

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE



XXXII CICLO DI DOTTORATO DI RICERCA

CURRICULUM MEDICINA TRASLAZIONALE

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

TESI DI DOTTORATO

Cambiamenti morfostrutturali coroideali in pazienti affetti da
Degenerazione Maculare Senile intermedia valutati tramite
Swept-Source OCT e Swept Source OCT Angiografia

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Rodolfo Quarto

Relatore:

Chiar.mo Prof. Massimo Nicolò

Candidato:

dott.ssa Raffaella Rosa

INDICE

1. Anatomia

1.1 Retina

1.2 Macula

1.3 Coroide

2. Fisiopatologia dell'invecchiamento maculare

2.1 Invecchiamento fisiologico

2.2 Invecchiamento patologico: la Degenerazione Maculare Senile (AMD)

2.2.1 Drusen

2.2.2 Soft drusen e pseudodrusen reticolari: diagnosi differenziale

3. Nuove tecniche di imaging applicate allo studio della coroide: Spectral

Domain e Swept Source OCT, Angiografia OCT

3.1 Misurazione dello spessore coroidale con OCT

3.2 Visualizzazione della coriocapillare con Angiografia OCT

4. Alterazioni coroidali nell'AMD intermedia e correlazioni col fenotipo

5. Nostra esperienza

5.1 Metodo

5.1.1 Selezione dei pazienti

5.1.2 Rilevamento dello spessore coroidale centrale (CCT)

5.1.3 Rilevamento dell'area di flusso vascolare coriocapillare (CCVFA)

5.2 Analisi statistica

5.3 Risultati

5.3.1 Spessore coroidale centrale (CCT)

5.3.2 Area di flusso vascolare coriocapillare (CCVFA)

5.3.3 Relazione tra CCT e CCVFA

6. Discussione

7. Bibliografia

1. Anatomia

1.1. Retina

La retina è il sottile strato che riveste la faccia interna del bulbo oculare ed è responsabile della traduzione delle informazioni luminose in immagini.

E' costituita da differenti strati in cui sono contenuti i corpi cellulari delle cellule nervose e le loro sinapsi; questi sono, dall'interno all'esterno:

- membrana limitante interna, costituita dalle estremità terminali delle cellule di Muller
- strato delle fibre nervose
- strato delle cellule ganglionari
- strato plessiforme interno, che contiene le sinapsi tra le cellule bipolari e le cellule ganglionari
- strato nucleare interno, che contiene i corpi cellulari delle cellule bipolari, orizzontali ed amacrine
- strato plessiforme esterno, che contiene le sinapsi tra i fotorecettori e le cellule bipolari e orizzontali
- strato nucleare esterno, che contiene i corpi cellulari dei fotorecettori
- membrana limitante esterna, formata da giunzioni aderenti tra le cellule di Muller e i segmenti interni dei fotorecettori
- epitelio pigmentato retinico

- membrana di Bruch

Al di sotto della membrana di Bruch si trovano la coriocalpillare e la coroide.

L'apporto di sangue alla metà interna della retina è assicurato dall'arteria centrale della retina, che normalmente si divide in due rami, superiore e inferiore, a livello del disco ottico. Questi due rami si suddividono ulteriormente in un ramo nasale e uno temporale che vanno ad irrorare i corrispondenti quadranti di retina. La vascolarizzazione venosa retinica ricalca per lo più la distribuzione arteriosa. I vasi retinici sono situati all'interno dello strato delle fibre nervose, in vicinanza della membrana limitante interna della retina. Si ramificano nelle arteriole e venule di primo ordine dividendosi ad angolo retto. Nel 20% circa della popolazione, una porzione variabile dell'area papillomaculare è irrorata da uno o più arterie cilioretiniche, derivanti dalla circolazione ciliare; occasionalmente una grossa arteria cilioretinica può irrorare l'intera area maculare. I vasi retinici sono normalmente trasparenti e le arterie e le vene sono interconnesse tra di loro attraverso una fitta rete di capillari che si sfoccano all'esterno dello strato nucleare interno. Le venule drenano infine nella vena centrale retinica, che entra nella lamina cribrosa e porta in sangue refluo alla vena oftalmica superiore. La metà esterna della retina invece, costituita dall'epitelio pigmentato retinico e dai fotorecettori, è nutrita per diffusione dalla coriocalpillare¹.

1.2. Macula

La macula lutea è così chiamata perché è la porzione di retina che contiene la xantofilla, pigmento che le conferisce una colorazione giallastra. Anatomicamente corrisponde a una porzione di retina del diametro di circa 5.5 mm centrato approssimativamente 4 mm temporalmente e 0.8 mm inferiormente al centro del disco ottico. Sulla base dell'anatomia microscopica, l'area maculare può essere ulteriormente suddivisa in diverse zone, dal centro verso l'esterno:

- la foveola, che costituisce la porzione centrale della fovea e misura circa 350 μm di diametro; è situata all'interno della zona avascolare centrale (area maculare libera dai capillari retinici) che misura a sua volta circa 500 μm di diametro; la foveola presenta una piccola depressione centrale chiamata umbo;
- fovea centralis o fovea, una depressione della superficie retinica interna localizzata al centro della macula e che misura circa 1,5 mm (1500 μm);
- l'area parafoveale, un'area ad anello concentrico esterno ai precedenti della dimensione di circa 0,5 mm in cui gli strati delle cellule ganglionari, il nucleare interno e il plessiforme esterno presentano il maggior spessore;

- area perifoveale, area ad anello che circonda l'area parafoveale, dello spessore di circa 1,5 mm.

Oftalmoscopicamente non vi sono margini ben definiti tra le differenti zone che compongono la macula; nei soggetti sani è possibile apprezzare il riflesso foveale, che si forma proprio al centro della fovea, sovrastando l'umbo¹.

1.3. Coroide

L'arteria oftalmica, prima branca della carotide interna, dà origine alle arterie ciliari posteriori mediale e laterale; queste a loro volta si dividono, prima di entrare nella sclera, in una arteria ciliare posteriore lunga e 5-10 arterie ciliari posteriori brevi. Le due arterie ciliari posteriori lunghe entrano nella sclera a 3-4 mm dal nervo ottico e decorrono tra sclera e coroide lungo i meridiani di ore 3 e 9 fino ad arrivare all'ora serrata. Da lì, 3-5 rami piegano posteriormente e forniscono sangue alla coroide fino all'ora serrata. Le arterie ciliari posteriori brevi entrano nella sclera intorno al nervo ottico e si sfoccano anteriormente e posteriormente a fornire il sangue alla coroide posteriore fino all'equatore. Le arteriole pre-capillari sono brevi e sfoccano nei lobuli della coriocapillare. Questa è una porzione vascolare ad alto flusso composta da un singolo strato di capillari organizzati in un piano sottile fittamente anastomizzati tra loro e con caratteristiche peculiari rispetto a quelli del resto dell'organismo: hanno

dimensioni maggiori (40-50 μm rispetto ai 5-10 μm del resto dell'organismo), presentano pareti sottili che contengono fenestrazioni di ampie dimensioni (600-800 \AA) coperte da sottili diaframmi². La membrana basale delle cellule endoteliali della coriocapillare forma lo strato più esterno della membrana di Bruch. Dai lobuli della coriocapillare fuoriescono venule post-capillari, che si anastomizzano tra loro formando i vasi di medio calibro nello strato di Sattler e poi quelli di grosso calibro nello strato di Haller, senza confini anatomici precisi tra i due strati³. Il drenaggio venoso della coroide è per la maggior parte a carico delle vene vorticosi, situate una per quadrante 3-5 mm posteriormente all'equatore. Le vene vorticosi drenano nelle vene oftalmiche superiore e inferiore, che a loro volta aggettano rispettivamente nel seno cavernoso e nel plesso pterigoideo. La coriocapillare ha caratteristiche uniche: la sua membrana basale ne avvolge internamente l'intero network impedendo la migrazione di cellule endoteliali all'interno della membrana di Bruch, mentre le fenestrazioni "a ruota di bicicletta" del suo endotelio sono permeabili al passaggio di macromolecole. La coroide, grazie alle sue fenestrazioni, supporta i bisogni metabolici della retina esterna: l'ossigeno, gli elettroliti, i nutrienti e le citochine destinati al passaggio dalla coriocapillare all'epitelio pigmentato retinico e ai fotorecettori passano attraverso la membrana di Bruch, mentre i prodotti di degradazione del loro metabolismo percorrono il tragitto opposto per essere eliminati. Le vitamine, i segnali molecolari e altri fattori necessari

alla funzionalità dei fotorecettori sono veicolati da molecole lipoproteiche durante il loro passaggio attraverso la membrana di Bruch, come accade in senso inverso per le lipoproteine prodotte dall'EPR ed eliminate dalla coriocapillare. L'EPR inoltre pompa attivamente fluido dallo spazio sottoretinico per controbilanciare il rigonfiamento dei glucosamminoglicani presenti nella matrice extracellulare a livello dei fotorecettori; questo fluido viene eliminato dalla coriocapillare attraverso la membrana di Bruch. Tutti questi scambi metabolici essenziali per il corretto funzionamento della retina esterna vengono ostacolati dalle modificazioni morfologiche di questi strati legate all'invecchiamento^{2,3}.

Fisiopatologia dell'invecchiamento maculare

1.4. Invecchiamento fisiologico

Numerosi studi hanno dimostrato la comparsa di modificazioni strutturali a carico del complesso EPR - membrana di Bruch - coriocapillare correlate all'invecchiamento.

Le alterazioni nella regolazione molecolare della matrice extracellulare (aumento delle metalloproteasi, riduzione dell'elastina, deposizione di particelle di calcio fosfato nelle fibrille elastiniche, modificazione delle fibrille

di collagene da parte dei radicali liberi, accumulo di fattori del complemento) determinano un ispessimento della membrana di Bruch, che può arrivare fino a triplicare i valori di spessore originari nell'arco della vita.

Ma l'alterazione più significativa in termini di ricaduta clinica consiste nell'accumulo di materiale lipidico a livello della porzione profonda della membrana di Bruch, che si verificherebbe già precocemente durante la vita adulta: colesterolo esterificato, trigliceridi ed acidi grassi risultano virtualmente assenti in questa sede in persone al di sotto dei 30 anni di età, mentre sono presenti in misura variabile tra i 31 e i 60 anni e sono abbondanti in tutti i soggetti al di sopra di 61 anni.

Il colesterolo esterificato che si accumula a livello del complesso epitelio pigmentato retinico - membrana di Bruch - coriocapillare contiene apolipoproteina B proveniente dall'epitelio pigmentato retinico, quindi la deposizione di colesterolo a questo livello non è di origine ematogena (come dimostrano indirettamente anche studi epidemiologici), ma bensì di origine intraoculare. L'accumulo di uno strato lipidico in questa sede delicata rende difficoltoso il trasporto di sostanze attraverso gli strati retinici esterni, con ripercussioni sul funzionamento dell'EPR, sul nutrimento della retina esterna e sul mantenimento del benessere dei fotorecettori; questo strato lipidico infatti forma una barriera al passaggio delle molecole determinando una importante riduzione della conduttività idraulica della membrana di Bruch, che decresce in

maniera inversamente proporzionale alla presenza di contenuto lipidico della Bruch. Queste modificazioni degenerative a carico della retina esterna hanno importanti implicazioni nella formazione delle lesioni fondamentali della Degenerazione Maculare Senile, le drusen².

1.5. Invecchiamento patologico: la Degenerazione Maculare Senile (AMD)

La Degenerazione Maculare Senile è la causa principale di perdita visiva centrale irreversibile in pazienti di età maggiore di 50 anni nei paesi sviluppati⁴.

Viene classificata sulla base dello stadio in:

- Early AMD: definita dalla presenza di alcune drusen di piccole (minori di 63 microns, “hard” drusen) o medie dimensioni (maggiori di 63 ma minori di 125 microns);
- Intermediate AMD: definita dalla presenza di numerose piccole e medie drusen oppure di almeno una drusen di grandi dimensioni (maggiore di 125 microns, “soft drusen”);
- Advanced AMD: definita dalla presenza di atrofia geografica o di membrane neovascolari coroideali, insieme alle loro sequele (emorragie sottoretiniche o sub-EPR, fluido o fibrosi).

L'AMD è una patologia multifattoriale, in cui diversi fattori in ultimo

determinano una disfunzione del complesso epitelio pigmentato retinico – membrana di Bruch – coriocapillare, che porta alla formazione di drusen e alla perdita progressiva di cellule a livello dell'EPR e della coriocapillare con conseguente atrofia dei fotorecettori. Fattori di rischio riconosciuti per lo sviluppo di Degenerazione Maculare Senile sono:

- età;
- suscettibilità genetica;
- infiammazione;
- stress ossidativo;
- fattori ambientali (esposizione alla luce solare, fumo di sigaretta)⁵.

L'aspetto morfologico più precoce nell'AMD è lo sviluppo di depositi lipidici esternamente rispetto all'EPR, che possono essere distinti in "basal laminar deposits" (BLamD) e "basal linear deposits" (BLinD). I primi sono localizzati tra membrana plasmatica e membrana basale dell'EPR e sono costituiti da materiale granulare, mentre i secondi sono localizzati nello strato collagene interno della membrana di Bruch e sono costituiti da vescicole. Questo stadio precoce di AMD non è visibile oftalmoscopicamente direttamente, ma può essere percepito a seguito dei cambiamenti secondari a carico dell'EPR⁶⁻⁹.

2.2.1 Drusen

Successivamente rispetto allo sviluppo dei depositi lineari possono formarsi le drusen, che sono depositi focali di detriti extracellulari localizzati tra la membrana basale dell'EPR e lo strato collagene interno della membrana di Bruch. Possono comparire anche normalmente in pazienti di età avanzata e sono considerate le lesioni fondamentali nell'AMD. Le drusen istopatologicamente contengono lipidi (colesterolo, fosfolipidi e ceramidi), carboidrati, zinco, amiloide, granuli di lipofusina o melanina, fattore H, C3 e C8 del complemento, proteine tra cui apolipoproteine. I componenti principali delle drusen sono i lipidi, principalmente il colesterolo esterificato e non e la fosfatidilcolina⁹⁻¹³.

Sulla base dell'oftalmoscopia, le drusen possono essere suddivise in due tipi: hard drusen e soft drusen. Le hard drusen sono lesioni puntiformi, rotondeggianti, di color bianco-giallastro con margini ben definiti e di piccole dimensioni (minori di 63 microns di diametro); rappresentano lo stadio più precoce di presentazione delle drusen stesse visibili al fundus. Le soft drusen sono sollevamenti dell'EPR di maggiori dimensioni (maggiori di 125 microns), di colore giallastro e a margini meno distinti, che si formano per confluenza di diverse hard drusen, rappresentando uno stadio tardivo dello sviluppo delle drusen stesse.¹⁴

Le pseudodrusen reticolari sono accumuli di materiale extracellulare localizzati più internamente rispetto all'EPR, al di sotto della neuroretina; per questo

motivo sono anche chiamati depositi drusenoidi sottoretinici (subretinal drusenoid deposits, SDD).¹⁵⁻¹⁹ Sono un network di chiazze rotondeggianti giallastre ben definite, interconnesse tra loro, localizzate preferenzialmente nella porzione superiore nella macula.

Le drusen cuticolari, descritte da Gass per la prima volta nel 1977, sono una entità clinica specifica caratterizzata dalla presenza di innumerevoli, piccoli noduli giallastri sottoretinici uniformi sparsi su tutto il fundus. Risultano meglio visibili in angiografia con fluoresceina, dove appaiono precocemente iperfluorescenti con un pattern definito “a cielo stellato”.

Le drusen cuticolari sono localizzate tra la lamina basale dell’EPR e lo strato collagene interno della membrana di Bruch, proprio come le drusen presenti nell’AMD. Il termine drusen cuticolari quindi si riferisce a un particolare fenotipo che è caratterizzato dalla presenza di un grande numero di drusen di piccole dimensioni (almeno 50 drusen tra i 25 e i 75 micron di diametro) sparse uniformemente su tutto il fundus di entrambi gli occhi, iperfluorescenti all’angiografia con fluoresceina e di cui almeno 20 localizzate al di fuori del Wisconsin age-related maculopathy grading template.¹⁹

Recentemente Spaide et al. ha riportato l’esistenza di una forma distinta di drusen che si possono ritrovare in occhi che presentano una coroide spessa, definita pachi-coroide. Per questo motivo gli Autori le hanno chiamate pachychoroid-associated drusen, o “pachydrusen”. Nonostante siano drusen di

dimensioni generalmente superiori ai 125 micron, il loro aspetto e il pattern di distribuzione è differente rispetto a quello delle soft drusen: i margini esterni risultano ben definiti e non si localizzano prevalentemente nella porzione centrale della macula, ma possono distribuirsi in tutto il polo posteriore.²⁰

2.2.2. Soft drusen e pseudodrusen reticolari: diagnosi differenziale

La prevalenza delle pseudodrusen reticolari è stata stimata tra il 13.4% e il 32% nella popolazione generale utilizzando l'imaging multimodale per la loro diagnosi; sono bilaterali nel 50-84% dei casi. La loro prevalenza è ovviamente maggiore in pazienti affetti da AMD, dove si aggira tra il 16.8% e il 79%, in base alla modalità di imaging utilizzata e allo stadio e tipo di AMD. La presenza di pseudodrusen reticolari è più frequentemente associata alle neovascolarizzazioni coroideali di tipo 3 (68.4-83%), mentre risulta raramente associata a quelle di tipo 1 e 2 ed alla vasculopatia polipoidale della coroide (9-13% e 2-3.4% rispettivamente). Negli occhi affetti da atrofia geografica, si riscontra la presenza di pseudodrusen reticolari nel 29-50% dei casi.²²

I depositi drusenoidi sottoretinici sono ultrastrutturalmente simili alle drusen ma biochimicamente differenti: alcuni componenti sono simili a quelli delle drusen (lipidi, colesterolo, amiloide, fattori del complemento e detriti cellulari), ma presentano una maggior concentrazione di colesterolo non esterificato, vitronectina e presentano al loro interno opsina e pigmenti dei fotorecettori. Inoltre, sono ricche di cellule immunitarie (microglia e macrofagi soprattutto), fattore che permette di ipotizzare una loro patogenesi infiammatoria.²³ L'accumulo di materiale si estende ai segmenti esterni dei fotorecettori e può arrivare fino allo strato nucleare esterno. Le strutture circostanti soffrono della presenza del pseudodrusen: ci sono infatti evidenze della comparsa di polimegetismo dell'epitelio pigmentato retinico, distruzione dei fotorecettori e gliosi reattiva.

L'imaging multimodale è la modalità migliore per la diagnosi delle pseudodrusen reticolari: l'infrarosso, l'autofluorescenza del fundus, lo SD-OCT e lo SS-OCT widefield

en face hanno la maggior sensibilità, mentre le fasi tardive dell'ICGA e la foto del fondo in luce blu hanno maggior specificità.²⁴ E' stato quindi suggerito di utilizzare un test sensibile come test di screening e un test specifico come conferma.

Le pseudodrusen sono ben visibili in luce blu; risultano ipofluorescenti in autofluorescenza (SW-FAF), ma possono avere un core isofluorescente, che gli conferisce un aspetto "a bersaglio" (probabilmente per accumulo di materiale lipofuscinico oppure per interruzione focale dell'elissoide). Anche all'infrarosso le pseudodrusen esibiscono un pattern reticolare iporefllettente con possibile aspetto "a bersaglio". Allo SD-OCT appaiono come accumuli di materiale iper-reflettente ben visibili al di sopra dell'epitelio pigmentato retinico, nello spazio sottoretinico; la capacità dello SD-OCT di diagnosticare le pseudodrusen è eccellente. L'angiografia retinica con fluoresceina e con verde d'indocianina non sono test di elezione per la diagnosi delle pseudodrusen, per via della loro natura invasiva; il loro ruolo rimane però dirimenti nella diagnosi delle neovascolarizzazioni coroideali eventualmente associate alle pseudodrusen.

Le pseudodrusen evolvono in 3 stadi tomografici:

stadio 1 - accumulo diffuso di materiale granulare iper-reflettente tra l'epitelio pigmentato retinico e l'elissoide;

stadio 2 - il materiale si ispessisce e distorce il profilo dell'elissoide;

stadio 3 - il materiale acquisisce forma conica e interrompe focalmente l'elissoide.

Stadio 4 - il materiale può riassorbirsi e migrare negli strati retinici interni.

Le forme avanzate di pseudodrusen sono associate a degenerazione dell'epitelio pigmentato retinico sottostante e dei fotorecettori. Queste alterazioni potrebbero essere collegate ad una involuzione della coriocabillare e portare allo sviluppo di atrofia geografica nel tempo.²⁵

3. Nuove tecniche di imaging applicate allo studio della coroide: Spectral Domain e Swept Source OCT e Angiografia OCT

Esistono due differenti tipologie di strumenti per acquisire le immagini tomografiche: Spectral Domain (SD-OCT) e Swept-Source (SS-OCT).

Lo SD-OCT utilizza uno spettrometro per acquisire le immagini. Questo ha una risoluzione limitata, per cui la sua capacità di rilevare il segnale OCT varia in base all'ampiezza assiale dell'area da scansionare. Questo fenomeno è conosciuto come "sensitivity roll off" e comporta una graduale riduzione di sensibilità dello strumento via via che le strutture sono situate maggiormente in profondità. Questo fenomeno dipende dalla velocità dello strumento; gli strumenti SD-OCT attualmente in commercio lavorano ad una velocità pari a 70.000 scansioni assiali per secondo.

Lo Swept-Source è una tecnologia di recente sviluppo che utilizza una lunghezza

d'onda maggiore, tra 1040 e 1060 nm, e un detector ad alta velocità nell'acquisire le immagini tomografiche per cui riesce a realizzare 100.000 scansioni al secondo; il "sensitivity roll off" è significativamente minore utilizzando lo SS-OCT rispetto allo SD-OCT e questo gli conferisce dei vantaggi nello studio della coroide, come dimostrato da svariati studi.²⁶⁻³⁰

La lunghezza d'onda utilizzata dallo SD-OCT è intorno agli 840 nm; lo SS-OCT utilizza come già detto una lunghezza d'onda di 1050 nm, che risulta essere meno assorbita dalle opacità oculari e presenta una penetrazione migliore nei tessuti, particolarmente nello studio della coroide perchè viene rifratta in misura minore dal pigmento presente nell'epitelio pigmentato retinico e nella coriocalpillare.³¹

L'angiografia OCT è un'estensione delle funzioni dell'OCT strutturale che si basa sull'esecuzione di svariate scansioni nel medesimo punto per evidenziare il movimento e di conseguenza individuare ed isolare la vascolarizzazione.²⁸ La tecnologia si basa sul concetto che l'unico movimento che ci si aspetta di vedere nella retina sia il flusso sanguigno all'interno dei vasi. Il grosso vantaggio legato all'angiografia OCT è la possibilità di isolare le strutture vascolari in base alla loro profondità in maniera tridimensionale, per cui è possibile visualizzare in modalità en face separatamente i diversi strati microvascolari retinici, semplicemente segmentando i diversi strati retinici. E' così possibile ottenere una visualizzazione distinta del plesso retinico superficiale, plesso retinico profondo, retina esterna

avascolare, coriocabillare.

I vantaggi dell'angiografia OCT risiedono nella sua velocità di acquisizione, ripetibilità e non invasività. Le immagini sono ben contrastate, la risoluzione ed il contrasto sono alti e non si ha oscuramento delle immagini per assenza di leakage. Sulla base delle immagini ottenute è possibile effettuare misurazioni che possono essere utilizzate come markers dell'attività vascolare normale o patologica. I dati di OCT strutturale e angiografia sono acquisiti contemporaneamente, per cui è possibile visualizzare ed integrare entrambe le informazioni riguardo alla posizione della struttura vascolare osservata. L'angiografia OCT è facilmente ripetibile perché rapida e non invasiva. Ha però limiti importanti di cui è bene tenere conto durante il suo utilizzo: il tempo di acquisizione è maggiore rispetto all'OCT tradizionale ed è quindi maggiormente soggetta ad artefatti di movimento, rispetto all'angiografia tradizionale non è in grado di visualizzare alterazioni di permeabilità o leakage; inoltre è in grado di intercettare il segnale di flusso quando questo ricade all'interno di un range limitato e predeterminato per ogni strumento. L'aspetto delle strutture vascolari visualizzate dall'angiografia OCT dipende molto dai parametri e dalle caratteristiche proprie di ogni strumento, per cui è necessaria molta cautela nel paragonare immagini ottenute con strumenti differenti. In ultimo, le immagini ottenute con OCT angiografia sono soggette a molti tipi di artefatti che possono comprometterne l'affidabilità, per cui la loro interpretazione deve sempre essere effettuata con attenzione e conoscenza dei limiti della tecnica.

3.1 Misurazione dello spessore coroideale con OCT

Lo SD-OCT viene utilizzato per ottenere misure quantitative dello spessore retinico e per catturare alterazioni morfologiche dell'architettura retinica.^{27,28}

Per quanto riguarda la valutazione della coroide, però presenta importanti limiti: la visualizzazione dell'intera coroide con tecniche di acquisizione standard è possibile solo in occhi affetti da miopia elevate, per via della bassa capacità di penetrazione nei tessuti e del backscattering a livello dell'epitelio pigmentato retinico.

L'introduzione della tecnica EDI (Enhanced Depth Imaging) ha permesso la visualizzazione delle strutture coroideali in dettaglio e la misurazione dello spessore coroideale.³²

Nella maggior parte degli studi pubblicati utilizzando la tecnologia EDI-OCT, viene definite come "spessore coroideale" un dato rappresentativo ottenuto misurando un punto, spesso corrispondente al centro della fovea, o al massimo alcuni punti lungo una scansione lineare³²⁻⁴². La misurazione di alcuni punti soltanto però può essere inficiata da ispessimenti o assottigliamenti focali della coroide o, più spesso, da irregolarità dell'interfaccia sclera-coroideale.

Utilizzando lo SS-OCT è possibile visualizzare la coroide senza necessità di utilizzare tecnologie ulteriori per processare l'immagine, grazie alla sua lunghezza d'onda

maggiore.^{28,43,44}

Lo SS-OCT sembra permettere un'identificazione dell'interfaccia sclero-coroideale più accurate rispetto allo SD-OCT, risultando quindi superiore nella misurazione dello spessore coroideale in occhi normali.²⁸

Ad oggi, vi sono numerosi studi ottenuti con differenti metodiche che riportano lo spessore coroideale maculare in occhi normali; questo risulta essere compreso tra i 272 e i 448 μ .^{32,33,36,43,44}

Bisogna però ricordare che lo spessore coroideale è soggetto ad una grossa variabilità intra e inter-individuale; diverse caratteristiche e patologie oculari e non sono state associate a modificazioni nello spessore coroideale: età, lunghezza assiale, errore refrattivo, corioretinopatia sierosa centrale, malattia di Vogt-Koyanagi-Harada, vasculopatia polipoidale della coroide, terapia fotodinamica, degenerazione maculare senile. Persino lo stesso individuo può avere una considerevole variabilità nello spessore coroideale tra un occhio e l'altro.³⁰⁻⁴⁴

3.2 Visualizzazione della coriocapillare con Angiografia OCT

La visualizzazione della coriocapillare in vivo utilizzando le tecniche tradizionali è

difficoltosa per via della refrazione della luce da parte dei tessuti sovrastanti, in particolare dall'epitelio pigmentato retinico. Nonostante la coriocapillare sia composta da capillari di discrete dimensioni, questi sono arrangiati così strettamente tra loro che lo spazio intercapillare è spesso inferiore rispetto alla risoluzione laterale dell'angiografia tradizionale. Inoltre la fluoresceina fuoriesce rapidamente dai capillari oscurando subito i dettagli vascolari della struttura. Sono state utilizzate metodiche per rallentare il flusso all'interno dell'occhio, come innalzando la pressione intraoculare, per cui è stato possibile identificare un pattern di riempimento lobulare della coriocapillare, ma non è possibile ugualmente identificare i singoli vasi in ogni lobulo. Anche con il verde d'indocianina il leakage, seppur minore, impedisce di visualizzare nel dettaglio il pattern vascolare. L'OCT ha una risoluzione assiale insufficiente per visualizzare la coriocapillare, mentre l'angiografia OCT (OCTA) è in grado di discernere il flusso vascolare della coriocapillare, producendo un contrasto tra la coriocapillare e l'epitelio pigmentato retinico.²⁸ Si ottiene così un'immagine granulare formata aree chiare e scure di diverse dimensioni; le aree chiare sono le aree di flusso, mentre quelle scure corrispondono ad aree di riduzione relativa e localizzata del segnale di flusso; sono quindi considerate aree di flusso basso o assente e sono chiamate "flow void". Da studi istologici, si è evidenziata la presenza di vasi fantasma ("ghost vessels") nella coriocapillare; questi sono essenzialmente segmenti di capillari non funzionanti, che risultano essere correlati positivamente con la maggiore età e con la presenza di degenerazione maculare senile, sia con drusen che

con pseudodrusen.⁹ Il flusso sanguigno è assente all'interno delle ghost vessels, ma potrebbe essere compromesso anche nei vasi adiacenti al segmento occluso, anche senza coinvolgere l'intero lobulo della coriocapillare. Una riduzione della perfusione della coriocapillare può costituire un rischio per il sovrastante epitelio pigmentato retinico e innescare così un circolo vizioso con ulteriore danneggiamento della coriocapillare.

4. Alterazioni coroideali nell'AMD intermedia e correlazioni col fenotipo

Diversi studi supportano l'evidenza della riduzione dello spessore coroideale sottofoveale in pazienti con pseudodrusen reticolari, sia rispetto a pazienti sani che rispetto a pazienti affetti da AMD senza pseudodrusen. L'assottigliamento coroideale però coinvolge il polo posteriore anche esternamente rispetto all'area maculare: l'ampio coinvolgimento coroideale con aumento della sua porzione stromale suggeriscono come alla base della patogenesi delle pseudodrusen possa esserci una vasculopatia diffusa a livello coroideale che determina ipoperfusione e in ultimo rimpiazzo fibrotico.^{21,22}

Lo spessore coroideale è, come già detto, un parametro estremamente variabile nella popolazione e può essere influenzato da diversi fattori e patologie oculari.

La Degenerazione Maculare Senile iniziale in particolare è correlata ad una perdita di cellule endoteliali coroideali, e questa osservazione correla bene con l'associazione dimostrata tra assottigliamento coroideale e presenza di pseudodrusen reticolari.²²

5. Nostra esperienza

Lo scopo del nostro studio è di valutare le differenze nello spessore coroideale centrale (Central Choroidal Thickness, CCT) e nell'area di flusso della coriocapillare (Choriocapillaris Vascular Flow Area, CCVFA) tra pazienti affetti da AMD intermedia

con e senza pseudodrusen reticolari utilizzando SS-OCT e SS-OCTA, tenendo conto dei fattori che possono influire sullo spessore coroideale, come l'età e la lunghezza assiale.

5.1 Metodo

5.1.1 Selezione dei pazienti

Abbiamo eseguito un'analisi retrospettiva su pazienti con AMD intermedia e pazienti sani presso il Centro di Retina Medica della Clinica Oculistica di Genova, Italia. I dati raccolti da 27 occhi di 27 pazienti con AMD intermedia sono stati paragonati ai dati ottenuti da 17 occhi di 17 pazienti sani di età corrispondente, afferiti al nostro Centro per visita di screening. I criteri di inclusion erano: diagnosi di AMD intermedia classificata come Gruppi 1a, 2a, 2b, o 3 dall'International Classification and Grading System for Age-Related Macular Degeneration¹⁴; età maggiore di 50 anni e acuità visive con la migliore correzione (Best Corrected Visual Acuity, BCVA) uguale o maggiore di 20/200 (35 lettere ETDRS). Criteri di esclusione erano: presenza di errore refrattivo maggiore di +4/-6 diottrie di equivalente sferico; lunghezza assiale maggiore di 26 o minore di 24 mm; patologie oculari concomitanti nell'occhio in studio (compresa la cataratta se questa rendeva impossibile ottenere immagini di

buona qualità all'OCT). Tutti i pazienti inclusi nello studio avevano eseguito una visita oculistica completa, tra cui: valutazione della BCVA con le tavole ETDRS, esame biomicroscopico alla lampada a fessura, oftalmoscopia binoculare indiretta, fotocolor del fundus (FCP), autofluorescenza del fundus (FAF), misura della lunghezza assiale attraverso biometria ottica, SS-OCT e SS-OCTA.

La lunghezza assiale è stata misurata utilizzando il biometro ottico Lenstar LS900 (Haag-Streit, USA). Le immagini OCT, OCTA, FCP e FAF sono state realizzate utilizzando lo SS-OCT (DRI OCT TRITON plus; Topcon Corporation, Tokyo, Japan). Questo strumento utilizza una lunghezza d'onda centrata sui 1500 nm con una velocità di acquisizione di 100,000 A-scans per secondo. Le risoluzioni assiali e trasversali sono rispettivamente di 7 e 20 μm nei tessuti. Le immagini sono state catturate da esaminatori esperti e dopo dilatazione della pupilla. Per ogni paziente sono stati eseguiti protocolli di scansione che comprendevano le linee radiali della lunghezza di 12 mm e l'acquisizione volumetrica tridimensionale (3D) della macula su un'area di $4.5 \times 4.5 \text{ mm}^2$ (320 scansioni orizzontali x 320 scansioni verticali), entrambe centrate sulla fovea.

Abbiamo poi identificato la presenza di drusen molli e pseudodrusen reticolari separatamente lungo ognuna delle 12 linee della scansione radiale; dal momento che non c'è un gold standard nella visualizzazione delle drusen e in particolare delle pseudodrusen reticolari, abbiamo utilizzato sia le immagini a colori che

l'autofluorescenza per validare la nostra classificazione attraverso la modalità "multi-imaging". Per ogni paziente abbiamo determinate la severità della presenza di drusen molli e pseudodrusen reticolari indipendentemente, classificandola come: nessuna drusen molle/pseudodrusen reticolare (noSD/RPD = SD/RPD assenti in tutte le scansioni radiali), moderata (mSD/RPD = SD/RPD identificate in >0 e ≤ 6 scansioni lineari radiali) o severa (sSD/RPD = SD/RPD identificate in >6 scansioni lineari radiali). Dal momento che non esiste una definizione comunemente accettata riguardo alla severità della presenza di SD/RPD, abbiamo deciso questi cut-off arbitrariamente e abbiamo potuto verificare che ci permettevano di separare qualitativamente i nostri gruppi di pazienti in maniera soddisfacente. La Figura 1 mostra degli esempi di immagini FCP, FAF e SS-OCT di pazienti classificati come moderate e severe SD/RPD, e dimostra la bontà della nostra procedura semi-quantitativa di classificazione.

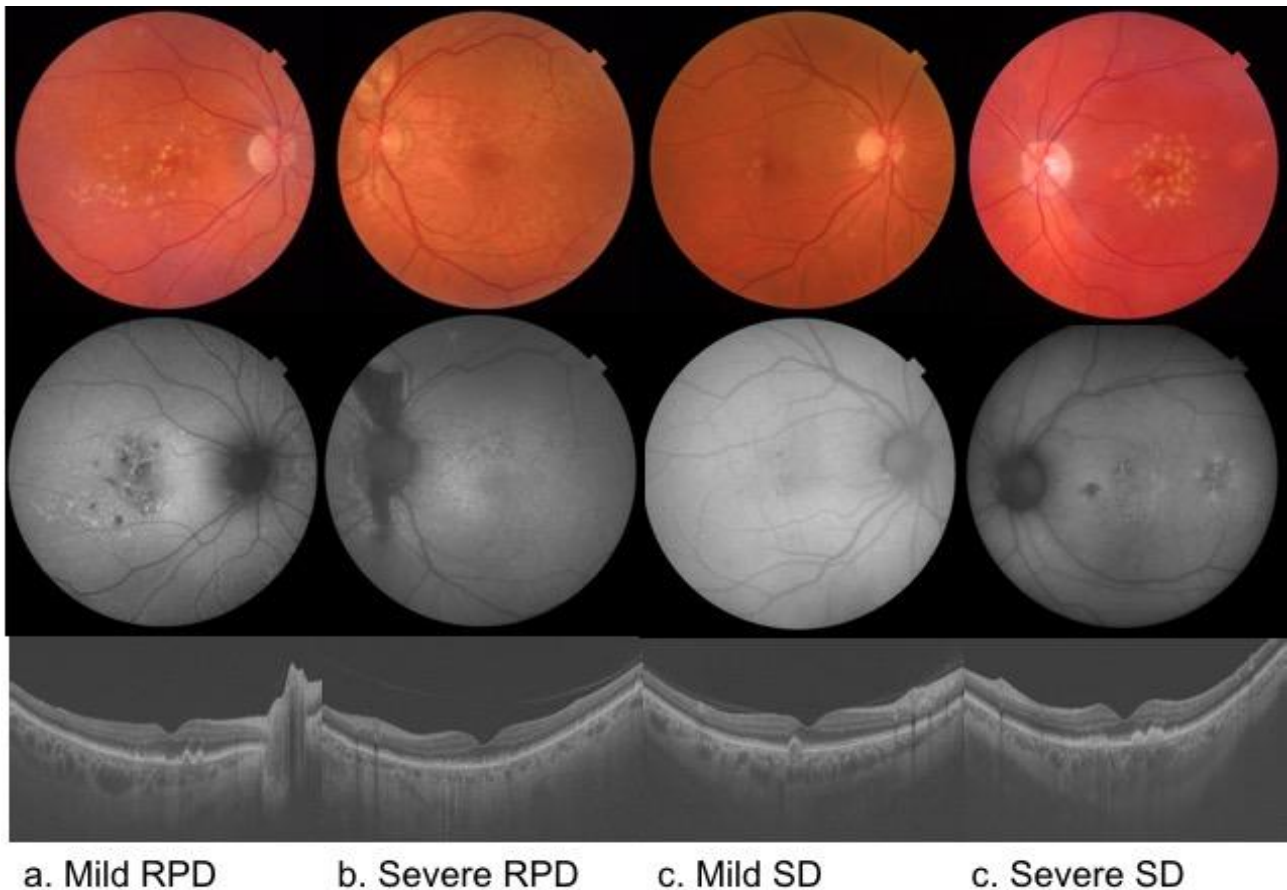


Figura 1. Immagini FCP, FAF e SS-OCT di pazienti con diverso grado di severità di SD/RPD. Lato sinistro: esempi di pazienti con (a) moderate e (b) severe RPD. Lato destro: esempi di pazienti con (c) moderate e (d) severe SD.

5.1.2 Rilevamento dello spessore coroideale centrale (CCT)

Abbiamo definito come spessore coroideale centrale (CCT) la distanza tra la linea corrispondente alla Membrana di Bruch al di sotto dell'epitelio pigmentato retinico e l'interfaccia sclero-coroideale nell'area della griglia ETDRS standard (una regione circolare di 6 mm di diametro centrata sulla fovea). Il software ImageNet 6 (Topcon)

misura automaticamente lo spessore di retina e coroide nella regione maculare, creando una mappa di spessori. La griglia ETDRS è stata centrata manualmente sulla fovea qualora necessario. Gli strati retinici e l'interfaccia sclero-coroideale sono stati delineati automaticamente dallo strumento (Figure 2). Il valore di spessore coroideale e retinico raccolti per ogni occhio per le analisi erano la media di tutti i valori di spessore all'interno della griglia ETDRS. La segmentazione automatica è stata controllata visivamente e corretta qualora ritenuta inaccurata.



Figura 2. Segmentazione automatica della membrana di Bruch (linea verde in alto) e dell'interfaccia sclero-coroideale (linea verde in basso) dimostrata sulla B-scan di un partecipante rappresentativo (paziente b. della Figura 1). La distanza tra queste due linee è calcolata sulla base della media delle distanze tra tutti i punti misurati all'interno della griglia ETDRS centrata sulla fovea per ricavare il CCT per ogni occhio in studio.

5.1.3 Rilevamento dell'area di flusso vascolare coriocapillare (CCVFA)

Le scansioni angiografiche con swept-source OCT sono state ottenute attraverso

l'analisi di cubi centrati sulla fovea di $4.5 \times 4.5 \text{ mm}^2$, ognuno dei quali era costituito dall'insieme di 320 B-scans ripetute 4 volte. Le immagini di angiografia OCT della coriocapillare sono state ricostruite dal software della Topcon, che identifica automaticamente la profondità della coriocapillare. Il software posiziona automaticamente una linea di segmentazione a livello della membrana di Bruch e l'altra $10.4 \mu\text{m}$ esternamente alla prima. Nelle immagini SS-OCTA (esempio in Figura 3), i pixels chiari corrispondono ai capillari retinici. La percentuale di pixels chiari nelle immagini Angio-OCT della coriocapillare può essere ritenuta una misura indiretta dell'area di flusso vascolare della coriocapillare (CCVFA), come dimostrato da un precedente studio.⁴⁵

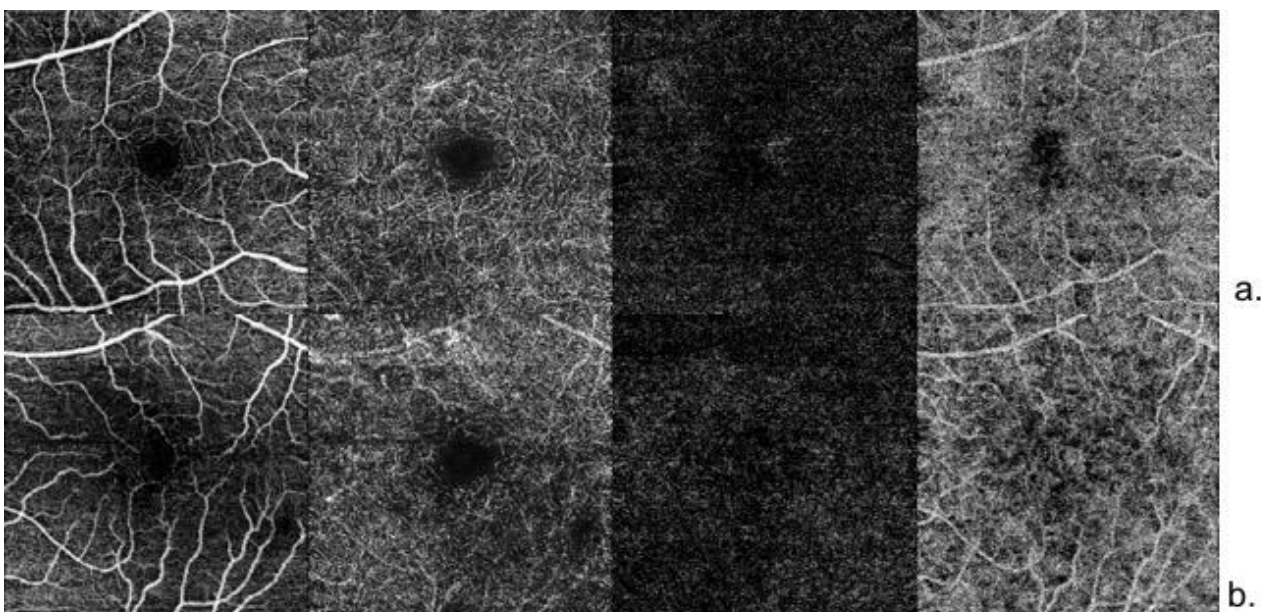


Figura 3. Immagine Angio-OCT della coriocalpillare di due pazienti corrispondenti rispettivamente a: linea in alto – paziente c. e linea in basso – paziente b. della Figura 2. Da sinistra a destra: immagini OCT-A del plesso retinico superficiale, plesso retinico profondo, retina esterna, coriocalpillare.

Per contare la percentuale di pixels bianchi nelle nostre immagini Angio-OCT, ogni immagine è stata esportata in formato jpg e importata nel software di analisi di immagini open access Fiji⁴⁶. In Fiji, ogni immagine di 320 x 320 pixel, 8-bit è stata binarizzata utilizzando la sequenza di comandi Image>Adjust>Threshold>Auto. La binarizzazione delle immagini è stata fatta attraverso il metodo di Otsu (un algoritmo che permette di selezionare automaticamente una soglia da istogrammi in scala di grigi).⁴⁷ L'area di flusso vascolare della coriocalpillare in termini di percentuale di pixels bianchi è stata quindi calcolata dividendo il numero di pixels bianchi nell'immagine binarizzata per il numero totale dei pixels dell'immagine e poi moltiplicando il numero ottenuto per 100.

Le immagini Angio-OCT con indice di qualità (calcolato automaticamente dal software Topcon durante l'acquisizione dell'immagine) al di sotto di 40 sono state escluse dall'analisi dell'area di flusso vascolare della coriocalpillare (dati di 2 partecipanti sani e di 2 pazienti affetti da AMD intermedia).

5.2 Analisi statistica

Per valutare se la severità delle drusen molli e delle pseudodrusen reticolari andasse ad influenzare lo spessore corioideale centrale e l'area di flusso vascolare corioideale abbiamo utilizzato l'analisi standard one-way ANOVA. Qualora l'analisi ANOVA indicasse differenze significative, abbiamo utilizzato un'analisi post-hoc con la procedura di comparazione multipla Tukey-Kramer single-step. Abbiamo costruito modelli di regressione lineare multipli per correlare le misure di spessore corioideale centrale e area di flusso vascolare della coriocalpillare alla presenza di drusen molli e pseudodrusen reticolari, tenendo conto dell'età dei pazienti e della lunghezza assiale del bulbo. I diversi parametri sono stati aggiunti ai modelli utilizzando una procedura di inclusione a steps, includendo i parametri uno alla volta e mantenendoli solo se il Bayesian Information Criterion (BIC) si riduceva di più di 2 unità. La correlazione tra spessore corioideale centrale e area di flusso vascolare della coriocalpillare è stata valutata con una regressione lineare semplice.

Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Quindi, considerando l'ampiezza del nostro campione, la nostra analisi è stata in grado di catturare stime di media/grande dimensione d'effetto, assicurando così che i risultati statisticamente significativi nel nostro studio corrispondono ad effetti clinicamente significativi (95% di intervallo di confidenza con l'80% di potenza, dimensione d'effetto di $f=0.5$ (ANOVA), $f^2=0.3$ (regressione multipla), e $r=0.36$ (regressione semplice).

Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando Matlab versione R2016b (Mathworks).

I dati e le analisi eseguite sono consultabili sul database di Zenodo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.1198747>).

5.3 Risultati

Un riassunto delle caratteristiche demografiche di tutti i pazienti analizzati è mostrata nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche dei 27 occhi (27 pazienti) affetti da degenerazione maculare senile intermedia e dei 17 occhi di soggetti sani come gruppo di controllo.

	iAMD	Controlli
n. occhi	27	17
Età (anni, media [min.-max.])	77.0 [66 – 91]	69.8 [58 – 84]
Sesso - maschi (n; %)	16; 59.3%	9; 52.9%
Sesso - femmine (n; %)	11; 40.7%	8; 47.1%
Fachici (n; %)	18; 66.7%	13; 76.5%
Pseudofachici (n; %)	9; 33.3%	4; 23.5%
SR (D, media [min.-max.])	0.16 [-6 - +3.5]	-0.13 [-3 - +2.5]
AL (mm, media [min.-max.])	23.7 [22.25 - 25.96]	23.7 [22.24 - 25.8]
BCVA (lettere ETDRS, media [min.-max.])	72 [35 – 84]	79 [59 – 87]

5.3.1 Spessore coroideale centrale (CCT)

Lo spessore coroideale centrale medio tra tutti i partecipanti allo studio era di 167 ± 82 μm (media \pm deviazione standard). La presenza di drusen molli moderate o severe non ha dimostrato di avere influenza sullo spessore coroideale centrale ($F_{2,41}=2.17$,

p=0.13). Per contro, la Figura 4(a) dimostra come la presenza di pseudodrusen reticolari influisca sullo spessore coroidale centrale ($F_{2,41}= 6.16$, $p=0.0046$). Nello specifico, l'analisi post-hoc ha mostrato che lo spessore coroidale centrale era significativamente minore nei partecipanti con pseudodrusen reticolari severe rispetto ai partecipanti senza pseudodrusen reticolari ($p=0.0044$). Lo spessore coroidale centrale nei pazienti con pseudodrusen reticolari moderate non risultava invece statisticamente differente a quello dei pazienti senza pseudodrusen reticolari ($p=0.16$) e a quello dei pazienti con pseudodrusen reticolari severe ($p=0.52$, figura 4).

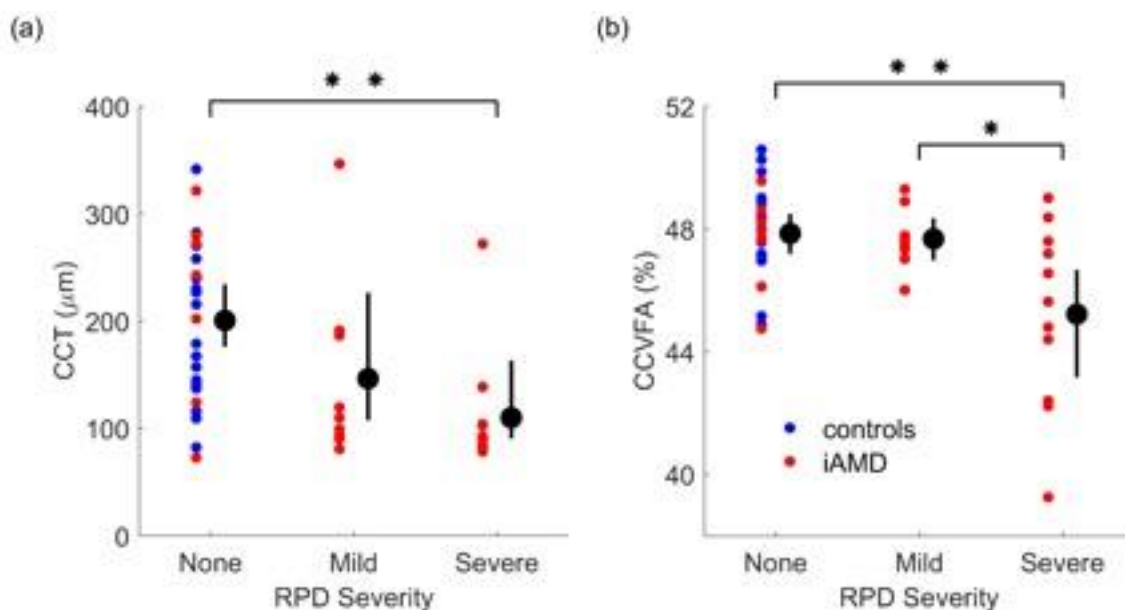


Figura 4. La presenza di RPD influisce su CCT and CCVFA. CCT (a) e CCVFA (b) sono rappresentati come una funzione della severità delle RPD. I puntini neri sono le medie; l'intervallo di confidenza è al 95%. I dati individuali dei pazienti affetti da iAMD e dei

*controlli normali sono rappresentati come puntini rossi e blu rispettivamente. Black dots are means; error bars are 95% bootstrapped confidence intervals. Individual subject data from the iAMD participants and normal controls are plotted as red and blue dots respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.*

E' stata eseguita un'analisi di regressione lineare multipla per valutare la dipendenza dello spessore coroidale centrale (CCT, variabile dipendente) dall'età, dalla lunghezza assiale, dalla presenza di drusen molli o pseudodrusen reticolari. Abbiamo iniziato l'inclusione dei parametri da un modello di base che includeva solo un'intercetta; aggiungendo i parametri della presenza di pseudodrusen reticolari e di lunghezza assiale il BIC del modello si riduceva di 7.7 e 2.3 unità rispettivamente. I parametri di età e presenza di drusen molli invece non hanno modificato la forma del modello (il BIC è aumentato di 1.5 e 3.3 unità rispettivamente) e sono stati quindi esclusi dall'analisi di regressione. L'equazione di regressione che abbiamo quindi trovato era:

$$\text{CCT} = 877.1 - 28.6 (\text{AL}) - 46.1 (\text{RPD})$$

Il modello quindi è stato in grado di predire significativamente i valori di spessore coroidale centrale ($F_{2,41}=10.1$, $p=0.00028$), con $R^2=0.33$. La lunghezza assiale e la presenza di pseudodrusen reticolari erano entrambe significativamente e inversamente associate con lo spessore coroidale centrale ($p=0.0018$ and $p=0.00055$ rispettivamente).

5.3.2 Area di flusso vascolare coriicapillare (CCVFA)

L'area di flusso vascolare della coriicapillare media tra tutti i partecipanti allo studio era $47.1 \pm 2.2\%$. La presenza di drusen molli moderate o severe non ha dimostrato di influire sulla CCVFA ($F_{2,39} = 1.28$, $p = 0.29$). Per contro, la Figura 1(b) dimostra come la presenza di pseudodrusen reticolari influisce significativamente sulla CCVFA ($F_{2,39} = 7.02$, $p = 0.0025$). Nello specifico, l'analisi post-hoc ha dimostrato come la CCVFA risultava significativamente minore nei pazienti affetti da pseudodrusen reticolari severe rispetto ad entrambi i gruppi di pazienti senza pseudodrusen reticolari ($p = 0.0022$) e con pseudodrusen reticolari moderate ($p = 0.028$). L'area di flusso vascolare della coriicapillare era invece simile tra i pazienti senza e con moderate pseudodrusen reticolari ($p = 0.97$).

Come eseguito per i dati riguardanti lo spessore coroideale centrale, un'analisi di regressione lineare multipla è stata calcolata per stabilire l'influenza dell'età, della lunghezza assiale, della presenza di drusen molli e pseudodrusen reticolari sull'area di flusso vascolare della coriicapillare (variabile dipendente). Abbiamo iniziato l'inclusione dei parametri da un modello di base che includeva solo un'intercetta; aggiungendo il parametro della presenza di pseudodrusen reticolari il BIC del modello si è ridotto di 7.0 unità. L'aggiunta del parametro di età non ha modificato significativamente la forma del modello (il BIC si è ridotto di 0.1), mentre i parametri di lunghezza assiale e presenza di drusen molli hanno modificato il modello, con

aumento del BIC di 3.7 unità in entrambi i casi. In conclusione, abbiamo ottenuto la seguente equazione di regressione:

$$\text{CCVFA} = 48.0 - 1.2 (\text{RPD}).$$

Il modello di regressione quindi è stato in grado di predire significativamente i valori di area di flusso vascolare della coriocapillare ($F_{1,40}=11.6$, $p=0.0015$), con $R^2=0.23$. La presenza di pseudodrusen reticolari è risultata quindi significativamente e inversamente associata con lo l'area di flusso vascolare cella coriocapillare ($p=0.0015$).

5.3.3 Relazione tra CCT e CCVFA

Abbiamo utilizzato il coefficiente di Pearson di correlazione prodotto-momento per valutare la relazione tra spessore corioideale e vascolarizzazione. Tra tutti i partecipanti, abbiamo osservato una correlazione positiva statisticamente significativa tra lo spessore corioideale centrale e l'area di flusso vascolare della coriocapillare ($r(40)=0.44$, $p=0.0032$). Il diagramma in Figura 5 riassume il risultato e mostra la linea di regressione che si adatta meglio ai dati.

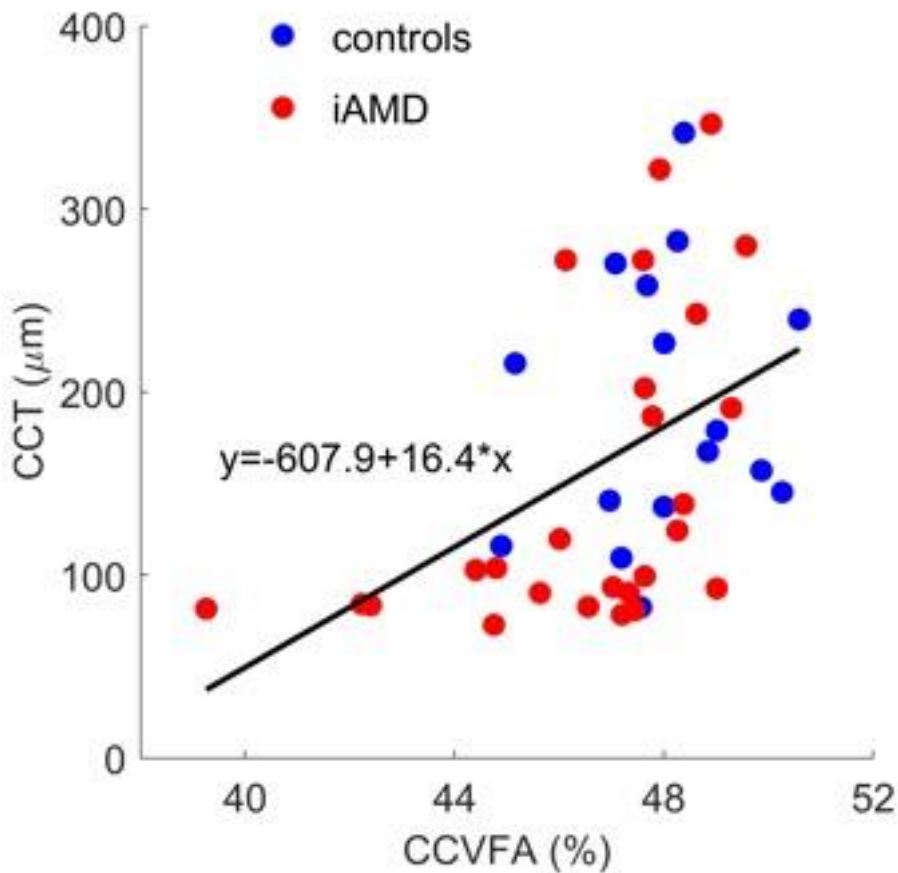


Figura 5. Grafico a dispersione della relazione tra spessore e vascolarizzazione coroideale. Per ogni paziente, le misure di CCVFA (%) sono rappresentate rispetto al CCT (μm). I dati riguardanti i pazienti affetti da iAMD e i controlli normali sono rappresentati rispettivamente come puntini rossi e blu. La linea nera è la linea di regressione lineare che meglio si adatta ai dati e che è descritta dall'equazione sovrascritta al grafico.

6. Discussione

Già svariati Autori hanno dimostrato una riduzione nello spessore coroideale e nella

perfusione della coriocapillare in occhi affetti da Degenerazione Maculare Senile intermedia.^{21,25,48-52}

Lo scopo del nostro studio è di valutare la correlazione tra la presenza di pseudodrusen reticolari, spessore coroideale e vascolarizzazione della coriocapillare, tenendo conto dei fattori potenzialmente confondenti.

I nostri dati concordano con l'ipotesi, già da tempo avanzata da alcuni Autori,^{25,53-55} secondo la quale la presenza di pseudodrusen reticolari possa essere un segno precoce di patologia vascolare coroideale, che può poi evolvere in atrofia coroideale, indipendentemente dalla presenza di altri segni di Degenerazione Maculare Senile intermedia, come le drusen molli.

Lo spessore coroideale centrale e l'area di flusso vascolare della coriocapillare nei pazienti affetti dalla presenza di pseudodrusen reticolari severe era significativamente ridotta rispetto sia agli occhi sani sia agli occhi di pazienti affetti da AMD intermedia ma senza pseudodrusen reticolari. Inoltre, abbiamo osservato una relazione significativa tra CCT and the CCVFA; questo dato suggerisce che lo spessore della parte centrale della coroide è almeno in parte influenzato dall'area di flusso vascolare a livello della coriocapillare. Abbiamo in ultimo trovato una relazione significativa tra spessore coroideale centrale e lunghezza assiale del bulbo, dato in accordo con la letteratura a disposizione. La nota correlazione tra spessore retinico centrale ed età non ha raggiunto la significatività statistica nella nostra casistica,

probabilmente perché abbiamo incluso pazienti appartenenti ad un range di età piuttosto ristretto e perché il nostro campione aveva una numerosità minore rispetto a studi precedenti. L'età e la lunghezza assiale non sono invece risultati correlati in maniera statisticamente significativa con l'area di flusso vascolare della coriocapillare. Il dato che emerge preponderante su tutti è che la riduzione dello spessore coroideale centrale e dell'area di flusso vascolare della coriocapillare risultano correlati in maniera statisticamente significativa con il grado di severità della presenza di pseudodrusen reticolari. Al contrario di quanto riportato in studi precedenti,⁵⁶⁻⁵⁹ nella nostra casistica la presenza di drusen molli non ha influenzato l'area di flusso vascolare della coriocapillare. La ragione di questa discrepanza potrebbe risiedere nella presenza di artefatti nell'acquisizione e nell'elaborazione delle immagini angiografiche in questi studi precedenti, in particolare la presenza dei cosiddetti "flow void" a livello della coriocapillare, che potrebbero averne alterato i dati. I "flow voids" sono aree di apparente mancanza di flusso a livello della coriocapillare; sono localizzati al di sotto di drusen molli e si formano a causa del cono d'ombra posteriore che determina la drusen stessa, riducendo così il segnale angio-OCT. Alcuni Autori⁵⁹ hanno elaborato le immagini ottenute con procedure di compensazione volte a rimuovere i "flow voids" a livello della capillare, dimostrando che è possibile migliorare la qualità della visualizzazione e la quantificazione vascolare a livello della coriocapillare con l'angiografia OCT. Nel nostro studio abbiamo utilizzato le immagini ottenuto con lo swept-source OCT-A senza modificarle: questo potrebbe in teoria

sottostimare l'area di flusso vascolare della coriocalpillare nei pazienti con AMD intermedia affetti dalla presenza di sole drusen molli (gruppo no RPD). Abbiamo invece osservato dati estremamente simili tra il gruppo con AMD intermedia affetto solo da soft drusen (no RPD) e i controlli sani. Come precedentemente riportato quindi, anche dai nostri dati si evince che la tecnologia swept source sembra essere superiore alla spectral domain nella visualizzazione della coriocalpillare, dal momento che l'angiografia OCT basata su tecnologia Spectral Domain è maggiormente soggetta ad artefatti da attenuazione rispetto alla Swept Source per via della minor lunghezza d'onda utilizzata.²⁸ I nostri dati supportano la teoria per la quale la maggior lunghezza d'onda utilizzata dalla tecnologia Swept Source permette un miglior rapporto segnale/rumore a livello della coriocalpillare, anche nel passaggio attraverso grosse drusen molli, riducendo quindi la presenza di artefatti.⁶⁰ Diversi studi sia istologici che clinici hanno dimostrato nel passato una ridotta circolazione a livello della coriocalpillare al di sotto delle drusen molli; i nostri risultati invece supportano la tesi di Alten et al.⁶¹ secondo la quale la coriocalpillare è alterata maggiormente in relazione alla presenza e all'abbondanza delle pseudodrusen reticolari, che sono più piccole e causano minor "effetto ombra" sulla coriocalpillare sottostante rispetto alle drusen molli. In conclusione, la presenza di pseudodrusen reticolari sembra essere correlata ad una vascolopatia che non sembra colpire la sola coriocalpillare, ma bensì l'intera corioidede, determinandone una riduzione globale di spessore.

Riconosciamo diverse limitazioni al nostro studio, a cominciare dal ridotto numero di

occhi inclusi nella nostra analisi. Inoltre abbiamo utilizzato un software di segmentazione automatica (che ha note limitazioni nel delineare la coriocalpillare) per l'analisi della coriocalpillare e non abbiamo utilizzato alcuna tecnica per rimuovere gli artefatti dalle immagini angio-OCT.

Questo ha fatto sì che risultassero incluse nell'analisi le "flow voids" occasionalmente presenti al di sotto delle drusen molli di maggiori dimensioni, fatto che potrebbe aver potenzialmente sottostimato la differenza nell'area di flusso vascolare della coriocalpillare tra pseudodrusen reticolari e drusen molli, sottostimando quindi gli effetti che abbiamo riportato.

In ultimo, le pseudodrusen reticolari e le drusen molli non colpiscono solitamente le stesse porzioni di retina: le pseudodrusen reticolari sono più frequentemente localizzate nel quadrante superotemporale della macula, mentre le drusen molli sono più centrali²². Nonostante questo, diversi studi hanno dimostrato che le pseudodrusen reticolari sono correlate a variazioni nello spessore coroideale non solo nel quadrante superotemporale, ma in tutta l'area maculare.²⁵ La nostra classificazione della severità delle drusen molli e delle pseudodrusen reticolari compensa la differente localizzazione delle due forme di drusen rispetto alla fovea andando ad analizzare una porzione retinica relativamente ampia: la nostra analisi ai fini della classificazione ha compreso l'intero polo posteriore (FAF, FCP e scansioni di 12 mm con SS-OCT). La misura dello spessore coroideale centrale comprende l'intera

griglia ETDRS (6mm di diametro centrato sulla fovea), e la valutazione dell'area di flusso vascolare coroideale allo stesso modo ha incluso quasi completamente la regione maculare (4.5x4.5 mm centrata sulla fovea).

Nonostante queste limitazioni, i risultati del nostro studio dimostrano come lo spessore coroideale centrale e l'area di flusso vascolare coroideale siano significativamente ridotti negli occhi di pazienti affetti dalla presenza di pseudodrusen reticolari, rispetto agli occhi di pazienti che presentano solo drusen molli e di pazienti sani di pari età. I nostri dati suggeriscono che la patogenesi delle pseudodrusen reticolari possa essere correlata ad una patologia vascolare coroideale. Ulteriori studi sono necessari per meglio valutare le differenti patogenesi associate con la comparsa di drusen molli o pseudodrusen reticolari negli occhi di pazienti affetti da AMD intermedia.

BIBLIOGRAFIA

1. Agarwal A., Gass' Atlas of Macular Disease, fifth edition, 2012;
2. Curcio C.A, Johnson M. Structure, Function, and Pathology of Bruch's Membrane. Basic Science and Translation to Therapy, Anatomy and Physiology. McCormick.northwestern.edu
3. Spaide RF, et al. Optical Coherence Tomography Angiography. Prog Retin Eye Res. 2018 May;64:1-55. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.11.003.
4. Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, et al. Prevalence of age related macular degeneration in the United States. Arch Ophthalmol. 2004;122:564–572.
5. Borrelli E, et al. Alterations in the choriocapillaris in intermediate age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58:4792–4798. DOI:10.1167/iovs.17-22360
6. Green WR, Key SN 3d. Senile macular degeneration: a histopathologic study. Trans Am Ophthalmol Soc 1977; 75:180-254.
7. Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. Ophthalmology 1993; 100:1519-35.
8. Green WR. Histopathology of age-related macular degeneration. Molecular

Vision 1999; 5:27

9. Curcio C.A, Johnson M. Structure, Function, and Pathology of Bruch's Membrane. Basic Science and Translation to Therapy, Anatomy and Physiology. Mccormick.northwestern.edu
10. Wang L, Clark ME, Crossman DK, et al. Abundant lipid and protein components of drusen. PLoS ONE 2010;5:e10329.
11. Curcio CA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS. Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:265–274.
12. Haimovici R, Gantz DL, Rumelt S, Freddo TF, Small DM. The lipid composition of drusen, Bruch's membrane, and sclera by hot stage polarizing microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:1592–1599.
13. Curcio CA, Presley JB, Medeiros NE, et al. Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. Exp Eye Res 2005;81:731–741.
14. Bird, A.C., et al., An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. Surv. Ophthalmol 1995. 39, 367-374.
15. Zweifel SA, et al. Reticular pseudo-drusen are subretinal drusenoid deposits. Ophthalmology 2010; 117:303–312.e1.
16. Oak ASW, et al. Subretinal drusenoid deposits: further characterization by lipid histochemistry. Retina. 2014;34(4):825-826. PMID 24589874

17. Greferath U, et al. Correlation of histologic features with in vivo imaging of reticular pseudodrusen. *Ophthalmology*. 2016;123(6):1320-1331. PMID 27039021
18. Ebrahimi KB, et al. Decreased membrane complement regulators in the retinal pigmented epithelium contributes to age-related macular degeneration. *J Pathol*. 2012;229(5):729-742. PMID 23097248
19. Curcio C.A, Johnson M. Structure, Function, and Pathology of Bruch's Membrane. *Basic Science and Translation to Therapy, Anatomy and Physiology*, 2013. mccormick.northwestern.edu
20. Gass, J.D.M., 1977. *Stereoscopic Atlas of Macular Disease: Diagnosis and Treatment*, fifth ed. Mosby, St. Louis, MO.
21. Spaide RF. Disease Expression In Nonexudative Age-Related Macular Degeneration Varies With Choroidal Thickness. *Retina* 2017 0:1–9,
22. Rabiolo et al. Spotlight on reticular pseudodrusen *Clinical Ophthalmology* 2017:11.
23. Ebrahimi KB, et al. Decreased membrane complement regulators in the retinal pigmented epithelium contributes to age-related macular degeneration. *J Pathol*. 2012;229(5):729-742. PMID 23097248
24. Spaide R.F, Curcio C.A. Drusen characterization with multimodal imaging, *RETINA* 2010 30:1441–1454,
25. Querques G, et al. Choroidal changes associated with reticular

- pseudodrusen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(3):1258–1263.
26. Spaide RF, Koizumi H, Pozzoni MC. Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2008;146:496–500.
27. Spaide RF. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of retinal pigment epithelial detachment in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2009; 147:644-652
28. Spaide, R.F. et al. Optical coherence tomography angiography, *Progress in Retinal and Eye Research* (2018), doi:10.1016/j.preteyeres.2017.11.003.
29. Huber R, Adler DC, et al. Fourier domain mode locking at 1050 nm for ultra-high-speed optical coherence tomography of the human retina at 236,000 axial scans per second. *Opt Lett*. 2007;32:2049–2051.
30. Copete S, et al. Direct comparison of spectral-domain and swept-source OCT in the measurement of choroidal thickness in normal eyes. *British Journal of Ophthalmology* Published Online First: 28 November 2013
31. Esmaeelpour M, et al. Three-dimensional 1060-nm OCT: choroidal thickness maps in normal subjects and improved posterior segment visualization in cataract patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:5260–5266.
32. Margolis R, Spaide RF. A pilot study of enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in normal eyes. *Am J Ophthalmol*. 2009;147:811–815.
33. Rahman W, et al. Repeatability of manual subfoveal choroidal thickness

- measurements in healthy subjects using the technique of enhanced depth imaging optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52: 2267–2271.
34. Ikuno Y, Kawaguchi K, Nouchi T, Yasuno Y. Choroidal thickness in healthy Japanese subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51: 2173–2176.
35. Benavente-Perez A, et al. Reproducibility-repeatability of choroidal thickness calculation using optical coherence tomography. *Optom Vis Sci.* 2010;87:867–872.
36. Manjunath V, Taha M, Fujimoto JG, Duker JS. Choroidal thickness in normal eyes measured using Cirrus HD optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 2010;150:325–329.
37. Maruko I, Iida T, Sugano Y, Ojima A, Ogasawara M, Spaide RF. Subfoveal choroidal thickness after treatment of central serous chorioretinopathy. *Ophthalmology.* 2010;117:1792–1799.
38. Maruko I, Iida T, Sugano Y, et al. Subfoveal choroidal thickness after treatment of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Retina.* 2011;31:510–517.
39. Fong AH, Li KK, Wong D. Choroidal evaluation using enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Retina.* 2011;31:502–509.
40. Chung SE, Kang SW, Lee JH, Kim YT. Choroidal thickness in polypoidal choroidal vasculopathy and exudative age-related macular degeneration.

- Ophthalmology. 2011;118:840–845.
41. Koizumi H, Yamagishi T, Yamazaki T, Kawasaki R, Kinoshita S. Subfoveal choroidal thickness in typical age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. In press.
42. Maruko I, Iida T, Sugano Y, Saito M, Sekiryu T. Subfoveal retinal and choroidal thickness after verteporfin photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol*. 2011; 151:594 – 603.
43. Masaya Hirata, et al. Macular Choroidal Thickness and Volume in Normal Subjects Measured by Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, July 2011, Vol. 52, No. 8
44. Caramoy A. and Heindl L. M., Variability of choroidal and retinal thicknesses in healthy eyes using swept-source optical coherence tomography – implications for designing clinical trials. *Clin Ophthalmol*. 2017; 11: 1835–1839. Published online 2017 Oct 12.
45. Nicolò M, et al. Choroidal vascular flow area in central serous chorioretinopathy using swept-source optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:2002–2010.
46. Schindelin J, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–682.
47. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans*

- Syst Man Cybern. 1979;9:62–66.
48. Lains et al. Choroidal Changes Associated With Subretinal Drusenoid Deposits in Age-related Macular Degeneration Using Swept-source Optical Coherence Tomography. *AJO*, August 2017, Vol 180; 55-63
49. Garg A, et al. Reticular pseudodrusen in early age-related macular degeneration are associated with choroidal thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(10): 7075–7081.
50. Zheng F, et al. Choroidal thickness and choroidal vessel density in nonexudative age-related macular degeneration using swept-source optical coherence tomography imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:6256–6264.
51. Ueda-Arakawa N, et al. Macular choroidal thickness and volume of eyes with reticular pseudo-drusen using swept-source optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 2014;157(5):994–1004.
52. Capuano V, et al. Choroidal maps in non-exudative age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2016;100(5): 677–682.
53. Rabiolo A, et al. Spotlight on reticular pseudodrusen. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2017;11:1707-1718. doi:10.2147/OPHTH.S130165.
54. Smith RT, et al. Reticular macular disease. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(5):733-743 e732. PMID 19878758
55. Switzer DW, Jr., et al. Segregation of ophthalmoscopic characteristics according to choroidal thickness in patients with early age-related macular degeneration.

Retina. 2012;32(7):1265-1271. PMID 22222760

56. Cicinelli MV, et al. Choroid morphometric analysis in non-neovascular age-related macular degeneration by means of optical coherence tomography angiography. *British Journal of Ophthalmology* 2017;101:1193-1200.
57. Mullins, et al. "Choriocapillaris Vascular Dropout Related to Density of Drusen in Human Eyes with Early Age-Related Macular Degeneration." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52.3 (2011): 1606–1612. *PMC*. Web. 12 July 2018.
58. Borrelli et al. Alteration in choriocapillaris in intermediate age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017
59. Zhang Q, et al. A novel strategy for quantifying choriocapillaris flow voids using swept-source OCT angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:203– 211. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22953>.
60. Lane M, et al. Visualizing the choriocapillaris under drusen: comparing 1050-nm swept-source versus 840-nm spectral-domain optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:OCT585–OCT590. DOI:10.1167/iovs.15-18915
61. Alten, F., et al. Exploring choriocapillaris under reticular pseudodrusen using OCT-Angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2016) 254: 2165. <https://doi.org/10.1007/s00417-016-3375-1>