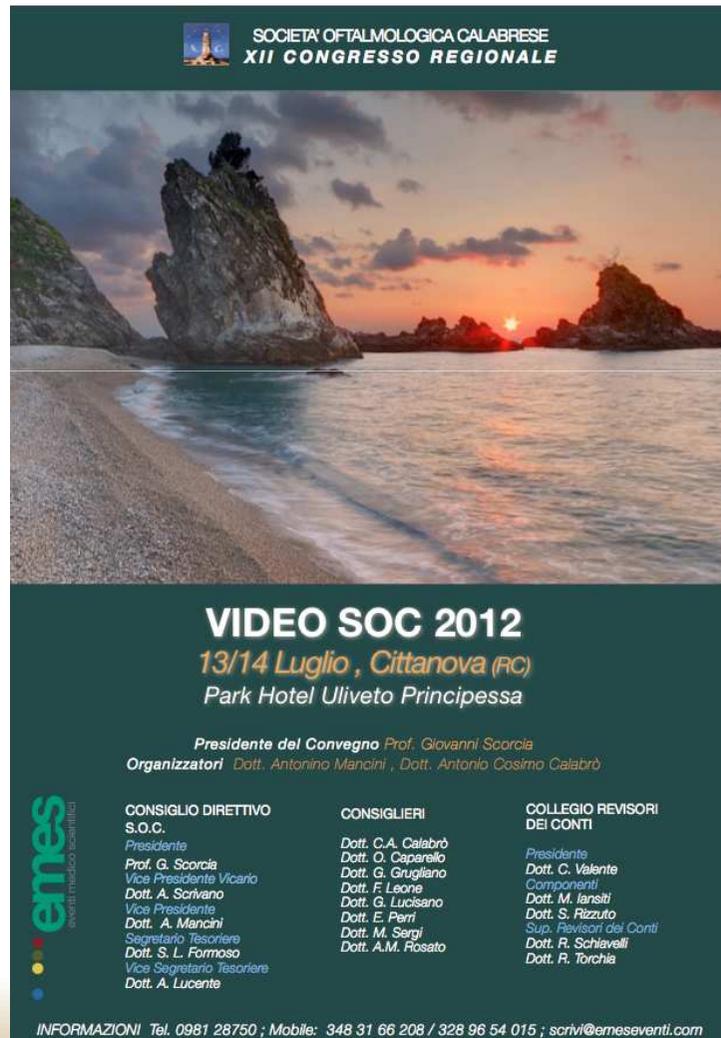


Video SOC 2012

Corsi di diagnostica strumentale

Coordinatore dei Corsi dottor Totò Calabrò



SOCIETA' OFTALMOLOGICA CALABRESE
XII CONGRESSO REGIONALE

VIDEO SOC 2012
13/14 Luglio, Cittanova (RC)
Park Hotel Oliveto Principessa

Presidente del Convegno Prof. Giovanni Scorcìa
Organizzatori Dott. Antonino Mancini, Dott. Antonio Cosimo Calabrò

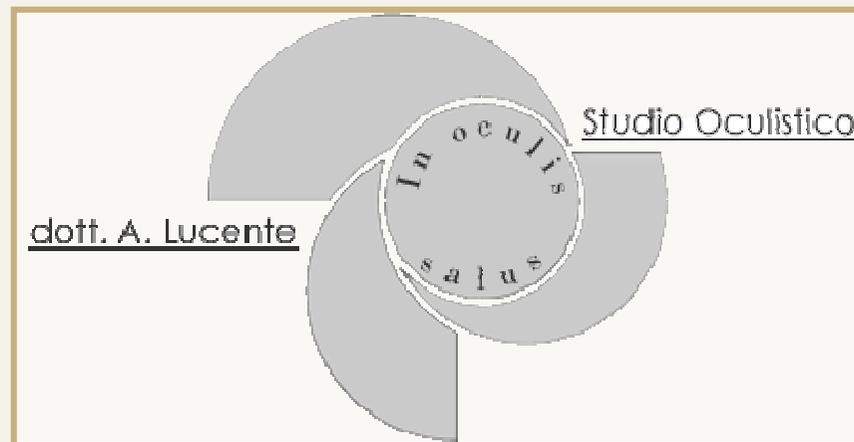
CONSIGLIO DIRETTIVO S.O.C. <i>Presidente</i> Prof. G. Scorcìa <i>Vice Presidente</i> Vicario Dott. A. Scrivano <i>Vice Presidente</i> Dott. A. Mancini <i>Segretario Tesoriere</i> Dott. S. L. Formoso <i>Vice Segretario Tesoriere</i> Dott. A. Lucente	CONSIGLIERI Dott. C.A. Calabrò Dott. O. Caparellò Dott. G. Grugliano Dott. F. Leone Dott. G. Lucisano Dott. E. Perri Dott. M. Sergi Dott. A.M. Rosato	COLLEGIO REVISORI DEI CONTI <i>Presidente</i> Dott. C. Valente <i>Componenti</i> Dott. M. Farsiti Dott. S. Rizzuto <i>Sup. Revisori dei Conti</i> Dott. R. Schiavelli Dott. R. Torchia
--	--	--

emes
avere il medico oculista

INFORMAZIONI Tel. 0981 28750 ; Mobile: 348 31 66 208 / 328 96 54 015 ; scrivi@emeseventi.com

Endotelio Corneale

Microscopia Speculare
Microscopia Confocale



No Commercial Interests

Cellule endoteliali al microscopio a scansione



Microscopio Zeiss 1879

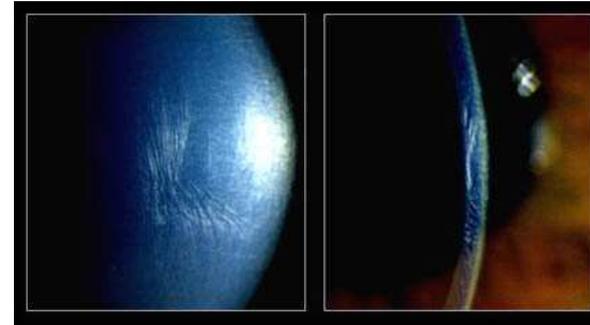
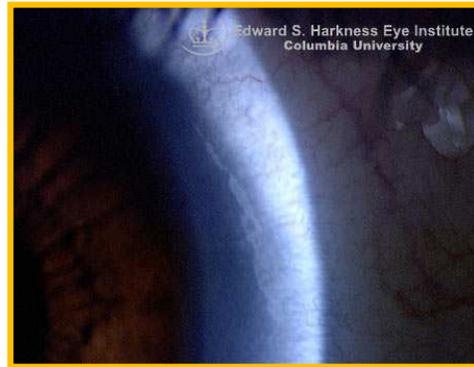
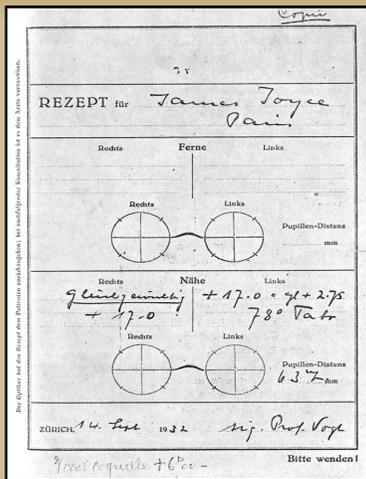


Microscopio Elettronico
a Scansione SEM
Carl Zeiss EVO® MA 15

Cellule endoteliali al microscopio a scansione



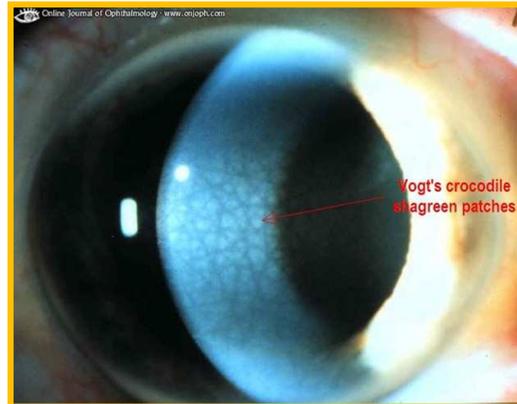
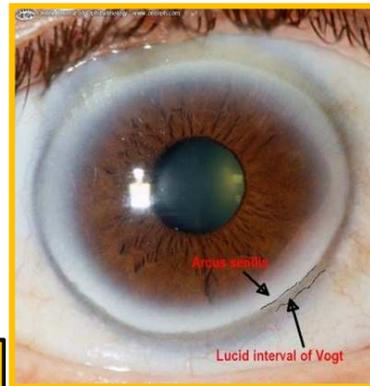
Un po' di storia



Alfred Vogt
1879-1943



James Joyce 1882 -1941



White Limbal Girdle of Vogt: Corneal opacity that occurs in an arc concentric pattern and is adjacent to the limbus within the palpebral fissure at 3 and 9 o'clock; it is more common nasally than temporally, but it is frequently both. It is found in 60% of patients older than 40 years and occurs more frequently in women than in men.

Vogt's striae: Vertical stress lines seen deep in the affected stroma of keratoconus.

Vogt's anterior mosaic crocodile shagreen: Anterior mosaic crocodile shagreen appears as bilateral, polygonal, grayish-white opacities in the deep layers of the epithelium and in Bowman's layer.

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome

Una prima testimonianza strutturale dell'endotelio corneale risale ai disegni schematici di Alfred Vogt (1879-1943) riportati nel suo Atlante di Biomicroscopia (1921)

DSEK / DSAEK/ DLEK/ FS-DSEK/ DMEK/ Cornea Transplant

DSEK - Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty

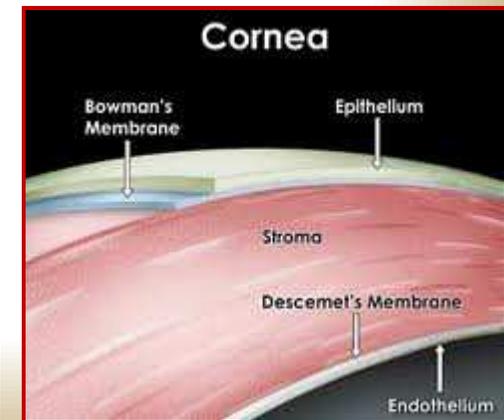
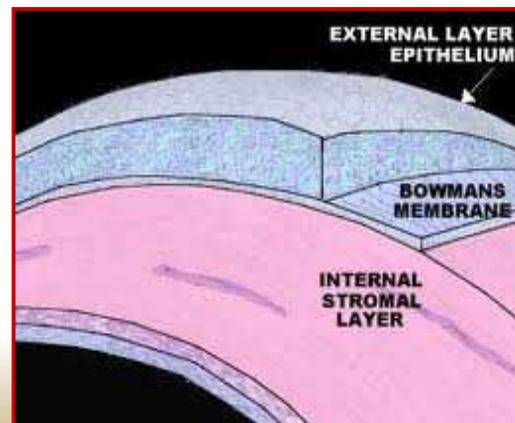
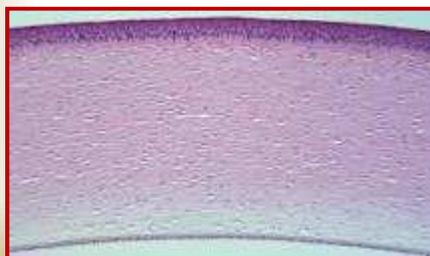
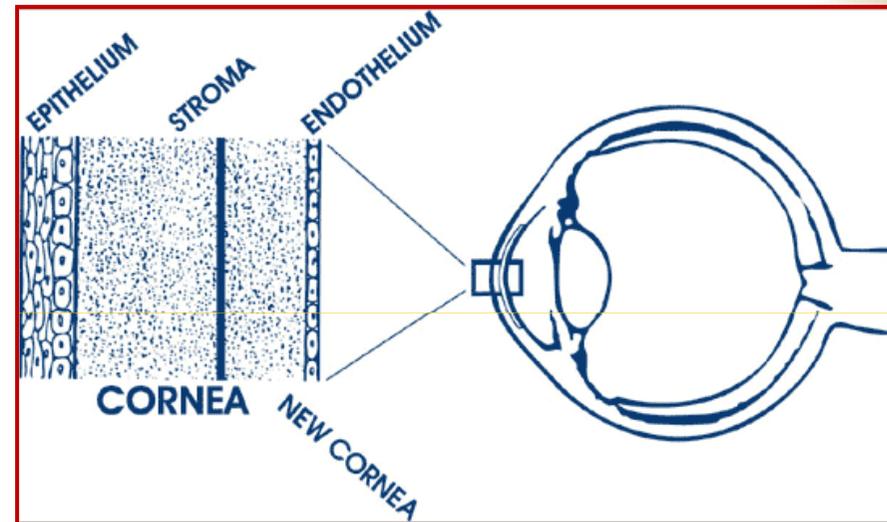
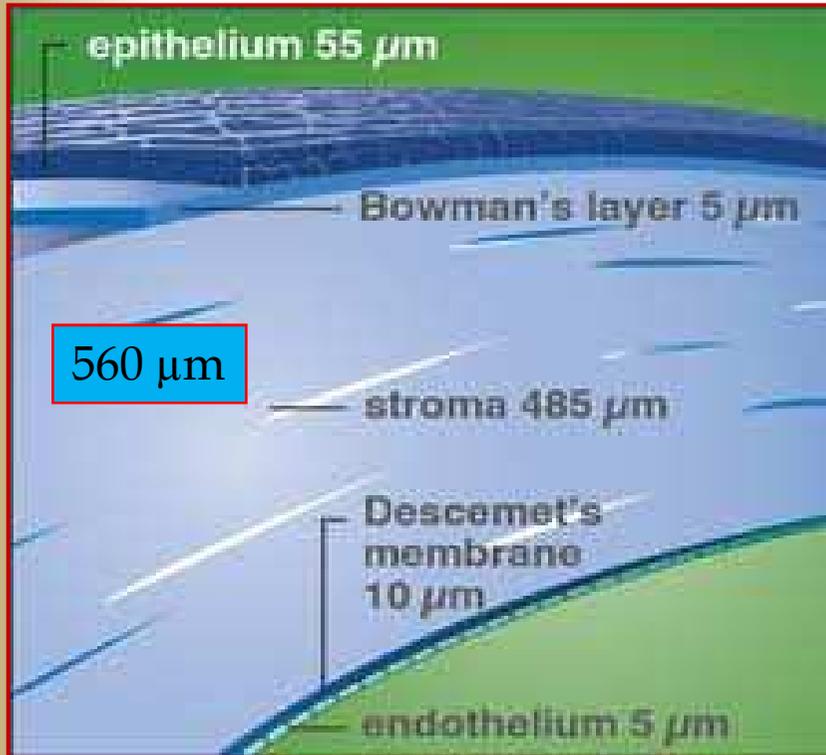
DSAEK - Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty

DLEK-Deep lamellar endothelial keratoplasty

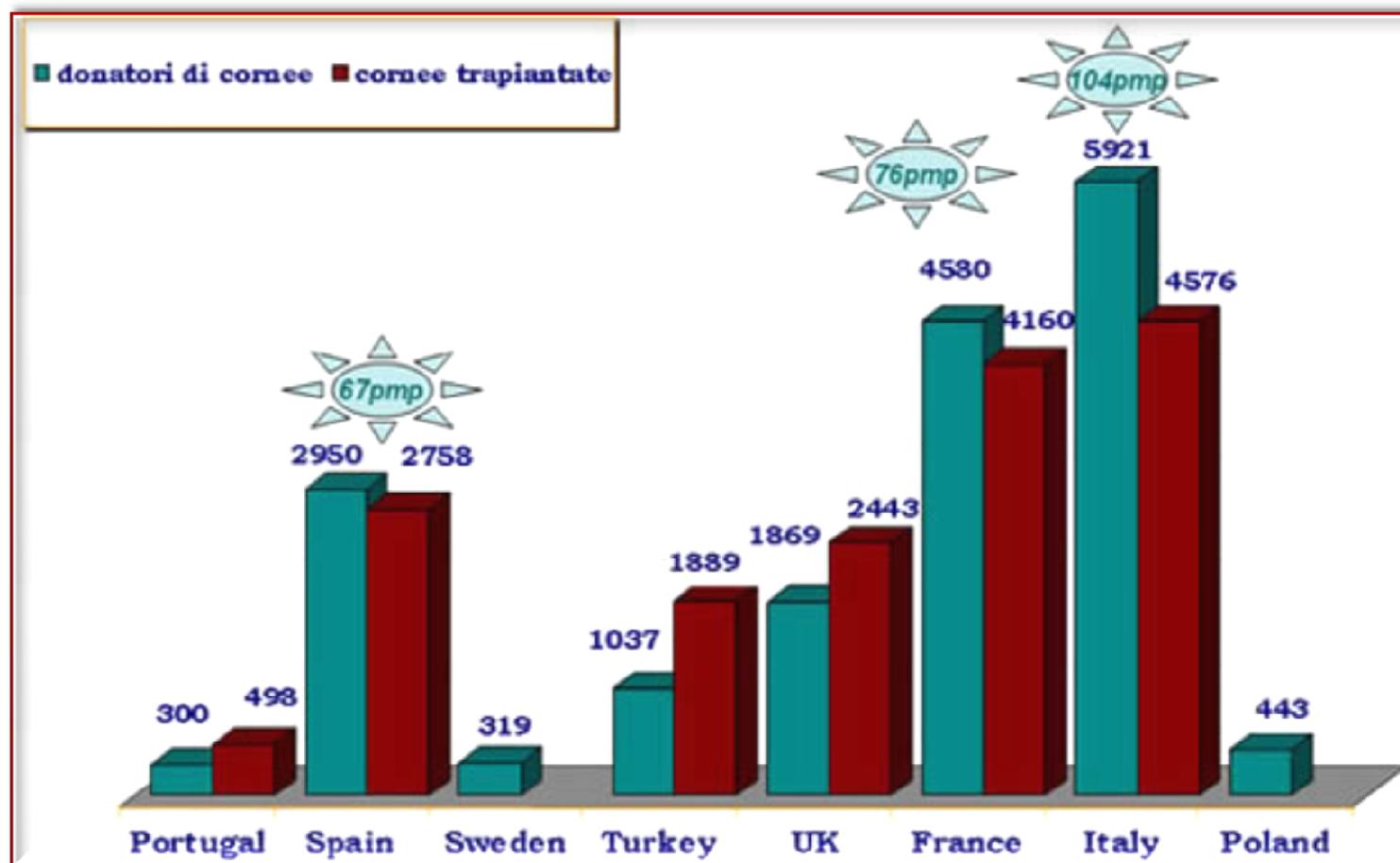
FS-DSEK Femtosecond Descemet stripping endothelial keratoplasty

DMEK-Descemet membrane endothelial keratoplasty

Film lacrimale 3 μ m



Trapianti di Cornea in Europa 2005 (fonte Consiglio d'Europa)



Società Scientifiche Italiane che si interessano di Cornea e Superficie Oculare

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

EuCornea : European Society of Cornea & Ocular Surface Disease Specialists
con sede a Dublino

Endotelio Corneale

- ☞ Spessore cornea è \pm di **535** micron al centro (Doughty e Zaman, 2000)
- ☞ Cresce \pm del **23%** verso la periferia
- ☞ L'epitelio è meno del **10%** dello **spessore corneale** (Holden e coll, 1982; Patel e coll. 2001)
- ☞ L'endotelio monostratificato misura \pm **5** micron **1%** dello **spessore corneale**
- ☞ **\pm 500-600** mila cellule, **\pm 60%** sono **esagonali** alla nascita
- ☞ Superficie della cornea è **\pm 1,3 / 1,4 cm² = 130-140 mm²**
- ☞ Circa **3000-4000 x mm²** cellule nell'infanzia
- ☞ **3000-4000 x 130-140 mm² = \pm 390000/560000** cellule in tutto
- ☞ Area media delle cellule endoteliali è di **200-300 μ ²**
- ☞ Diminuiscono di numero **\pm 0.6% l'anno**

Polimorfismo & Polimegatismo

Polimorfismo o Pleomorfismo o Esagonalità

(poli=molti; pleo=più; morfo=forma)

Risponde alla domanda: quanti lati hanno le cellule endoteliali?

∞ Il **Polimorfismo** è individuato da **HEX**, grado di Esagonalità o Coefficiente di Forma o di Figura

HEX= 60%

Fisiologicamente si trovano cellule eptagonali o pentagonali nel mosaico endoteliale per un 40%

Esagonalità & tassellazione, tassellatura, pavimentazione

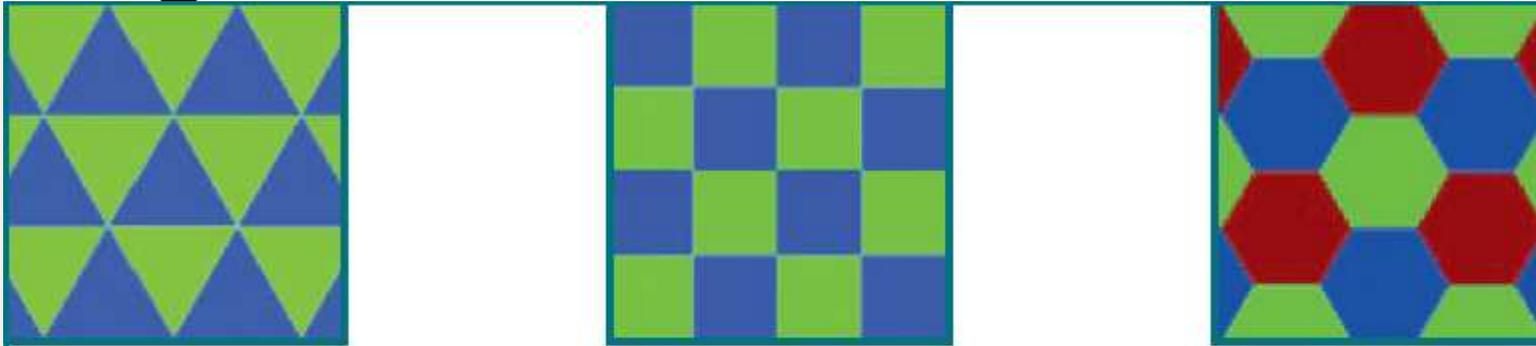


Fig. 1 - Se si impone l'utilizzo di un solo poligono regolare per tutta la tassellazione, abbiamo tre configurazioni possibili; la misura degli angoli del tassello dovrà essere un divisore intero di 360° ; andranno bene solo il triangolo equilatero (60°), il quadrato (90°) e l'esagono regolare (120°).

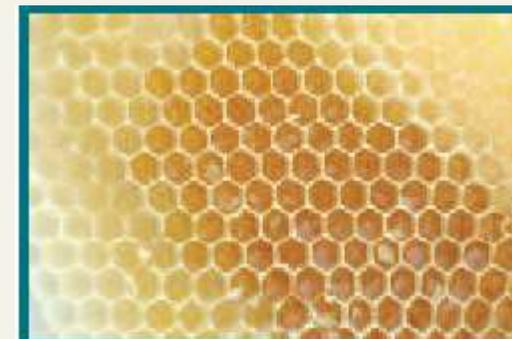
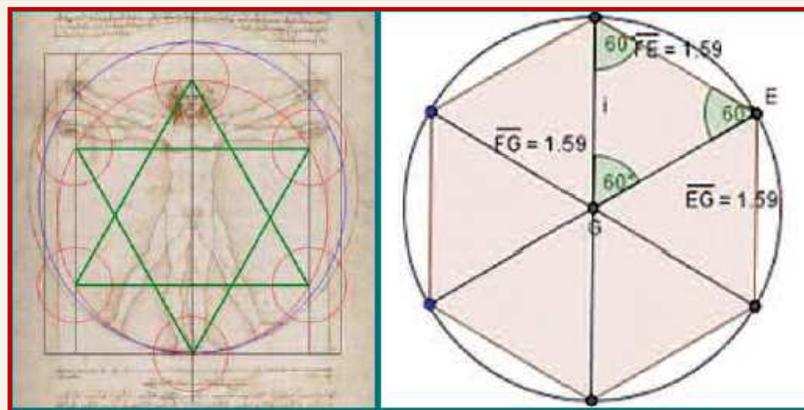
Esagono regolare (esa=sei e gono=angolo)

Sei lati uguali, sei angoli congruenti, con ampiezza di 120°

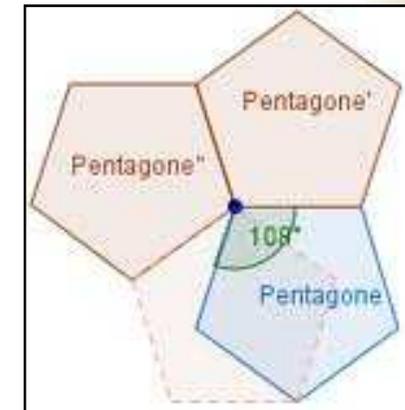
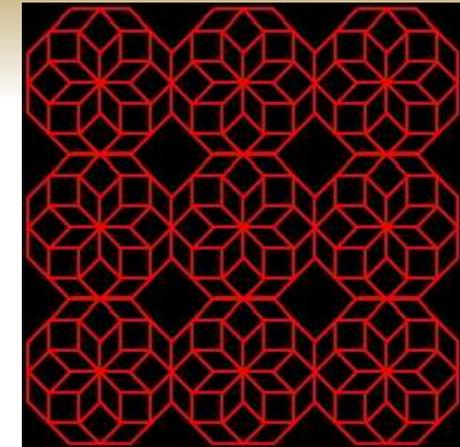
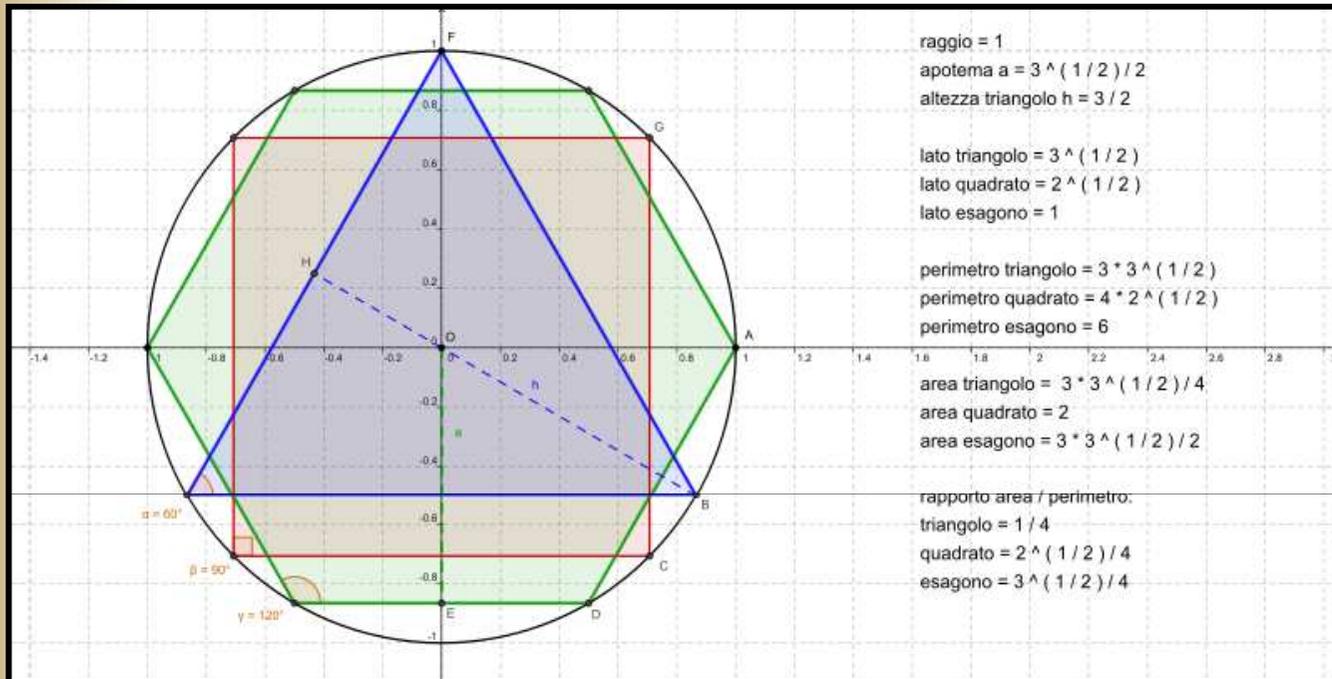
Composto di sei triangoli equilateri con il vertice in comune

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 $\geq 90\%$)

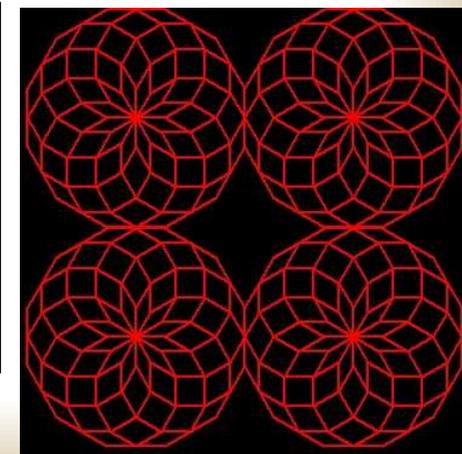
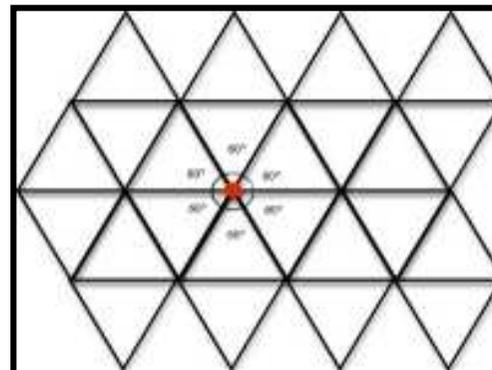
tassellazione
tassellatura
pavimentazione



Tassellatura con poligoni regolari



Pappo d'Alessandria osservò che la forma ad esagono regolare, rispetto ad altre possibili pavimentazioni del piano, ha il massimo rapporto area/perimetro per ogni cella considerata



Polimegatismo

(*poli =molti; megatos = dimensioni*)

Risponde alla domanda: quale area hanno le cellule endoteliali?

∞ Il **Polimegatismo** è individuato da **CV**, Coefficiente di Variabilità o **COV**, Coefficient of Variation of Cell Size

CV = 32% (Rapporto tra **SD/AVG** %)

Non oltre il 32% delle cellule esaminate per campo potrebbe aver una superficie variabile da quella standard

Polimegatismo e Lac

Le lac possono avere l'effetto di accelerare il Polimegatismo

(Schoessler JP, Woloschak MJ. Corneal endothelium in veteran PMMA contact lens wearers Int Contact Lenc Clin 1981; 8 (6): 19-25).

L'incremento del Polimegatismo è stato confermato :

- *con uso non permanente di lac*
- *con uso permanente di lac*

Per Polimegatismo si intende l'aumento numerico di cellule con area di dimensioni diverse l'una dall'altra; si esprime in termine di Coefficiente di Variazione dell'area cellulare **CV**, rapporto tra la Deviazione Standard **SD** dell'area cellulare e la superficie cellulare media **AGV**

$$CV = SD/AGV$$

Aumento del Polimegatismo e Lac

- Uso giornaliero di lac in PMMA per periodi molto lunghi il CV aumenta dal:

31% e il 82%

- Uso di lac morbide per molti anni il CV aumenta dal:

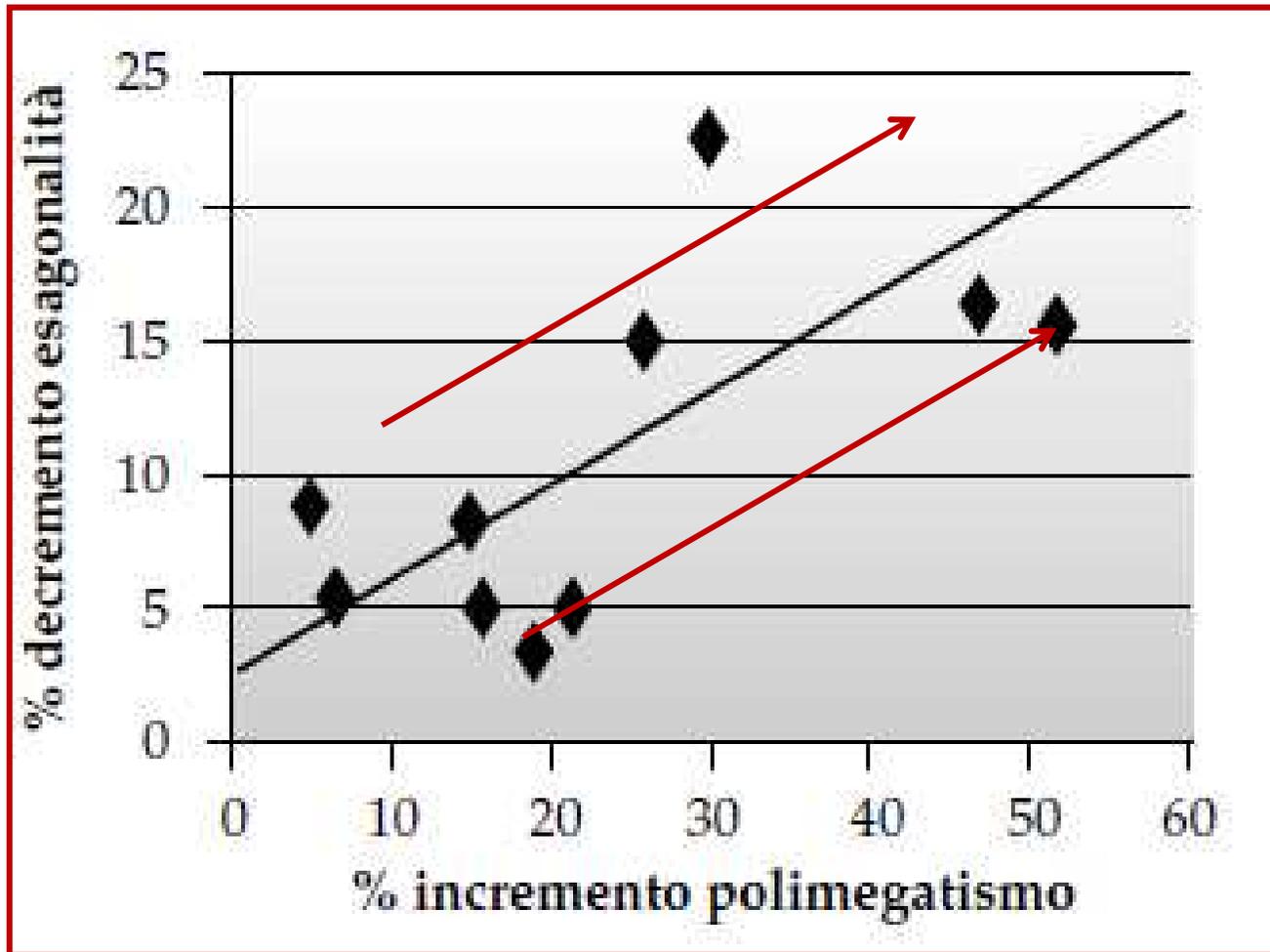
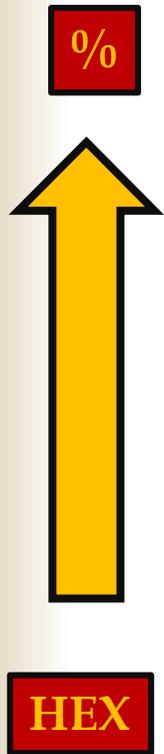
27% e il 37%

- Uso a permanenza di lac morbide il CV aumenta dal:

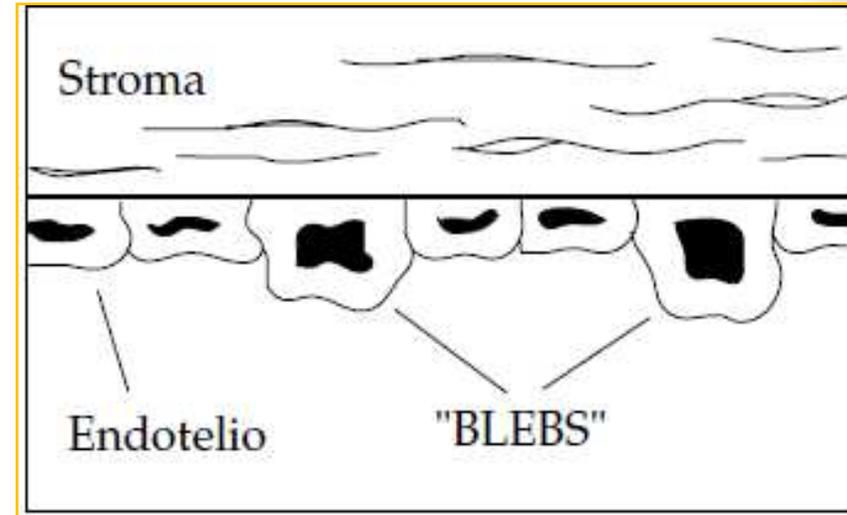
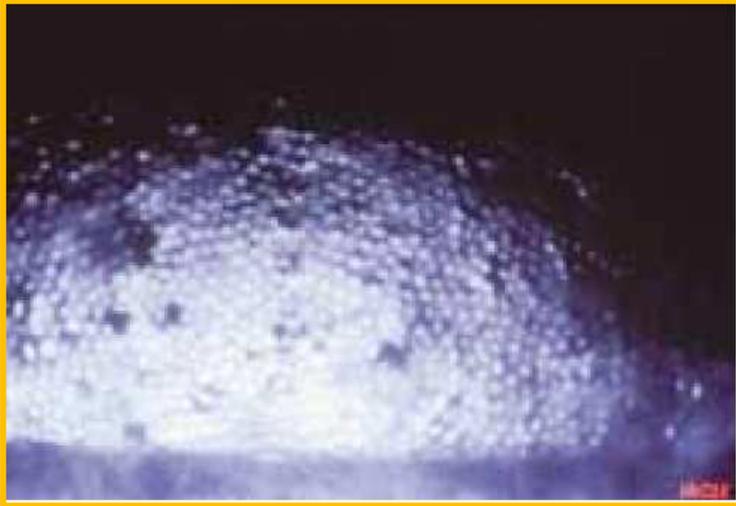
22% e il 51%



Rapporto tra Polimorfismo **HEX** e Polimegatismo **CV** in %



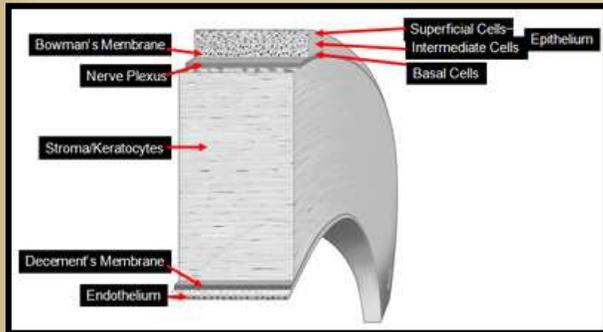
Lac e Blebs



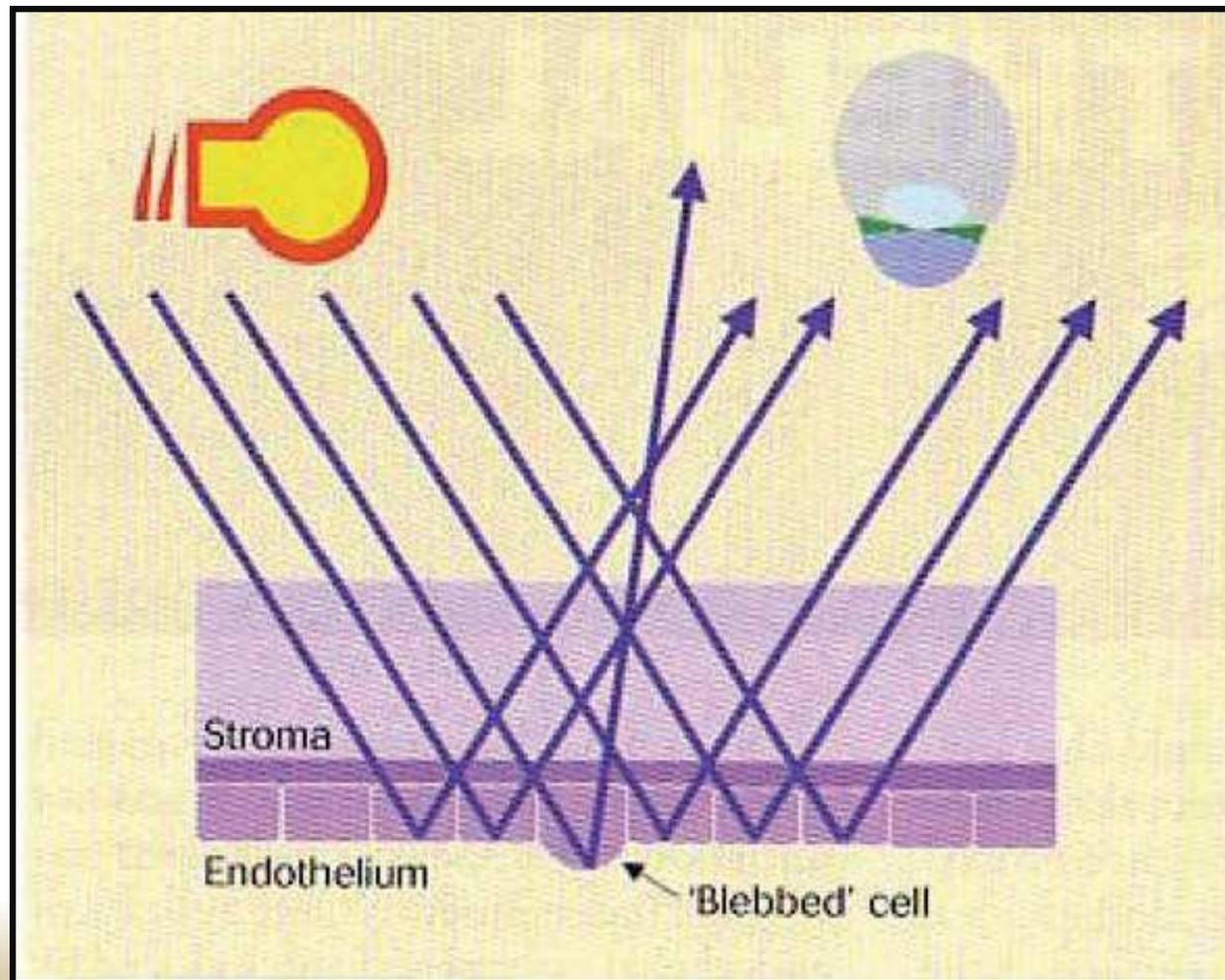
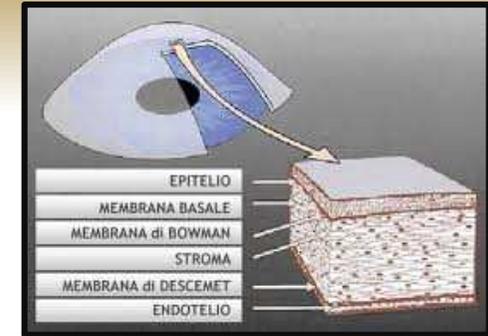
Le blebs : - zone scure che si manifestano con l'uso delle lac

- aumentano in numero e grandezza fino a un livello massimo (20-30 min.)
- dopo cominciano a diminuire fino a livello minimo (45-50 min.)
- rimangono costanti per il periodo d'uso delle lenti
- rimozione della lente determina scomparsa del fenomeno
- edema localizzato interessa una o più cellule endoteliali
- rigonfiandosi divengono sporgenti nell'acqueo (idropi delle cellule)

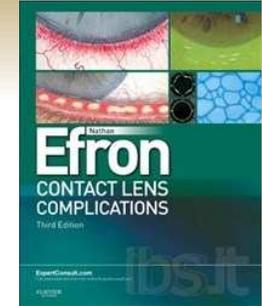
L'entità della risposta è inversamente proporzionale al valore di trasmissibilità (Dk/t) della lente a contatto.



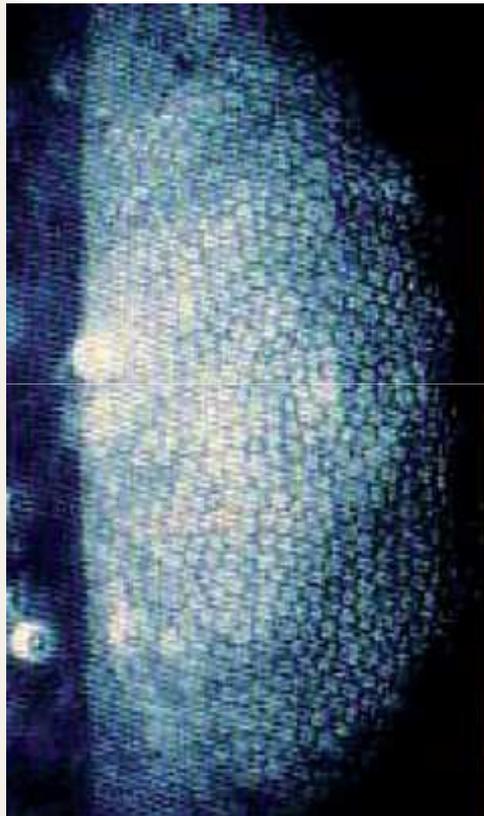
Blebbed cell al microscopio speculare



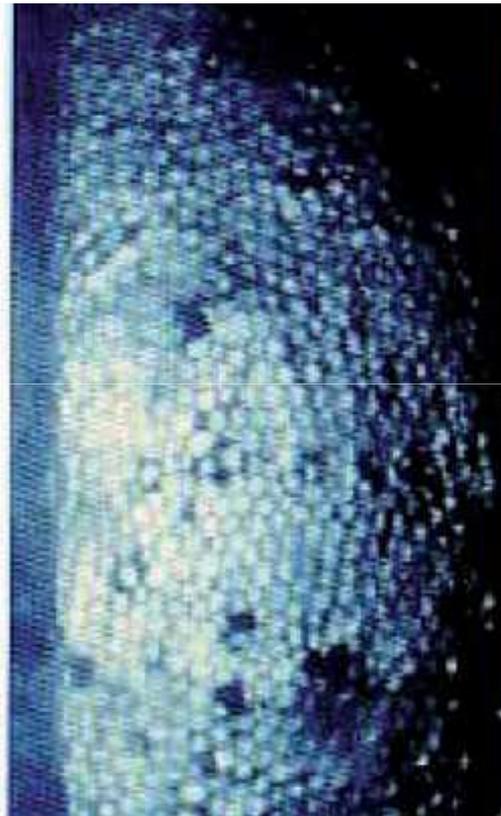
Scala di Nathan Efron per Blebs



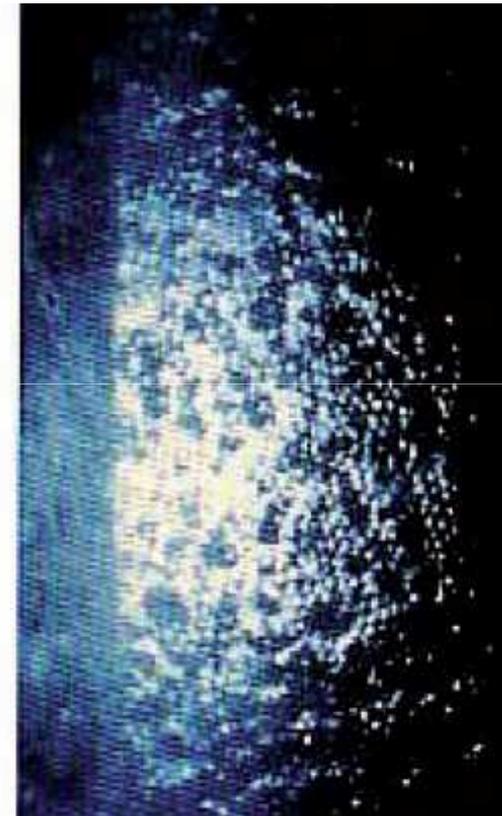
Ed. 2012



no blebs grado 0°



blebs al II° grado



blebs al IV° grado

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) 13. Hamano H., Jacob JT,

“Ridistribuzione delle cellule endoteliali”

Area media delle cellule 200/400 μm^2



Nei portatori di Lac si può avere

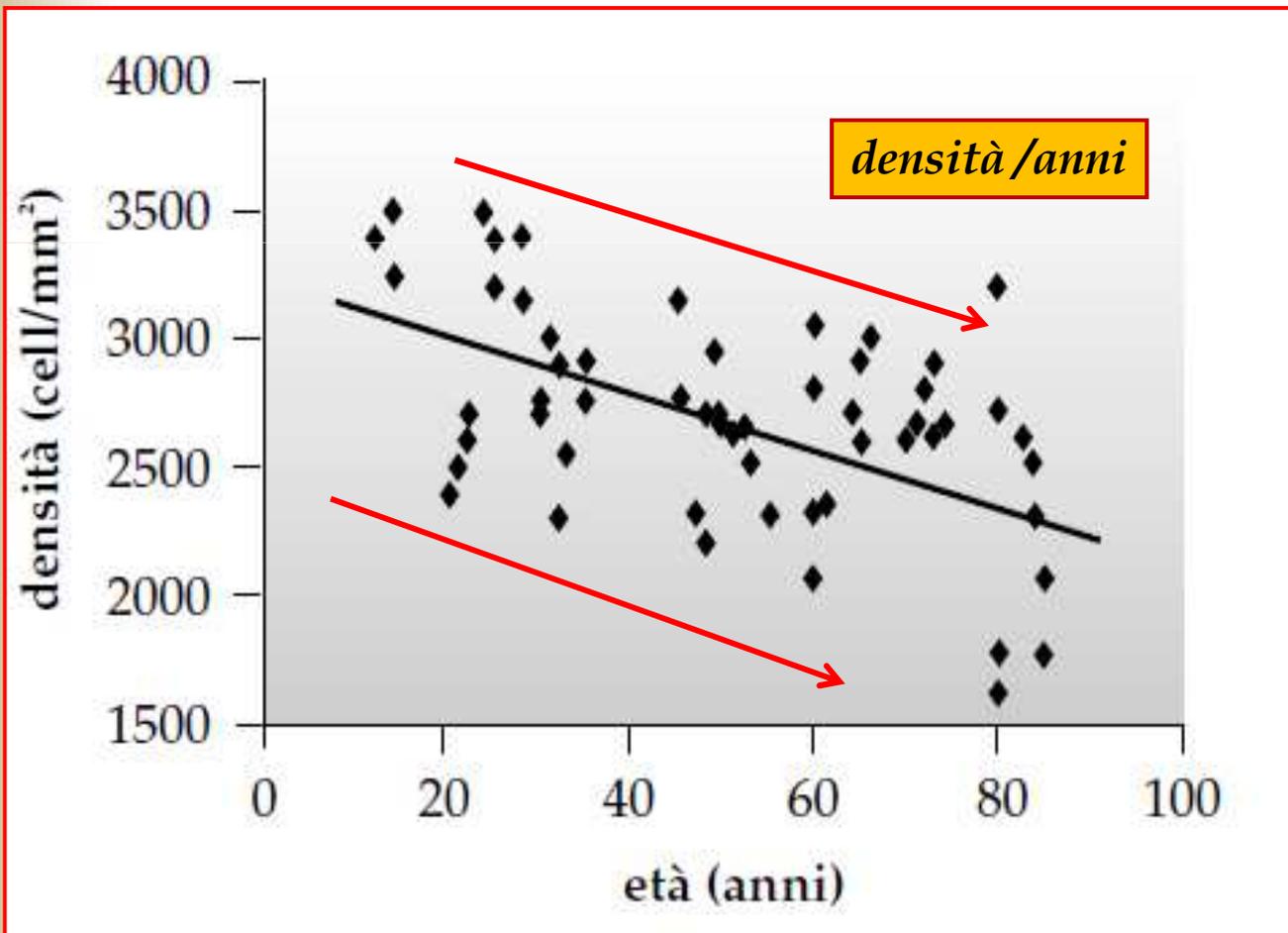
- a) aumento delle dimensioni di ogni singola cellula;
- b) assottigliamento della superficie corneale centrale;
- c) maggiore addensamento di cellule nella zona periferica della cornea.

Teoria della “**ridistribuzione delle cellule endoteliali**” per discriminare il polimegatismo dovuto all’età e quello indotto dalle lac.

Diminuzione della densità delle cellule endoteliali (cell/mm²) con l'età

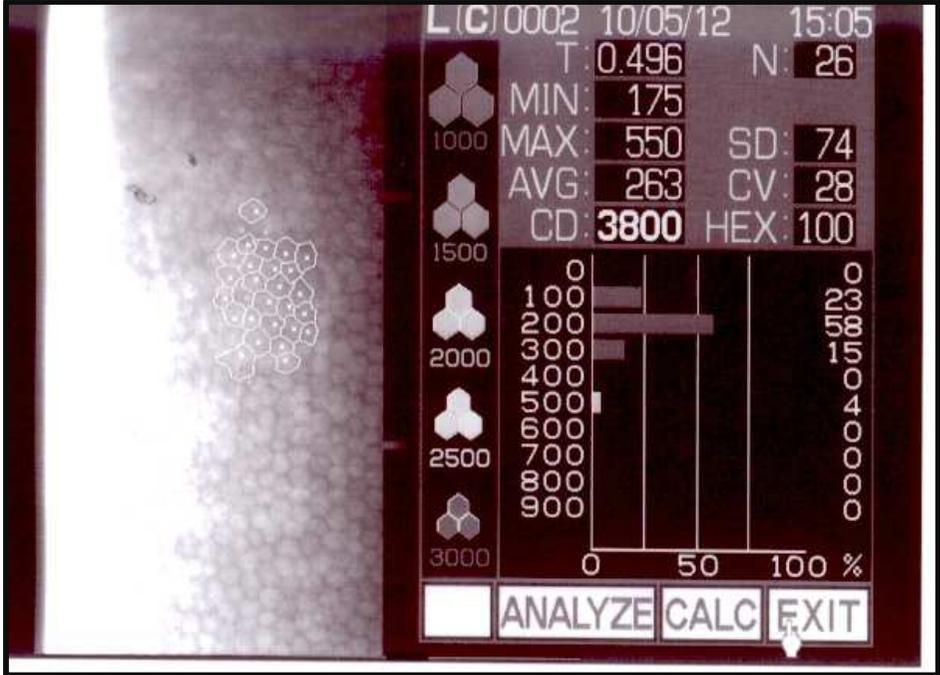
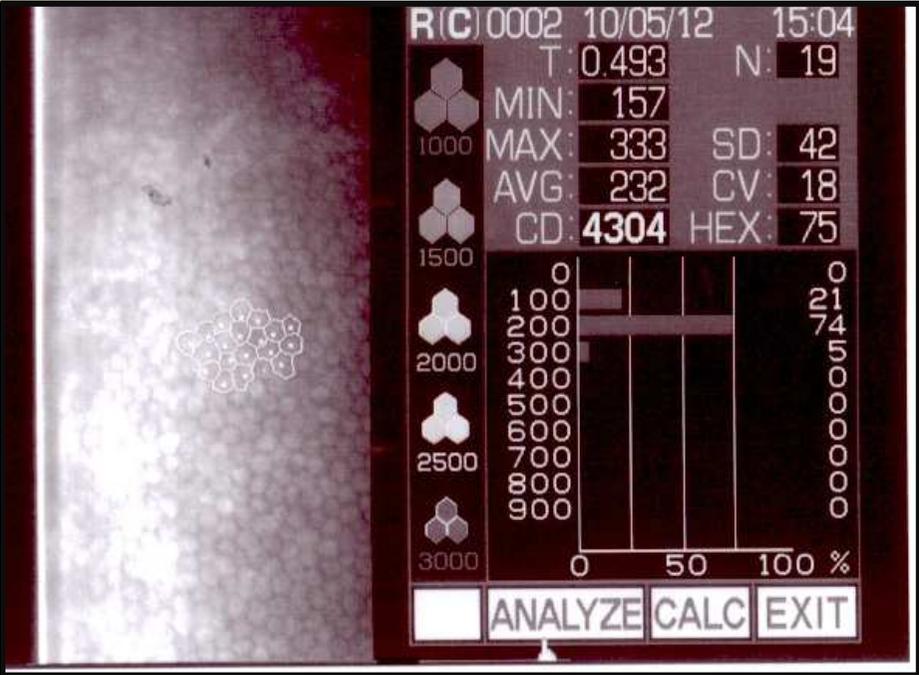


Il giapponese **Jiroemon Kimura** oggi 19 Aprile 2012 ha compiuto la bellezza di **115 anni!!**.



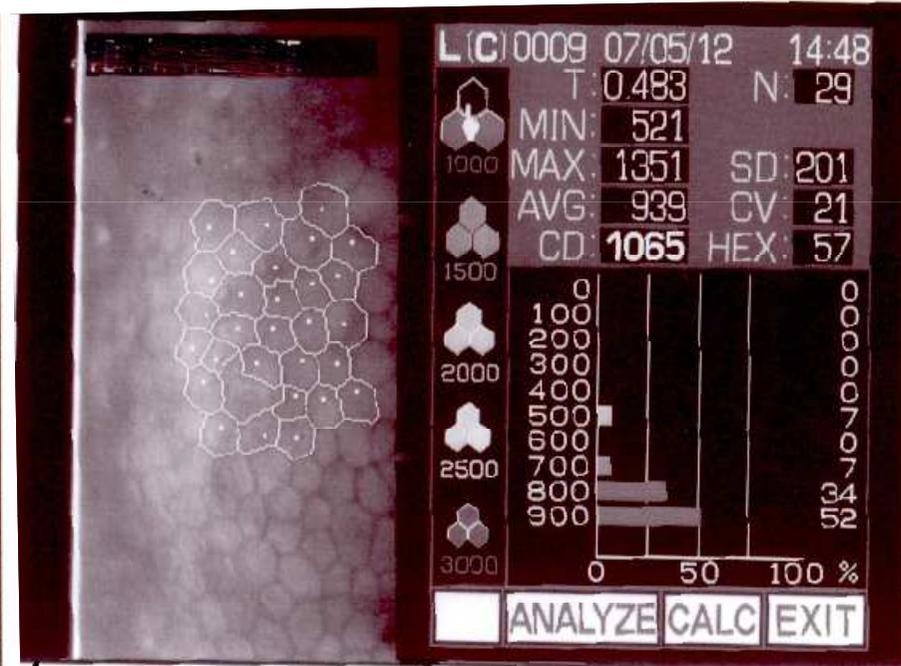
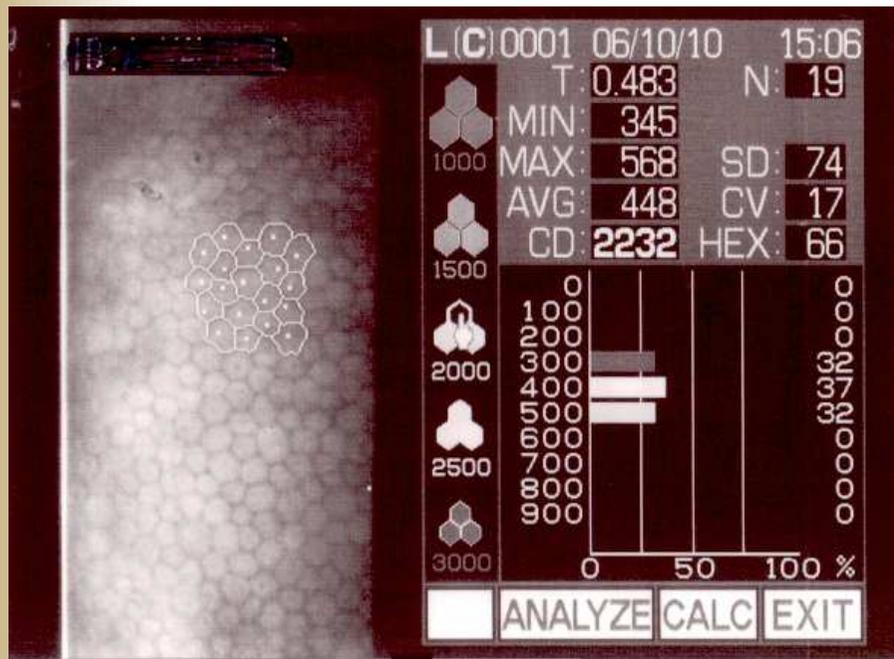
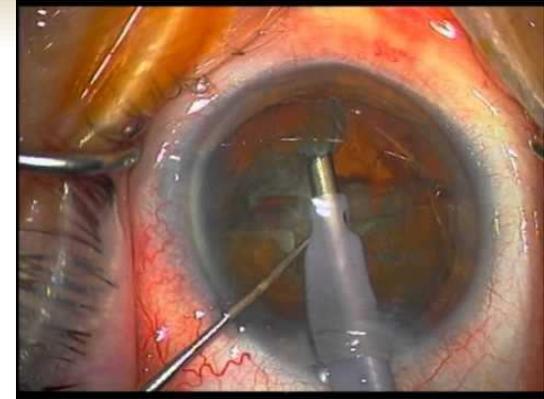
Endothelial Cell Density by Age	
Age	Average Endothelial Cell Density cells/mm ²
10 - 19	2,900 - 3,500
20 - 29	2,600 - 3,400
30 - 39	2,400 - 3,200
40 - 49	2,300 - 3,100
50 - 59	2,100 - 2,900
60 - 69	2,000 - 2,800
70 - 79	1,800 - 2,600
80 - 89	1,500 - 2,300

Cellule endoteliali in infanzia (5 aa)

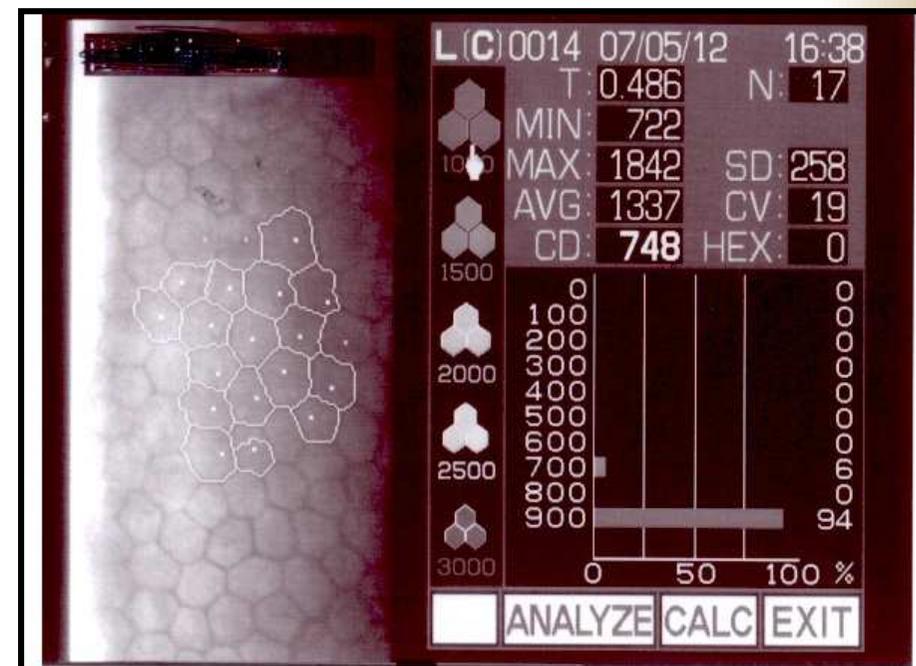
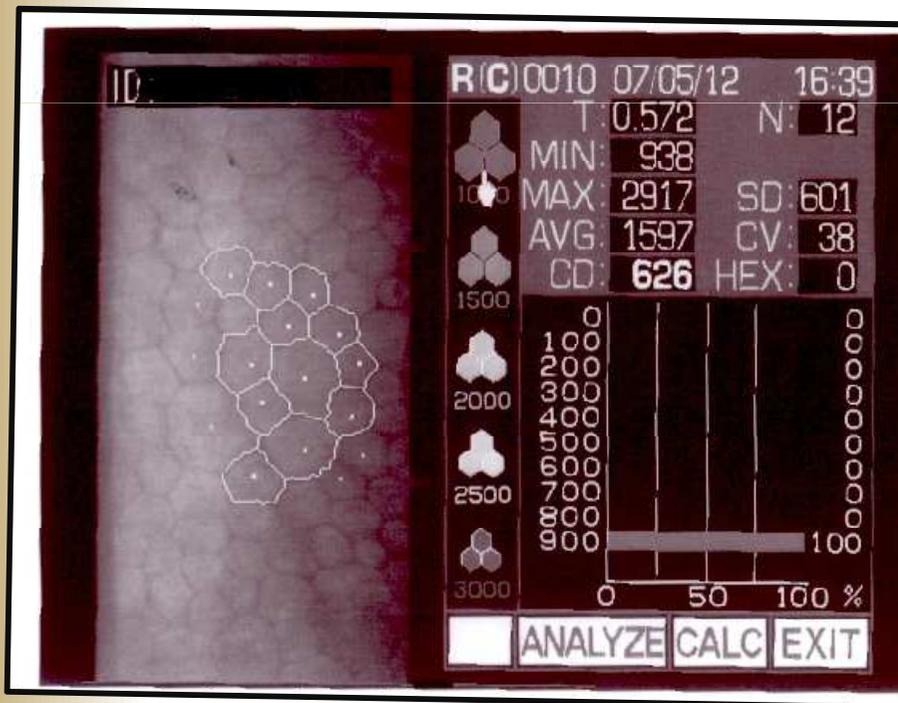


Endotelio pre e post intervento di cataratta

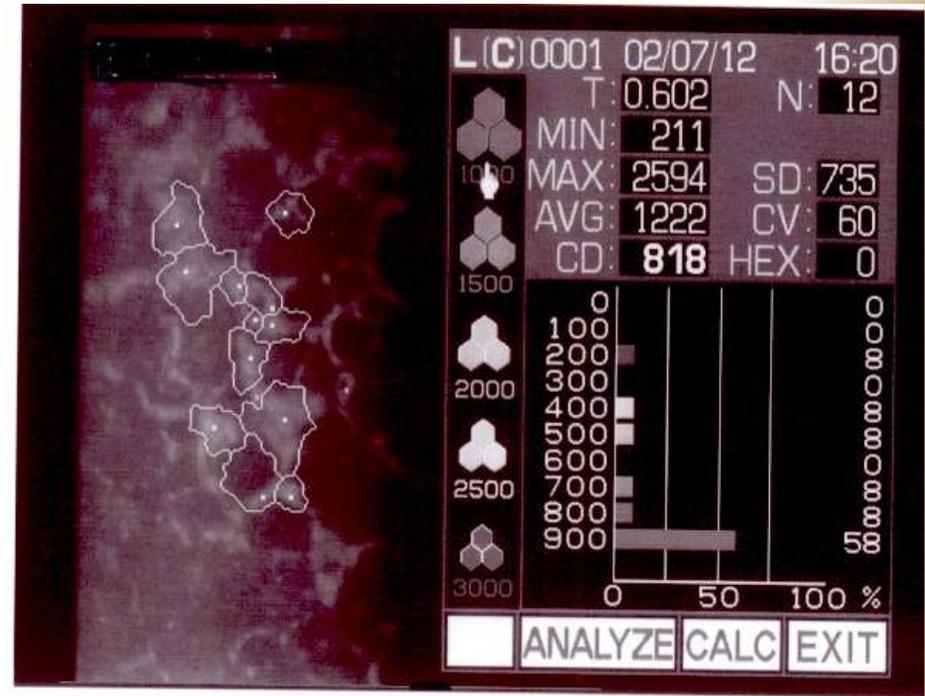
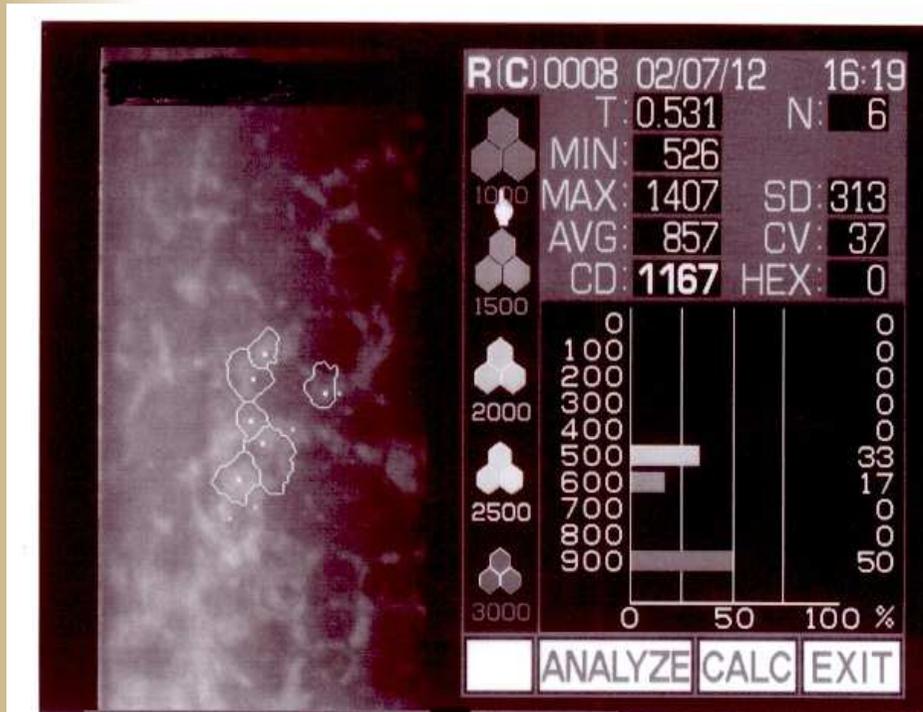
Una diminuzione di 200-400 cellule per mm^2 circa del **10%** è compatibile con un atto chirurgico ben condotto.



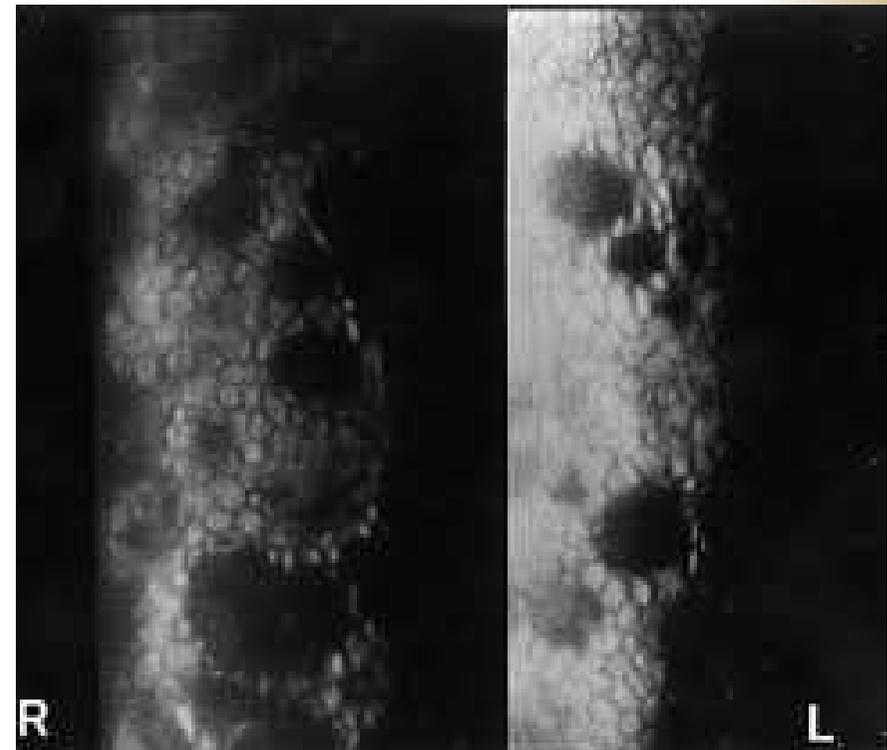
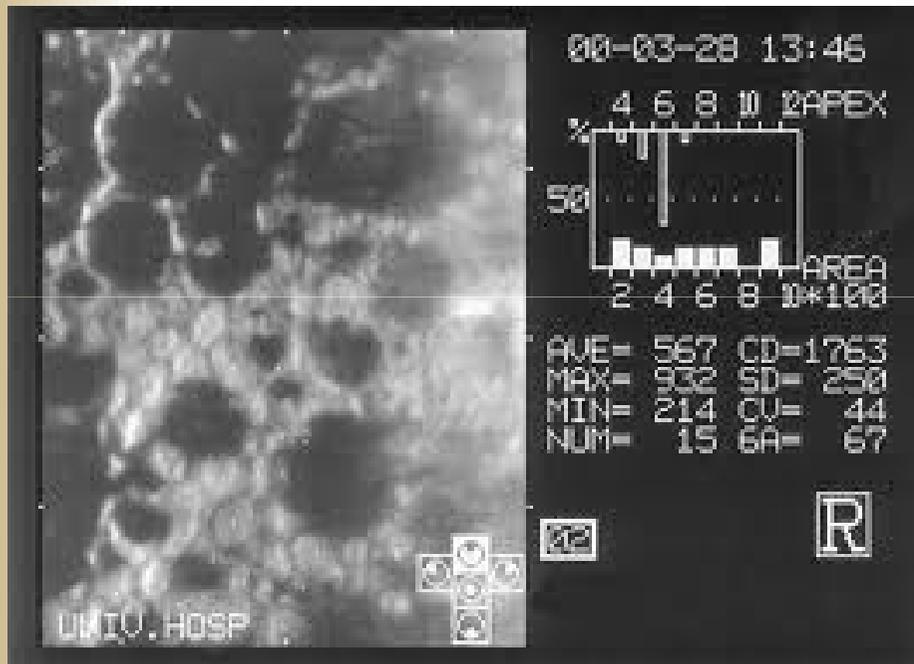
Endotelio in trapianto corneale dopo 35 anni



Distrofia endoteliale di Fuchs



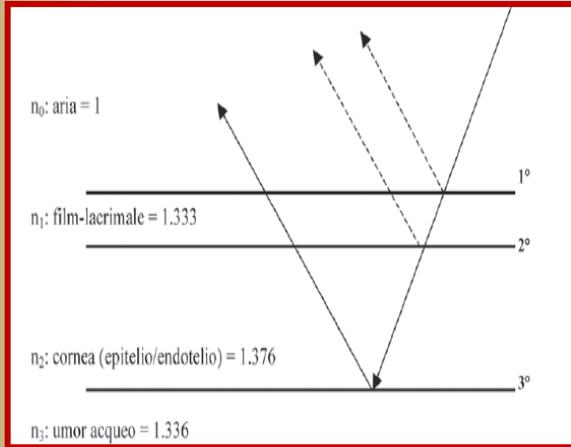
Cornea Guttata



Parametri al microscopio endoteliale speculare

- ∞ a) **CD** *Densità Cellulare per mm^2*
- ∞ b) **HEX** *Coefficiente di Esagonalità o **Polimorfismo** delle cellule (%)*
- ∞ c) **CV** *Coefficiente di Variabilità o **Polimegatismo** delle cellule (%)*
- ∞ d) **MAX** *Area della/e cellula/e più estesa/e in micron quadrati (μ^2)*
- ∞ e) **MIN** *Area della/e cellula/e meno estesa/e in micron quadrati (μ^2)*
- ∞ f) **SD** *Deviazione Standard delle dimensioni cellulari (μ^2)*
- ∞ g) **AGV** *Average (media) delle aree delle cellule in micron quadrati (μ^2)*
- ∞ h) **T** *Spessore Corneale in micron (μ)*
- ∞ i) **N** *Numero di Cellule selezionate per la conta (**valore numerico**)*

Principi fisici della microscopia speculare



- 1° interfaccia aria-lacrime ($n_0 - n_1$)
- 2° interfaccia lacrime-epitelio corneale ($n_1 - n_2$)
- 3° interfaccia endotelio-umor acqueo ($n_2 - n_3$)

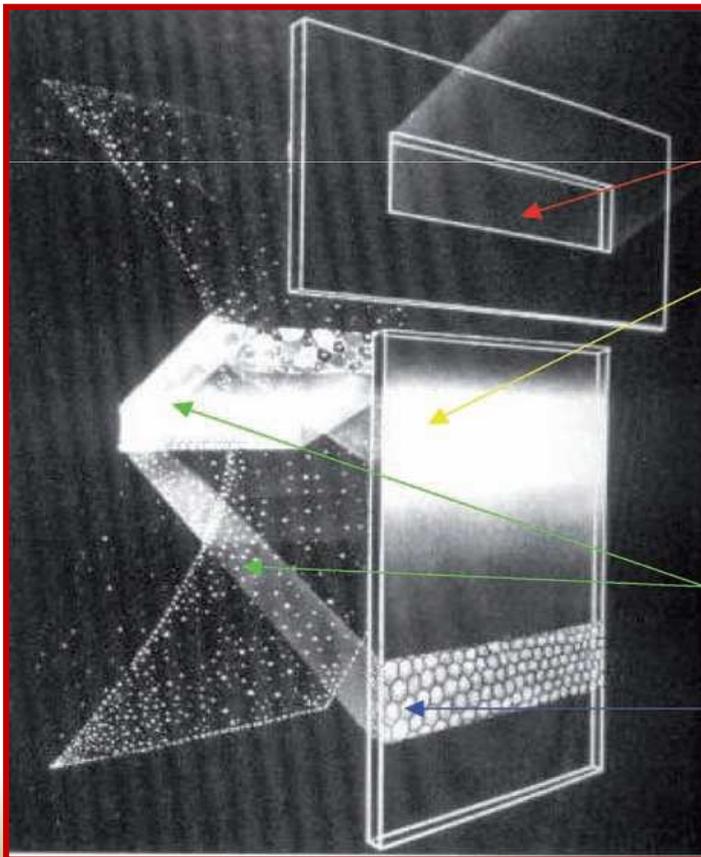
Nell'immagine si vede il fascio di luce incidente sulla cornea, selezionato da una fessura di **200 μm x 500 μm** (freccia rossa)

Il fascio di luce incidente subisce una grande riflessione dalle prime due interfacce.

Una quantità di luce viene riflessa, circa il **2%** rispetto alla incidente (freccia gialla)

La quantità di luce trasmessa è circa il **98%**. Questa viene riflessa per **0.02%** dalla terza interfaccia, attraversa in senso opposto tutto lo spessore corneale e, per un sistema di lenti condensatrici, si forma l'immagine dell'endotelio sullo schermo di osservazione (freccia verde)

L'immagine del mosaico endoteliale è quella focalizzata dal sistema di osservazione (freccia blu)



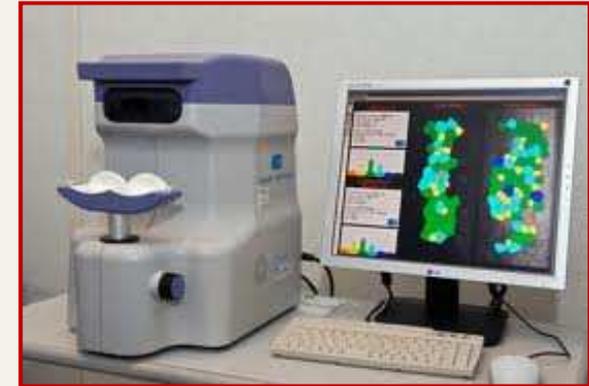
Microscopi Speculari



Topcon 3000 SP



Tomey EM-3000



CSO



SLD RH-100 Rhine-Tec

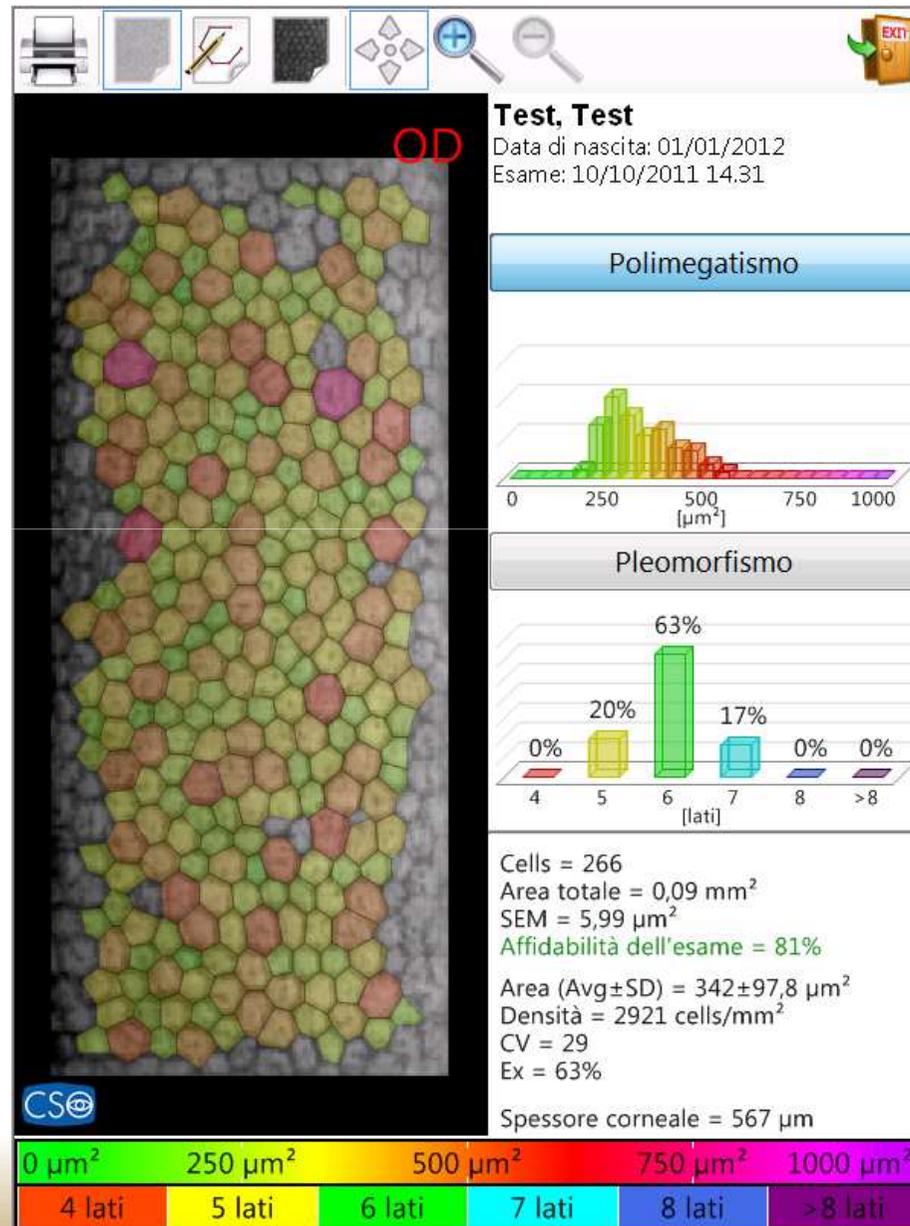


RH-001 Rhine-Tec



SW-7000 Oamin CINA

Printout di Stampa Perseus CSO



Microscopia Confocale

- ❧ Il microscopio confocale nasce negli anni **Cinquanta**.
- ❧ Le basi teoriche della strumentazione sono state attuate da **Marvin Lee Minsky** n. a New York 1927
- ❧ I primi microscopi progettati con tecnologia **CLSM** (*Confocal Laser Scanning Microscope*), costruiti in Inghilterra all'inizio degli anni **Novanta**.
- ❧ Lo strumento opera come un normale microscopio ottico, ma la risoluzione finale è molto aumentata.
- ❧ Attraverso due diaframmi (*pinholes*) s'impediscono le dispersioni e le interferenze della luce di eccitamento concentrata sull'area campione e della luce riflessa dagli altri piani, con l'eliminazione di perdite di nitidezza.
- ❧ Il termine confocale descrive la caratteristica di questo microscopio: il punto d'osservazione e la fonte d'illuminazione convergono su un unico punto "**common focal point**".
- ❧ Le riflessioni di luce dalle zone vicine al punto d'osservazione, "**chiacchierio**" in microscopia, vengono bloccate con aumento della risoluzione e dell'ingrandimento.

Microscopia Confocale

Due modalità di microscopia confocale in oftalmologia:

∞ *luce bianca* White Light Source

ConfoScan 4.0

(Nidek Technologies, Italy)

∞ *luce laser* Laser Source

HRT3-Rostock con Cornea Module
(Heidelberg Eng., Germany)

Microscopi Confocali

Laser Source



HTR III Heidelberg

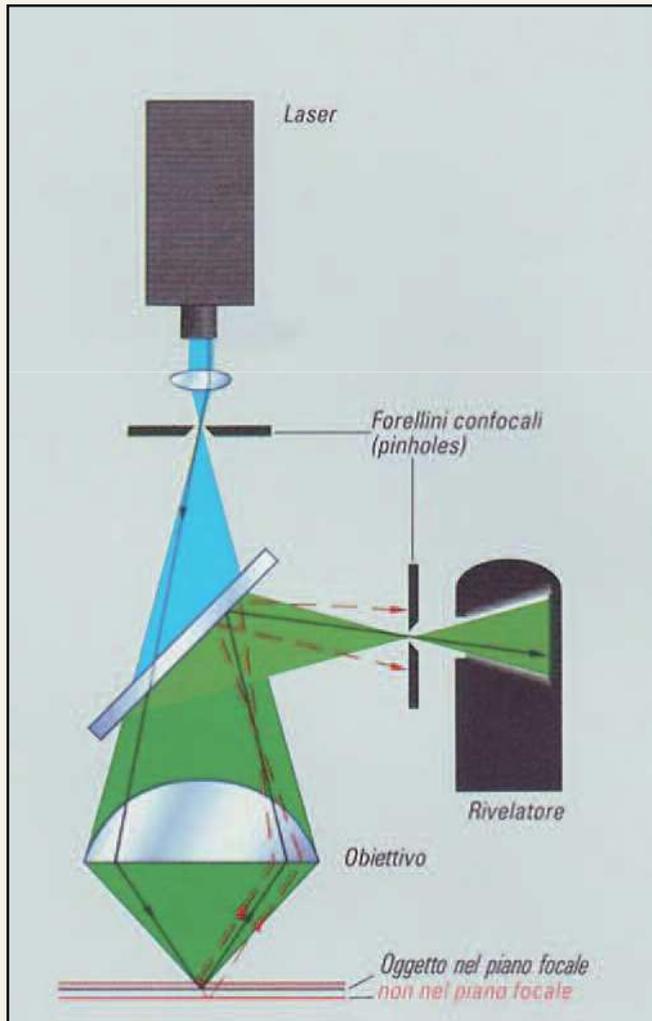
White Light Source



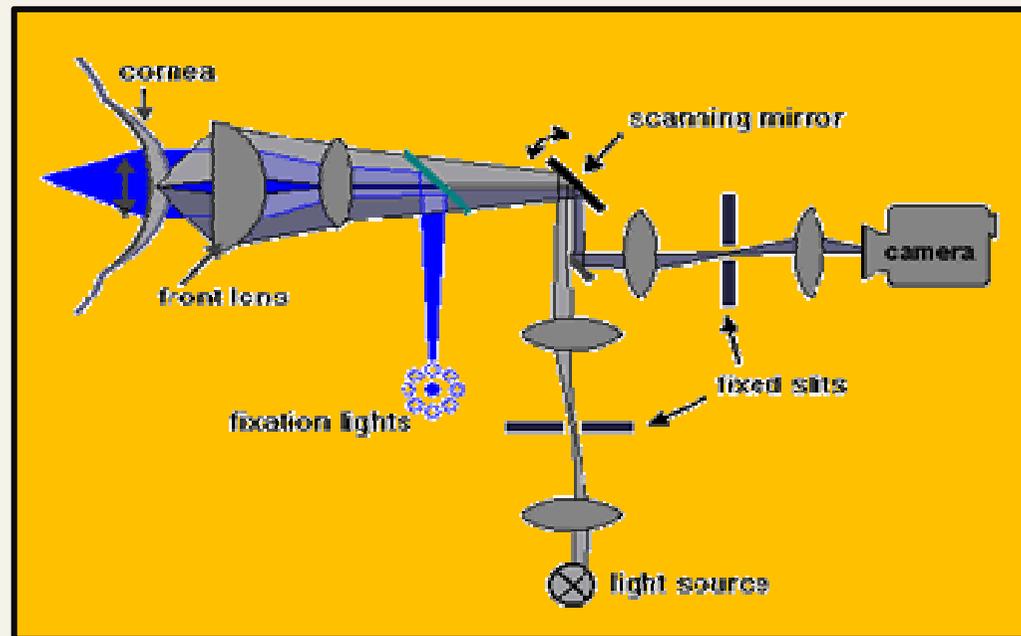
Confoscan 4 Nidek

Principi fisici dei microscopi confocali

Microscopia Confocale a luce laser (Laser Source)



Microscopia Confocale a luce bianca (White Light Source)



Confocal microscope with **40 x probe**

- Gel immersion exam
- Fully Automated Alignment
- Imaging through corneal haze and opacities
- Examination time below 15 sec
- Full cornea, Endothelium or Epithelium scan
- Real-Time in-vivo histology
- Multiple Internal fixation mires



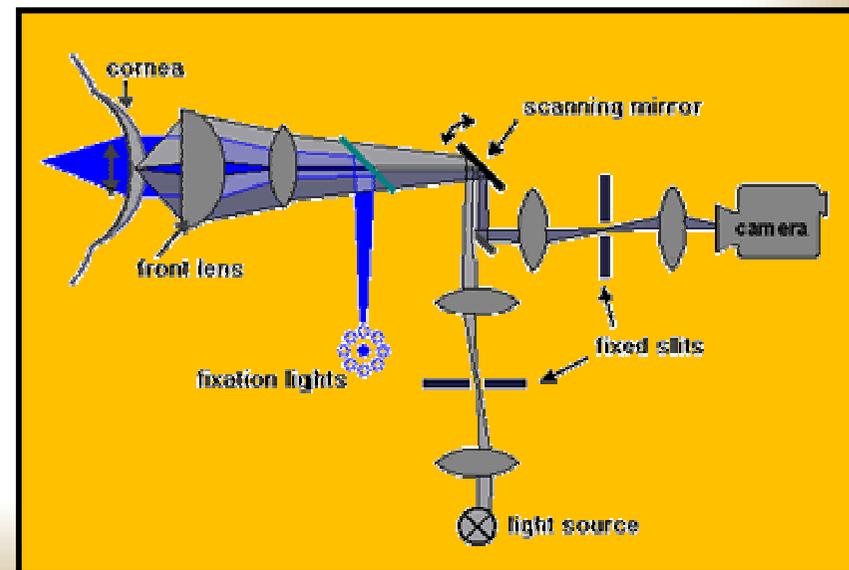
Non-Contact Endothelial Microscope with **20 x probe**

- Fully non-contact (12 mm working distance in air)
- High quality imaging through corneal haze and opacities
- Wider measurement area (up to 1000 cells/exam)
- Fully automatic cell count and endothelial density measurement
- Increases reimbursable exams

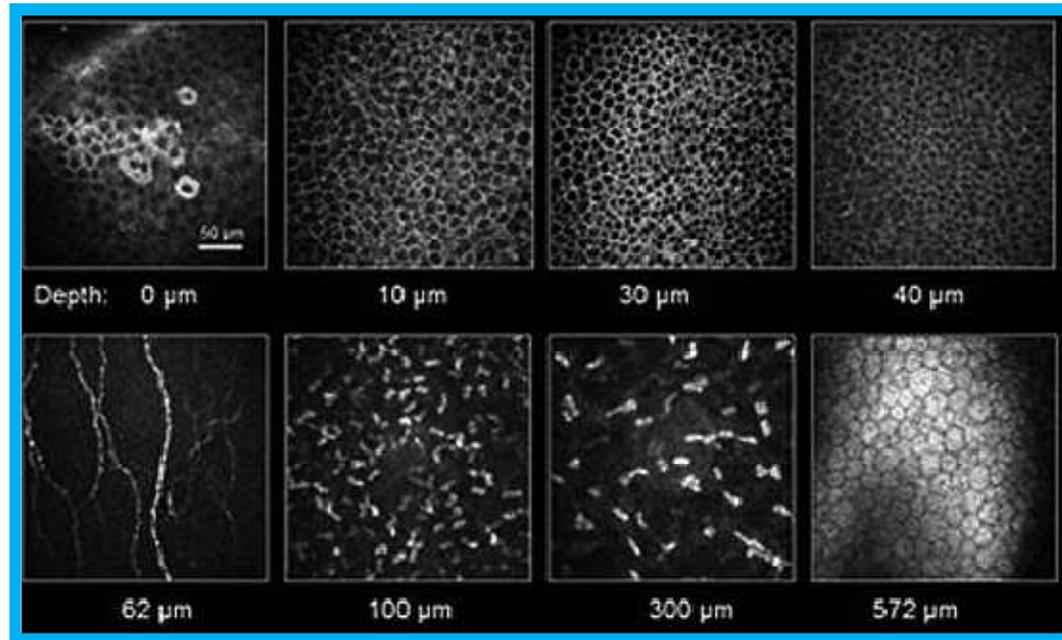
Permette un ingrandimento di 800- 1000X, su un'area d'immagine di 300-400 micron di lato con lenti 40X

Confocal Pachymeter with Z-Ring with **40 x probe**

- Innovative pachymetry technique
- Pachymetry through corneal haze and opacities
- ± 5 microns instrumental accuracy
- Z-Ring increases image stability
- Precise location of corneal layers and structures



HRT III con Modulo Cornea Rostock

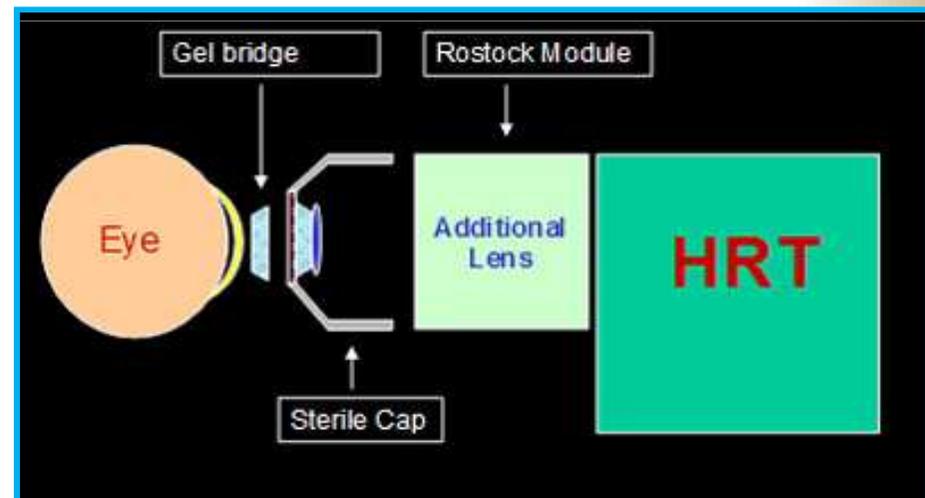
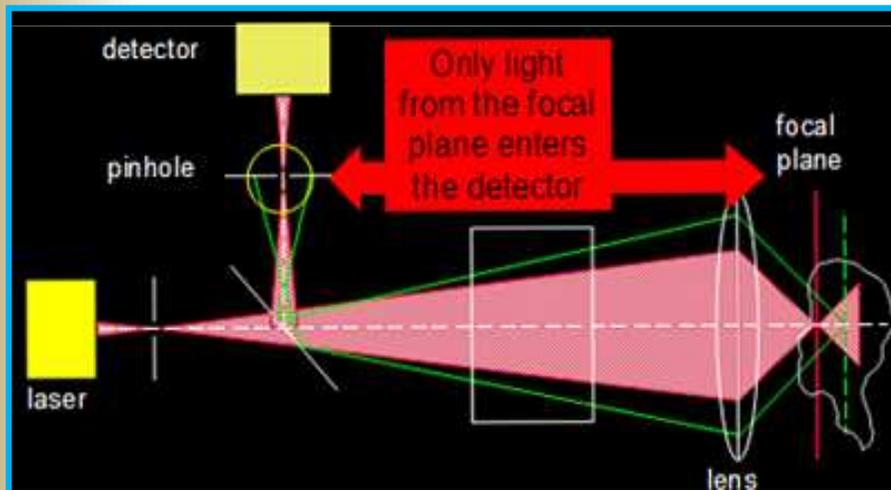


L'HRT utilizza una sorgente laser a diodo **Elio-Neon** a **670 nm**, fornendo sezioni di cornea di 10 micron di spessore.

Heidelberg Retina Tomograph HRT III è un confocal scanning laser ophthalmoscope, convertibile in un microscopio confocale usando il **Kit addizionale** composto da una lente che si adatta allo strumento base, il **modulo Rostok**. Un software di analisi corneale permette di indagare gli strati della cornea dall'epitelio all'endotelio.

Un raggio di luce analizza la cornea, creando 384 384 punti immagine in un'area di 400 micron ad un ingrandimento di 63X. Il sistema Confocale Laser ha due proprietà uniche:

- a) *lo strumento può essere meglio focalizzato a profondità diverse della cornea;*
- b) *la luce dispersa è bloccata, «blocked stray light», non abilitando immagini poco nitide, scegliendo solo quelle chiare disponibili, al contrario dei microscopi speculari che usano fonti di luce bianca.*



LA Scansione Laser Confocale rappresenta uno delle scoperte più significative per lo studio delle immagini in oftalmologia .



ConfoScan CS4

- Contact and no-contact
- Solo Confocale (Cornea)
- Probe 20X e 40 X
- Area 300/400 micron
- 768/384 x 576 pixel
(40 x mode/20 x mode)
- White Light Source

HRT 3



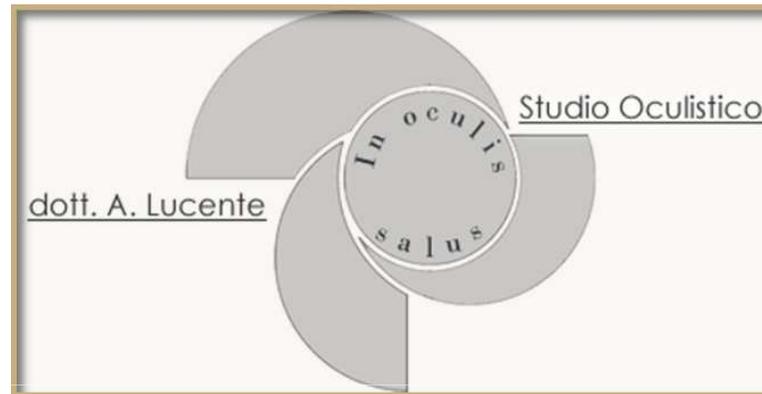
- Only Contact
- Modulare (Cornea, Retina, Glaucoma)
- Probe 63X
- Area 400 micron
- 384 x 384 point image
- Laser Source

E senza microscopia?



Non solo Haag Streit BX 900





Grazie per l'attenzione

www.amedeolucente.it