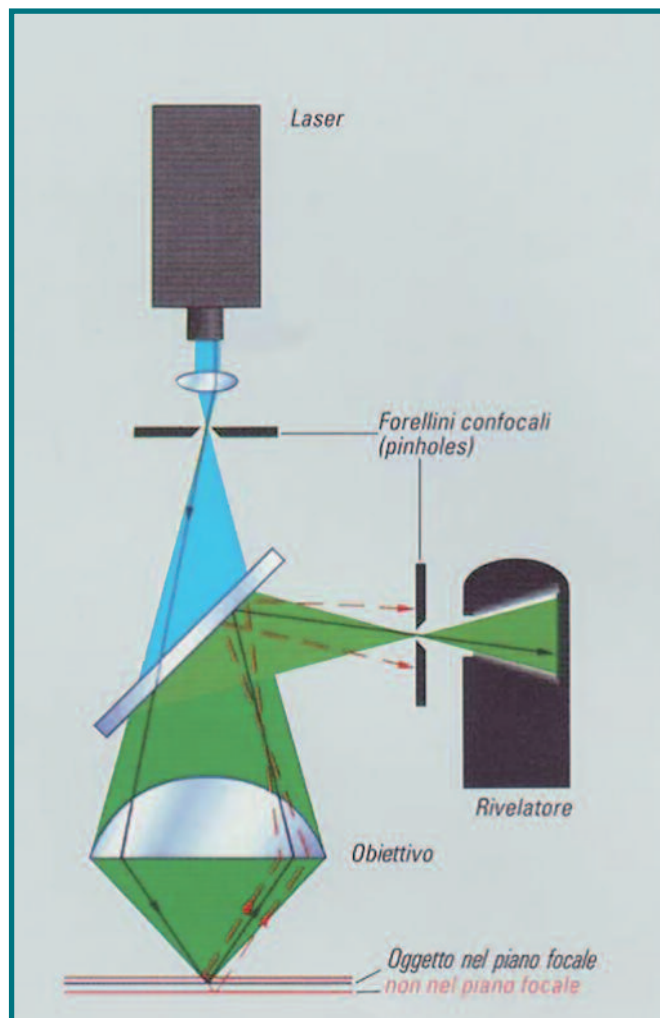


Fig. 9 - Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del microscopio confocale

nea-sclera, senza la diffrazione luminosa, propria di queste strutture non trasparenti, molto evidente nella microscopia confocale a luce bianca. L'indagine limbare non è comunque possibile a tutto lo spessore, rimanendo confinata agli strati superficiali, per ora limite di questa metodica anche con luce laser. La microscopia confocale è utilizzata largamente in biologia. Permette lo studio tridimensionale delle strutture indagate, con sezione in piani paralleli dei preparati, minimizzando le interferenze provenienti dalle altre sezioni adiacenti con l'uso di diaframmi, i pinholes, già citati. Per lo studio dei tessuti biologici è usato unicamente il laser come sorgente di luce (Fig. 9 e 10). Questa metodica d'indagine permette quindi un esame istologico di tutta la cornea, lo studio dettagliato delle patologie corneali, delle sezioni dello stroma prodotte dalle diverse chirurgie rifrattive corneali.

Con lo studio confocale molti insuccessi chirurgici si sono compresi meglio, e lo studio confocale della cornea guida ormai l'evoluzione delle tecniche chirurgiche rifrattive, come indispensabile banco di prova. Lo strato



endoteliale è ben visionato ma non acquista maggiore definizione rispetto alla microscopia endoteliale speculare.

### Considerazioni Finali

L'endotelio corneale affascina e stupisce l'oculista per la sua sorprendente unicità morfo-funzionale, risultando un "unicum" biologico nel nostro organismo.

Sia la microscopia speculare che quella confocale ne danno un'immagine chiara e dettagliata, senza grandi differenze qualitative. Il limite ancor oggi è che s'indaga una piccola area centrale della cornea, anche se si può spostare il campo d'indagine su zone medio-periferiche, facendo guardare il paziente lateralmente o scegliendo campi non centrali nel menu a disposizione in alcuni strumenti speculari (Topcon 3000 SP) o confocali (HRT3 Rostok). Il futuro avrà come sfida l'indagine limbare e delle cellule staminali con tecnologie non invasive, per un'informazione veloce e confortevole dello stato corneale globale, compresa la riserva staminale cellulare. Per ora

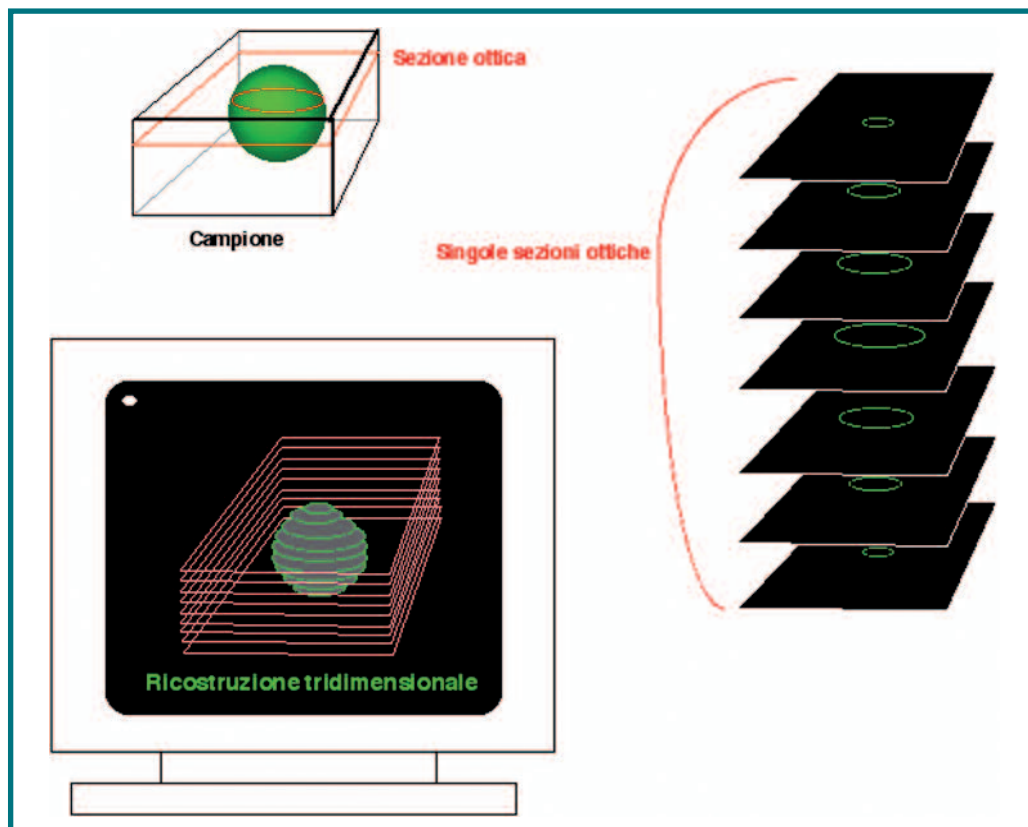


Fig. 10 - Schema microscopio confocale

possiamo solo estendere lo studio corneale ancora più diffusamente nella pratica clinica, per avere dati che serviranno nella storia del paziente, e che potranno aiutare le nostre scelte terapeutiche verso decisioni più oggettive, appropriate e documentate. ■

## BIBLIOGRAFIA

1. Zantos SG and Holden BA (1977) "Transient endothelial changes soon after wearing soft contact lens". *Am J Optom Physiol Opt.* 54, 856-858
2. Efron N, Hollingsworth J, Koh HH, et al. (2001) "Confocal microscopy" In: *The cornea. In: Its Examination in Contact Lens Practice.* P.86-135, Ed. Efron N. (Oxford: Butterworth-Heinemann)
3. Holden BA, Williams L and Zantos SG (1985) "The endothelial changes in the human cornea". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 1354-1359
4. MacRae S.M., Matsuda M., Shellan S., et al. "The effect of hard contact lenses on the corneal endothelium". *Am J Ophthalmol*, 1986. 102: 50.
5. Holden BA, Sweeney DF, Vannas A, et al. "Effect of hard and soft contact lens wear on the human cornea". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 102, 50-57
6. Nathan Efron. "Contact Lens Complication". 2004 Butterworth-Heinemann.
7. J. Wang, D.Fonn, T.L. Simpson, J. Lyndon. "Precorneal and Pre- and Post Lens Tear Film Thickness Measured Indirectly with Optical Coherence Tomography". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2524-2528
8. Holden BA, Sweeney DF. "Corneal exhaustion syndrome (CES) in long-term contact lens wearers: A consequence of contact lens-induced polymegathism?". *Am J Optom Physiol Opt* 1988;65:95P