

(130)

Badanie autofluorescencji dna oka z zastosowaniem konfokalnego skaningowego oftalmoskopu laserowego HRA (Heidelberg Retina Angiograph)

Fundus Autofluorescence examination using a confocal Scanning Laser Ophthalmoscope HRA (Heidelberg Retina Angiograph)

Joanna Dolar-Szczasny¹, Jerzy Mackiewicz¹, Almut Bindewald², Frank G. Holz², Zbigniew Zagórski¹

¹Z Katedry i I Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zbigniew Zagórski

²Z Kliniki Okulistycznej Uniwersytetu w Bonn

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Frank G. Holz

Summary: Purpose: To present application of a confocal Scanning Laser Ophthalmoscope (cSLO) for fundus autofluorescence examination, as a new method of visualization of retinal pigment epithelium and its possible significance in the diagnosis of different retinal diseases.

Material and methods: Typical autofluorescence images in age-related macular degeneration (AMD), Stargardt disease, Best disease and pattern dystrophies are presented, based on the own experience and literature data. Autofluorescence images were obtained with a cSLO using an argon laser for generation of excitation light at 488 nm and a barrier filter >500 nm for the detection of the emitted signals.

Results: A variety of autofluorescence patterns, associated with the accumulation of lipofuscin in RPE cells, was found in the above entities.

Conclusions: Presented method of fundus autofluorescence examination gives new possibilities in studying the pathogenetic mechanisms in various retinal diseases and may be useful in monitoring the follow-up and the effects of the treatment.

Słowa kluczowe: autofluorescencja, konfokalny skaningowy oftalmoskop laserowy, lipofuscyna, nabłonek barwnikowy siatkówki, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem.

Key words: autofluorescence, confocal scanning laser ophthalmoscope, lipofuscin, retinal pigment epithelium, age-related macular degeneration.

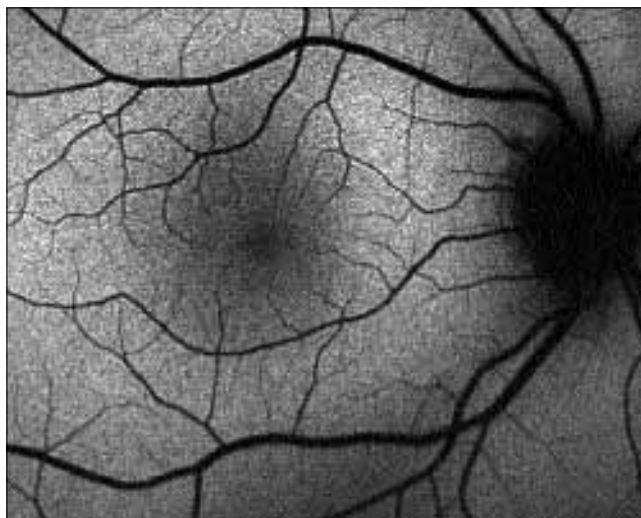
Wprowadzenie

Technika badania autofluorescencji dna oka została po raz pierwszy opisana w 1995 roku przez Rückmanna i wsp. (13). Na podstawie badań spektrofotometrycznych dna oka oraz badań *in vitro* za najważniejsze źródło autofluorescencji dna oka uważa się lipofuscynę (LP) zawartą w nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE) (4-8).

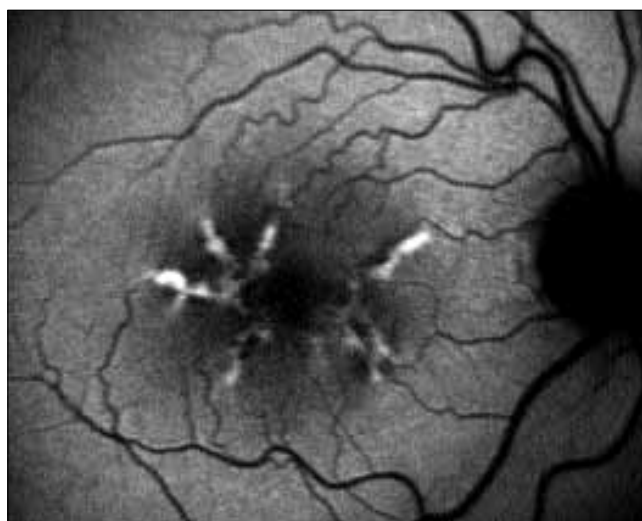
Obrazowanie RPE *in vivo* sprawiało dotychczas wiele problemów. Powody tego były różne, m. in. właściwości optyczne oka oraz mały rozmiar elementów komórkowych tworzących pojedynczą warstwę pomiędzy siatkówką neurosensoryczną a błoną Brucha. Wprowadzenie do diagnostyki skaningowego oftalmoskopu laserowego umożliwiło obrazowanie topograficznego rozkładu

intensywności autofluorescencji dna oka pochodzącej z lipofuscyny nagromadzonej w przedziałach lizosomalnych komórek RPE. Nadmierna akumulacja lipofuscyny w cytoplazmie RPE ma miejsce nie tylko w procesie starzenia się, ale także w związku z wieloma dziedzicznymi i zwyrodnieniowymi chorobami siatkówki, takimi jak zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD), choroba Stargardta, choroba Besta czy inne dystrofie plamkowe (pattern dystrophies). Choroby te, pomimo różnej etiologii, charakteryzuje występowanie podobnych mechanizmów patogenetycznych.

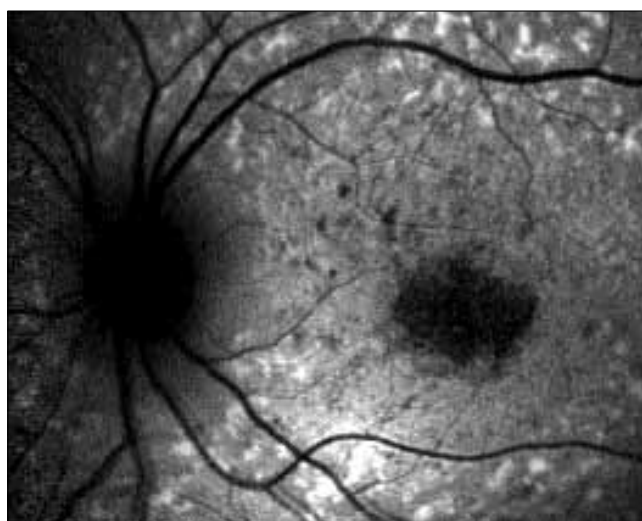
Lipofuscyna w RPE pochodzi głównie z niekompletnej degradacji fagocytowanych dystalnych części zewnętrznych segmentów fotoreceptorów i składa się z różnych biomolekuł: lipidów, protein, a także retinoidów. Ostatnio wykazano, że niektóre retinoidowe



Ryc. 1. Obraz autofluorescencji prawidłowego dna oka.
Fig. 1. Normal fundus autofluorescence image.



Ryc. 2. Obraz autofluorescencji dna oka chorego z dystrofią plamkową (pattern dystrophy).
Fig. 2. Fundus autofluorescence in a patient with pattern dystrophy.



Ryc. 3. Obraz autofluorescencji dna oka chorego z chorobą Stargarda.
Fig. 3. Fundus autofluorescence in a patient with Stargardt disease.

składniki, na przykład A2-E, mają właściwości toksyczne i mogą odgrywać rolę w patogenezie chorób takich, jak AMD (3,12).

Wizualizacja lipofuscyny *in vivo* pozwala na lepsze poznanie znaczenia zmian metabolicznych w patogenezie chorób siatkówki. Dodatkowo obrazowanie autofluorescencji dna oka może być użyteczne w diagnozowaniu dziedzicznych chorób siatkówki. Dynamiczne zmiany zachodzące na poziomie RPE, które powodują zmiany w jego wewnętrznej fluorescencji, mogą zostać wykorzystane do monitorowania efektów nowych rozwiązań terapeutycznych. Co więcej, identyfikacja za pomocą tej techniki charakterystycznych czynników ryzyka u chorych ze zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem może być pomocna w ocenie nowych terapii i planowaniu badań.

Otrzymywanie obrazów autofluorescencji dna oka za pomocą Heidelberg Retina Angiograph (HRA)

Przestrzenne rozmieszczenie i intensywność autofluorescencji dna oka uzyskiwane są w HRA poprzez użycie lasera argonowego o długości fali wzbudzającej 488 nm. Zielona wiązka światła lasera argonowego jest zredukowana przez zastosowanie filtra interferencyjnego do tego stopnia, że stosunek intensywności zielonego do niebieskiego wynosi poniżej 10^{-7} . Padająca wiązka światła laserowego o średnicy 3 mm przechodzi przez źrenicę, która może być farmakologicznie rozszerzona. Światło emitowane odbierane jest po przejściu przez filtr odcinający, który przepuszcza jedynie fale o długości powyżej 500 nm. Artefakty związane z odbijaniem się światła o długości 488 nm w tylnym odcinku oka nie mają wpływu na powstający obraz w związku z tym, że współczynnik zatrzymywania fal niebieskiego światła wzbudzającego przez filtr odcinający wynosi 10^{-6} . Filtr ten redukuje również refleksy powstające na optycznej powierzchni soczewki obiektywu (współczynnik odbicia wynosi ok. 1%).

Obrazy są od razu poddawane obróbce cyfrowej i przetwarzane przez wbudowany procesor, a następnie wyświetlane na ekranie komputera. W celu wzmocnienia sygnału autofluorescencji program analizujący porównuje kilka otrzymanych obrazów, korygując je pod względem ewentualnych ruchów oka, i oblicza tzw. obraz średni.

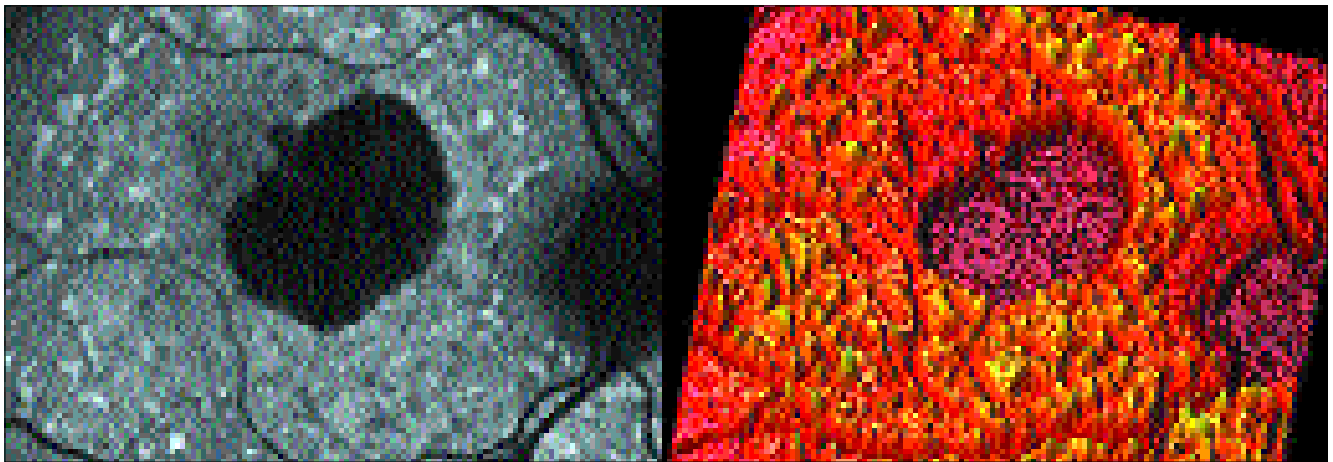
Autofluorescencja w chorobach siatkówki

Prawidłowy rozkład sygnału autofluorescencji odpowiada wynikom badań histologicznych. Największa intensywność przypada na obszar okołodołkowy z obniżeniem się sygnału w samym dołku i zmniejszaniem się sygnału w kierunku obwodu, co koresponduje z gęstością fotoreceptorów (1) (ryc. 1).

Badanie autofluorescencji dna oka ma zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu różnych form AMD, a szczególnie zaniku geograficznego nabłonka barwnikowego siatkówki (10,11).

Obszary zwiększonej autofluorescencji najwyraźniej wskazują na początki zaniku RPE, gdyż poprzedzają rozwój i powiększanie się istniejących już obszarów zaniku, co może odzwierciedlać patogenetyczną rolę nadmiernej akumulacji LP w RPE. Również w oczach z druzami miękkimi obszar z punktowym wzrostem sygnału autofluorescencji po pewnym czasie może przekształcić się w obszar zaniku. Badanie rozkładu sygnału autofluorescencji na dnie oka pozwala zatem na identyfikację wyznaczników prognostycznych.

W oczach z zanikiem geograficznym w późnych stadiach AMD obrazowanie tą metodą pokazuje także różne wzory zmienionej autofluorescencji w obszarze przylegającym do zaniku. Fenotypy wzmocnionej autofluorescencji są następujące: ogniskowy (focal), opasujący (band) i rozsiały (diffuse) (9). Wzory te w obydwójgu



Ryc. 4. Kolorowa interpretacja sygnału autofluorescencji u chorego z zanikiem geograficznym siatkówki; widoczny zwiększony sygnał autofluorescencji w strefie otaczającej zanik.

Fig. 4. Colour version of fundus autofluorescence in a patient with geographic atrophy: increased autofluorescence in surround zone of atrophy is present.

oczach są symetryczne do siebie nawzajem (2).

W innych chorobach siatkówki opisywane są także różnorodne zmiany w autofluorescencji dna oka (14). Dystrofie czopków mogą być związane z wyraźnym pierścieniem zwiększonego sygnału autofluorescencji otaczającym plamkę, bez korespondujących zmian w angiografii. W ostrej strefowej utajonej retinopatii zewnętrznej (AZOOR) zaobserwowano obszary zwiększonej autofluorescencji odpowiadające ubytkom w polu widzenia, podczas gdy inne techniki badania nie wykazują żadnych zmian w tym obszarze. W chorobie Stargarda punktowe plamki mają typową jasną fluorescencję, która może się zmniejszać wraz z rozwojem w tych miejscach zaniku RPE. Istnieje duża fenotypowa różnorodność rozszaniach zmian autofluorescencji w chorobie Stargarda. Podczas gdy niektórzy chorzy wykazują wzmożoną autofluorescencję nad obszarami siatkówki, które nie wykazują zmian, u innych poziom autofluorescencji jest w granicach normy (ryc. 2,3).

W badaniu czułości siatkówki (retinal sensitivity) z zastosowaniem perymetrii plamkowej wykazano, że wzmożona autofluorescencja odpowiada obszarom funkcjonalnego uszkodzenia fotoreceptorów.

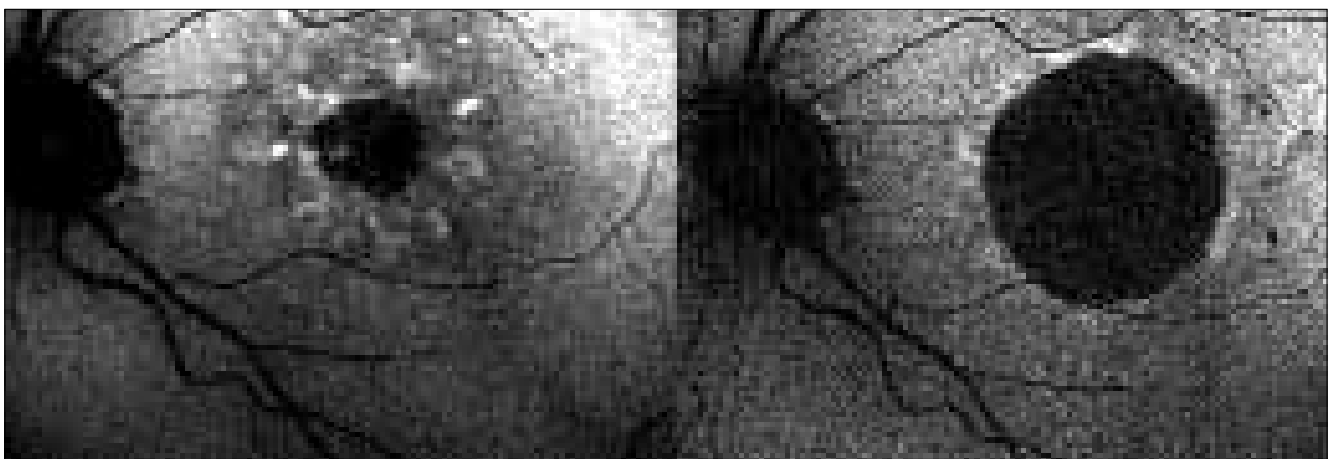
Poza obrazowaniem zawartości lipofuscyny w warstwie komórek RPE obrazowanie autofluorescencji za pomocą HRA jest bardzo dokładną metodą, służącą do rejestrowania zaniku zewnętrznych warstw siatkówki. Obszary te, w związku z tym, że pozbawione są

RPE, więc również i fluoroforów lipofuscyny, mają ciemny wygląd i charakteryzują się bardzo niskim sygnałem autofluorescencji lub sygnał ten w ogóle nie występuje. Z tego powodu obszary zanikowe RPE są lepiej widoczne w badaniu HRA niż w funduskopii, a ich zarejestrowanie nie wymaga dodatkowej iniekcji dożylnego fluoresceiny do wykazania ubytku okienkowego (ryc. 4).

Obrazowanie autofluorescencji dna oka jest najdokładniejszą metodą służącą do rejestracji powiększania się obszaru zaniku RPE w okresie obserwacji. Do długofalowych analiz można zastosować program automatyczny obliczający wielkość obszaru zaniku. Automatyczna komputerowa analiza cyfrowego obrazu pozwala na dokładne znalezienie oraz pomiar wielkości obszaru atrofii i jest przydatna do długofalowych badań naturalnego przebiegu chorób siatkówki związanych z zanikiem RPE oraz do monitorowania efektów terapeutycznych (ryc. 5).

Podsumowanie

Obrazowanie dna oka za pomocą autofluorescencji jest nieinwazyjną metodą, dostarczającą dodatkowych informacji poza tymi, które uzyskujemy, wykonując konwencjonalne fotografie dna oka czy angiografię fluoresceinową. Ta technika badania daje możliwość lepszego zrozumienia patogenetycznych mechanizmów występują-



Ryc. 5. Postęp zaniku geograficznego w czasie u chorego ze zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem (AMD).

Fig. 5. Progression of geographic atrophy in a patient with AMD.

cych w różnych chorobach siatkówki i jest przydatna w monitorowaniu ich przebiegu. W związku z wprowadzaniem nowych metod terapeutycznych stwarza również nowe możliwości ich oceny.

PIŚMIENICTWO:

- Bellmann C., Holz F. G., Schapp O., Volcker H. E., Otto T. P.: *Topography of fundus autofluorescence with a new confocal scanning laser ophthalmoscope*. Ophthalmologe, 1997, 94, 385-391.
- Bellmann C., Jorzik J., Spital G., Unnebrink K., Pauleikhoff D., Holz F. G.: *Symmetry of bilateral lesions in geographic atrophy in patients with age-related macular degeneration*. Arch. Ophthalmol., 2002, 120, 579-584.
- Bergmann M., Schütt F., Holz F. G., Kopitz J.: *Does A2-E, a retinoid component of lipofuscin and inhibitor of lysosomal degradative functions, directly affect the activity of lysosomal hydrolases?* Exp. Eye Res., 2001, 72, 191-195.
- Boulton M., Marshall J.: *Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: a model for aging*. Br. J. Ophthalmol., 1986, 70, 808-815.
- Boulton M., McKechnie M., Breda J., Bayly M., Marshall J.: *The formation of autofluorescent granules in cultured human RPE*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1989, 30, 82-89.
- Delori F. C., Dorey C. K., Staurengi G., Arend O., Goger D. G., Weiter J. J.: *In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits RPE lipofuscin characteristics*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1995, 36, 718-729.
- Delori F. C., Staurengi G., Arend O., Dorey C. K., Goger D. G., Weiter J. J.: *In vivo measurement of lipofuscin in Stargardt's disease-fundus flavimaculatus*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1995, 36, 2327-2331.
- Feeney L.: *Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1978, 17, 583-600.
- Holz F. G., Bellmann C., Schütt F., Völcker H. E.: *Patterns of increased in vivo fundus autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1999, 237, 145-152.
- Holz F. G., Staudt S., Bellmann C., Völcker H. E.: *Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2001, 42, 1051-1056.
- Schmitz-Valckenberg S., Jorzik J., Unnebrink K., Holz F. G.: *Analysis of digital scanning laser ophthalmoscopy fundus autofluorescence images of geographic atrophy in advanced age-related macular degeneration*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 2002, 240, 73-78.
- Schutt F., Bergmann M., Holz F. G., Kopitz J.: *Isolation of intact lysosomes from human RPE cells and effects of A2-E on the integrity of the lysosomal and other cellular membranes*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 2002, 240, 983-988.
- von Ruckmann A., Fitzke F. W., Bird A. C.: *Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope*. Br. J. Ophthalmol., 1995, 79, 407-412.
- von Ruckmann A., Schmidt K. G., Fitzke F. W., Bird A. C., Jacobi K. W.: *Fundus autofluorescence in patients with hereditary macular dystrophies, malattia leventinese, familial dominant and aged-related drusen*. Klin. Monatsbl. Augenheilkd., 1998, 213, 81-86.

Praca wpłynęła do Redakcji 1.02.2004 r. (587).

Zakwalifikowano do druku 04.05.2005 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
lek. med. Joanna Dolar-Szczasny
Katedra i I Klinika Okulistyki AM w Lublinie
ul. Chmielna 1
20-079 Lublin