



Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche,  
Diagnostiche e Pediatriche  
Università degli Studi di Pavia  
Fondazione IRCCS “Policlinico S. Matteo”  
**Sezione di Clinica Oculistica**  
(Direttore: Prof. P. E. Bianchi)



# FONDAZIONE IRCCS POLICLINICO SAN MATTEO PAVIA

**STRUTTURA COMPLESSA DI OCULISTICA**

**DIRETTORE: PROF. P.E. BIANCHI**

**BANCA DEGLI OCCHI DI PAVIA "F. TRIMARCHI"**

**RESPONSABILE: Dott. R. CECCUZZI**

# MICROSCOPIA SPECULARE ENDOTELIALE IN EYE BANKING

R. Ceccuzzi, M. Di Palma, G. Mantegna

# Microscopia speculare endoteliale

- Metodica non invasiva di analisi dell'endotelio
- Utilizzata nell'eye banking in :
  - Conservazione a freddo (+4° C)\*
  - Screening pre organocoltura (+31° C)

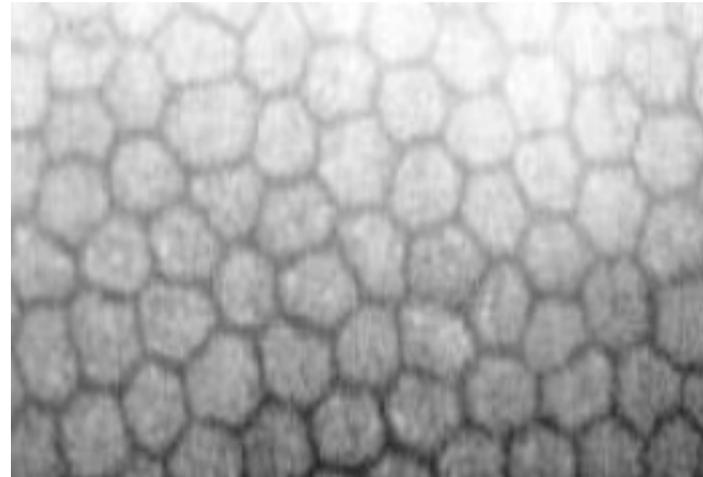
\* (Anche pre/post cut evaluation in EBAA medical standards)

# Argomenti

- Endotelio
- Microscopia speculare:
  - Principi ottici
  - Strumentazione
  - Parametri quantitativi
  - Analisi qualitative

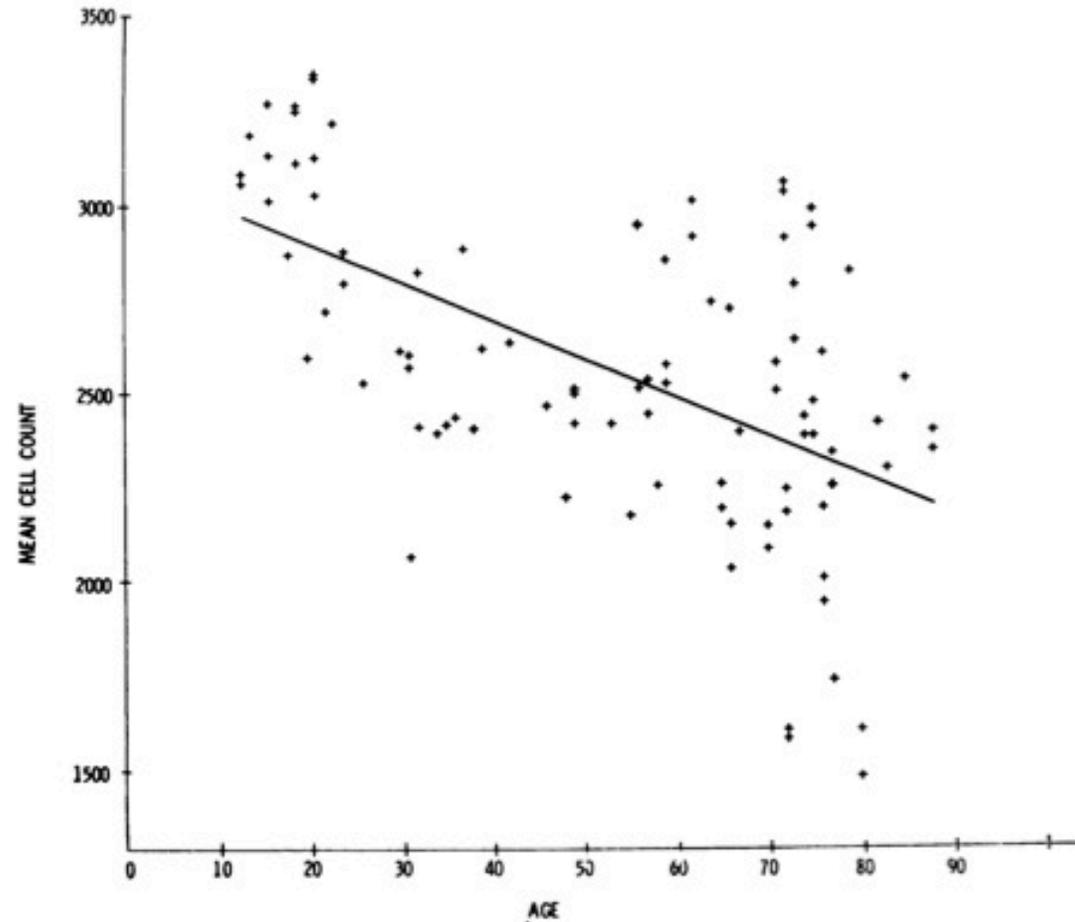
ENDOTELIO

- **Monostrato di cellule perenni**
- **Superficie posteriore della membrana di Descemet**
- **Morfologia prevalentemente esagonale (pattern a nido d'ape)**



- Nei giovani adulti la densità endoteliale media è 3500 cell/mm<sup>2</sup>
- La densità endoteliale subisce un graduale fisiologico declino in funzione dell'età
- La perdita endoteliale fisiologica è stata stimata a 0.56% per anno

(Murphy C., Invest Ophthalmol Vis Sci 1984)



- **La densità media per età ha tuttavia un ampio range di variazione**

(Sturrock G.D. bjo 1978)

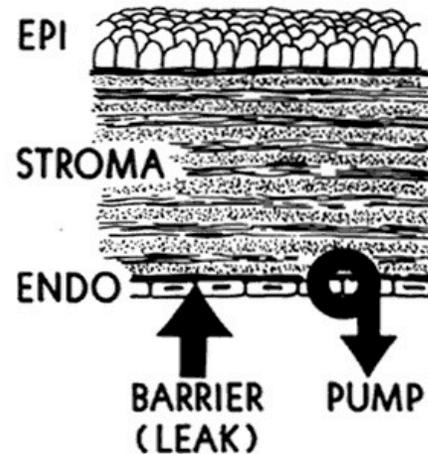
**Funzione principale dell'endotelio:**

**Mantenere costante (78%) il  
contenuto idrico dello stroma corneale**



**Spessore (~520 $\mu$ m) e Trasparenza**

## ENDOTHELIAL BARRIER AND PUMP

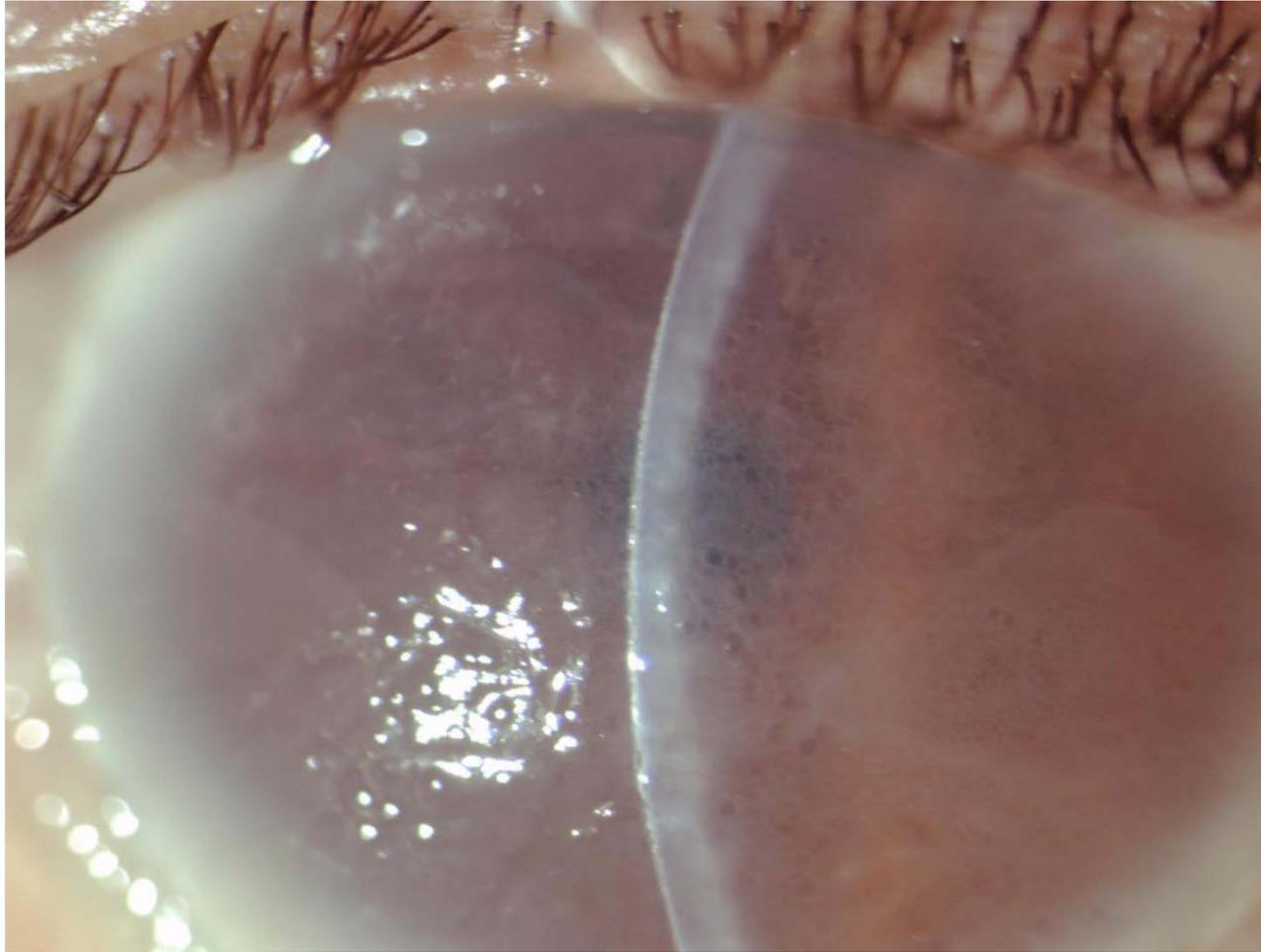


LEAK RATE =  
METABOLIC PUMP RATE

- 1) 78% H<sub>2</sub>O
- 2) MAINTENANCE CORNEAL THICKNESS

Due meccanismi in equilibrio:

- Barriera endoteliale incompleta con parziale passaggio di fluidi nello stroma
- Meccanismo di trasporto attivo di ioni bicarbonato verso la camera anteriore con relativo passaggio acqua

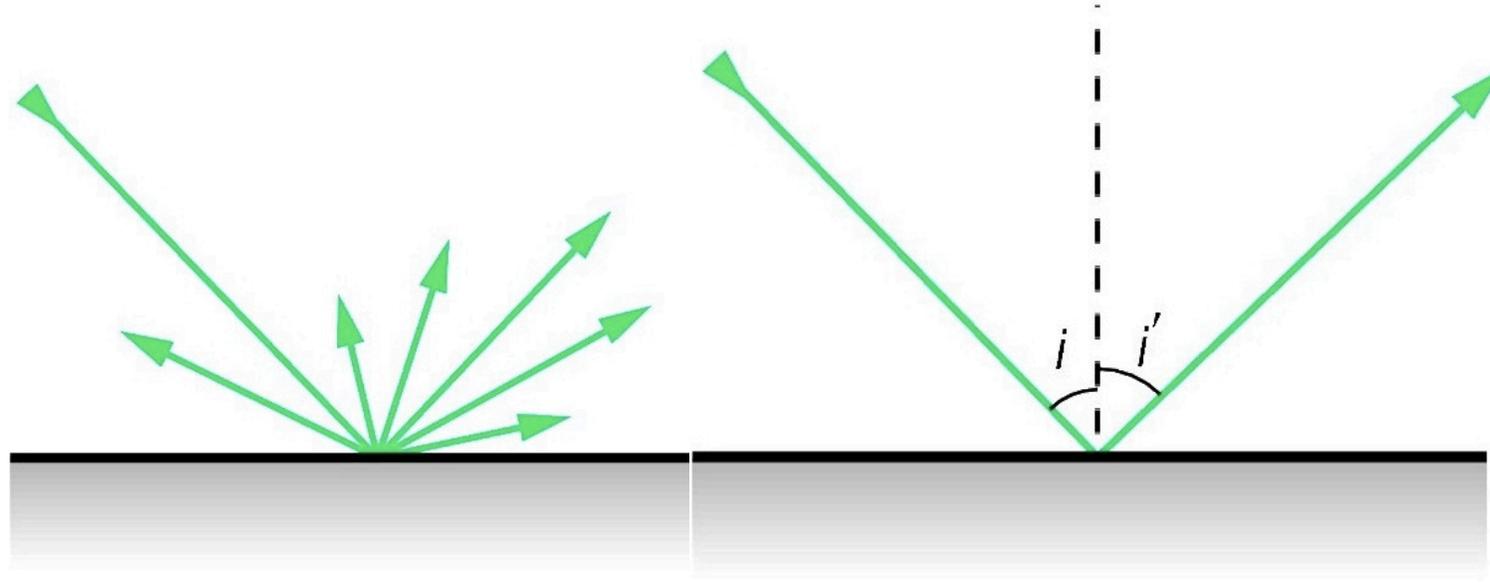


- **Alterazione della funzione di barriera**
- **Blocco del meccanismo attivo di trasporto**
- **Massiva riduzione della densità endoteliale (<400 cell/mm<sup>2</sup>)**

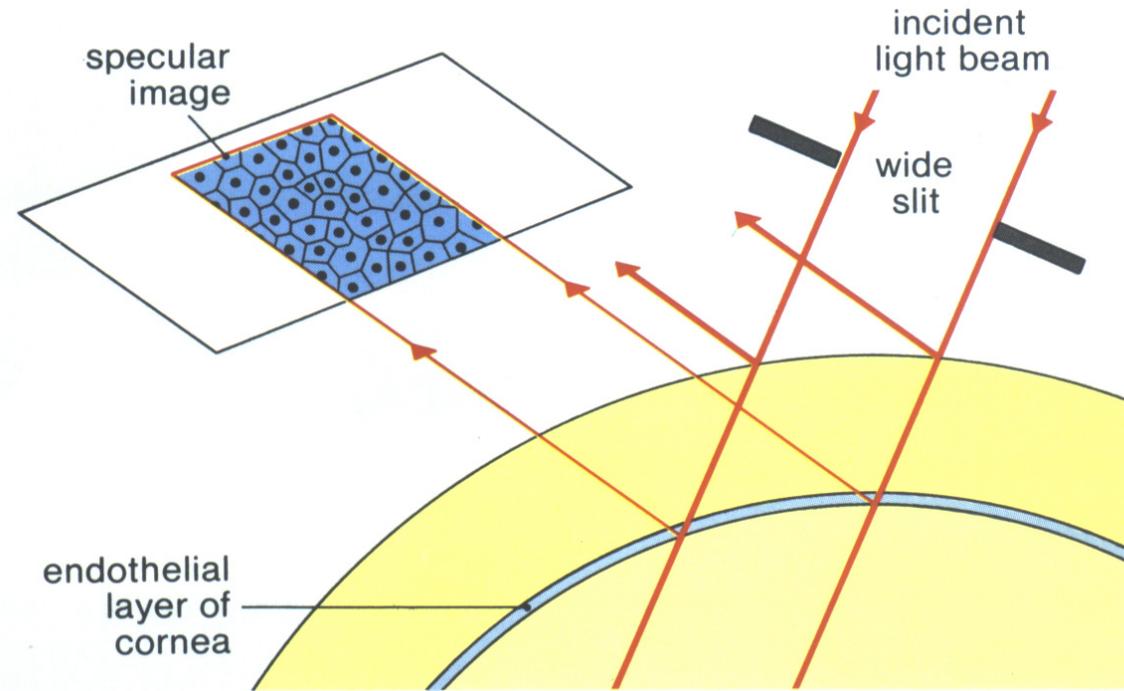
**EDEMA CORNEALE**

# MICROSCOPIA SPECULARE

# Principi Ottici



- La luce incidente su una superficie può essere riflessa (oltre che assorbita e rifratta)
- Una piccola porzione di luce è riflessa specularmente: l'angolo di riflessione è uguale all'angolo di incidenza

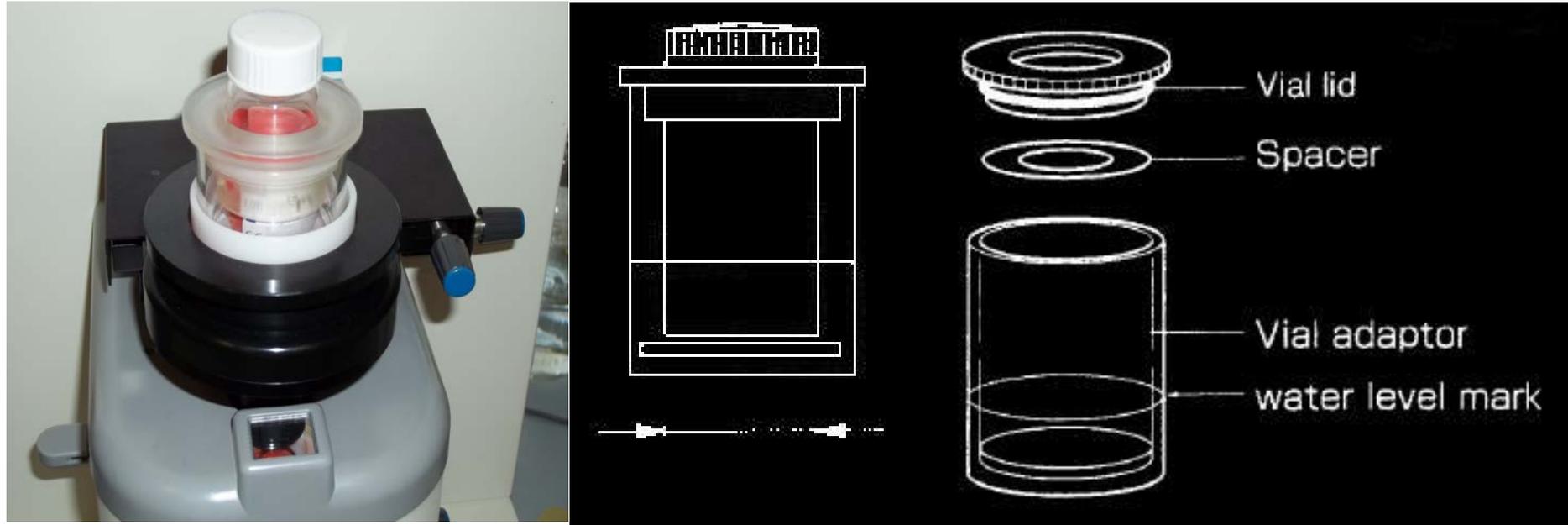


- Quando un raggio di luce attraversa un mezzo non omogeneo ad ogni interfaccia parte della luce viene riflessa
- La luce riflessa specularmente dalla superficie corneale posteriore viene raccolta attraverso un sistema focalizzato

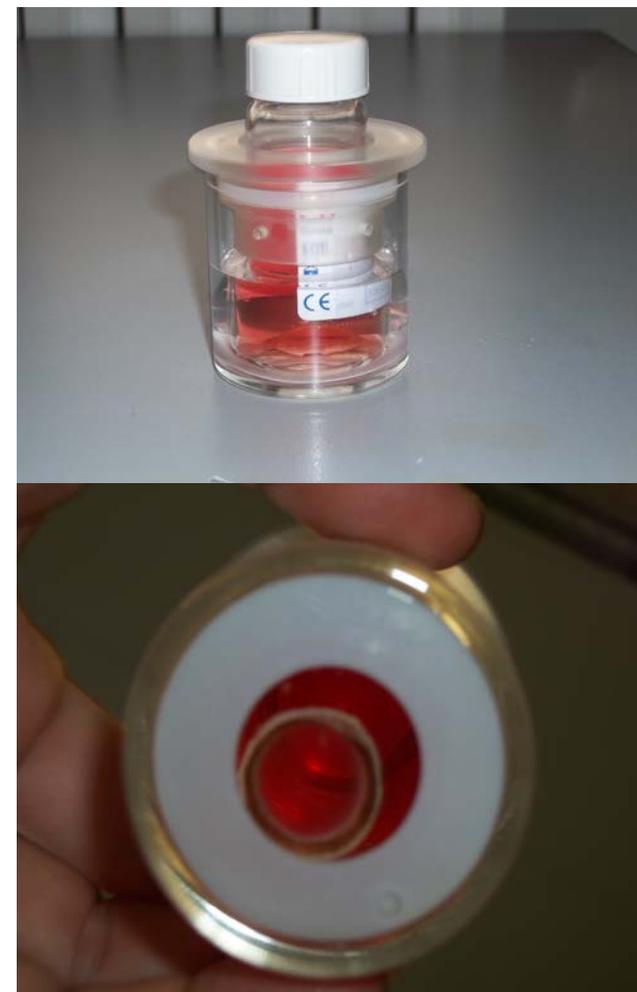
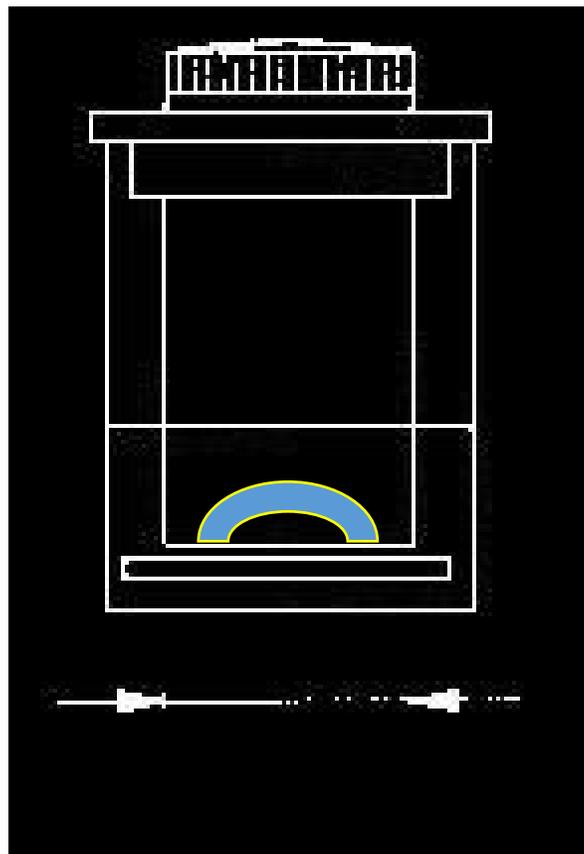
# Strumentazione



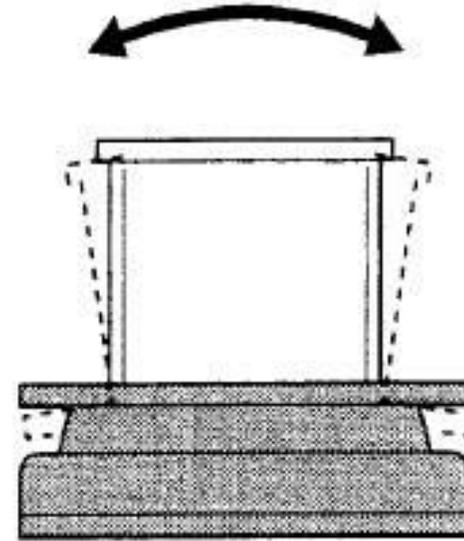
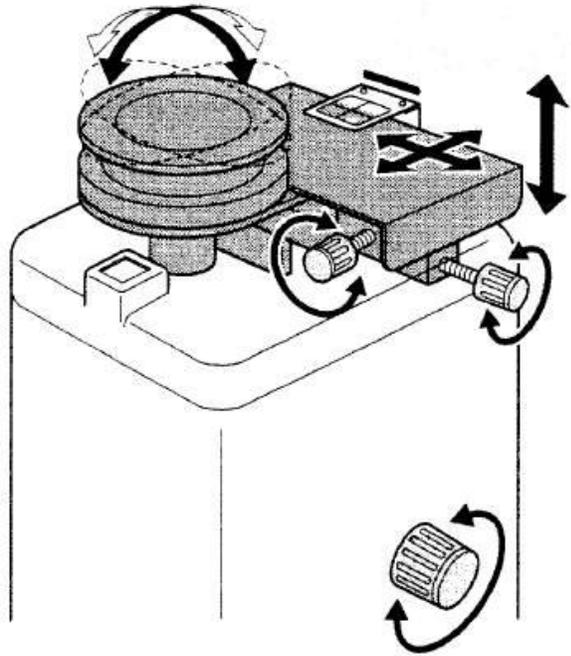
- Si utilizza uno specifico microscopio dotato di:
  - Videocamera integrata
  - Software di analisi
  - Dispositivo di pachimetria ottica



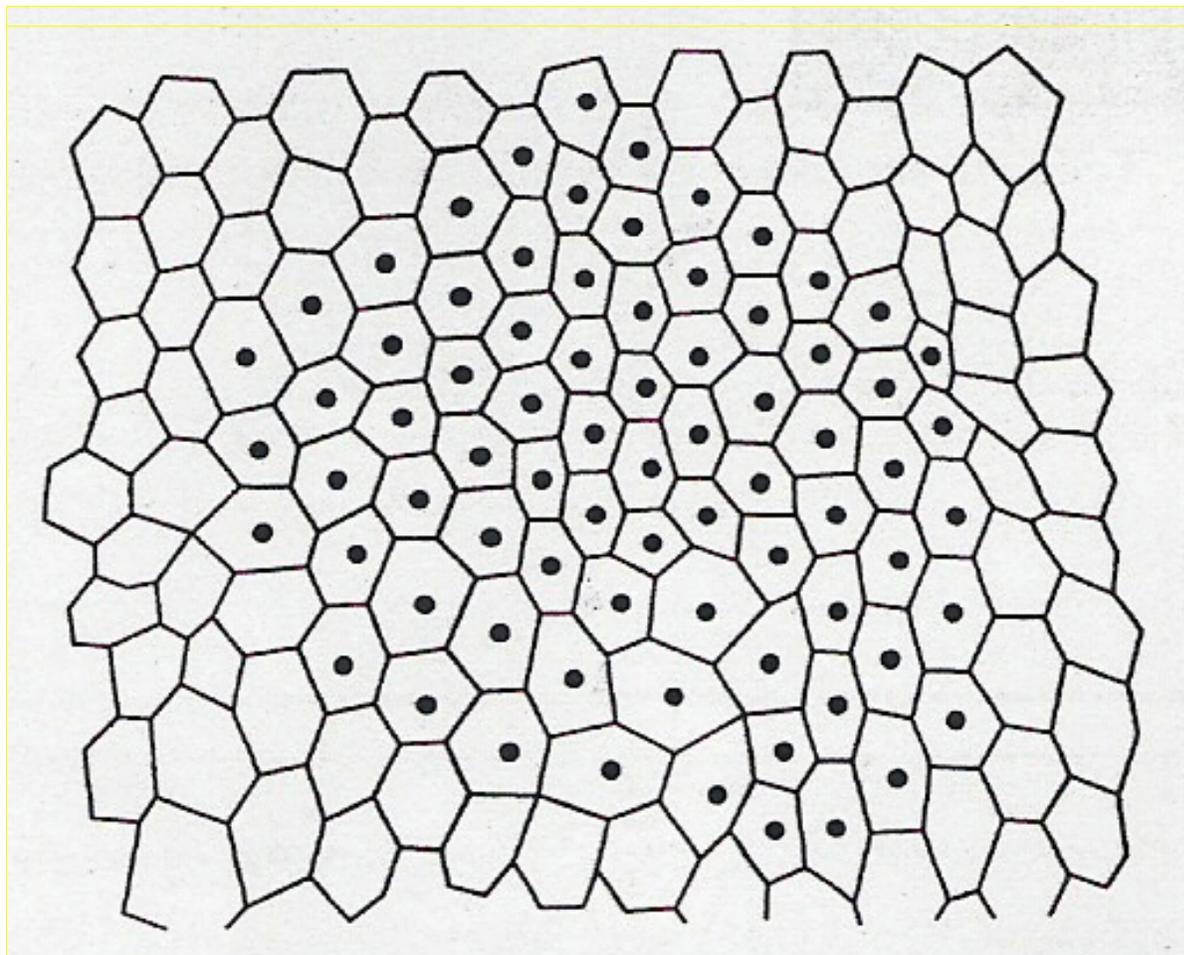
**Il flacone con liquido di conservazione o la viewing chamber si posiziona nell'apposito alloggiamento**



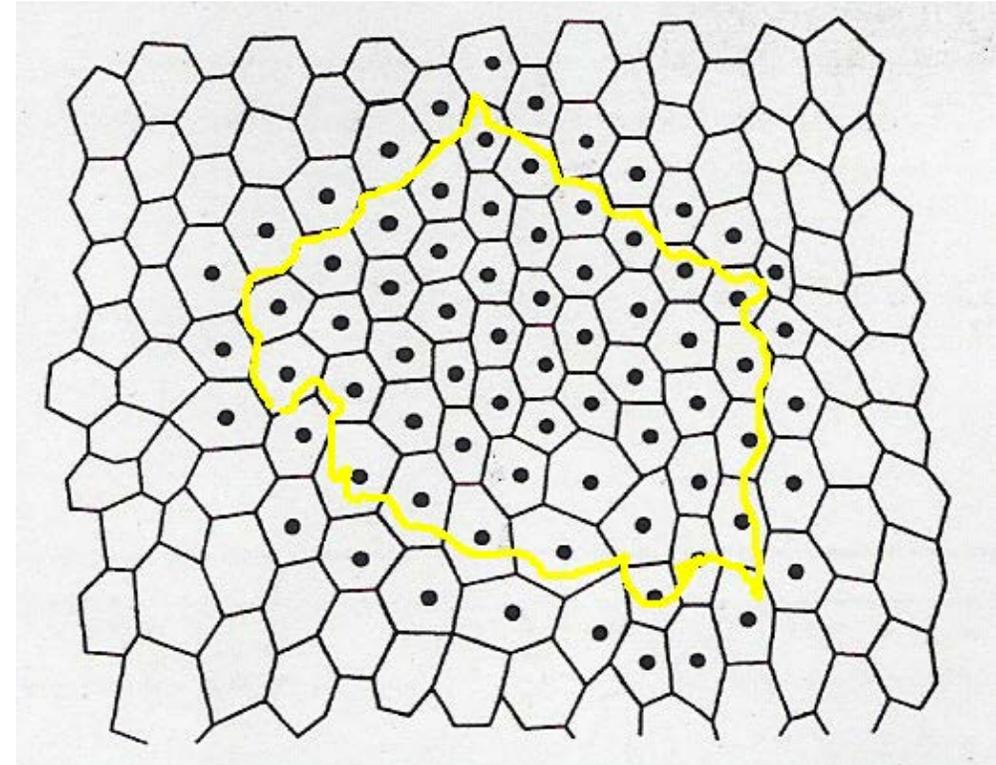
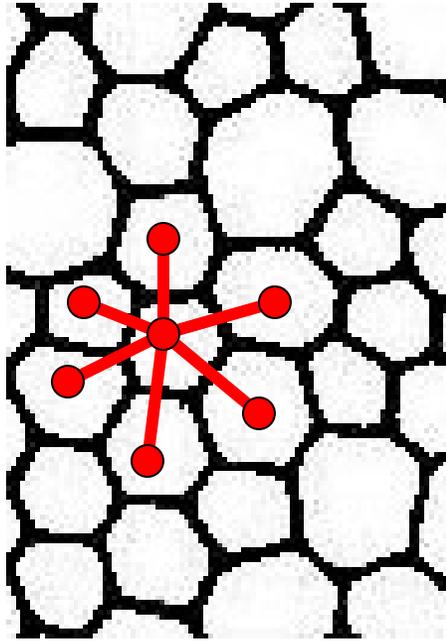
La cornea è posizionata sul fondo del  
flacone con il lato endoteliale verso il basso



- *Gli snodi permettono un movimento sugli assi  $x$ ,  $y$ ,  $z$ .*
- *L'alloggiamento basculante permette di inclinare il tessuto rispetto alla fessura del microscopio*

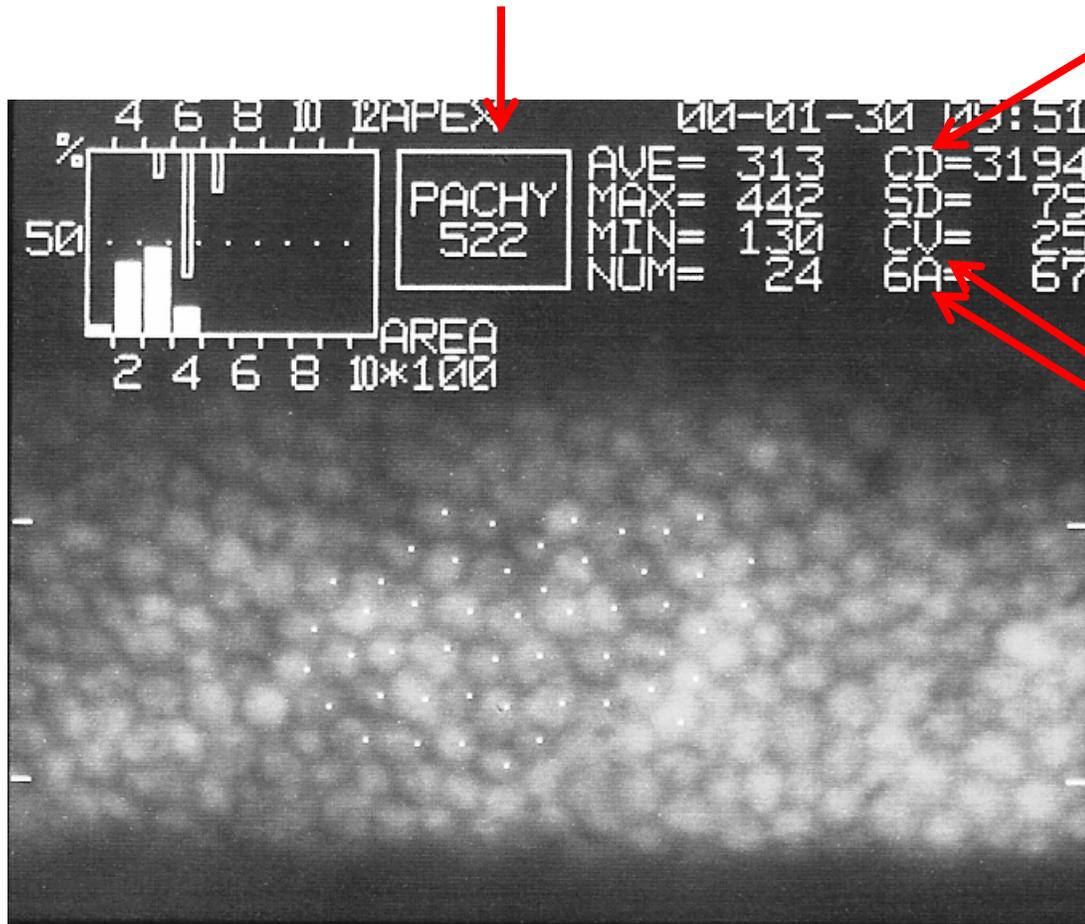


- Il software permette di effettuare la conta endoteliale con metodica "Center Method"



- Inserendo il centro di ciascuna cellula il software determina i margini e calcola l'area mediante i pixel corrispondenti
- Le cellule periferiche sono escluse non essendo interamente circondate da altre cellule inserite

# Parametri quantitativi



I parametri più importanti sono:

- Densità endoteliale (CD)
- Coefficiente di variazione (CV)
- Esagonalità (6A)
- Pachimetria ( $\mu\text{m}$ )

# Densità endoteliale (CD)

Densità cellulare (cell/mm<sup>2</sup>) = 10<sup>6</sup>/area cellulare media

Es: Area cell media = 346 μm<sup>2</sup>

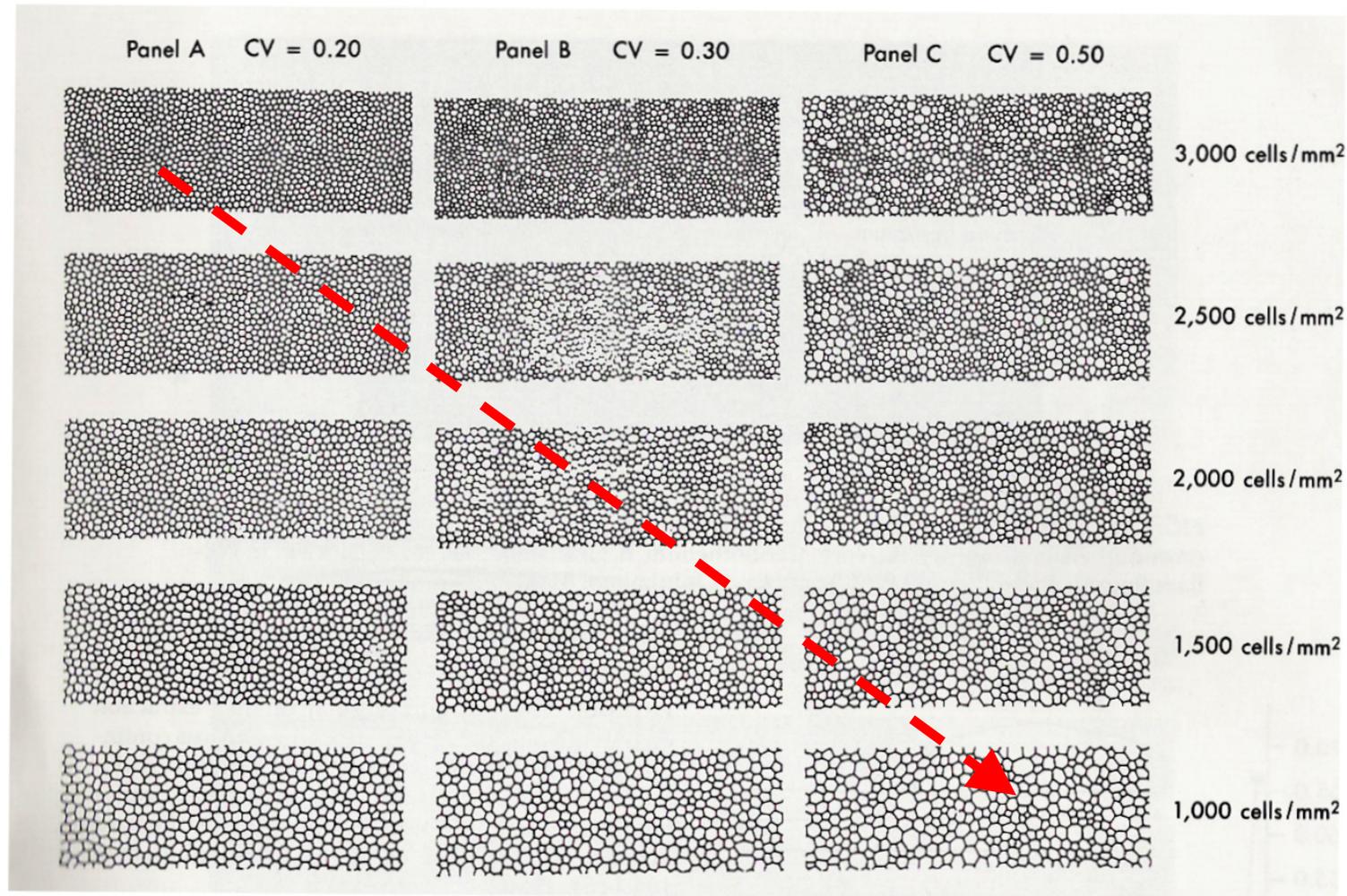
CD = 10<sup>6</sup>/346 = 2890 cell/mm<sup>2</sup>

# Coefficiente di variazione (CV)

Coefficiente di variazione =  $SD / \text{area cellulare media}$

Valori normali 0.25 - 0.30

Valori elevati significano una notevole variabilità delle dimensioni cellulari che viene denominata **POLIMEGATISMO**



- Cornee con la stessa CD possono avere differenti CV
- La sola CD non evidenzia la stabilità corneale
- La freccia rossa indica la "direzione d'instabilità"

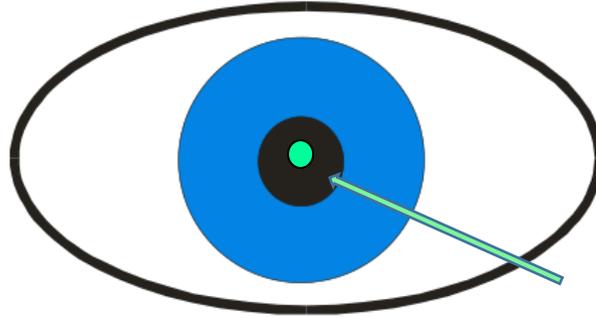
# Esagonalità (6A)

esagonalità = % cellule con 6 lati

Valori normali > 50%

Elevato numero di cellule con più o meno di sei lati indica instabilità cellulare ed è denominato **POLIMORFISMO**

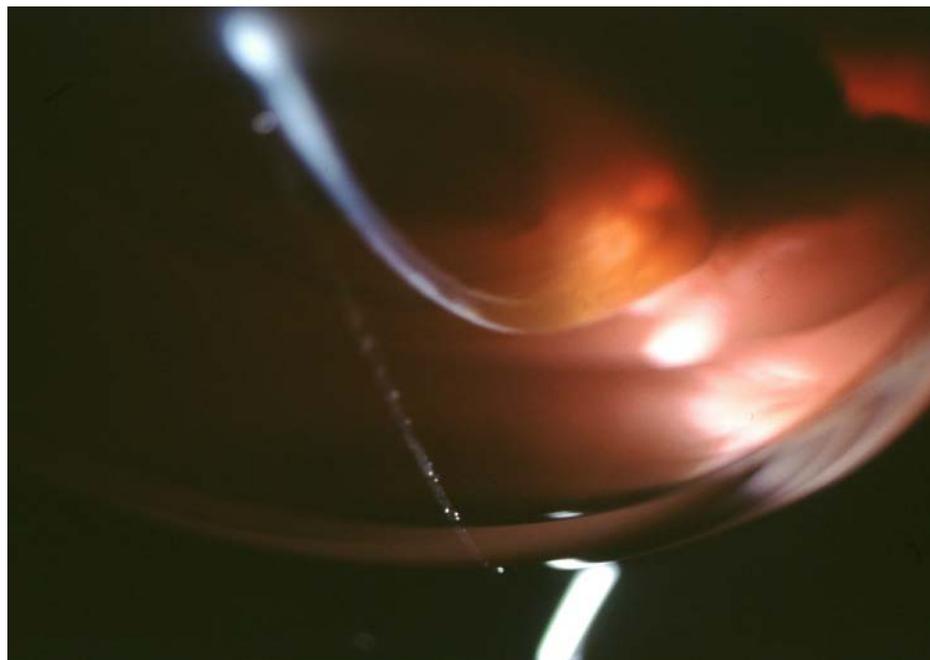
## Importante ricordare che:



- Il microscopio speculare analizza una piccola area centrale (<math>< 1 \text{ mm}^2</math>) anche con misurazione multiple

### Alcuni AA hanno riportato che:

- La CD assiale è un buon indicatore della CD totale
- Un deficit cellulare periferico può essere dedotto da:
  - Marcato pleomorfismo e polimegatismo
  - CD significativamente più elevata nell'occhio controlaterale

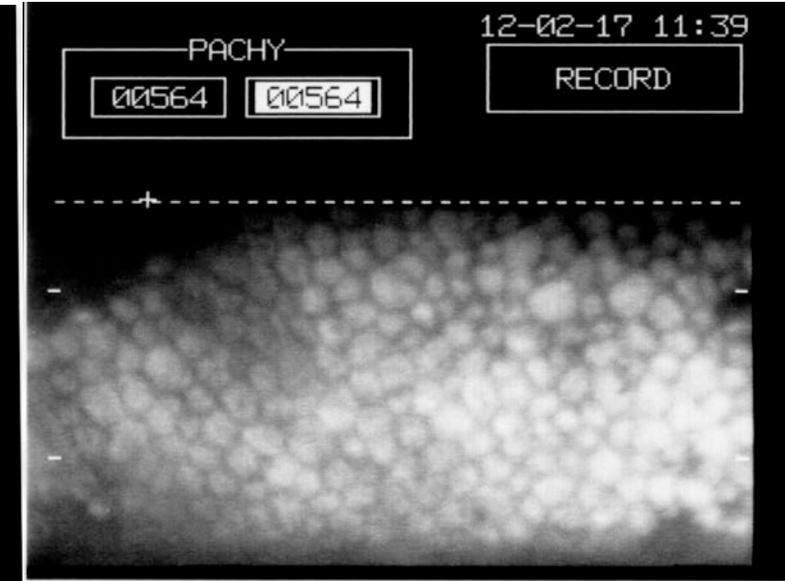
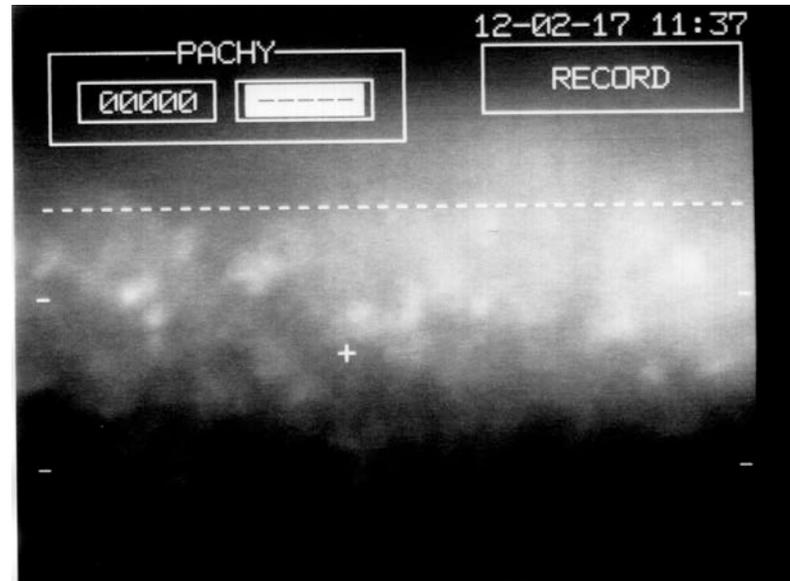


**I dati del microscopio speculare devono sempre essere interpretati congiuntamente ad un esame del tessuto alla lampada a fessura**

# Pachimetria ( $\mu\text{m}$ )

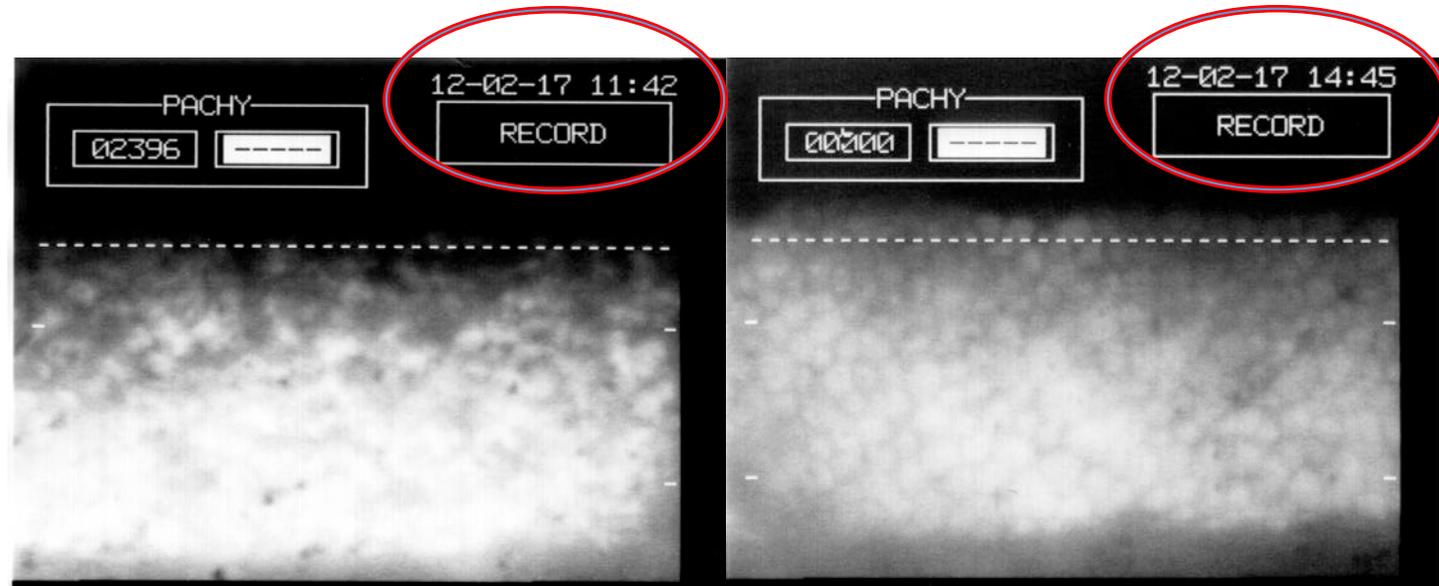
Pachimetria ottica con modalità "manuale":

- si azzera la scala micrometrica focalizzando l'epitelio
- si legge il valore focalizzando sull'endotelio (distanza ep-end)
- V.N. >  $500\mu\text{m}$  (attendibile solo per "valori estremi")



# Analisi qualitative

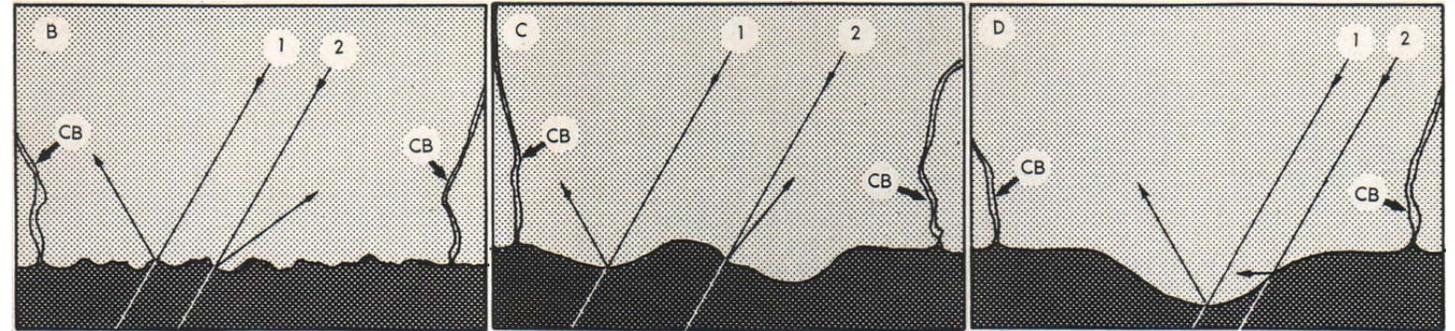
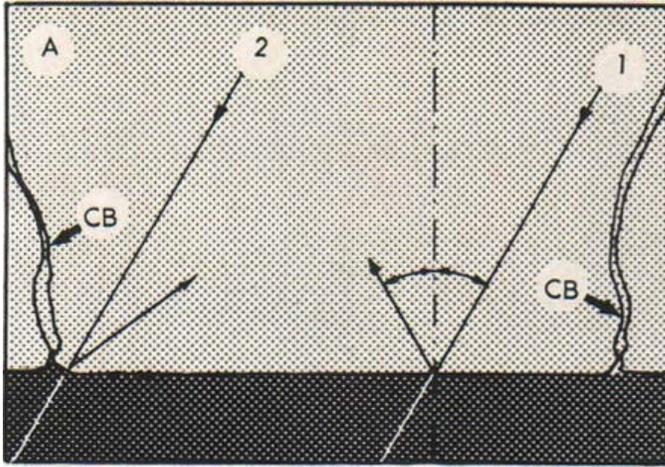
- Prima di iniziare l'esame è essenziale riportare il tessuto a temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) per evitare artefatti
- La cornea fredda non permette una corretta visualizzazione dell'endotelio: quadro a "ciottoli di fiume"





- E' essenziale riconoscere le strutture normali e quelle patologiche:

**INTERPRETARE IL  
CHIAROSCURO**

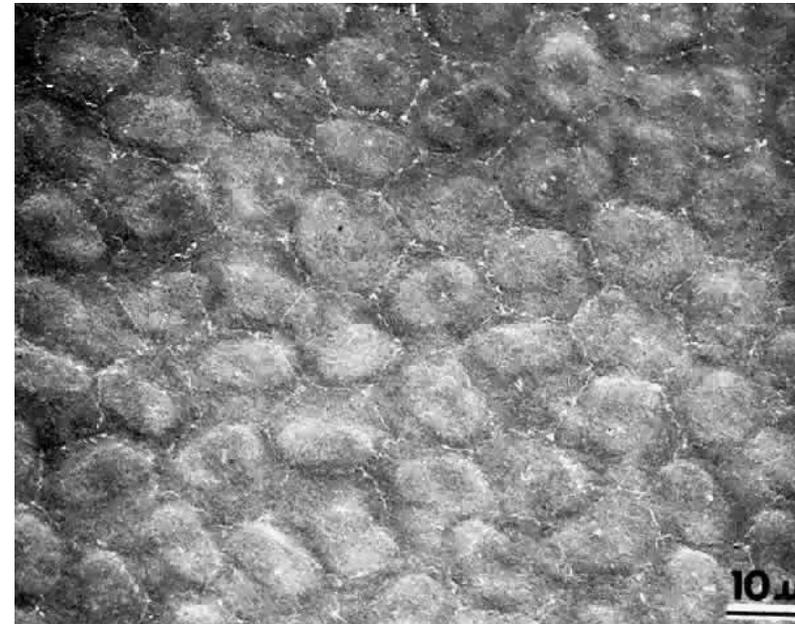
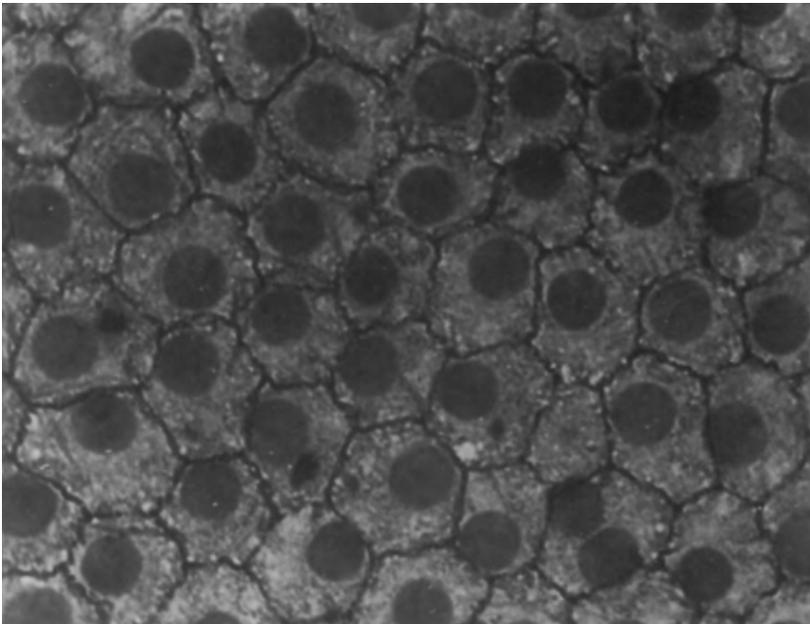


**Le immagini dipendono dalla regolarità della superficie endoteliale:**

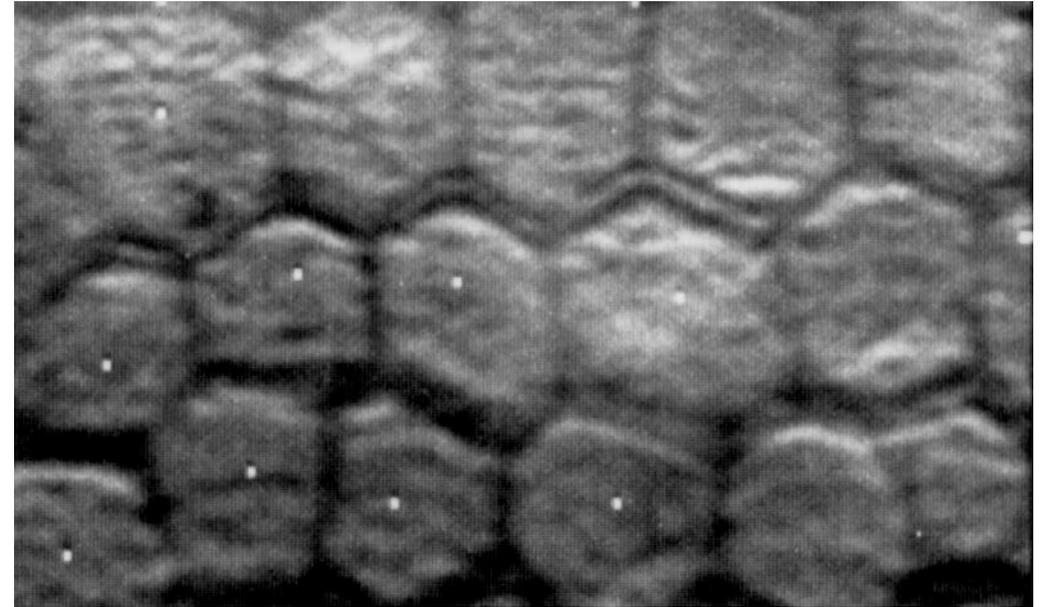
- **Superficie regolare = area più chiara**
- **Superficie rugosa od ondulata = aree non uniformi chiare e scure**
- **Escrescenze posteriori = area scura con apice chiaro**

Alcuni AA hanno **correlato** le **variazioni morfologiche** osservate in microscopia speculare con:

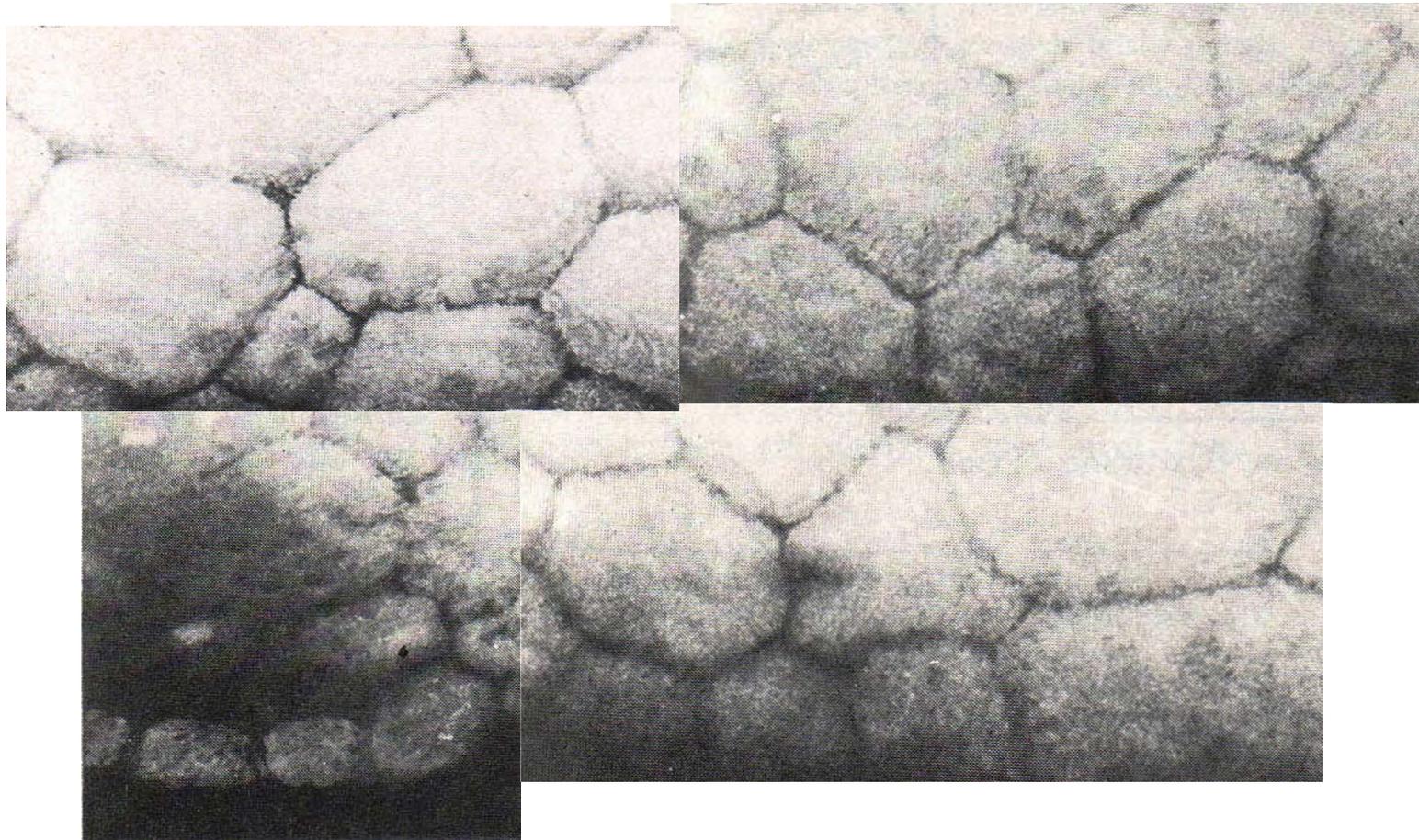
- Preparati istologici in microscopia ottica (Sherrard E.S. 1978)
- Preparati in microscopia elettronica a scansione (Bigar F. 1982)



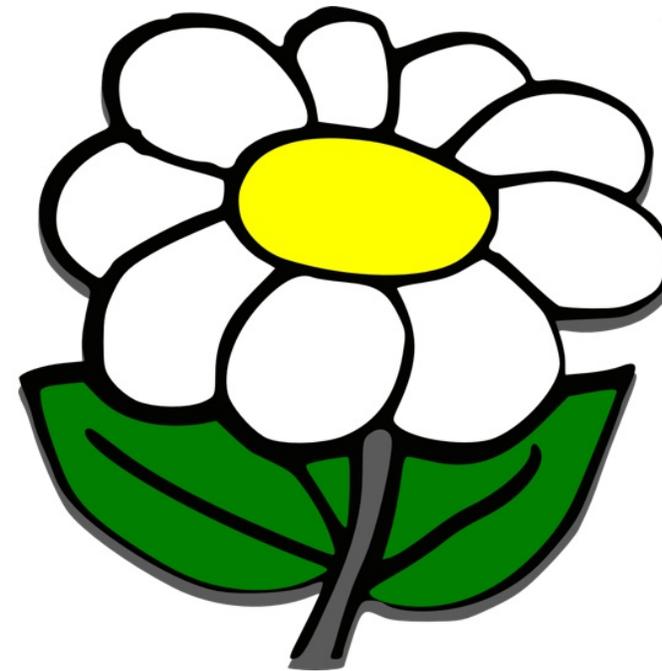
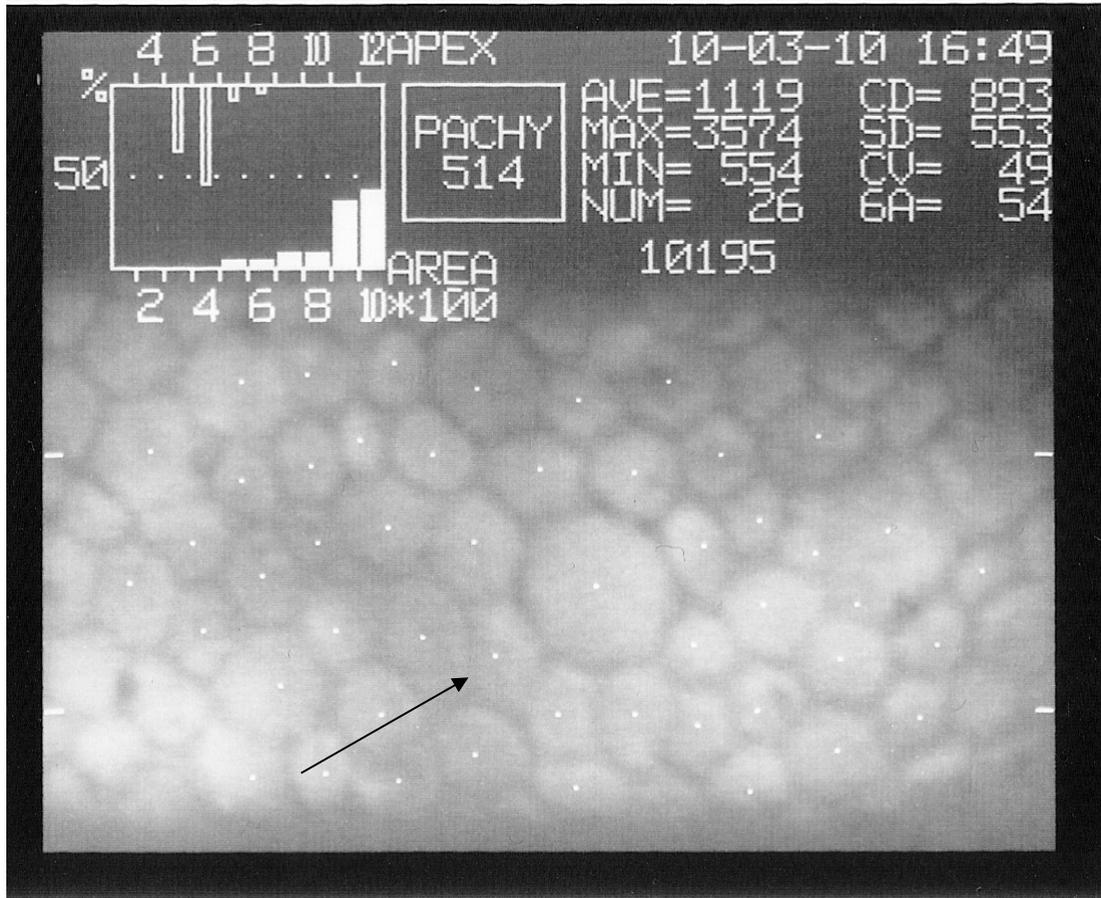
- I **marginari cellulari** appaiono come sottili linee scure
- La differenza di altezza fra cellule contigue simula dei **marginari doppi**



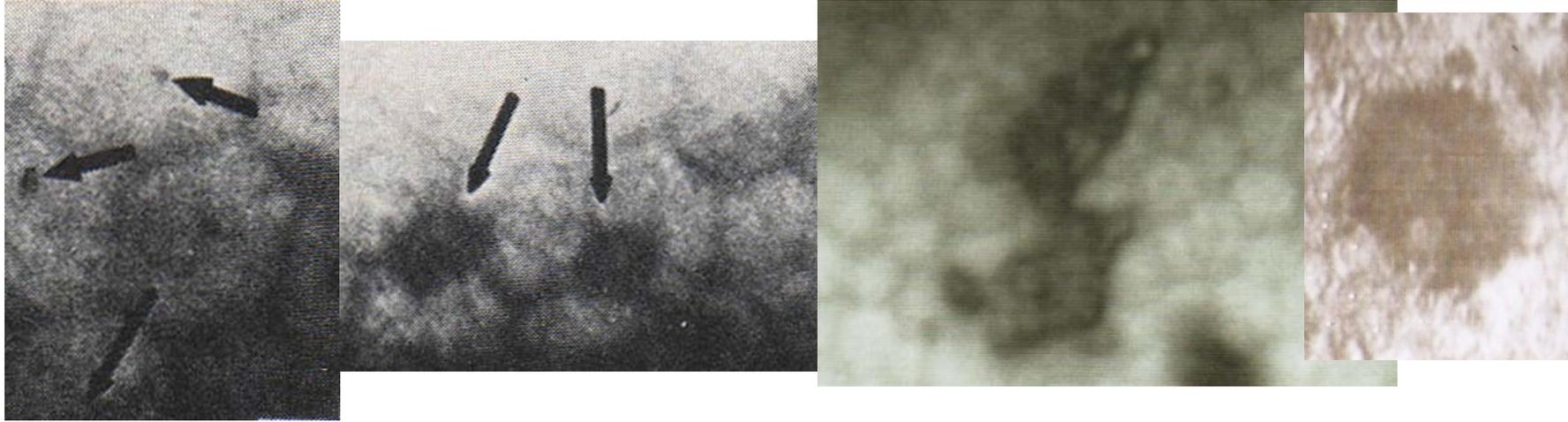
- La **forma** prevalente è quella **esagonale**
- Nel caso di **polimorfismo**, che consegue a sofferenza cellulare, si osservano quadri cellulari variegati: cellule giganti, allungate, compresse, indentate e...



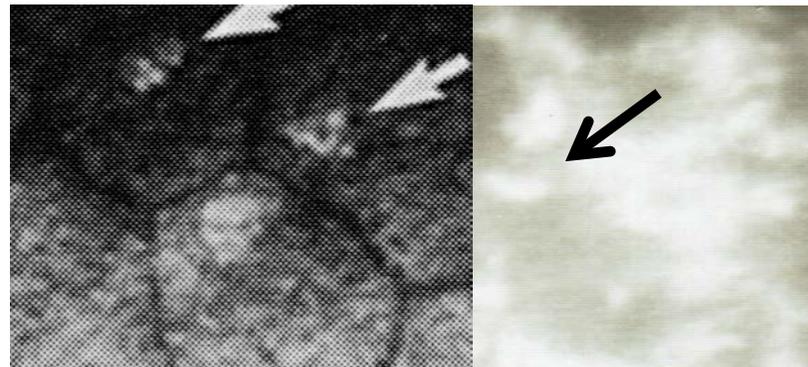
- ...a "margherita"



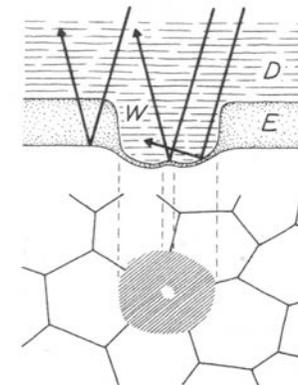
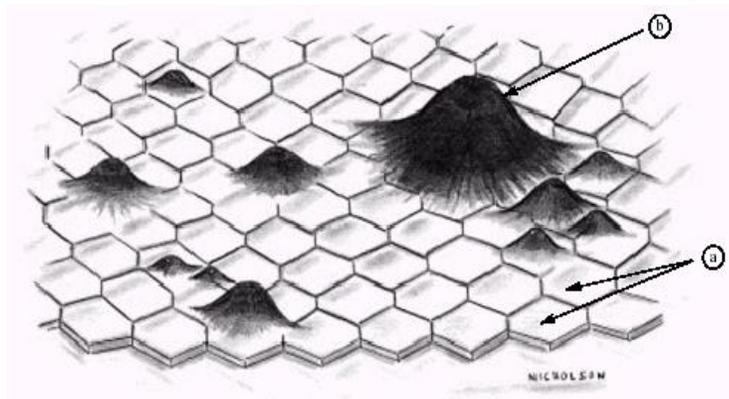
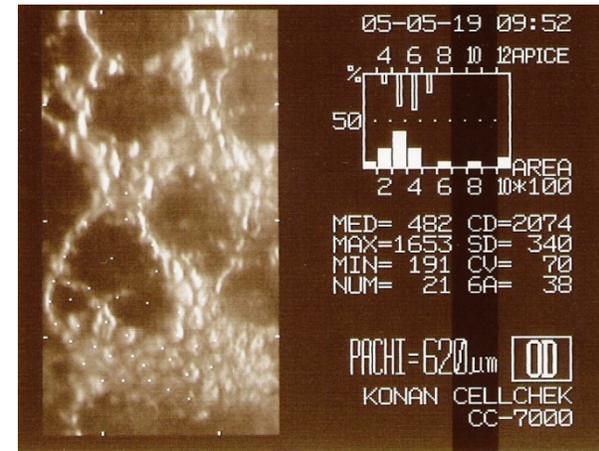
- **Aree scure** rappresentano: cilia, vacuoli o blebs, globuli rossi, depositi di pigmento



- **Aree chiare** rappresentano: nuclei, leucociti adesi, corpi ialini

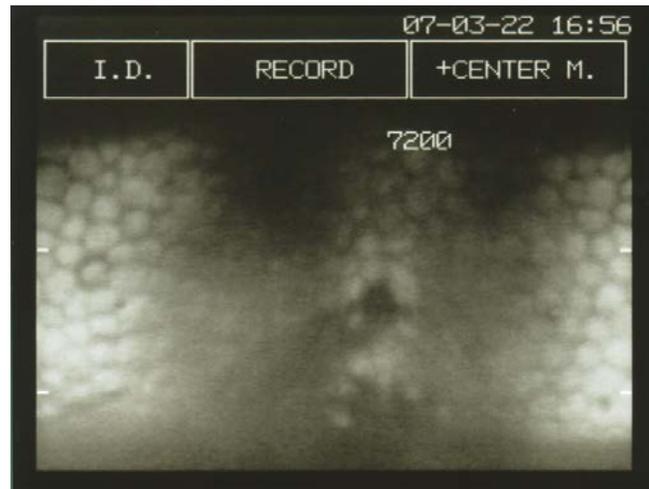


- Nella **distrofia di Fuchs** le cellule endoteliali mostrano escrescenze verrucoidi: guttae



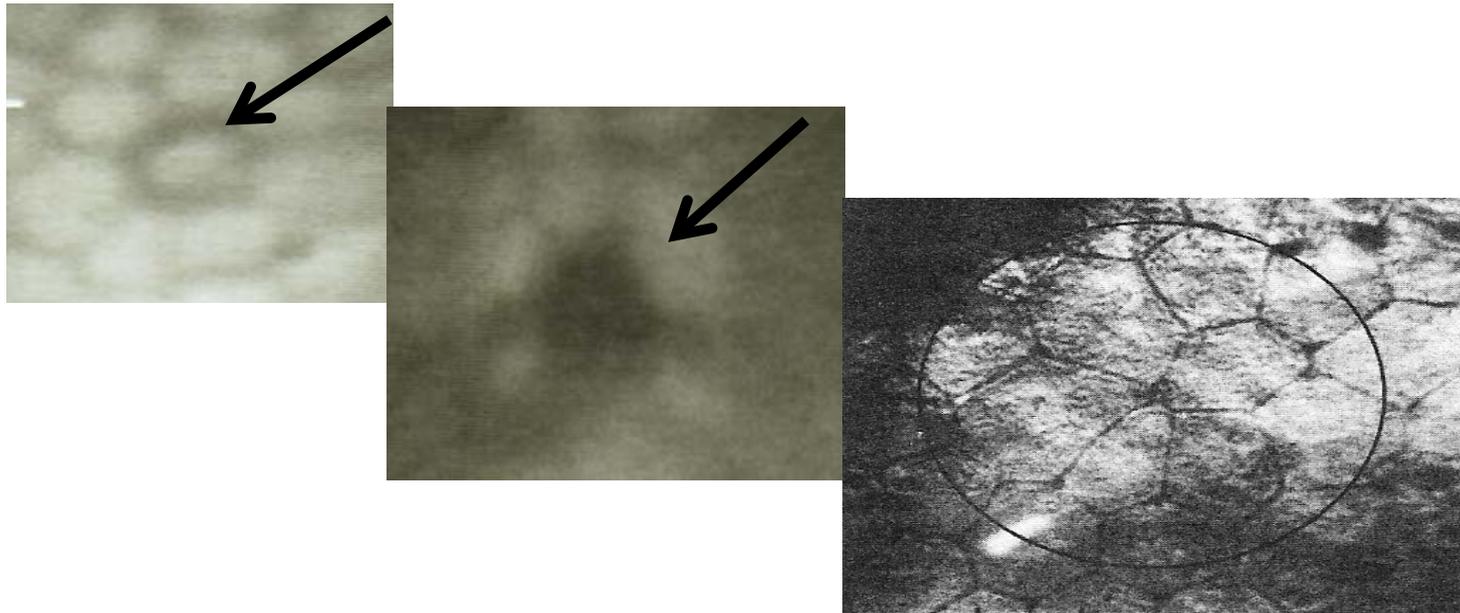
Nella gutta si ha una dispersione della luce (**area scura**) e una riflessione della luce (**area chiara**)

- Le **pieghe** sono la manifestazione fisica dell'edema corneale
- Possono essere **lievi, moderate o severe**
- Popolate con cellule normali o sofferenti - necrotiche

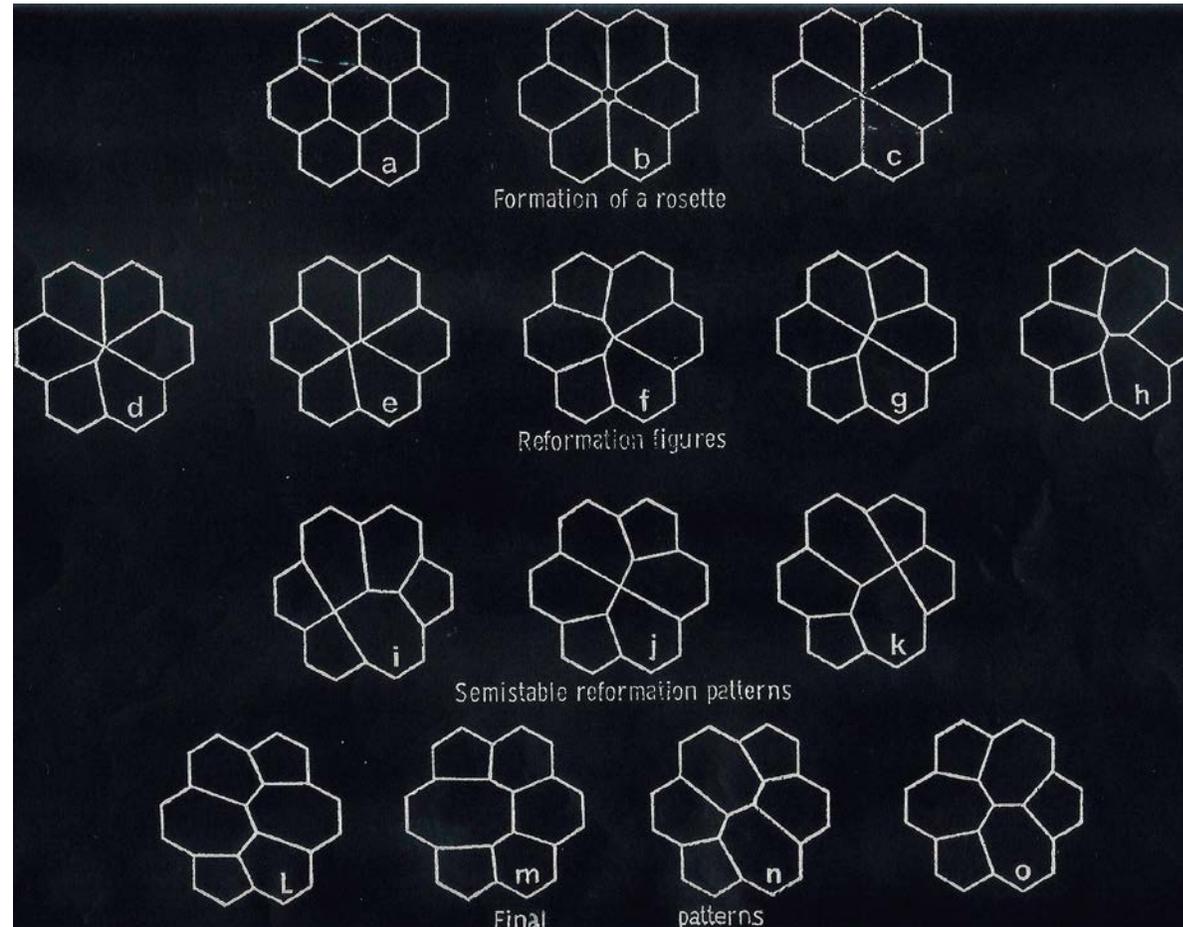


## Evoluzione della necrosi cellulare

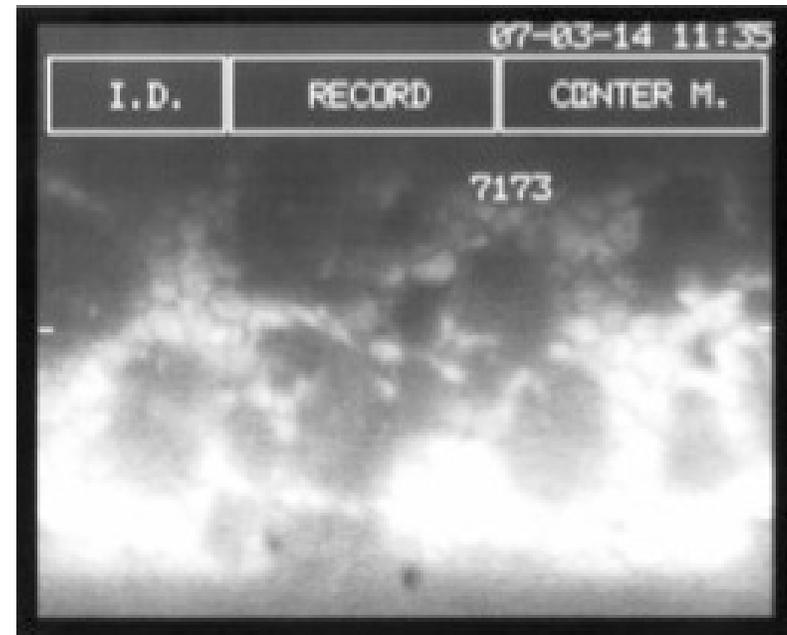
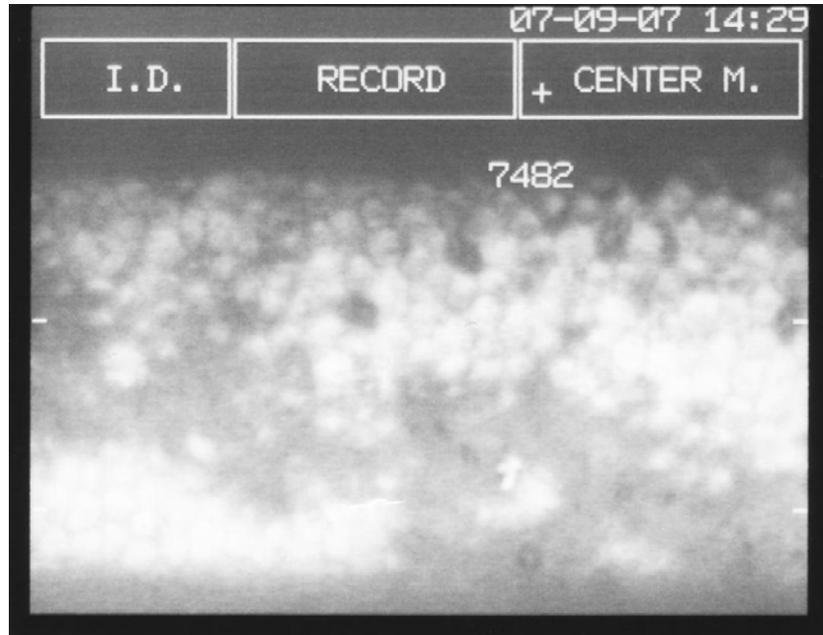
- La cellula ha inizialmente un aspetto rigonfio e margini sfumati
- Successivamente si ha necrosi della cellula (residuano detriti cellulari)
- L'ultimo stadio è rappresentato dalla migrazione delle cellule circostanti che si modificano per coprire la lacuna (**rosetta**)



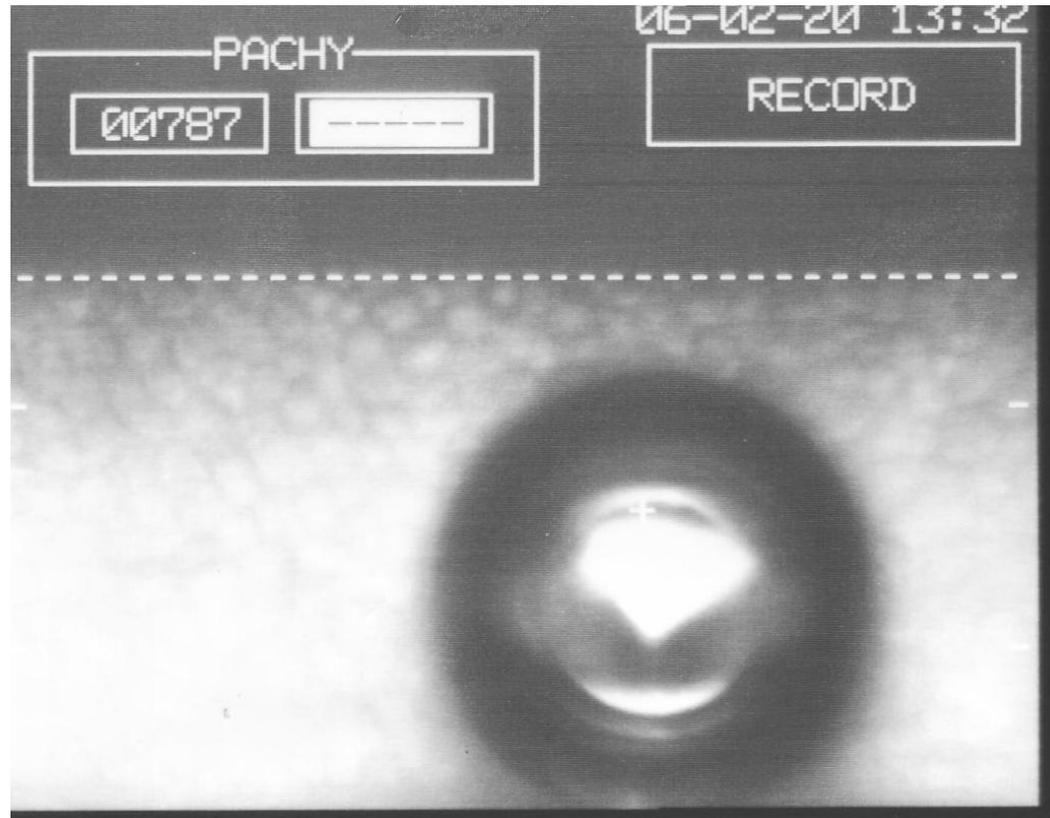
# Evoluzione delle cellule circostanti la cellula necrotica



From: Steffen Sperling - Courtesy of Birte Olesen - Danish Cornea Bank



Ampie **chiazze scure** rappresentano aree di necrosi cellulare massiva (per es: lesioni post traumatiche)



??????????

# Conclusioni

- La microscopia speculare nonostante la ridotta superficie d'esame risulta essere una metodica:
- Facile, rapida ed accurata
- A basso costo
- Non invasiva poichè la visualizzazione attraverso i flaconi di conservazione riduce la manipolazione e conseguentemente il rischio di traumi e contaminazioni
- E' quindi l'esame di scelta nella conservazione a freddo e un utile screening pre organocoltura



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**