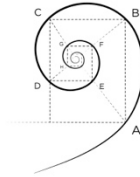




**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO**



**DOTTORATO DI MEDICINA MOLECOLARE E TRASLAZIONALE
CICLO XXXIII**

Anno Accademico 2019/2020

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
MED/30**

**APPROCCIO INTEGRATO ALLO STUDIO DEL GLAUCOMA:
DALLA CLINICA ALL'INDAGINE BIOCHIMICO-MOLECOLARE**

Dottorando: Roberta FARCI
Matricola N°: R11922

TUTORE: Prof. Luca Mario ROSSETTI
CO-TUTORE: Prof. Maurizio FOSSARELLO

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. Michele SAMAJA

Indice:

ABSTRACT	5
ABBREVIAZIONI	9
INTRODUZIONE	13
<i>Epidemiologia</i>	14
<i>Genetica</i>	14
<i>Anatomia</i>	16
<i>Fisiologia</i>	17
<i>Caratteristiche cliniche del glaucoma</i>	18
<i>Imaging</i>	23
<i>Trattamento</i>	28
<i>Biochimica</i>	30
<i>Connessioni</i>	33
<i>Metabolomica</i>	37
<i>Perimetro Compass</i>	40
SCOPO DEL LAVORO	46
APPROCCIO CLINICO AL GLAUCOMA	
<i>Materiali e metodi</i>	48
<i>Risultati</i>	66
APPROCCIO BIOCHIMICO-MOLECOLARE AL GLAUCOMA	
<i>Materiali e metodi</i>	86
<i>Risultati</i>	93
DISCUSSIONE	104
CONCLUSIONI	134

PRODOTTI DELLA RICERCA.....138
REFERENZE.....141
FIGURE E TABELLE.....160
DICHIARAZIONE DI RESEARCH INTEGRITY.....164
RINGRAZIAMENTI.....165

CONFLITTI DI INTERESSI: nessuno.

ABSTRACT

Il glaucoma è una patologia neurodegenerativa sostenuta dalla morte per apoptosi delle CGR. Rappresenta la principale causa di cecità irreversibile al mondo. Non sono ancora stati compresi a fondo tutti i meccanismi che causano la degenerazione neuronale nel glaucoma (tanto che sussistono delle forme di glaucoma a PIO normale). Un ruolo importante nel meccanismo patogenetico glaucomatoso viene riconosciuto oggi ad una condizione di infiammazione cronica a livello retinico determinata da alterazioni dei livelli di PIO.

Lo scopo del presente progetto di dottorato è stato un approccio multidisciplinare al glaucoma, di tipo clinico e biochimico-molecolare. In primo luogo, è stato implementato un prototipo di perimetro (Compass, Centervue, Padova, Italia), attuando dapprima un database normativo di soggetti sani al fine di integrare le caratteristiche demografiche per il test perimetrico 30-2. Successivamente, è stata valutata l'affidabilità test-retest dell'apparecchio, eseguendo il campo visivo "New Grid" per sei volte consecutive in un gruppo di pazienti clusterizzati secondo l'MD, ottenendo una bassa variabilità intra-test. È stato altresì calcolato l'agreement tra tre diversi revisori, i quali hanno esaminato indipendentemente le perimetrie e le foto fundus Compass, stabilendo un peggioramento o meno della patologia glaucomatosa, nonché la concordanza tra l'analisi da remoto dei campi visivi e immagini Compass, e la visita clinica standard dei pazienti affetti da glaucoma. I risultati hanno messo in evidenza un'ottima concordanza tra i Reviewers e tra gli esami da remoto e la visita clinica. Ai fini di stabilire la precisione punto per punto del perimetro, è stata eseguita un'analisi del Compass 10-2 in pazienti affetti da atrofia geografica, trovando una corrispondenza punto per punto della perimetria con l'immagine retinica sottostante. In ultimo, è stata effettuata un'analisi dell'osmolarità lacrimale e di tutti i parametri clinici del film lacrimale in pazienti affetti da glaucoma asimmetrico.

Per quanto riguarda l'indagine biochimico-molecolare, è stata effettuata una analisi preliminare nell'umore acqueo della proteina di gap-junction Connexina 43 in un piccolo gruppo di soggetti sani e glaucomatosi, che ha posto in evidenza un aumento quasi doppio della dell'espressione della molecola nei soggetti glaucomatosi, anche se la ridotta numerosità del campione non ha prodotto un risultato statisticamente significativo.

È stato inoltre utilizzato in questo progetto di dottorato un metodo innovativo di analisi: la metabolomica, ramo scientifico che si occupa di analizzare i metaboliti <1,5 kDa che derivano da specifici processi chimici cellulari in campioni biologici umani. Utilizzando la Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ^1H , sono stati analizzati campioni di vitreo di pazienti sottoposti a vitrectomia, identificando un aumento di acetone e metanolo negli occhi glaucomatosi.

ABSTRACT

Glaucoma is a neurodegenerative disease caused by ganglion cells death by apoptosis. It represents the leading cause of irreversible blindness in the world. Although the mechanisms triggering the neuronal degeneration in glaucoma have not yet been fully understood, a chronic inflammatory condition at the retinal level, sustained by abnormal IOP, is considered today a main factor in glaucoma pathogenesis.

The aim of this PhD project was a multidisciplinary approach to glaucoma investigation, both clinical and bio-molecular.

Firstly, a prototype of visual field analyzer (Compass, Centervue, Padua, Italy) was implemented, primarily by developing a demographic database of healthy subjects for 30-2 perimetric test.

Subsequently, the test-retest reliability of the device was assessed by performing the "New Grid" visual field six straight times in a group of patients clustered according to the MD, resulting in a good inter-test reliability. The agreement between three different reviewers was also calculated: they independently examined Compass visual fields and the fundus photos, establishing whether or not the glaucomatous pathology worsened, as well as the agreement between the remote analysis and the standard clinical visit of glaucoma patients. The results highlighted an excellent agreement among the Reviewers and between remote analysis and the clinical examination.

In order to establish the Compass' point-by-point accuracy, a 10-2 visual field was performed in patients affected by geographic atrophy, finding an accurate correspondence of the perimetric scores with the underlying retinal image.

Ultimately, the osmometry and all the clinical parameters of the tear film were analyzed in patients suffering from asymmetric glaucoma.

Afterwards, for the biochemical and molecular approach, the analysis of gap-junction protein connexin 43 in the aqueous humor of affected and unaffected glaucoma patients was performed: a nearly double expression of the protein was found in glaucomatous subjects, even if there were no statistically significant differences, probably due to the small number of samples.

An innovative method of biochemical analysis was introduced in this doctorate thesis: the metabolomics, a scientific branch that deals with the analysis of <1.5 kDa metabolites deriving from specific cellular processes in human samples. Vitreous samples of patients operated by vitrectomy were analyzed by ¹H-NMR Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, and an increase in acetone and methanol was observed in glaucomatous eyes.

ABBREVIAZIONI:

CGR: cellule ganglionari retiniche

PIO: pressione intraoculare

GPAA: glaucoma ad angolo aperto

GAC: glaucoma ad angolo chiuso

NO: nervo ottico

RNR: rima nervosa retinica

FNR: fibre nervose retiniche

OCT: tomografia a coerenza ottica

SD-OCT: Spectral Domain OCT

RNFL: retinal nerve fiber layer

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor

ERKs: Extracellular Signal Regulated Protein Kinases

MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase

AP-1: Fattore di Trascrizione Attivatore della Proteina-1

NF- κ B: Nuclear Factor-Kb

Bad: BCL-2 associated agonist of cell death

ATP: Adenosina Trifosfato

MLK3: Mixed-Lineage Protein Kinase 3

Cx: Connessine

EGF: Epithelial Growth Factor

NMR : spettroscopia di risonanza magnetica nucleare

LC-MS: spettrometria di massa

GC : gascromatografia

HPLC: cromatografia liquida ad alte prestazioni

PCA: Principal Component Analysis

SLO: Scanning Laser Ophthalmoscopy

SAP: Standard Automated Perimetry

IR: infrarosso

LAN: Local Area Network

ZEST: zippy estimation of sequential thresholds

FP: false positive

BS: blind spot

MD: Mean Defect

HFA: Humphrey field analyzer

PSD: Pattern Standard Deviation

GHT: Glaucoma Hemifield Test

FN: false negative

DS: Deviazione Standard

CR: coefficiente di riproducibilità

AG: atrofia geografica

DMS: degenerazione maculare senile

AF: autofluorescenza

HRA: Heidelberg Retinal Angiograph

SRP: sensibilità retinica perimetrica

SG: scala di grigi

CMP: Compass

BCVA: best corrected visual acuity

SO: superficie oculare

IDEEL: Impact of Dry Eye on Everyday Life

OSDI: Ocular Surface Disease Index

tBUT: Tear break Time Test

DED: dry eye disease

dB: Decibel

B/W: black e white

Med Eyes: Medical Eyes

Trab Eyes: Trabeculectomy Eyes

Best Eyes: occhi migliori

IOL: intraocular lens

GJA1: Gap Junction Protein Alpha 1

DO: densità ottica

SITA: Swedish Interactive Thresholding Algorithm

pCx43: Connessione 43 fosforilata

GJ: Gap Junctions

PX1: Pannessina-1

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2

MMP-2: Metallo-proteinasi della Matrice 3

MMP-2: Metallo-proteinasi della Matrice 2

ZO-1: Zonula Occludens-1

JCT: Tessuto iuxta-canalicolare

FGF-2: Basic fibroblast growth factor 2

FGF-1: Acidic fibroblast growth factor 1

BAK: Benzalkonium Chloride

FID: free induction decay

ROS: specie reattive dell'ossigeno

ADH1b: Alcol deidrogenasi 1 b

ALDH2: Aldeide Deidrogenasi 2

FDH: Formato Deidrogenasi

INTRODUZIONE

Il glaucoma è una neuropatia ottica cronica caratterizzata da una progressiva degenerazione delle CGR e degli assoni[1]. Durante l'embriogenesi, la vescicola ottica si forma a partire dall'invaginazione della parete neuroectodermica del proencefalo ed è collegata al diencefalo tramite il peduncolo ottico. Di conseguenza, tali neuroni hanno origine nel sistema nervoso centrale e i loro corpi cellulari sono siti nella retina interna. La patogenesi del glaucoma prevede l'apoptosi delle CGR; la morte del corpo cellulare delle CGR è la causa dell'atrofia assonale e del deficit nel trasporto assonale anterogrado e retrogrado[2]. Tale processo degenerativo provoca l'aumento dell'escavazione del nervo ottico (NO) – “cupping” (all'esame oftalmoscopico è visibile un'escavazione ampia e ripida), difetti irreversibili del campo visivo e perdita della vista [3, 4]. Il glaucoma colpisce più di 70 milioni di persone in tutto il mondo e circa il 10% presenta cecità bilaterale; pertanto esso rappresenta la principale causa di cecità irreversibile sia nei paesi occidentali che in quelli in via di sviluppo[5]. Il glaucoma può rimanere asintomatico fino ai suoi stadi più gravi, con il risultato che il numero di individui malati è effettivamente più elevato di quanti ne siano consapevolmente affetti. Gli studi di popolazione suggeriscono che solo una percentuale compresa tra il 10% e il 50% è conscia di esserne colpita[6, 7]. La patogenesi del glaucoma è stata solo parzialmente compresa finora e prevede che i fattori che contribuiscono alla sua progressione siano molteplici, tra i quali età avanzata, familiarità per glaucoma, etnia africana, uso di cortisonici sistemici o topici, PIO elevata [8, 9]. I glaucomi possono essere classificati in due grandi categorie: glaucoma ad angolo aperto (GPAA) e glaucoma ad angolo chiuso (GAC). Negli Stati Uniti, oltre l'80% dei casi è rappresentato da GPAA; tuttavia, il GAC è responsabile di un numero molto elevato di pazienti con grave perdita della vista[4]. Il GPAA può essere subclassificato in primario e secondario, a

seconda del meccanismo che causa l'ostruzione del deflusso di umor acqueo. Il glaucoma secondario può derivare da traumi, uveiti, tumori, neovasi, facolisi, condizioni come la dispersione del pigmento o pseudoesfoliazione, eritrociti in camera anteriore, blocco del ciliare, emorragie intraoculari, sindrome endoteliale iridocorneale, o essere facomorfico. Il GPAA può essere altresì classificato in glaucoma congenito o associato ad anomale dello sviluppo (Sindrome di Rieger, anomalia di Peter, aniridia, ectopia lentis, Sindrome di Sturge-Weber, nanofalmo, microcornea congenita etc.). Tali fattori causano l'aumento della PIO e conducono a danno glaucomatoso del NO.

Epidemiologia

La prevalenza del GPAA (4.20%) è altissima in Africa, mentre la prevalenza del GAC molto elevata in Asia (1.09%). La prevalenza del glaucoma nell'etnia Caucasica è stata stimata del 2.45% (tra l'1% e l'1,5% tra i 40 e i 65 anni, a tra il 2% e il 7% oltre i 65 anni [10, 11].

Genetica

Diversi geni sono implicati nel glaucoma, tra cui il gene codificante la miocilina (MYOC, GLC1A), [12, 13] optineurina (OPTN), [14] e il dominio di ripetizione WD 36 [15], associati a tratto monogenico, autosomico dominante; tuttavia, questi geni rappresentano meno del 10% di tutti i casi di glaucoma[13]. Il primo locus identificato per il GPAA è situato sul cromosoma 1. Il gene rilevante è MYOC, sito nel locus GLC1A, e codifica per la proteina miocilina. Le mutazioni del gene della miocilina sono generalmente implicate nelle forme di GPAA giovanile o ad insorgenza in giovane età, e sono solitamente caratterizzate da livelli molto elevati di PIO. Nella popolazione adulta affetta da GPAA, la prevalenza delle mutazioni della miocilina varia dal 3% al 5%[16]. I portatori di mutazioni associate alla malattia sviluppano il fenotipo del glaucoma in circa il 90% dei casi[17]. Il ruolo della miocilina nell'insorgenza del glaucoma non è

stato completamente chiarito: è stato speculato che la proteina mutata interferisca con il metabolismo proteico oculare e con il traffico di proteine, provocando un accumulo intracellulare di proteine mal ripiegate e una conseguente ipertensione oculare[15]. A differenza degli individui con mutazioni a carico del gene MYOC, quelli con alterazioni del gene OPTN (codificante per l'optineurina) hanno livelli normali di PIO. [13] Sebbene il meccanismo che vede le varianti del gene OPTN implicate nel glaucoma non sia stato chiarito, ci sono prove che suggeriscono che l'optineurina possa avere un ruolo neuroprotettivo riducendo la suscettibilità delle CGR agli stimoli apoptotici. Un numero crescente di studi ha utilizzato scansioni dell'intero genoma per cercare loci di suscettibilità al glaucoma. Il locus CAV1 / CAV2 su 7q34 può essere associato al GPAA nelle popolazioni di derivazione europea. Questo risultato è stato replicato da studi indipendenti [15]. Tali geni codificano per proteine (caveoline) coinvolte nella generazione e nella funzione delle caveole, vale a dire invaginazioni della membrana cellulare coinvolta nella segnalazione cellulare e nell'endocitosi. Il locus CDKN2BAS su 9p21 ha dimostrato di essere correlato al rischio di glaucoma in più coorti.[18] Il meccanismo con cui questi geni potrebbero contribuire al GPAA non è chiaro: è stato ipotizzato che possano interagire con il fattore di crescita trasformante β , una molecola che regola la crescita e la sopravvivenza delle cellule in tutto il corpo.

L'aumento della PIO è responsabile del danno della lamina cribrosa del NO e delle strutture adiacenti[19]. La sclera è perforata a livello della lamina cribrosa per consentire il passaggio dei vasi e delle terminazioni nervose. L'aumento della PIO induce stress mediante ischemia, compressione, deformazione, e rimodellamento della lamina cribrosa con conseguente danno meccanico e morte assonale[20]. Tale meccanismo induce un blocco del trasporto assonale anterogrado e retrogrado verso il nucleo genicolato laterale. Studi autoptici hanno evidenziato che il substrato istologico di tale alterazione è costituito da

accumulo di vescicole e disorganizzazione di microtubuli e neurofilamenti nelle regioni prelaminari e postlaminari[19]. Alti livelli di PIO sono responsabili di disfunzione mitocondriale nelle CRG e negli astrociti con conseguente stress metabolico[21]. Nel GPAA, l'aumento della PIO non è associato ad altre malattie oculari, a differenza del glaucoma secondario, in cui un fattore esterno -sia oculare che extra-oculare- influisce sul deflusso dell'umore acqueo. L'umore acqueo è prodotto dall'epitelio della pars plicata del corpo ciliare, mediante un meccanismo di secrezione attiva e passiva. Un liquido ad alto contenuto proteico passa dai capillari fenestrati (ultrafiltrazione) allo stroma dei processi ciliari, da cui avviene il trasporto attivo dei soluti attraverso l'epitelio ciliare. Il gradiente osmotico così stabilito facilita il flusso passivo dell'acqueo nella camera posteriore. La secrezione è soggetta all'influenza del sistema nervoso simpatico, con azioni opposte mediate dai recettori beta-2 (aumento della secrezione) e dai recettori alfa-2 (diminuzione della secrezione)[22, 23] Anche l'azione enzimatica è fondamentale: l'anidrasi carbonica gioca un ruolo chiave.

Drenaggio dell'umore acqueo

La PIO è determinata dall'equilibrio tra la velocità di produzione dell'umor acqueo e il suo deflusso: quest'ultimo a sua volta dipende da vari fattori, tra cui la resistenza del tessuto trabecolare e il livello di pressione venosa episclerale.

Anatomia

Il trabecolato è una struttura a setaccio, situato in corrispondenza dell'angolo irido-corneale attraverso il quale il 90% dell'umore acqueo viene drenato all'esterno dell'occhio. Consta di tre componenti:

- La rete uveale è la porzione più interna, costituita da filamenti ricoperti di cellule endoteliali simili a cordoni derivanti dall'iride e dallo stroma del

corpo ciliare. Gli spazi inter-trabecolari sono relativamente ampi e offrono poca resistenza al passaggio dei liquidi;

- il tessuto corneo-sclerale si trova all'esterno della rete uveale per formare la parte più spessa del trabecolato. È composto da strati di fili di tessuto connettivo con cellule simili all'endotelio sovrastante. Gli spazi inter-trabecolari sono più piccoli rispetto a quelli della maglia uveale, conferendo maggiore resistenza al flusso;
- la rete juxta-canalicolare (cribriforme) è la parte esterna del trabecolato e collega la parte corneo-sclerale all'endotelio della parete interna del canale di Schlemm. È costituito da cellule incorporate in una densa matrice extracellulare con spazi intercellulari stretti e offre la maggior parte della normale resistenza al deflusso acquoso;
- il canale di Schlemm è un canale circonfrenziale situato all'interno della sclera perilimbale. La parete interna è rivestita da cellule endoteliali irregolari a forma di fuso contenenti ripiegamenti (vacuoli giganti) che si ritiene trasportino la soluzione acquosa attraverso la formazione di pori transcellulari. La parete esterna è rivestita da cellule piatte lisce e contiene le aperture dei canali collettori, che escono dal canale ad angoli obliqui e si collegano direttamente o indirettamente con le vene episclerali. I setti dividono comunemente il lume in 2-4 canali.

Fisiologia

L'umor acquoso fluisce dalla camera posteriore a quella anteriore attraverso la pupilla. Esistono tre percorsi di drenaggio all'esterno del bulbo oculare.

- Deflusso trabecolare (90%): l'acquoso fluisce attraverso il trabecolato nel canale di Schlemm e, successivamente, nelle vene episclerali.

- Drenaggio uveosclerale (10%): l'umor acqueo passa attraverso il corpo ciliare nello spazio supracoroidale e viene drenato dalla circolazione venosa da corpo ciliare, coroide e sclera.
- Iride: il drenaggio dell'umor acqueo avviene attraverso l'iride.

Caratteristiche cliniche del glaucoma

Rima neuroretinica

La rima neuroretinica (RNR) è il tessuto rosa-arancio sito tra il bordo esterno e il margine del disco ottico. Nei dischi di dimensioni normali, il bordo neuroretinico è tipicamente più sottile nelle posizioni a ore 12 e 6 e solitamente si allarga anzitutto nel settore infero-temporale (83% di occhi), seguito da quello supero-temporale, da quello nasale, per poi proseguire nei settori temporali (regola "ISNT"). Questa regola ha un'elevata sensibilità per il glaucoma ma non è molto specifica, vale a dire che gli occhi senza glaucoma spesso rispettano tale regola[24] . (Figura 1)

Cup/disc (C/D) ratio

Il rapporto C/D indica il rapporto tra il diametro del disco ottico e l'escavazione dello stesso, espresso come frazione; generalmente è utilizzato il diametro verticale sebbene ci possa avvalere anche del rapporto orizzontale. I dischi ottici di piccolo diametro hanno C/D piccoli e viceversa; solo il 2% della popolazione ha un rapporto C/D maggiore di 0,7 (Figura 1). L'asimmetria $>0,2$ tra i due occhi dovrebbe essere valutata attentamente [25].



Figura 1 . Stereo-fotografia eseguita con Compass (Centervue, Padova), che mette in evidenza l'aumento del C/D in un soggetto glaucomatoso.

Il C/D patologico è causato da una diminuzione irreversibile del numero di fibre nervose retiniche (FNR), cellule gliali e vasi sanguigni. Un documentato aumento del C/D è sempre indicativo di glaucoma. Se un occhio con un disco ottico piccolo e un'escavazione corrispondentemente piccola sviluppa glaucoma, si assisterà ad un aumento di dimensioni dell'escavazione nel tempo; tuttavia, anche in presenza di danni sostanziali, l'escavazione in tali NO può essere più piccola rispetto a un'escavazione fisiologica grande. I dischi ottici più grandi e più piccoli sono più difficili da interpretare: ad esempio, nei piccoli NO i cambiamenti associati al glaucoma potrebbero non provocare escavazione, bensì un appiattimento della superficie del disco; in NO grandi il bordo è relativamente stretto anche in condizioni fisiologiche e può essere potenzialmente interpretato erroneamente come glaucomatoso. I dischi inclinati ("tilted disk") sono più comuni negli occhi miopi e mostrano un bordo più ampio e leggermente inclinato verso l'interno. I NO negli occhi molto miopi sono ancora più difficili da interpretare.

Dimensioni del disco ottico

Le dimensioni del NO sono importanti al fine di stabilire se un rapporto C/D sia normale; rappresentano, inoltre, un importante indicatore prognostico. Si ritiene che i dischi di grandi dimensioni abbiano maggiori probabilità di subire danni, in particolare in un glaucoma a pressione normale. Il diametro maggiore conferisce una debolezza meccanica e quindi una maggiore vulnerabilità allo spostamento della lamina cribrosa indotto dalla PIO; la lamina cribrosa è più sottile negli occhi con glaucoma a pressione normale [26]. La dimensione del disco varia tra le varie etnie ed è maggiore negli individui africani. L'imaging può misurare oggettivamente l'area del disco, ma il diametro verticale è il parametro più frequentemente utilizzato clinicamente[25]; il diametro verticale medio normale (per i dischi non glaucomatosi) è di 1,5-1,7 mm in una popolazione caucasica.

Sottotipi di danno glaucomatoso

Sono stati descritti quattro aspetti oftalmoscopici della papilla glaucomatosa.

Il glaucoma è caratterizzato da un progressivo restringimento della RNR in maniera variabile e può assumere la forma di restringimento diffuso, "notching", o entrambi. Il restringimento del cerchio, pur avvenendo in tutti i settori del disco, è generalmente più comune ai poli inferiore e superiore.

- I difetti ischemici focali sono caratterizzati da "notch" localizzati superiori e/o inferiori e possono essere associati a difetti del campo visivo localizzati con minaccia precoce di perdita di fissazione;
- il NO miope affetto da glaucoma è un disco inclinato (con inserzione obliqua), poco profondo con una mezzaluna temporale di atrofia parapapillare, unitamente a evidenze di danno glaucomatoso. Sono

comuni scotomi densi superiori o inferiori che minacciano la fissazione. Questa morfologia è più comune nei pazienti maschi giovani;

- i dischi sclerotici sono caratterizzati da un'escavazione poco profonda e piatta e una RNR leggermente inclinata, atrofia peripapillare variabile e perdita del campo visivo periferico. La coroide peripapillare è più sottile rispetto ad altri tipi di disco. I pazienti sono più anziani, non vi è differenza tra i sessi e vi è un'associazione con lo stato vascolare sistemico;
- i dischi ad ingrandimento concentrico (verificati mediante follow-up) sono caratterizzati da un assottigliamento della RNR abbastanza uniforme e sono frequentemente associati a perdita diffusa del campo visivo. La PIO è spesso notevolmente elevata alla presentazione.

Segni non specifici di danno glaucomatoso

Emorragie del disco ottico

La presenza di piccole emorragie ("a scheggia") epi o peri-papillari è stata stimata essere $\leq 0,2\%$ nella popolazione normale. D'altra parte, una grande percentuale di pazienti con glaucoma presenta emorragie del disco ottico, molto spesso trascurate durante l'esame clinico e più facili da trovare nelle foto del fundus[27]. Molti studi hanno dimostrato che tali emorragie sono associate alla progressione della malattia. Spesso si estendono dalla RNR alla retina, più comunemente infero-temporalmente. Possono verificarsi anche in individui sani e in pazienti con malattie vascolari sistemiche[28].

Vasi sanguigni circumlineari

La presenza dei vasi sanguigni circumlineari è un segno di assottigliamento precoce della RNR. È caratterizzata dalla comparsa di uno spazio tra il bordo neuroretinico e un vaso sanguigno superficiale. Il restringimento della RNR

cambia la posizione dei vasi sul disco ottico, mettendo in evidenza la flessione, la baionetta o la scoperta dei vasi circumlineari. Questi cambiamenti di posizione sono particolarmente importanti da osservare quando si cerca la progressione del glaucoma, osservando le foto fundus. La baionetta è caratterizzata da vasi sanguigni con doppia angolazione. A causa della perdita di RNR, un vaso che entra nel NO dalla retina può inclinarsi bruscamente all'indietro nel disco e quindi girare verso la sua direzione originale per attraversare la lamina cribrosa. I rami collaterali tra due vene del NO, simili a quelli successivi all'occlusione della vena retinica centrale, sono relativamente rari. Probabilmente sono causati da un'ostruzione circolatoria cronica di basso grado. Può anche verificarsi tortuosità vascolare retinica[29]. La perdita di RNR nasale è un segno di danno moderatamente avanzato; può svilupparsi uno spazio tra il RNR e il sistema vascolare retinico centrale. La visualizzazione della lamina cribrosa si verifica nel glaucoma avanzato. Le fenestrature grigie puntiformi nella lamina cribrosa diventano visibili quando l'RNR si allontana dalla stessa. Le fenestrature a volte appaiono lineari e questo può essere un segno di danno grave, indicante una distorsione della lamina. I punti possono essere anche essere presenti in occhi non affetti da glaucoma [30]. Il "bordo affilato" è un segno di danno glaucomatoso in progressione: poiché la RNR adiacente al bordo del disco viene persa, il margine del disco assume un angolo più acuto. Un vaso "a baionetta" è spesso visto su un bordo affilato. Questo non deve essere confuso con un "bordo nasale affilato", che si riferisce all'angolazione acuta della RNR al margine nasale.

Modificazioni peri-papillari

L'atrofia peripapillare che circonda la testa del nervo ottico può essere indice di glaucoma nonché segno di danno precoce nei pazienti con ipertensione oculare[31]. La zona alfa (esterna) è caratterizzata da alterazioni epiteliali pigmentate retiniche superficiali. La zona beta (interna) è caratterizzata da

atrofia corioretinica, ed è distinta dal bordo sclerale. La zona beta è più ampia e più comune nel glaucoma ed è un fattore di rischio per la progressione; la posizione dell'atrofia peri-papillare della zona beta sembra indicare l'orientamento della probabile perdita del campo visivo. Nel glaucoma, i difetti sottili dello strato di fibre nervose retiniche (FNR) precedono lo sviluppo di dischi ottici francamente patologici e i cambiamenti del campo visivo; la loro insorgenza spesso segue le emorragie discali. Si verificano due modelli: (a) difetti localizzati a forma di cuneo e (b) difetti diffusi che sono più grandi e hanno bordi indistinti. Talvolta sono evidenti difetti a seguito di emorragie discali. La luce rossa (verde) aumenta il contrasto tra retina normale e difetti, sia sulla biomicroscopia con lampada a fessura che sulla fotografia del fondo oculare, e in genere ne facilita l'identificazione.

Imaging

Imaging del glaucoma acquisito con OCT

Quigley dimostrò che una diminuzione dell'uno per cento (1%) delle FNR nei primati era visibile con la fotografia in luce blu. Ad oggi, l'uso corrente è riservato all'OCT[32]. La tomografia a coerenza ottica (OCT) sfrutta il principio dell'interferometria. Le onde di luce riflesse vengono analizzate, in particolare viene analizzato il ritardo con cui il riflesso viene intercettato mediante gli infrarossi[33]. La sorgente luminosa dell'OCT viene suddivisa da un partitore ottico in due fasci di luce coerente, di cui uno di lunghezza nota. L'altro fascio viene indirizzato al braccio sonda, rivolto ai tessuti da studiare. La luce riflessa dal braccio di riferimento, e dal braccio di esplorazione, viene quindi ricombinata ed inviata ad un sensore. Nei moderni strumenti OCT (Spectral Domain OCT-SD-OCT-, Spectralis) sono state eliminate le parti meccaniche in movimento durante l'esame, sia modificando la lunghezza d'onda della sorgente luminosa, oppure utilizzando uno spettrometro che analizza le differenze di lunghezza d'onda nel braccio di riferimento ed in quello

diesplorazione.

Con i nuovi apparecchi i tempi di acquisizione sono stati enormemente ridotti:

- da 400 a 40000 A-scan al secondo
- da 1 B-scan a bassa risoluzione in 1,6 secondi, a 1 B-scan ad alta risoluzione
- della lunghezza di 6 mm in 4 centesimi di secondo

La maggiore velocità di acquisizione ha permesso di:

- ridurre ad 1/30 gli artefatti da movimento;
- ripetere più volte la stessa scansione;
- ridurre il numero di B-Scan utili ai fini della ricostruzione delle immagini.

L'OCT consente di utilizzare sia le sezioni A-scan (utilizzate, analogamente all'ecografia) per la valutazione della lunghezza assiale sfruttando un solo fascio di luce. I tracciati B-scan, o bidimensionali, vengono ottenuti affiancando circa 1600 scansioni A-scan, eseguite lungo una linea di circa 6 mm di lunghezza. I parametri principali misurati e analizzati per la classificazione e il rilevamento della progressione: testa del NO, l'FNR e le CGR. L'OCT misura le FNR a 3,4 mm e da 2,9 mm a 6,8 mm dal bordo papillare, in modo progressivo e decrescente verso la periferia, lungo le arcate vascolari. Le FNR sono analizzabili anche con il Red Free digitale, e con filtri selettivi GDx e HRT[34].

I parametri che l'OCT è in grado di studiare riguardo la patologia glaucomatosa sono:

- Average RNFL Thickness;
- RNFL Symmetry;
- Rim Area - Disc Area;
- Average C/D Ratio;

- Vertical C/D Ratio;
- Cup Volume;
- Neuro-retinal Rim Thickness;
- RNFL Thickness;
- RNFL Quadrants;
- RNFL Clock Hours.

Gli spessori rilevati sono disegnati in bande di colore verde, giallo e rosso, per valori rispettivamente normali borderline o patologici, rispetto al database normativo, presente in tutti gli SD-OCT (Figura 2).

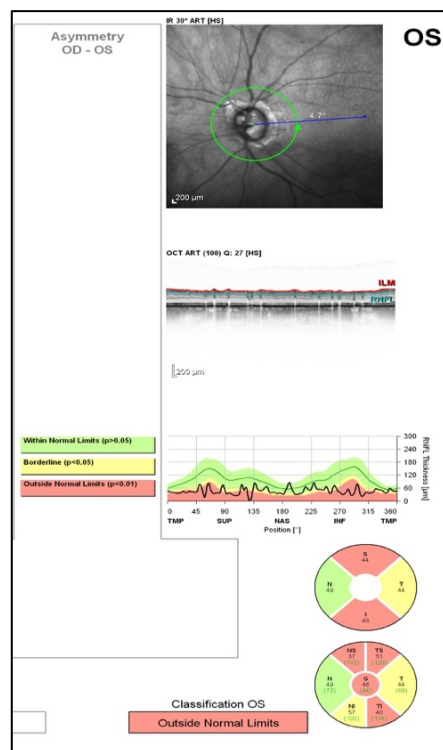


Figura 2. OCT Heidelberg (Heidelberg, Germania) di un paziente glaucomatoso. I quadranti in giallo evidenziano una perdita parziale di FNR mentre i quadranti rossi rappresentano una perdita grave di FNR.

L'analisi delle CGR prevede la misurazione dello spessore retinico a livello della macula nel tentativo di rilevare il danno glaucomatoso in fase iniziale. Inizialmente considerato inferiore alla valutazione RNFL peripapillare, con la più recente tecnologia OCT l'interesse per l'analisi delle CGR è stato rinnovato ed è considerato comparabile [32]. I valori degli spessori delle CGR sono rappresentati con colore verde (range normale: p-value 5% to 95%), in giallo (valori borderline: p-value < 5%) e rosso (valori fuori dai limiti normali: p-value <1%) rispetto al database di oltre 300 occhi sani. La famiglia degli SD-OCT Spectralis Heidelberg, OCT, OCT Plus, HRA+OCT, nel GlaucomaReport espone dati su papilla ottica, RNR e spessore delle FNR, con relativo database. È stato introdotto un software di analisi della progressione su diverse macchine, che fornisce una valutazione calcolata dell'entità del danno nel tempo presentata in forma grafica (Figura 3).

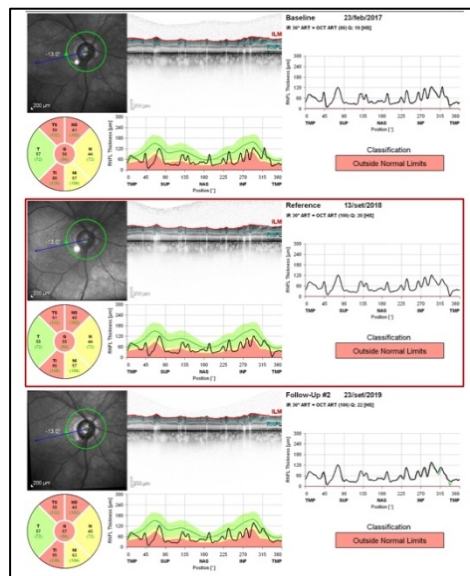


Figura 3. Follow up di un paziente glaucomatoso con OCT

Perimetria ottica computerizzata

La perimetria ottica è in grado di fornire la localizzazione topografica del difetto delle FNR. Il “gold standard” per lo studio del campo visivo è il perimetro Humphrey (Carl Zeiss Meditec, Germania)[35].

- I primi cambiamenti includono una maggiore variabilità delle risposte in aree che successivamente svilupperanno difetti e leggera asimmetria tra i due occhi [36].
- Piccole depressioni paracentrali possono formarsi in una fase relativamente precoce, spesso superonasale; sono probabilmente più comuni in glaucomi a pressione normale[37].
- Il salto nasale (scotoma di Rönne) rappresenta una differenza di sensibilità sopra e sotto la linea mediana orizzontale nel campo nasale; il difetto è delimitato dalla linea mediana orizzontale, corrispondente al rafe orizzontale dello strato di FNR[37].
- Il cuneo temporale è meno comune del salto nasale ma ha implicazioni simili.
- Difetti arciformi -scotoma di Bjerrum- (Figura 4) si sviluppano come risultato della coalescenza di scotomi paracentrali. Si sviluppano tipicamente tra 10° e 20° di fissazione come estensioni verso il basso o verso l'alto a partenza dalla macchia cieca. Con il tempo tendono ad allungarsi circonferenzialmente lungo la distribuzione delle fibre nervose arcuate[38].

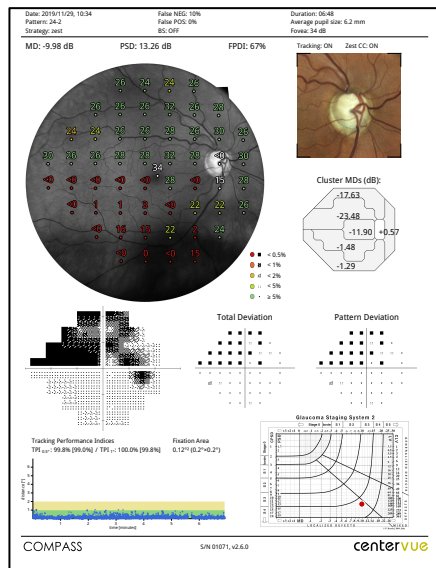


Figura 4. Compass 24-2 che mostra uno scotoma arciforme.

- Uno scotoma ad anello si sviluppa quando i difetti arcuati superiori e inferiori diventano contigui, di solito nel glaucoma avanzato. Il campo visivo allo stadio finale è caratterizzato da una piccola isola di visione centrale, tipicamente accompagnata da un'isola temporale. Il pattern perimetrico 10-2 facilita il monitoraggio del campo centrale residuo [37].
- In media ci si può aspettare un peggioramento annuo della Total Deviation di poco superiore a 1,0 dB nei pazienti adeguatamente trattati[39].

Trattamento

Il goal del trattamento per il glaucoma è la riduzione della PIO [40, 41]. Vari studi hanno dimostrato l'efficacia dell'abbassamento della PIO nella prevenzione del deterioramento visivo: l'Ocular Hypertension Treatment Study [42], l'Early Manifest Glaucoma Trial[43] etc.

Il trattamento di prima scelta è rappresentato dagli analoghi delle prostaglandine [41], salvo in casi di intolleranza o di contrindicazione. Le prostaglandine e gli inibitori dell'anidraasi carbonica sono attivi di giorno e di notte, a differenza degli antagonisti dei recettori β -adrenergici e gli agonisti α -adrenergici che esercitano la loro azione farmacologica durante il giorno. I bloccanti dei recettori β -adrenergici possono arrecare degli effetti sistemici, quali bradicardia o asma. Recentemente, formulazioni nutraceutiche sono state proposte a scopo neuroprotettivo; tuttavia, le evidenze scientifiche dell'efficacia sono scarse anche in ragione del fatto che la patogenesi del glaucoma è solo parzialmente compresa[44, 45]. In caso di fallimento della terapia topica, di tachifilassi, o di pazienti scarsamente aderenti ai colliri, la chirurgia filtrante rappresenta la scelta. Ogni anno, negli Stati Uniti vengono eseguiti circa 274 interventi di chirurgia filtrante per milione di abitanti. La trabeculoplastica laser induce delle modificazioni del trabecolato, agendo sulle cellule pigmentate, e aumentando il deflusso di umor acqueo. L'efficacia delle procedure chirurgiche, tuttavia, si riduce del 10% ogni anno successivo all'intervento. [46] La trabeculectomia comporta la creazione di una fistola tra la camera anteriore e lo spazio sottocongiuntivale (Figura 5).

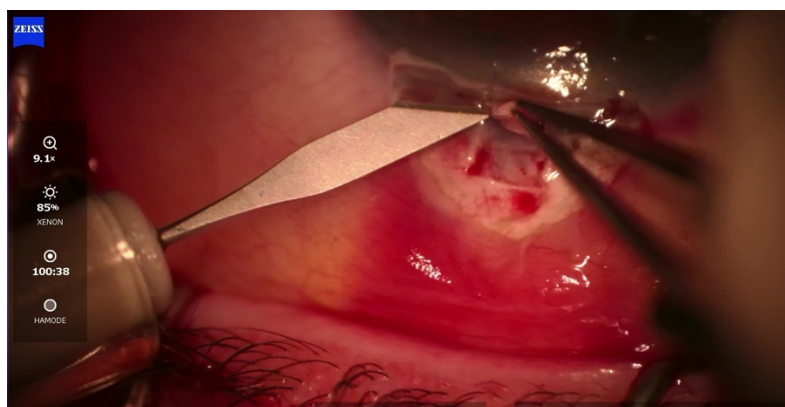


Figura 5. Creazione dello sportello sclerale durante la trabeculectomia.

Ciò fornisce un metodo alternativo di drenaggio dell'umore acqueo, laddove la via trabecolare sia ostruita o mal funzionante in caso di glaucoma[47]. Altre metodiche, tra cui l'impianto di valvole di drenaggio, o di chirurgia mini-invasiva con impianto di stent in camera anteriore sono attualmente possibili.[48]

Biochimica

Il glaucoma è una patologia neurodegenerativa che prevede la morte per apoptosi delle CGR, e dei loro assoni. La patogenesi implica uno status infiammatorio cronico, a livello retinico, ascrivibile all'aumento della PIO e al conseguente stress ossidativo. Non sono ancora stati compresi a fondo tutti i meccanismi che causano la degenerazione neuronale nel glaucoma (tanto che sussistono delle forme di glaucoma a PIO normale). La prima sede ad essere interessata è la lamina cribrosa, costituita da cellule di matrice extracellulare, che avvolgono i fasci di nervi che vi passano attraverso; le cellule della matrice extracellulare sono ricoperte da astrociti, i quali svolgono una funzione di supporto ai neuroni[49]. L'aumento della PIO comporta un'alterazione del trasporto anterogrado e retrogrado delle fibre nervose, le quali risultano demielinizzate prima e dopo il passaggio nella lamina cribrosa: studi di microscopia elettronica hanno messo in evidenza un accumulo di mitocondri e alterazioni del citoscheletro a questo livello[50]. La disfunzione dei mitocondri avviene a causa dell'aumento del calcio citoplasmatico rilasciato dal reticolo endoplasmatico, che porta a un aumento della permeabilità dei pori di transizione, con rigonfiamento, rottura delle membrane e depolarizzazione dei mitocondri: il risultato finale è il fallimento energetico e l'apoptosi assonale[51, 52]. Il blocco del trasporto anterogrado e retrogrado implica l'arresto del rilascio di fattori di crescita cerebrali, come il CNTF e il BDNF (quest'ultimo prodotto anche a livello delle CGR e dello strato nucleare interno). La riduzione delle neurotrofine comporta l'attivazione dei segnali apoptotici, i quali sono mediati dai fattori di trascrizione della via MAPK.[53]

Le MAPK sono una famiglia di proteine serine/treonine chinasi, che comprendono: le chinasi -Jun N terminali, la p38 MAPK, e l'extracellular signal regulated protein kinases (ERKs). Tale processo non riguarda solo gli assoni, ma anche gli astrociti, la microglia e le cellule del Müller[54]. È stata proposta la perdita del supporto astrocitico come ipotesi patogenetica della degenerazione assonale: gli assoni soggetti a apoptosi, espongono delle molecole che inducono la fagocitosi da parte degli astrociti. La fagocitosi è benefica in condizioni fisiologiche, ma se porta alla distruzione degli assoni, causa una patologia degenerativa quale è il glaucoma. Condizioni di stress a livello retinico causano la fosforilazione di c-Jun a livello della serina 63 o 73.[53] L'apoptosi nel glaucoma comporta l'attivazione a cascata delle caspasi mediante il Fattore di Trascrizione attivatore della proteina-1 (AP-1), di cui c-Jun fa parte, e il nuclear factor- κ B (NF- κ B). La p38 è implicata nel glaucoma in quanto l'aumento della PIO causa la fosforilazione del dominio Treonina/Glicerina/Tirosina, il quale attivano l'Activating Transcription Factor 2 e inducono l'iperfosforilazione dei neurofilamenti tau[55]. Nelle retine degli animali glaucomatosi, le procaspasi apoptotiche 3,8,9 e le caspasi infiammatorie 1, 4 e 12 sono attivate dopo un periodo di PIO elevata sia mediante la via esterna (attraverso recettori) che interna (mitocondriale)[56]. I geni IAP e XIAP svolgono un ruolo inibitore delle caspasi. La via PI-3 chinasi/Akt, che viene attivata mediante il legame di citochine e fattori di crescita a specifici recettori, esercita un'importante azione anti-apoptotica. Akt inibisce l'apoptosi a livello post-trascrizionale mediante la fosforilazione di proteine proapoptotiche, come mediatori premitocondriali, - tra cui Bad- e postmitocondriali – tra cui la caspasi 9. Akt regola la fosforilazione di c-jun interferendo con la via MLK3[53]. Una over espressione di BCL-2 è protettiva per il glaucoma; al contrario, un aumento dell'espressione del gene BAX è fortemente proapoptotica. La cascata apoptotica è mediata dalle GJ, le quali sono costituite dalle connessine (Cx)[57]. A livello oculare le Cx 36 e 43 sono site a livello di astrociti, cellule di Müller, microglia, epitelio pigmentato retinico,

cellule endoteliali e trabecolato[58]. In particolare, è stato evidenziato il ruolo Cx43 nella propagazione del segnale infiammatorio dalle CGR agli astrociti e alle cellule amacrine circostanti, mediante segnali apocrini da parte di mediatori quali l'EGF. Stress esterni, come l'aumento della PIO o insulti ischemici, causano la chiusura delle tight junctions, mediante fosforilazione della tirosina della Cx43 (C-Src mediata), con conseguente ipertrofia assonale e perdita di adesione delle cellule assonali [56]. La Cx 26, 31 e 43 sono state localizzate nel trabecolato. Ivi, partecipano attivamente al drenaggio di umor acqueo mediante attivazione dell'ATP[59].

L'ischemizzazione dei capillari retinici, data dalla compressione per aumento della PIO, induce un incremento della glicolisi anaerobia: livelli aumentati di L-arginina, L-lisina, cisteina, treonina, glicina antranilato, ascorbato, 4-idrossibenzoato, mio-inositolo, acetato, glicole propilenico, 2-idrossi-butirato, creatina e colina e livelli ridotti di L-fenilalanina, treonina, glutamina, 4-amminobutanoato e isopropanolo sono stati identificati nel vitreo dei pazienti affetti da glaucoma. L'acetato, essendo un precursore dell'acetil-CoA, viene secreto dalle cellule glaucomatose[59]. L'eccitotossicità, indotta da amminoacidi eccitatori come il glutammato e l'omocisteina, rappresenta un meccanismo di disfunzione neuronale nel glaucoma, essendo il glutammato il neurotrasmettitore eccitatore retinico. Il suo aumento è imputabile alla ridotta espressione di trasporters del glutammato e di glutamina sintetasi a livello delle cellule del Müller[60]. Studi recenti hanno dimostrato che tra i pazienti glaucomatosi è presente un aumento della formaldeide endogena, la quale porta alla formazione di legami incrociati tra DNA e proteine, promuovendo anche l'iperfosforilazione e la polimerizzazione della proteina tau, accompagnate da disfunzione cellulare e apoptosi delle cellule gangliari [60].

Connexine

Negli organismi multicellulari, l'omeostasi è regolata per mezzo di tre meccanismi di comunicazione: intracellulari, extracellulari and intercellulari. Questi ultimi sono svolti dalle GJ. Le GJ sono costituite da due emi-canali - uno per ogni cellula adiacente-, ognuno dei quali consta di 6 Cx ciascuno. Le Cx sono delle proteine trans-membrana consistenti in un loop citoplasmatico, 2 loops extracellulari, una porzione citoplasmica C-terminale e una porzione citoplasmica N-terminale (Figura 6)[61, 62].

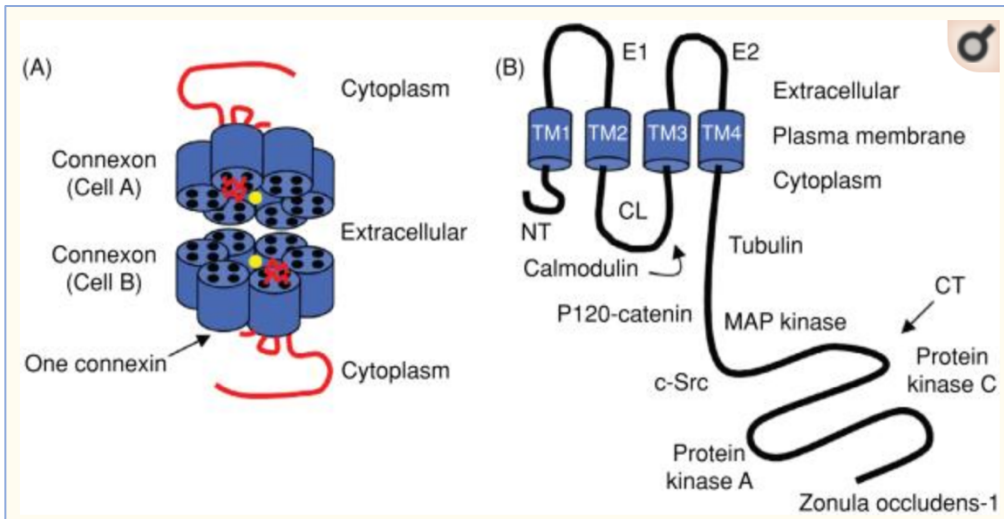


Figura 6. Modello di un canale di giunzione gap Cx43 e monomero. (A) La posizione dei pori del canale è stata indicata dal cerchio giallo. (B) Il monomero Cx43 con partner proteici. Le abbreviazioni sono le seguenti: NT, N-terminale; CL, ansa citoplasmatica; CT, C-terminale; E1 ed E2, anse extracellulari 1 e 2; TM1-4, segmenti trans-membrana 1-4 (fotografia estrapolata dall'articolo "Gap Junctions" di Nielsen MS et al.).

Sono state identificate più di 20 tipi di Cx e sono state denominate in base al loro peso molecolare, espresso in kiloDalton. Il compito delle GJ è quello di instaurare una comunicazione cellulare mediante il trasferimento di molecole con peso al di sotto dei 1-1.5 kilodalton, come l'adenosina trifosfato (ATP), inositolo trifosfato and adenosin monofosfato ciclico, ioni, nicotinamide adenina dinucleotide, glutammato e prostaglandine[63]. Questo flusso è stato denominato *gap junctional intercellular communication*, ed è responsabile dei processi di nitrosilazione[63], sumoilazione, fosforilazione, rilascio di cationi divalenti, potenziali di membrana e molecole redox, regolazione del calcio nello spazio extracellulare. Le Cx sono implicate nello stress ossidativo[64], nei processi di ischemia/riperfusion[65] e condizioni infiammatorie[65]. Il meccanismo avviene mediante internalizzazione delle Cx di una delle due cellule, a formare un anello di giunzione, che sarà poi degradato dai lisosomi e proteasomi[66]. Tale processo è finalizzato all'adesione cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare. Altre proteine citoplasmatiche, tra cui Ezrin, α -tubulina, zona occludens-1 (ZO-1) interagiscono con le Cx al fine di modulare la funzione channel/non channel[67, 68]. Il sistema integrine-connesine svolge un ruolo di primo piano nel rilascio degli esosomi, particelle a doppio strato lipidico coinvolte in molti processi patologici, tra cui le neoplasie[67]. Gli esosomi trasportano varie molecole bioattive, tra le quali enzimi, citochine, eicosanoidi, RNAs, giocando un notevole ruolo nella comunicazione intercellulare[69]. Gli esosomi sono internalizzati nella membrana plasmatica, riciclati nel pathway lisosomiale in seguito a degradazione nei lisosomi e integrazione nel corpo multi-vescicolare. Tali esosomi tardivi vengono infine fusi alla membrana plasmatica, con conseguente rilascio nello spazio extracellulare[70]. La distribuzione delle Cx nei vari apparati è riassunta nella Tabella 1.

Organi	Connessine
Sistema nervoso centrale	Cx43, Cx26, Cx32, Cx47, Cx29, Cx45, Cx30
Sistema cardio-vascolare	Cx40, Cx43, Cx45, Cx37, Cx47
Sistema linfatico	Cx37, Cx43, Cx47
Fegato	Cx32, Cx26, Cx43
Intestino e stomaco	Cx26, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx57, Cx31, Cx31.1
Derma	Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45
Rene	Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46
Polmone	Cx26, Cx32, Cx43, Cx46, Cx30, Cx31
Occhio	Cx26, Cx30, Cx30.2, Cx32, Cx36, Cx37, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50, Cx57
Sistema immunitario	Cx30.3, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43
Pancreas	Cx36, Cx43, Cx45, Cx32
Muscoli e osso	Cx39, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx37, Cx32

Tabella 1. Distribuzione delle Connessine nel corpo umano.

Le connessine individuate nell'occhio comprendono le Cx26, Cx30, Cx30.2, Cx32, Cx36, Cx37, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 and Cx57. Cx43 é espressa in multipli tipi cellulari, tra cui astrociti, cellule di Müller, microglia, epitelio pigmentato retinico e cellule endoteliali; le Cx sono coinvolte nello sviluppo e nella fisiologia oculare; ricoprono altresì un ruolo importante nei meccanismi di flogosi oculare[71].I fibroblasti delle culture umane esposti al TNF- α mostrano

una ridotta espressione della Cx43, la quale risulta attenuata anche dall'inibitore di N chinasi c-jun terminale, suggestivo del coinvolgimento sia della mitogenic-activated protein kinase signaling pathway e della Cx43 come mediatori dell'infiammazione corneale[72]. L'introduzione di glucosio all'interno delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico induce l'accumulo di IL-6, IL-8 e TGF- β , e downregola i livelli di Cx43 e di GJ[73]. L'intensa esposizione degli albinici ai raggi ultravioletti aumenta i livelli di Cx36 nello strato plessiforme interno e riduce la quantità di Cx43 in seguito al danno luce-indotto; la produzione di Cx43 è intensificata dalla luce a livello di epitelio pigmentato e di coroide. Cx43 è colocalizzata con nitrotrosine, markers infiammatori e ionized calcium-binding adaptor molecule-1[74]. Studi precedenti suffragano l'ipotesi che l'abbassamento dei livelli della Cx43, mediante riduzione dell'espressione o blocco dei canali, abbia un effetto benefico per il bulbo oculare. Il trattamento di leucomi corneali mediante PTK o mediante oligonucleotidi antisense di Cx43 accelera la riepitelizzazione corneale. Tale meccanismo prevede una riduzione significativa dell'edema, differenziazione e proliferazione di fibroblasti[75]. Un simile effetto si ottiene utilizzando α -carboxy terminus 1, un peptide mimetico della Cx43[76]. La Cx43 ha una comprovata efficacia nella vascolarizzazione dell'limbus corneale in pazienti affetti da cheratopatia neurotrofica[77]. Contrariamente, l'iniezione di oligonucleotidi antisense della Cx43 in modelli di coniglio affetti da glaucoma riduce la produzione di fibroblasti con ritardo del processo di cicatrizzazione[74]. Oligonucleotidi antisense della Cx43 sono responsabili di un ritardo del processo cicatriziale in pazienti sottoposti a plurime trabeculectomie, con conseguente mantenimento di una PIO normale per un tempo maggiore [74]. Cx43 risulta aumentata nell'endotelio, astrociti e cellule di Müller prossime a lesioni imputabili alla retinopatia diabetica[78]. La Cx43 ha un ruolo dominante nei processi metabolici e biochimici di tutti i tessuti.

Metabolomica

La metabolomica è la valutazione qualitativa e quantitativa dei metaboliti (peso molecolare <1,5 kDa) nei fluidi corporei[79]. Il primo che parlò di metabolomica fu Jeremy Nicholson, definendola “la misurazione quantitativa della risposta metabolica multiparametrica dinamica dei sistemi viventi a stimoli fisiopatologici o modificazione genetica”[80]. La metabolomica è una branca delle scienze -omiche, sistemi sperimentali che valutano la complessa relazione fisio-patogenetica esistente tra eziologia nosologica e funzionamento dell’organismo [81]. La metabolomica costituisce, pertanto, un campo di ricerca in via di sviluppo che studia il metaboloma, risultato dei pattern metabolici a livello funzionale a partire dall’espressione genetica (genomica), dalla trascrizione in mRNA (trascrittoma), fino alla sintesi proteica (proteomica) tenendo in considerazione l’interazione con i fattori ambientali (dieta, stato generale, stile di vita, farmaci)[82]. Con un metodo scientifico e sistematico, la metabolomica, analizza i metaboliti che derivano da specifici processi chimici cellulari dei quali sono considerati “impronte chimiche uniche”. Il risultato dello studio della metabolomica è la costituzione di profili metabolomici nel sangue, nelle urine, e negli altri fluidi corporei[83]. Sono stati eseguiti studi di metabolomica su diabete, ipertensione arteriosa, cancro[84]. Si è stimato che il numero di metaboliti identificabili tramite l’esame del profilo metabolico dell’organismo umano, con un probabile utilizzo nella diagnostica clinica e nello sviluppo di nuovi farmaci, è di circa 1300-1400 molecole. La maggior parte di questi metaboliti deriva dalle vie metaboliche quali la glicolisi, il ciclo di Krebs, il metabolismo di lipidi e aminoacidi. La metabolomica può essere utilizzata sia per l’identificazione di stati fisiologici, che patologici e prepatologici i quali possono essere correlati a fattori di rischio specifici genetici o ambientali, la cui identificazione può aiutare a mettere in atto piani di screening e prevenzione, o identificare dei target molecolari per impedire o rallentare lo sviluppo della malattia. L’identificazione di minuscoli cambiamenti metabolici può aiutare a

identificare disturbi importanti che altre analisi non riuscirebbero a identificare con la medesima rapidità.[85] A differenza della genomica, della trascrittomica e della proteomica, la metabolomica può tener conto dei fattori ambientali. I fenotipi metabolici rappresentano il prodotto finale dell'interazione tra fattori genetici, ambientali e dietetici. La genetica, l'ambiente, la flora intestinale, la dieta e in generale le risposte dell'organismo allo stress, agli ormoni, all'attività fisica e a qualsiasi tipo di trauma, possono alterare qualitativamente e quantitativamente il metaboloma. E' inoltre possibile differenziare il metaboloma primario, dipendente dai geni dell'ospite, ed il co-metaboloma, controllato dal microbioma (insieme di microrganismi, batteri, protozoi e funghi che vivono come organismi commensali o simbiotici nell'ospite)[82]. Negli studi metabolomici, è importante prevenire e correggere le fonti di bias, come l'età e il sesso, la dieta e lo stile di vita, l'ora del giorno della raccolta del campione, la temperatura e il tempo di conservazione. Inoltre, le malattie sistemiche e l'assunzione di farmaci e integratori possono potenzialmente alterare il metaboloma e dovrebbero essere prese in considerazione.

Tecniche strumentali e di analisi dei dati utilizzate nella metabolomica

Le 2 tecnologie principali attualmente utilizzate per l'analisi qualitativa e quantitativa dei metaboliti sono la Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e la Spettrometria di Massa (LC-MS). La Spettrometria di massa è una tecnica combinata con diverse tecniche di separazione, come la gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) [274]; è più sensibile e può coprire una gamma più ampia di metaboliti ma ha lo svantaggio di cambiare lo stato fisico del campione analizzato. La NMR, che è meno sensibile rispetto alla LC-MS – in quanto rileva principalmente i metaboliti solubili - non distrugge il campione e può analizzare campioni in vivo in modo non invasivo e ripetutamente nel tempo[86]. I campioni biologici di uso comune sono urine, plasma, siero, saliva, liquido seminale, liquor. Dopo la

raccolta, i campioni vengono conservati a temperature estremamente basse (-80°C) e, prima di essere analizzati, sono scongelati nel ghiaccio al fine di evitare bruschi sbalzi termici. Dopo lo scongelamento, i campioni possono essere analizzati in toto o subire processi di estrazione prima di essere analizzati con l’NMR e/o con la spettrometria di massa. La spettroscopia NMR misura le proprietà magnetiche di specifici nuclei atomici (come ^1H , ^{31}P , ^{13}C) dei metaboliti. Con questa metodica, i metaboliti a basso peso molecolare sono identificati attraverso le loro risonanze. In particolare, la posizione dei segnali nello spettro, la loro molteplicità e l’area integrata sono i parametri utilizzati per l’identificazione e la quantificazione delle singole molecole. La spettrometria di massa è invece utilizzata per identificare e quantificare i metaboliti in base alla differenza nel loro rapporto tra massa e carica, una volta avvenuta la loro separazione, tramite la ionizzazione di molecole in fase gassosa, la separazione dei diversi ioni prodotti e la loro rivelazione.

Ciascuna delle due tecniche presenta una serie di vantaggi e svantaggi elencati nella Tabella 2.

	VANTAGGI	SVANTAGGI
NMR	<ul style="list-style-type: none"> Alta specificità Alta riproducibilità Rapidità delle analisi Campioni analizzabili con minima o nulla manipolazione Non distruttiva 	<ul style="list-style-type: none"> Bassa sensibilità (nM) Elevato costo delle apparecchiature e della manutenzione
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilità (μM-nM) Diverse opzioni di separazione disponibili 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo Riproducibilità moderata

Tabella 2. Confronto tra Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e la Spettrometria di Massa (LC-MS).

Da queste indagini si ottengono dati multiparametrici che contengono informazioni quali-quantitative su un set completo di classi di metaboliti. Vista la numerosità e la complessità dei dati spettrali, la loro analisi prevede l'utilizzo di tecniche di elaborazione statistica multivariata che, tramite modelli matematici, statistici e informatici, ne permette l'interpretazione. I dati derivanti dalle analisi metabolomiche consistono in confronti fra popolazioni di soggetti con specifiche caratteristiche. Tramite algoritmi matematici, i software di analisi statistica multivariata analizzano la totalità delle variabili presenti in un sistema ricavando le componenti principali che descrivono la massima varianza data dal set di campioni. I modelli di interpretazione vengono elaborati mediante dei plot. Si ottiene sia una visione d'insieme delle variabili, la loro correlazione, la loro struttura e la presenza di eventuali bias. Le numerose variabili vengono studiate contemporaneamente. Esistono diverse tecniche di analisi statistica multivariata che si basano su metodi di proiezione. La PCA (Principal Component Analysis) fornisce una visione d'insieme del sistema di relazioni studiato: consiste in una procedura matematica che converte il set di variabili originarie correlate tra loro in un set di variabili non correlate, chiamate componenti principali.

Perimetro Compass

COMPASS è un perimetro automatico abbinato ad un oftalmoscopio a scansione che fornisce la sensibilità della soglia retinica e le immagini confocali della retina, mediante il sistema SLO[87] – Figura 7.



Figura 7. Perimetro Compas

Compatibilità con SAP

COMPASS offre piena compatibilità con il test del campo visivo standard 24-2, in quanto contiene un database di pari età della sensibilità retinica in soggetti normali (la cui creazione e il cui apporto è stato uno dei progetti del presente dottorato, che verrà discusso più avanti nel testo).

Oltre che la 24-2, le griglie COMPASS 10-2 e 30-2 sono altresì presenti nel device (Figura 8).

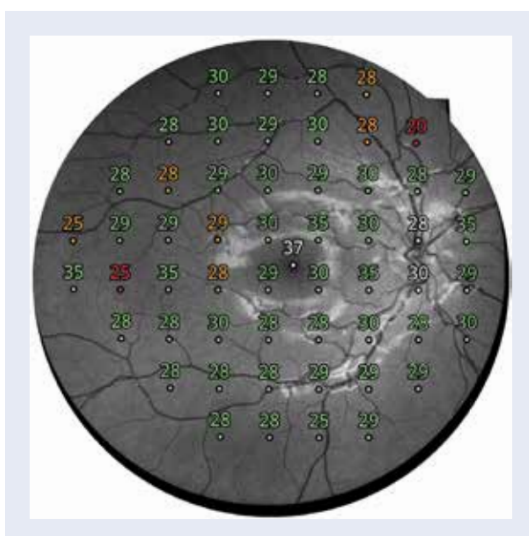


Figura 8. Campo visivo 24-2 eseguito con Compass

TrueColor Confocal Imaging

Per la prima volta in un test del campo visivo, COMPASS fornisce immagini confocali a 60° della retina in diverse modalità: TrueColor, Infrared (IR) e Red-free (Figura 9). Compass è in grado di scattare una foto del fondo oculare su un raggio di 30° con una pupilla di piccolo diametro, quindi non è necessaria alcuna dilatazione per la maggior parte dei soggetti.

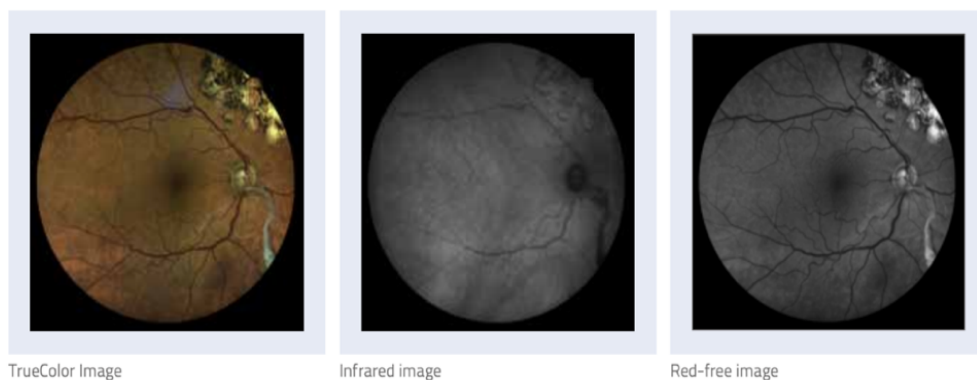


Figura 9. Foto fundus a colori, infrarosso e red free Compass

Tracciamento retinico attivo

Il “tracking” della retina è indispensabile alla perimetria automatizzata. Il monitoraggio continuo e automatizzato dei movimenti oculari produce una compensazione attiva delle perdite di fissazione, con gli stimoli perimetrici che vengono riposizionati automaticamente prima e durante la proiezione in base all'occhio corrente. Questo meccanismo riduce la variabilità del test-retest e garantisce un'accurata correlazione tra funzione (cioè valori di soglia retinica) e struttura (aspetto retinico).

Diagramma della fissazione del paziente durante il tempo dell'esame

In assenza di questo meccanismo, si verifica qualsiasi spostamento degli occhi al momento della proiezione degli stimoli, che produrrebbe facilmente artefatti nei risultati del campo visivo, riportando una sensibilità imprecisa. Le immagini IR, acquisite alla velocità di 25 immagini al secondo, consentono un

monitoraggio continuo e automatizzato dei movimenti oculari. Compass non prevede la necessità di lenti di prova con correzione automatica della rifrazione. Il SAP tradizionale viene eseguito attraverso la correzione refrattiva con lenti di prova, che aumenta il tempo di esame e può indurre artefatti. COMPASS è dotato di un sistema di correzione automatica della rifrazione, migliorante la performance del paziente (Figura 10).



Figura 10. Dettagli sul device Compass

Software di visualizzazione remota

COMPASS offre funzionalità integrate per la connettività di rete, sia per la revisione remota, che per il backup dei dati. COMPASS Remote Viewer è un software basato su browser che consente il backup da qualsiasi rete computer sulla stessa rete locale (LAN), con protezione tramite password. Il visualizzatore remoto fornisce strumenti di confronto delle immagini, misurazioni anatomiche, strumenti di post-elaborazione e altro ancora (tutto ciò è stato studiato nel progetto di telemedicina che verrà discusso in seguito). Le immagini scattate in momenti diversi possono essere registrate e visualizzate in rapida alternanza per facilitare il rilevamento dei cambiamenti morfologici nel tempo (Figura 11-12).



Figura 11. Stero-foto del fundus con Compass

- Calcolo cup/disc: i rapporti possono essere misurati e memorizzati (Figura 12).

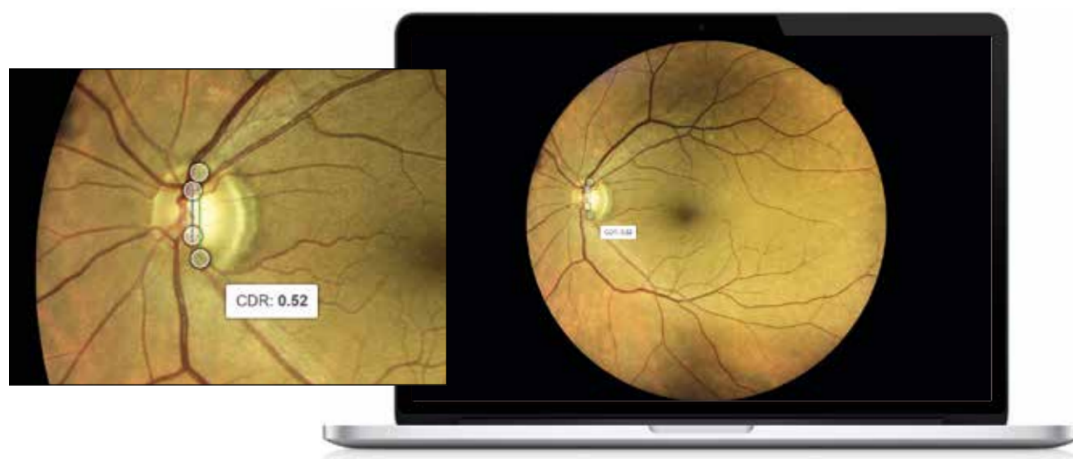
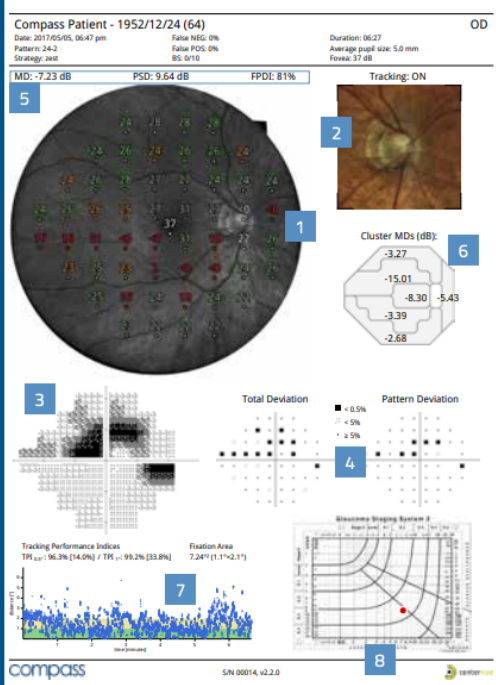


Figura 12. Foto fundus con Compass. A sinistra si vede dettaglio del Cup/Disc

Nella figura 13 sono riportate le caratteristiche della perimetria Compass.



Exam Report

- 1 Fundus Automated Perimetry (dB) over red-free image
- 2 Color image of ONH
- 3 Standard VF map
- 4 Deviation maps
- 5 Mean Deviation, Pattern Standard Deviation & Fundus Perimetry Deviation Index
- 6 Mean Deviation Cluster
- 7 Fixation plot
- 8 Glaucoma Staging Classifier

Progression Report

- 1 Baseline test
- 2 Follow-up test
- 3 Pointwise differential map
- 4 Cluster differential map
- 5 Mean Deviation progression
- 6 Fundus Perimetry Deviation Index progression

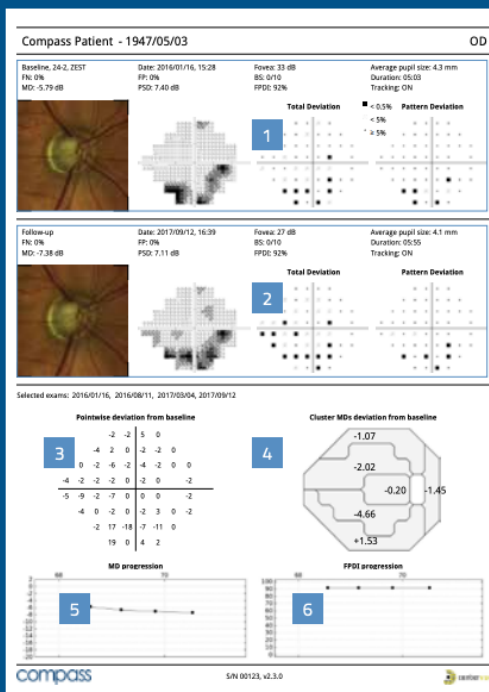


Figura 13. Caratteristiche descrittive della perimetria Compass.

SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro eseguito è stato un approccio multidisciplinare al glaucoma, realizzato sotto due aspetti principali: un approccio clinico con studio della perimetria ottica computerizzata e valutazione dei parametri della superficie oculare, e un approccio molecolare con analisi della Connessione 43 nell'umore acqueo e metabolomica del vitreo. I vari passaggi sono riassunti nel diagramma di flusso riportato nella Figura 14.

L'approccio clinico ha previsto la validazione del device Compass mediante un filone di ricerca comprensivo dei seguenti passaggi: la creazione di un database normativo per la griglia perimetrica 30-2 del software Compass, la valutazione della variabilità test-retest, l'"assessment" della concordanza tra tre revisori e la visita clinica mediante analisi delle immagini Compass "da remoto" e la valutazione punto per punto del perimetro 10-2 nello studio delle atrofie geografiche, in cui per la prima volta si testa un apparecchio in grado di sovrapporre gli "scores" perimetrici alla foto fundus. È stato, inoltre, eseguito uno studio per la valutazione di tutti i parametri della superficie oculare in pazienti affetti da glaucoma asimmetrico.

L'approccio molecolare ha riguardato lo studio della connessione 43 nell'umore acqueo e l'analisi metabolomica del vitreo di pazienti affetti da glaucoma.

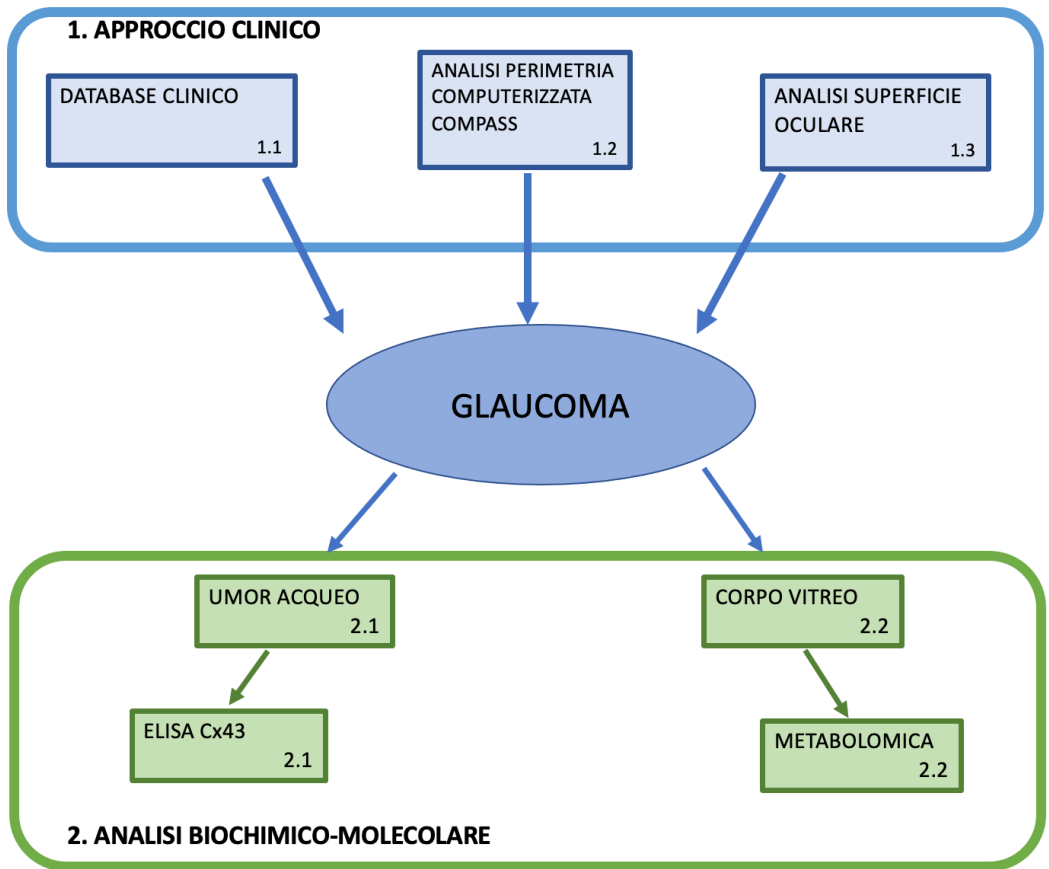


Figura 14. Flow-chart del lavoro eseguito

APPROCCIO CLINICO AL GLAUCOMA MEDIANTE PERIMETRIA OTTICA COMPUTERIZZATA COMPASS E ANALISI DELLA SUPERFICIE OCULARE

Materiali e metodi

Lo scopo del primo studio è stato di raccogliere un database normativo per tutte le posizioni del perimetro 30-2, in modo che il software Compass sia esteso ad una griglia perimetrica di 30° (Figura 15).

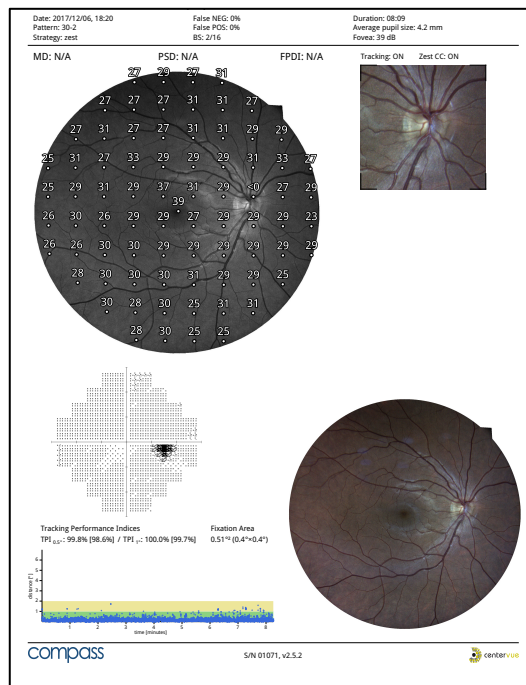


Figura 15. Campo visivo Compass 30-2

Lo studio è stato cross-sectional, osservazionale e multicentrico, ed è stato condotto presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, il Department for Ophthalmology, University of Rostock, e la Clinica Oculistica dell'Ospedale San Paolo, Università di Milano. Il protocollo di ricerca è stato

approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Ospedale San Paolo, ed eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

170 pazienti sono stati reclutati presso la Clinica Oculistica dell'Ospedale San Paolo; ogni sito avrebbe dovuto reclutare almeno 100 pazienti. I pazienti sono stati clusterizzati per età: 18-40, 41-60, 61-90 anni. I criteri di inclusione/esclusione clinici sono stati: età compresa tra 18 e 90 anni; migliore acuità visiva logMar corretta $\leq +0,1$ ($\geq 8/10$ decimali) nell'occhio in studio; refrazione sferica tra -12D e +15D nell'occhio studiato; astigmatismo tra -2D e +2D nell'occhio preso in esame; nervo ottico normale in entrambi gli occhi (assenza di escavazione all'esame oftalmoscopico, assottigliamento della RNR, "notching", emorragie del disco ottico, riduzione delle FNR); PIO inferiore a 21 mm Hg; nessuna patologia oculare, anamnesi negativa per trauma, chirurgia (tranne che cataratta non complicata) in entrambi gli occhi; assenza di patologie che potessero alterare il campo visivo; assenza di farmaci che potessero interferire con l'esecuzione dell'esame.

L'occhio dello studio è stato selezionato casualmente nel caso in cui entrambi gli occhi avessero soddisfatto i criteri di inclusione; se solo un occhio avesse soddisfatto i criteri di inclusione, è stato selezionato.

Le tappe dello studio sono state le seguenti:

Visita 1 – Visita di screening: anamnesi generale, remota e oftalmologica:

- acuità visiva in entrambi gli occhi;
- refrazione oggettiva in entrambi gli occhi;
- valutazione clinica del nervo ottico (lampada a fessura, oftalmoscopia o fundus camera, OCT delle FNR) in entrambi gli occhi
- tonometria di entrambi gli occhi
- soddisfacimento dei criteri di inclusione/esclusione clinici;

Poi, solo se il soggetto è stato incluso:

Visita 1 – Perimetria ottica computerizzata - per i pazienti che non avevano mai svolto un esame Compass, è stato eseguito un veloce test di apprendimento

(griglia COMPASS 24-2, ZEST) della durata di almeno 3 minuti; in seguito, è stato eseguito un campo visivo con Griglia COMPASS 30-2, ZEST, solo dell'occhio selezionato (inclusa foto a colori). Tutti i test perimetrici dovevano essere affidabili ($FP \leq 18\%$, $BS \leq 25\%$) e il diametro medio della pupilla durante il test $> 2,8$ mm. Qualsiasi prova inaffidabile è stata ripetuta. Tutti i dati raccolti da ciascun device Compass sono stati estrapolati online mediante backup. Sono state calcolate la sensibilità media puntuale e la Pattern Deviation per ciascuna posizione. È stata eseguita una regressione logistica a effetti misti. Il software di analisi statistiche R (R Core Team 2018) è stato utilizzato ai fini dei calcoli.

Successivamente, è stata valutata la variabilità test-retest per validare il prototipo Compass. Lo scopo dello studio è stato quello di raccogliere una serie di campi visivi eseguiti con Compass nell'arco di un periodo di circa due mesi, in una popolazione di pazienti con glaucoma a diversi stadi di gravità, al fine di caratterizzare la variabilità a breve termine rilevata dal dispositivo. Tale studio longitudinale, open-label, multicentrico, è stato realizzato presso IRCCS Fondazione "G.B. Bietti" (Roma, Italia), il Policlinico Città di Udine (Udine, Italia); Serviced 'Ophthalmologie et Centre du Glaucome HIA Begin (Parigi, Francia), Rotterdam Ophthalmic Institute (Olanda), Clinica Oculistica dell'Ospedale San Paolo (Milano, Italia). Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Ospedale San Paolo, ed eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

I pazienti arruolati in questo studio sono soggetti maschi/ femmine affetti da glaucoma ad angolo aperto in trattamento e in sede. Solo un occhio per paziente è stato incluso. Si tratta di uno studio longitudinale, open-label, multicentrico. 90 occhi di 90 pazienti glaucomatosi stratificati per MD hanno completato il protocollo. L'MD da utilizzare per la stratificazione è stato l'MD dell'ultimo test HFA affidabile disponibile. Ogni sito ha reclutato e completato:

3 o 6 pazienti con $-6 \leq MD \leq 0$ (perdita glaucomatosa precoce);

4 o 6 pazienti con $-12 \leq MD < -6$ (perdita glaucomatosa moderata);

6 pazienti con $MD < -12$ (perdita glaucomatosa avanzata).

I criteri di inclusione clinici sono stati: età compresa tra 18 e 80 anni; migliore acuità visiva corretta $\log Mar \leq +0.1$ ($\geq 8/10$ decimali) nell'occhio studiato; refrazione sferica tra $-12D$ e $+15D$ nell'occhio oggetto dello studio; astigmatismo tra $-2D$ e $+2D$ nell'occhio in studio; nervo ottico glaucomatoso preso in esame; OCT delle FNR o del NO anormale (almeno un settore fuori dai limiti normali); ultimo esame HFA eseguito non più di 3 mesi prima; storia di almeno 5 affidabili campi visivi effettuati nei 5 anni precedenti che fossero disponibili ad essere esaminati.

I campi visivi avrebbero dovuto essere conformi a almeno due dei seguenti criteri:

-Test perimetrici eseguiti non più di 5 anni prima nell'occhio in studio;

Unitamente a una delle seguenti condizioni:

i. MD or PSD fuori 95% dal limite di confidenza ($p < 0,05$);

ii. GHT fuori dai limiti normali;

iii. un cluster di almeno 3 punti con $p < 0,05$ nella mappa della Pattern Deviation;

iv. ciascun $p < 0,01$ che influisse sullo stesso emicampo; non poteva essere contiguo al punto cieco e non poteva attraversare la linea mediana orizzontale.

Criteri di esclusione clinici: qualsiasi intervento chirurgico oculare ad eccezione della chirurgia della cataratta non complicata e/o del glaucoma eseguita non più di 6 mesi prima; test perimetrico HFA eseguito in entrambi gli occhi più di 6 mesi prima; qualsiasi patologia oculare diversa dal glaucoma che potesse

influenzare il campo visivo; uso di qualsiasi farmaco che potesse interferire con la corretta esecuzione della perimetria o produrre una perdita del campo visivo; glaucoma ad angolo chiuso.

Si è fatto riferimento a uno studio pilota che ha mostrato che la deviazione standard (DS) delle differenze test-retest è di 1,36 dB tra il primo e il secondo test, e che dovrebbe potenzialmente sovrastimare la DS data la fase di apprendimento per tutti i soggetti. Pertanto, anche le stime della dimensione del campione dovrebbero essere prudenti. La formula sulla precisione della deviazione standard delle differenze per stimare la precisione del coefficiente di riproducibilità del 95% (95% CR) dato un intervallo di dimensioni del campione previste (n , numero di partecipanti), è stata utilizzata. Come fornito da Bland e Altman: $3s/\sqrt{n}$, con questa formula, è stato stimato che uno studio che includeva 90 pazienti avrebbe ottenuto un errore del +/- 18% nel senso che un CR del 95% = 2,67 dB, come supponendo questa ampia DS delle differenze, sarebbe stato stimato con un errore di +/- 0,49 dB, che suggeriamo sia clinicamente accettabile. Un abbandono del 20% dovuto alle visite multiple entro poche settimane previste, quindi il numero di pazienti reclutati per raggiungere il campione di 90 è $90 + 20\% = 110$ occhi di 110 pazienti.

L'occhio in esame è stato selezionato casualmente se entrambi gli occhi avessero soddisfatto i criteri di inclusione; se solo un occhio avesse soddisfatto i criteri di inclusione, questo avrebbe dovuto essere selezionato. Sono state previste sei sessioni in sei visite per eseguire tutti i campi visivi, ciascuna a circa una settimana di distanza dalla precedente.

Visita 0 - Visita di screening:

I seguenti esami sono stati eseguiti nel seguente ordine:

- migliore acuità visiva corretta, in entrambi gli occhi;

- refrazione oggettiva, in entrambi gli occhi;
- valutazione clinica delle condizioni del disco ottico (lampada a fessura, oftalmoscopia o foto fundus, OCT della FNR e NO), entrambi gli occhi. Se l'OCT è stato eseguito non più di 3 mesi prima, ha potuto essere utilizzato, altrimenti è stato necessario eseguire un nuovo esame OCT nella visita di screening;
- tonometria, in entrambi gli occhi;
- gonioscopia, in entrambi gli occhi;
- valutazione dei criteri di inclusione / esclusione clinici;

Successivamente, solo se l'occhio è stato incluso:

Visita 0 – Visita di screening:

- COMPASS demo “New Grid”, ZEST, occhio selezionato; Visita 1 – baseline (entro le 2 settimane dalla visita 0)
- COMPASS “New Grid”, ZEST, occhio selezionato (inclusa la foto fundus a colori); Visita 2 (tra 3 e 11 giorni dalla visita 1)
- COMPASS “New Grid,” ZEST, occhio selezionato (inclusa la foto fundus a colori); Visita 3 (tra 3 e 11 giorni dalla visita 2)
- COMPASS “New Grid”, ZEST, occhio selezionato (inclusa la foto fundus a colori); Visita 4 (tra 3 e 11 giorni dalla visita 3)
- COMPASS “New Grid”, ZEST, occhio selezionato (inclusa la foto fundus a colori); Visita 5 (tra 3 e 11 giorni dalla visita 4)

- tutti i test perimetrici dovevano essere affidabili ($FP \leq 18\%$, $BS \leq 25\%$, $FN \leq 30\%$) e il diametro pupillare medio durante la prova $> 2,8$ mm. Qualsiasi prova inaffidabile è stata ripetuta.

Nella Figura 16 è visibile un esempio di campo visivo “New Grid” con Compass.

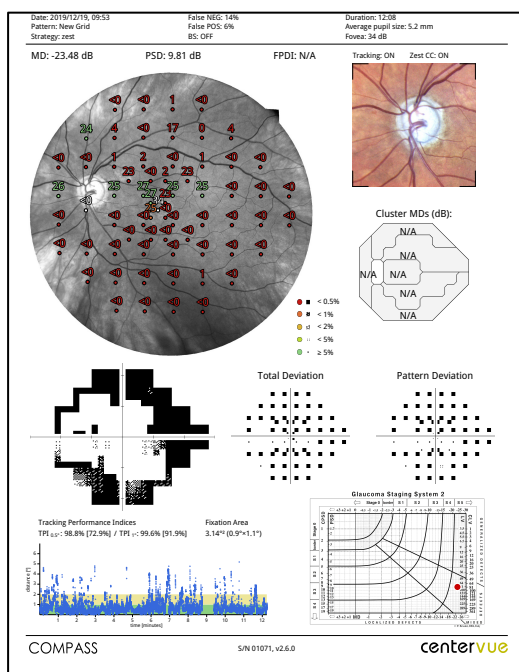


Figura 16. Campo visivo “New Grid” Compass

Tutti i dati raccolti da ciascuna macchina Compass sono stati analizzati dopo estrazione online dei dati mediante backup. I test del campo visivo inaffidabili sono stati esclusi e nell'analisi sono stati inclusi solo i pazienti con una serie completa di test archiviati affidabili. I campi visivi valutati alla prima visita non sono stati inclusi in nessuna analisi per evitare l'effetto di apprendimento. L'analisi statistica descritta di seguito è stata eseguita con tutti i dati ma anche per i tre sottoinsiemi secondo la stratificazione MD al fine di valutare come la variabilità a breve termine fosse correlata alla compromissione del campo visivo. Per ogni posizione nel test del campo visivo “New Grid” è stata valutata la variabilità a breve termine. La variabilità punto per punto a breve termine è

stata quantificata come media e DS dei valori soglia di decibel, in ciascuna sede, tra i cinque esami effettuati nel tempo. La variabilità a breve termine globale è stata ottenuta mediandola punto per punto per l'intero campo visivo (escluso il punto cieco). La variabilità a breve termine punto per punto è stata correlata alla quantità di eccentricità dalla fissazione mediante tecniche di regressione lineare. L'eccentricità è stata calcolata come la distanza euclidea dalla fissazione, in gradi, per ciascuna posizione di prova. Sono stati calcolati i grafici Bland-Altman e i limiti del 95% di concordanza della sensibilità alle intersezioni. L'effetto di apprendimento è stato valutato con l'analisi della varianza e l'associazione tra età, valori MD e la variabilità a breve termine è stata studiata con analisi di regressione.

Il terzo passo per la validazione del prototipo Compass è stata la valutazione inter e intra-operatore del macchinario. Uno studio, open-label, cross-sectional e monocentrico è stato condotto presso la Clinica Oculistica, ASST Santi Paolo e Carlo, dell'università di Milano da settembre a dicembre 2019. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Ospedale San Paolo, ed eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki. I criteri di inclusione clinici sono stati: età tra i 18 e gli 80 anni; diagnosi di glaucoma in almeno un occhio; pazienti che avevano precedentemente eseguito il campo visivo Compass. I criteri di esclusione clinici sono stati: diagnosi di ipertensione oculare; assunzione di farmaci che potessero interferire con la corretta esecuzione della perimetria o produrre difetti del campo visivo; inabilità ad eseguire la campimetria; inabilità ad eseguire campi visivi affidabili; inabilità a fornire un consenso informato.

Trattandosi di uno studio pilota che mirasse a studiare delle diagnosi cliniche "da remoto", il sample size è stato stabilito in base al numero di pazienti disponibili nella zona dell'ospedale. Sono stati inclusi nello studio entrambi gli occhi o solo uno che fosse affetto da glaucoma. Ai fini di evitare bias, in caso di segni perimetrici bilaterali di glaucoma è stato scelto in maniera causale un

solo occhio, che non fosse necessariamente il peggiore. Dopo aver stabilito i criteri di inclusione/esclusione, il campo visivo Compass “New Grid”/24-2/10-2, ZEST, dell’occhio eleggibile è stato scelto (prima visita). In seguito, il test COMPASS “New Grid”/24-2/10-2, ZEST, (inclusa la foto a colori) è stato ripetuto (seconda visita). La tonometria con iCare IC200 Tonometer e una foto stereo immagine sono state eseguite; l’OCT delle FNR è stato realizzato in maniera casuale, in accordo con le linee guida applicabili alla pratica clinica.

Il lavoro di valutazione clinica “da remoto” ha previsto due fasi: durante la prima fase, i dati sono stati indipendentemente revisionati da tre oftalmologi, chiamati Reviewers (A, B e C), i quali hanno classificato ogni occhio come “progredito” o “non progredito/instabile a causa delle fluttuazioni” comparando la prima e la seconda visita di ogni paziente.

Nel corso della seconda fase, i pazienti glaucomatosi sono stati valutati mediante una visita clinica canonica dal Reviewer A, e tali risultati sono stati considerati il “Gold Standard”. I dati OCT raccolti durante lo studio sono stati disponibili per i tre Reviewers ai fini della valutazione delle perimetrie.

É stato calcolato:

- l’agreement intra-observer tra la valutazione “da remoto” e l’esame clinico (“Gold Standard”) eseguiti dal Reviewer A;
- l’agreement tra l’analisi dei Reviewer B e C, rispettivamente, e il “Gold standard”;
- l’agreement inter-observer tra le valutazioni “da remoto” del reviewers A, B e C, per stabilire l’accordo tra i tre esaminatori.

La correlazione (tra il Reviewer A e B; tra il Reviewer B e C; tra il Reviewer A e C rispettivamente), e con il “Gold Standard”, sono state calcolate mediante l’indice K di Cohen. L’indice di Cohen per la concordanza tra i tre Reviewer è stato applicato in caso o meno di disponibilità dell’OCT. L’interpretazione dei valori di Kappa è stato eseguito in accordo con le linee guida: $k < 0,2 =$

concordanza molto bassa; k tra 0,2 e 0,4 = concordanza bassa; tra 0,41 e 0,61 = moderata; tra 0,61 e 0,80 = buona; $> 0,80$ = eccellente. Una regressione lineare multipla e un test Anova del Delta dei dati Compass (considerata una variabile dipendente) del Delta della PIO e dell'età del paziente (come variabile indipendente) è stata calcolata.

Come ultimo step, è stata valutata la precisione della struttura-funzione del Compass nello studio delle atrofie geografiche.

L'atrofia geografica (AG) è una forma avanzata, progressiva e irreversibile, di degenerazione maculare senile (DMS) la cui prevalenza è stimata in circa 8 milioni di persone in tutto il mondo [88]. Le aree atrofiche compaiono inizialmente nella retina peri-foveale e i pazienti non percepiscono problemi visivi poiché la loro visione centrale è ancora preservata. L'atrofia forma un anello attorno alla fovea, che può rimanere inalterata per vari anni, un fenomeno noto come risparmio foveale ("foveal sparing")[89]. In questo caso, la fissazione retinica rimane centrale e stabile. Vari studi hanno riscontrato che le AG si ingrandiscono a velocità comprese tra 0,53 e 2,6 mm²/anno[89]. Non esiste attualmente alcun trattamento disponibile che possa arrestare o far regredire la progressione delle AG; tuttavia, metodi diagnostici affidabili per monitorare la progressione dell'AG sono di notevole importanza anche per valutare l'efficacia di potenziali agenti terapeutici, per quanto riguarda i cambiamenti sia strutturali che funzionali. I metodi standard per la diagnosi e il follow-up della AG sono l'acuità visiva, la sensibilità al contrasto, la foto fundus a colori, le immagini autofluorescenza (AF) e infrarosso (IR), la tomografia a coerenza ottica (OCT), la microperimetria o la perimetria 10-2[90, 91] (Figura 17). La microperimetria è attualmente l'indagine clinica di scelta per valutare le funzioni visive residue e la visione funzionale nelle malattie degenerative maculari, in particolare la GA[92]. La correlazione anatomico-funzionale sulle aree di AG è piuttosto inesplorata. Oggigiorno la microperimetria è il metodo

diagnostico più affidabile per stabilire la relazione struttura-funzione della AG; tuttavia, i dispositivi di microperimetria attualmente disponibili sul mercato non sono dotati di foto del fondo oculare sullo sfondo.

Lo scopo di questo studio è stato di valutare una corrispondenza tra le immagini retiniche e la sensibilità perimetrica, entrambe fornite dal Compass.

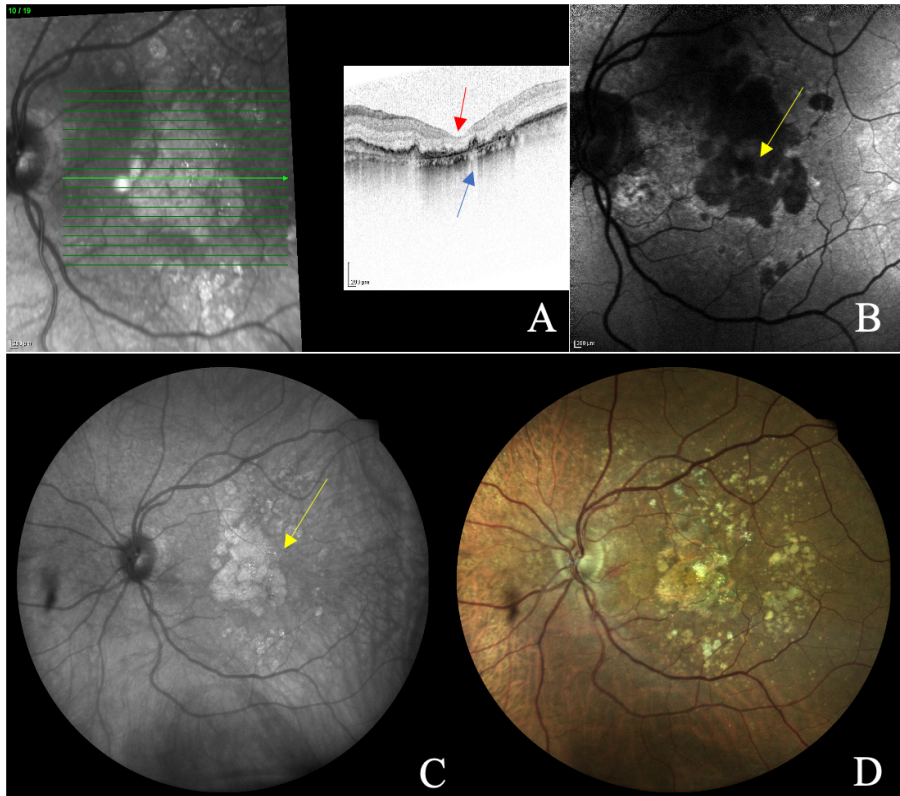


Figura 17. Imaging multimodale di AG: A) Heidelberg OCT di una AG mostra l'atrofia dell'EPR- freccia blu- e assottigliamento dell'IS /OS -freccia rossa- ottenuti con il dispositivo Heidelberg; B) AF di una lesione AG acquisita con dispositivo Heidelberg, vista come area scura ipofluorescente - freccia gialla-; C) L'immagine IR di una AG scattata con Compass mostra AG come una regione bianca e iperreflettiva - freccia gialla; D) foto fundus di AG realizzato con Compass.

Questo studio è stato condotto presso la Clinica Oculistica dell'Ospedale San Paolo, Università di Milano, Italia, da aprile 2018 e giugno 2019. Il protocollo di

ricerca è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Ospedale San Paolo, ed eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

Gli obiettivi dello studio erano:

- 1) valutare l'accordo delle seguenti immagini per valutare la morfologia della AG: fotografia Compass true-color, Compass IR, Heidelberg Spectralis IR, Heidelberg Spectralis AF.
- 2) quantificare la corrispondenza tra la sensibilità retinica perimetrica (SRP) e le seguenti immagini: fotografia Compass true-color, Compass IR, Heidelberg Spectralis IR, Heidelberg Spectralis AF.
- 3) valutare la corrispondenza della SRP con le aree AF.

Il protocollo dello studio era retrospettivo e trasversale. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a un esame oftalmologico completo, inclusa la misurazione della migliore acuità visiva corretta (BCVA) mediante Scala di Snellen (conversione dell'acuità decimale in logMAR), SD-OCT, imaging AF e IR (Spectralis HRA + OCT, Heidelberg, Germania), e 10-2 Compass (Compass, Centervue, Padova, Italia) consistente in un campo visivo centrale di 10° sovrapposto al fondo oculare e all'imaging IR. Entrambi gli occhi, se adempienti ai criteri di inclusione, sono stati considerati per ciascun paziente.

I criteri di inclusione clinici erano: 1) Età compresa tra 18 e 95 anni, con BCVA logMar $\geq +0,1$ ($\geq 8/10$ decimali) nell'occhio studiato; 2) refrazione sferica compresa tra -8D e + 8D nell'occhio preso in esame; astigmatismo tra -2D e + 2D nell'occhio oggetto di studio; 3) nervo ottico sano in entrambi gli occhi (nessuna evidenza di aumento dell'escavazione, assottigliamento della RNR o "notching" emorragie del disco, assottigliamento delle FNR); 4) PIO inferiore a 21 mm Hg in entrambi gli occhi. I criteri di esclusione clinici erano: 1) BCVA $< 0,8$ Logmar; 2) presenza di cataratta C4-C5 secondo il Lens Opacities Classification System III; 3) storia di neovascolarizzazione coroideale e

trattamento con anti-VEGF; 4) chirurgia oculare ad eccezione della chirurgia della cataratta non complicata in entrambi gli occhi eseguita meno di 6 mesi prima; 5) presenza di patologie che potessero influire sul campo visivo; 6) uso di farmaci che potenzialmente interferissero con la corretta esecuzione della perimetria. Tutti i test sono stati esaminati per individuare la presenza di artefatti, inclusi fissazione inappropriata, affaticamento, disattenzione o effetti di apprendimento, artefatti dati dalla palpebra superiore, qualsiasi evidenza di condizioni diverse dalla AG che potessero influenzare i risultati. Sono stati selezionati solo test affidabili. Per Compass, l'affidabilità era $FP \leq 18\%$, $BS \leq 25\%$, $FN \leq 30\%$; è stato rispettato un diametro pupillare medio durante il test $> 2,8$ mm. 62 soggetti soddisfacevano i criteri di inclusione ed esclusione; sono stati esclusi 21 pazienti: 7 per fissazione instabile e 9 per esami Compass inaffidabili.

1) Correlazione tra immagini retiniche

Le immagini del perimetro Compass con foto fundus a colori come background sono state analizzate per valutare la curva ROC. L'immagine Compass è stata convertita in bianco/nero: i punti bianchi corrispondono alle aree atrofiche, quelli neri per le aree al di fuori delle regioni atrofiche, ovvero la retina sana. Le dimensioni delle immagini IR (sia Compass che Spectralis) e le immagini AF sono state omologate per ogni paziente, utilizzando lo strumento "Scale" con il software GIMP (www.gimp.org). In tal modo, l'area GA è stata tracciata manualmente e il conteggio dei pixel grigi (area) è stato eseguito utilizzando ImageJ (imagej.nih.gov). È stata applicata la correlazione di Pearson per confrontare l'estensione della AG ottenuta con questi due dispositivi.

2) Correlazione struttura-funzione

Al fine di valutare la concordanza tra struttura (con qualsiasi modalità di imaging) e sensibilità retinica perimetrica (SRP) con il Compass, le immagini

elaborate come descritto nel paragrafo precedente sono state poi sovrapposte alla griglia perimetrica (Figura 18). Sono state ottenute delle immagini TIFF, le quali sono state analizzate con il software Image J posizionando il cursore su ogni punto perimetrico e registrando la corrispondente scala di grigi (SG) dell'immagine del fondo oculare. È stata quindi calcolata la correlazione puntuale tra SG e SRP.

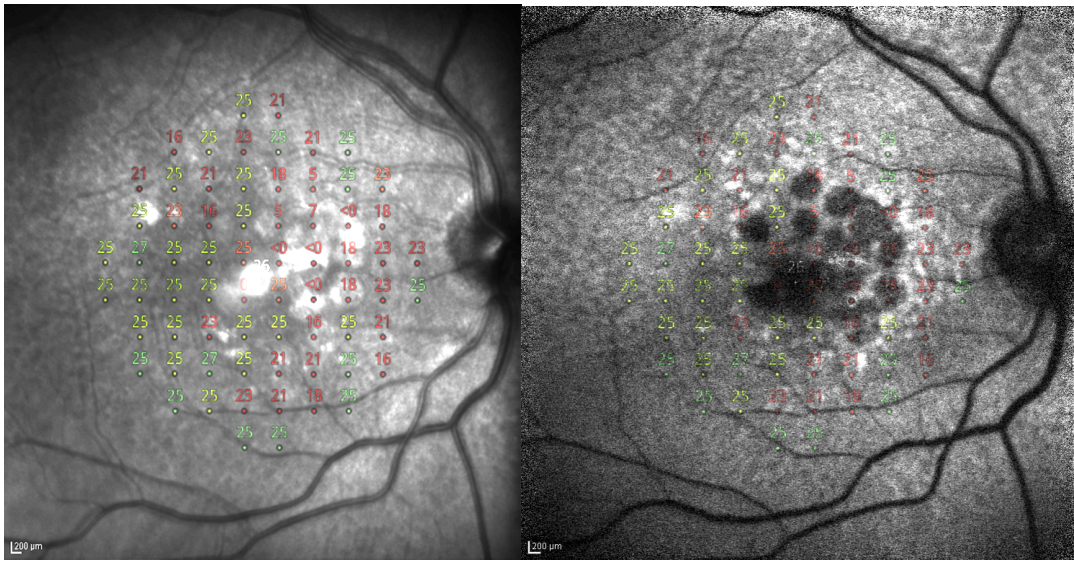


Figura 18. Un esempio di "merging image", ottenuta utilizzando il software GIMP, dopo aver sovrapposto un perimetro Compass 10-2 con immagini Heidelberg IR (a sinistra) e AF (a destra).

I dati sono stati in seguito esportati su Excel per creare i grafici ed è stato applicato un processo di binarizzazione (Black e White). Il codice B/W è stato assegnato basandosi sull'osservazione dei punti in corrispondenza del fondo AF e IR. Sono stati inoltre riportati i valori di Total Deviation e le percentuali di Pattern Deviation.

L'analisi mirava a valutare:

1. se la griglia Compass PRS fosse predittiva di un valore bianco dello sfondo del fondo oculare;

2. se fosse presente un accordo tra le aree GA, misurate sia con Compass IR che con Heidelberg IR;
3. se fosse presente una correlazione tra i punti della Scala di Grigi (SG) e della Total Deviation del Compass e le percentuali della Pattern Deviation (indice di correlazione) dopo la sovrapposizione del perimetro del Compass con le immagini AF e IR di Heidelberg rispettivamente.

È stata eseguita una regressione logistica a effetti misti[93]. L'analisi di correlazione tra la Total Deviation e la Pattern Deviation è stata calcolata utilizzando un'analisi di correlazione non parametrica di Spearman.

4. Le aree AG sono state misurate due volte dallo stesso operatore, al fine di valutare la variabilità test-retest. È stata calcolata la correlazione di Pearson tra le misurazioni di Heidelberg e Compass; quindi, è stata eseguita la correlazione tra le misurazioni intra-osservatore, con Compass e Heidelberg rispettivamente;
5. per quanto riguarda la correlazione tra la SRP di Compass e la scala di grigi su immagini IR e AF, è stata eseguita una correlazione di Pearson tra SG e i valori della Total Deviation e della Pattern Deviation. È stato realizzato un test t per campioni indipendenti per valutare la correlazione tra le regioni SG e B/W sia su AF che su sfondo IR, e tra SG e punti iper-fluorescenti su immagini AF.

Il software R Statistical (R Core Team 2018) è stato utilizzato per eseguire le analisi statistiche.

L'approccio clinico al glaucoma ha previsto l'analisi della superficie oculare (SO) in pazienti affetti da glaucoma asimmetrico.

Uno studio clinico trasversale è stato condotto presso la Clinica Oculistica dell'Ospedale San Paolo, dell'Università degli Studi di Milano da gennaio 2020 a febbraio 2020. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Ospedale San Paolo, ed eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato scritto è stato ottenuto da ciascun partecipante dopo una spiegazione completa degli obiettivi dello studio e delle sue procedure. Il principale criterio di inclusione clinico prevedeva adulti di entrambi i generi con diagnosi di glaucoma primario ad angolo aperto, trattato chirurgicamente con trabeculectomia in un occhio e in trattamento con colliri ipotonizzanti nell'occhio controlaterale. Per ogni paziente, è stato inoltre valutato l'occhio che mostrasse i segni clinici peggiori. I criteri di esclusione clinici sono stati: altre forme di glaucoma, DED (Dry Eye Disease) di natura neuropatica (causato da diabete, utilizzo di lenti a contatto da lungo tempo, precedenti infezioni oculari erpetiche, precedenti chirurgie oculari di altro tipo), sindrome di Sjögren e/o altre patologie autoimmuni, presenza di patologie corneali e di occhio secco di altra natura (congiuntiviti passate attive o cicatriziali, ustioni della SO, traumi oculari, cheratinizzazione del margine palpebrale e/o altre anomalie anatomiche e funzionali della palpebra), uso corrente di lenti a contatto, donne in stato di gravidanza e allattamento.

È stata vagliata la storia medica dei pazienti affetti da glaucoma seguiti presso l'Ambulatorio Glaucoma dell'Ospedale San Paolo, e i pazienti adempienti ai criteri di inclusione sono stati contattati per partecipare a questo studio cross-sectional.

I pazienti arruolati sono stati sottoposti ai test che seguono nell'ordine descritto:

- 1) Questionario Impact of Dry Eye on Everyday Life (IDEEL)
- 2) Questionario OSDI (OSDI, Copyright 1995, Allergan Inc, Irvine, California, US).
- 3) Osmolimetria del film lacrimale
- 4) Esame del segmento anteriore eseguito alla lampada a fessura

- 5) Grading dell'iperemia congiuntivale
- 6) Tear break-up time test (tBUT)
- 7) Grading dello staining corneale
- 8) Test di Schirmer

-Il questionario IDEEL è composto da 57 domande suddivise in 3 diversi moduli. Una scala Likert a 4 punti viene utilizzata per tutti i moduli ad eccezione della "frequenza dei sintomi dell'occhio secco" che viene valutata su una scala Likert a 5 punti. Il formulario "Impatto dell'occhio secco sulla vita quotidiana" è composto da 3 sottomoduli: Impatto sulle attività quotidiane (9 formulari), Impatto emotivo dovuto all'occhio secco (12 formulari) e Impatto sul lavoro dovuto all'occhio secco (6 formulari). Una scala Likert a 5 punti è prevista per tutti gli elementi tranne lo "Situazione a lavoro" che viene valutato su una scala dicotomica "Sì" o "No". Il modulo Soddisfazione per il trattamento dell'occhio secco è costituito da due valutazioni comprensive di Soddisfazione per l'efficacia del trattamento (6 elementi) e Disturbo/inconveniente correlato al trattamento (4 elementi). Una scala Likert a 5 punti viene utilizzata per tutti gli elementi tranne "Uso collirio", che è stato valutato su una scala dicotomica "Sì" o "No".[94]

-Il questionario OSDI è stato somministrato al paziente da un'ortottista. Il punteggio OSDI varia da 0 a 100 (0-12, normale; 13-22, DED lieve; 23-32, DE moderato; 33 o più, DED grave). [144] L'OSDI è un questionario che include 12 domande, suddivise in tre gruppi. Il primo gruppo contiene domande sui sintomi oculari della DED, il secondo sui sintomi oculari durante la visione della televisione o la lettura di un libro, e il terzo gruppo prevede quesiti sui sintomi oculari indotti da fattori ambientali. Ogni risposta è valutata su una scala da 0 a 4, dove 0 indica nessuna delle volte; 1, qualche volta; 2, la metà del tempo; 3, il più delle volte; 4, sempre. [95]

-L'osmolarità è stata misurata mediante il dispositivo i-Pen (I-MED Pharma Inc., Dollard-des-Ormeaux, QB, Canada). Il campione lacrimale è stato raccolto dal menisco lacrimale della palpebra inferiore, mentre il paziente fissava verso l'alto. È stata prestata attenzione per evitare il contatto tra la sonda e il globo oculare. L'osmolimetria è stata realizzata almeno un'ora dopo l'ultima instillazione del collirio[96, 97].

-Classificazione dell'iperemia congiuntivale: è stata valutata l'intera iperemia congiuntivale bulbare alla lampada a fessura. Le scale di valutazione erano le seguenti: 0 (nessuna: nessuna iperemia nella congiuntiva bulbare), 1 (lieve: dilatazione di alcuni vasi sanguigni congiuntivali (2 o 3)), 2 (moderata: dilatazione di molti vasi sanguigni congiuntivali (≤ 4 a 9 vasi)) o 3 (grave: dilatazione di tutti i vasi sanguigni congiuntivali (≥ 10 vasi))[98].

-Il tBUT è stato misurato determinando l'intervallo di tempo tra la fine dell'ammiccamento e la rottura della lacrima. Il tBUT è stato eseguito dopo aver diluito 2 strisce su 0,5 ml di soluzione salina e aver instillato con la pipetta 5 microlitri di soluzione di fluoresceina di sodio al 5% priva di conservanti nel tarso congiuntivale inferiore. Gli spazi scuri nel film lacrimale fluorescente (visti sulla lampada a fessura con un ingrandimento 10X utilizzando l'illuminazione blu cobalto) erano indicativi di rottura lacrimale[99].

-Scala di Oxford: dopo l'instillazione di una goccia di fluoresceina, l'occhio viene esaminato con la lampada a fessura utilizzando il filtro blu. Per osservare e valutare la colorazione sull'intera SO, è importante che l'esaminatore sollevi leggermente la palpebra superiore del paziente. Il sistema Oxford utilizza una scala composta da una serie di sei gradi, ordinata da A ad E in ordine di gravità crescente. In ogni grafico, la colorazione è rappresentata da una punteggiatura. Per valutare la colorazione, vengono effettuati confronti tra i disegni ufficiali e l'aspetto della colorazione sulla congiuntiva interpalpebrale esposta e sulla cornea del paziente.[99]

-Il test di Schirmer è stato eseguito senza anestesia, 15 minuti dopo il test della fluoresceina corneale, in una stanza scarsamente illuminata. Mentre il paziente guardava verso l'alto, una striscia sterile è stata inserita nel sacco congiuntivale inferiore sopra il terzo temporale del margine palpebrale inferiore. Dopo 5 minuti la striscia è stata rimossa e l'assorbimento lacrimale sulla striscia (in millimetri) è stato misurato.[100]

I dati di entrambi gli occhi sono stati studiati e confrontati mediante t-test per i dati appaiati. È stata calcolata la correlazione tra i questionari. Le correlazioni tra i questionari e i parametri ottenuti dai due occhi sono state calcolate al fine di valutare se i risultati del questionario fossero influenzati maggiormente da Trab Eye, Med Eye o dall'occhio che mostrasse i sintomi peggiori. Wilcoxon Signed Rank è stato applicato per analizzare la differenza di osmolimetria, tBUT e test di Schirmer tra Med eyes e Trab Eyes; la correlazione di Pearson è stata realizzata per calcolare le correlazioni tra i parametri della SO, e tra le variabili di SO e la quantità di principi attivi, dei conservanti e la durata della terapia in Med Eyes.

Risultati

Per quanto riguarda la creazione del database normativo 30-2, 170 soggetti sani sono sottoposti al campo visivo 30-2 Compass. 78 erano uomini e 92 erano donne. L'età media era $49,87 \pm 8,48$; la sensibilità retinica nella fovea era: $35,12 \text{dB} \pm 2,47$; l'MS: $34,69 \text{dB} \pm 9,52$; il tempo di esecuzione è stato: $7'5,02 \pm 5'1,57$; la correzione ottica (sferica) media: $0,05 \text{ diottrie} \pm 0,39$ (Figura 19).

L'analisi sulla variabilità test-retest, ha previsto 18 pazienti esaminati, 8 donne e 10 uomini. L'età media è stata: $65,0 \pm 9,9$; 6 persone presentavano un MD tra -6 e 0; 6 persone presentavano un MD tra -12 e -6; 6 persone presentavano un MD < -12 (Tabella 3). La durata media del test è stata: $8':21 \pm 1:20$; la

distribuzione MSs:19,52 [5,17; 28,63]; la distribuzione dB MDs:-8,31 [-22,03; -0,52] dB (Tabella 4 e 5).

I risultati sono riassunti nei grafici inseriti nelle figure 20,21,22.

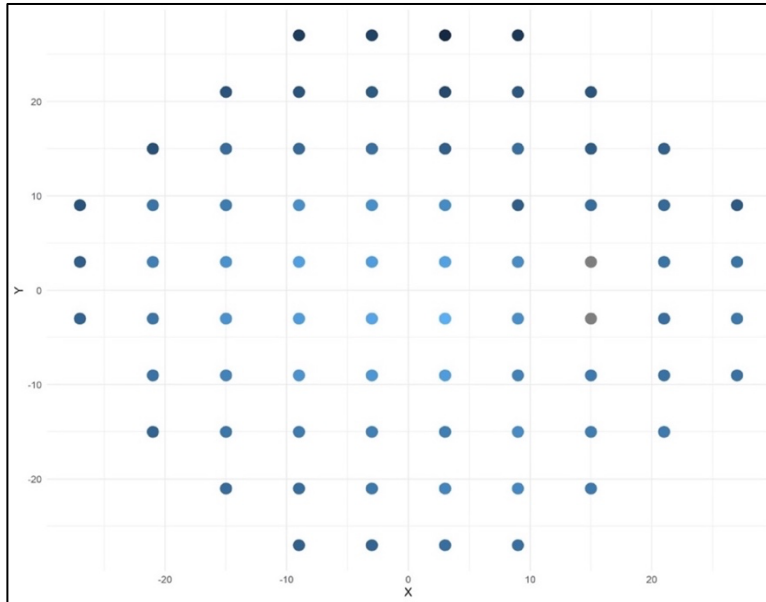


Figura 19. Scatterplot dei valori della sensibilità retinica (espressi in decibel)

Sito	Nome sito	del N	-6 ≤ MD ≤	-12 ≤ MD <	MD < -
			0	6	12
1	ROMA	21 / 18 (117%)	8	5	8
2	UDINE	18/18 (100%)	3	2	1
3	PARIGI	-	-	-	-
4	BELGIO	-	-	-	-
5	MILANO	18 / 18 (100%)	6	6	6

Tabella 3. Distribuzione dei test eseguiti nelle varie sedi.

Nome del sito	N (occhi)	Età media	Durata media del test	MS dB	MD dB
ROMA	21	66,2 ± 9,7	8:27 ± 1:23	19,36	-8,43
UDINE	18	6,7 ± 8,3	8:31 ± 0:55	18,5	-9,59
MILANO	18	62,3 ± 12	7:59 ± 1:26	20,55	-7,19

Tabella 4. La presente tabella mostra I parametri in studio (numero di occhi, età media, durata media del test, MS e MD)

Pazienti (N=36)		
Screening	8':31" ± 1:31	Media totale 8':21" ± 1:20
Baseline	8':22" ± 1:24	
Follow-up 1	8':20" ± 1:18	
Follow-up 2	8':15" ± 1:19	
Follow-up 3	8':28" ± 1:25	
Follow-up 4	8':17" ± 1:18	

Tabella 5. Questa tabella mostra la durata media dei campi visivi "New Grid" per ogni visita. La durata dell'esame non sembra essere influenzata dall'effetto apprendimento.

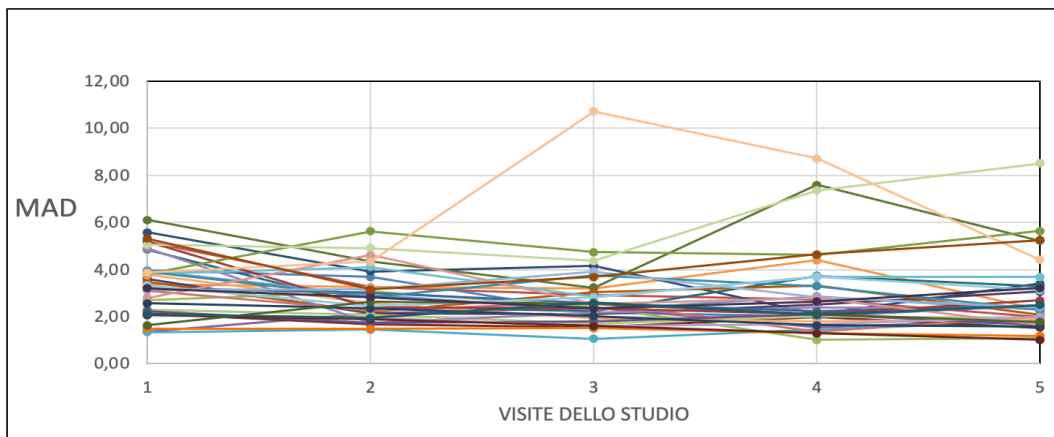


Figura 20. Il presente grafico mostra la Mean Absolute Difference dei 18 pazienti reclutati presso l'Ospedale San Paolo (espressa in dB sull'asse delle ordinate) riportata per ogni follow up (visita nell'asse delle ascisse).

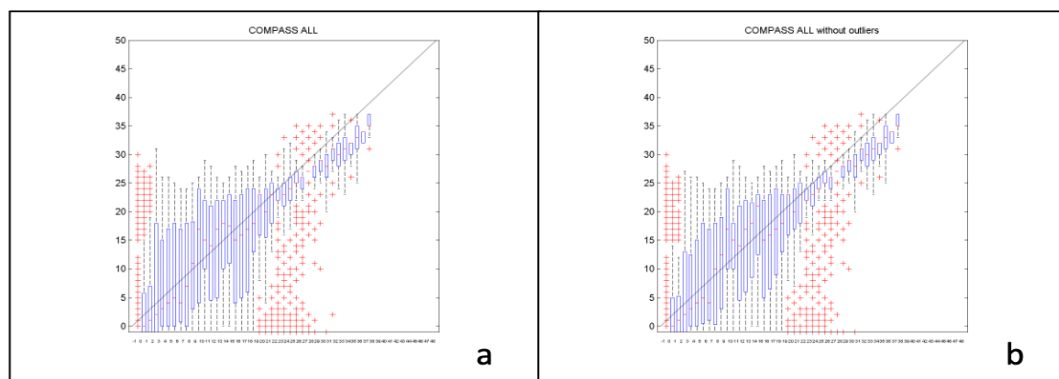


Figura 21. a. Boxplot che riporta la variabilità test-retest nel gruppo di pazienti studiato: nell'asse delle ordinate la Mean Average Difference e nell'asse delle ascisse il numero di campi visivi effettuati; b. Nell'asse delle ordinate la Mean Average Difference e nell'asse delle ascisse il numero di campi visivi effettuati senza i tre outliers identificati.

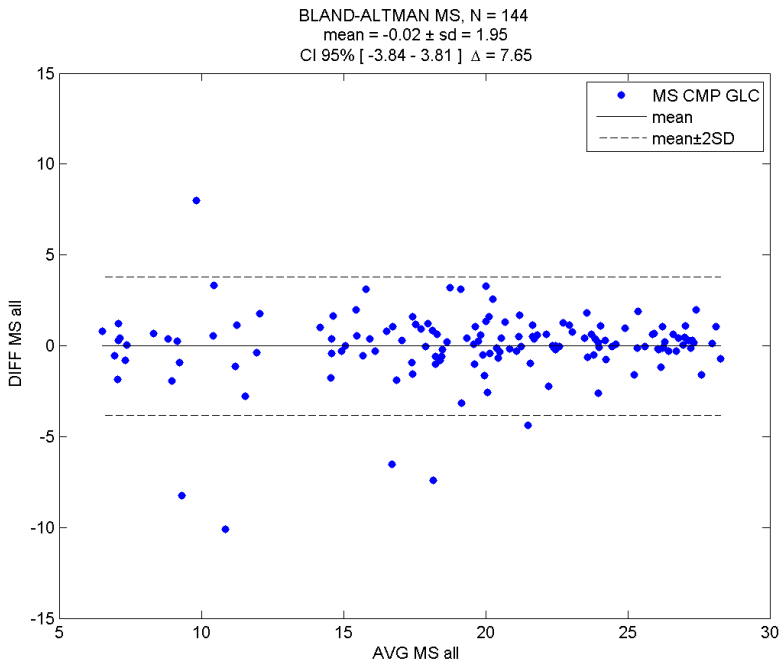


Figura 22. Plot Bland-Altman della variabilità test-retest di ogni coppia di campi visivi. Nell'asse delle ascisse è presente la media (average: "AVG"); nell'asse delle ordinate la differenza della Mean Sensivity (DIFF MS) per ogni campo visivo.

Per la valutazione dell'agreement "da remoto" tra i tre Reviewers, un totale di 63 occhi è stato arruolato nel presente studio (63 pazienti: 36 maschi, 27 femmine; età media: $68,4 \pm 12,0$ anni). 31 occhi destri; 32 occhi sinistri.

La media dei valori di PIO nella Visita 1 è $14,31 \pm 3,3$; la media dei valori del MD nella Visita 1 è $-11,9 \pm 7,0$. 98,4% ha eseguito la foto a colori durante la Visita 1; 1,6% non ha eseguito la foto fundus durante la Visita 1. Il 96,8% non ha presentato la stereo foto del fundus alla Visita 1; 3,2% ha presentato la stereo foto del fundus alla Visita 1. Il 60,3% dei pazienti ha effettuato l'OCT delle FNR durante la prima visita; il 39,7% non ha realizzato l'OCT delle FNR durante la prima visita.

I valori medi di PIO nella Visita 2 sono $14,7 \pm 5,2$; la media del MD nella Visita 2 è $-12,4 \pm 7,1$. Il 100% dei pazienti ha eseguito la foto a colori del fundus e la

stereo foto della retina. Il 27% dei pazienti ha eseguito lo SD-OCT; il 73% dei pazienti non ha realizzato lo SD-OCT. Il 3,2% dei pazienti ha eseguito un campo visivo 10-2; il 19,0% ha realizzato una perimetria 24-2; il 77,8% ha fatto una campimetria “New-Grid”. L’intervallo di tempo medio (espresso in mesi) tra la prima e la seconda visita è stato $24,1 \pm 9,5$ mesi.

La concordanza tra il Reviewer A e il Reviewer B durante la Fase 1 è elevata ($\kappa = 0,88$); la correlazione tra il report clinico del Reviewer A e la valutazione del Reviewer B è molto alta ($\kappa = 0,99$). Le valutazioni realizzate dal Revisore A e dal Revisore C durante la Fase 1 ha mostrato un ottimo agreement ($\kappa = 0,96$); la correlazione tra il revisore A e il revisore C nella seconda fase è eccellente ($\kappa = 0,96$). La concordanza tra il revisore B e il revisore C è significativa ($\kappa = 1,0$). La concordanza tra la Fase 1 e la Fase 2 del revisore A è totale ($\kappa = 1,00$) – Tabella 6. L’agreement tra il Reviewer A, B e C è riportato nella tabella sotto.

	Reviewer A	Reviewer B	Reviewer C
Reviewer A - da remoto -	1,00	0,88	0,96
Reviewer A - in vivo -	1,00	0,99	0,96
Reviewer B	0,88	1,00	1,00
Reviewer C	0,96	1,00	1,00

Tabella 6. La presente tabella mostra i K di Cohen degli agreement tra i vari Reviewers.

Pazienti senza OCT

La concordanza tra il revisore A e il revisore B nella prima fase è elevata (kappa = 0,82); la valutazione realizzata dal Revisore A e dal Revisore C durante la Fase 1 ha mostrato un buon accordo (kappa = 0,81). L'agreement tra il revisore A e il revisore B durante la fase 2 è significativo (valore kappa = 0,80). L'agreement tra il report realizzato dal Reviewer C e il Reviewer B con OCT, rispettivamente, ha mostrato un ottimo accordo (kappa = 0,90). La concordanza tra la valutazione "da remoto" effettuata dal Revisore C e le visite cliniche del Revisore A è stata eccellente (kappa = 0,96). L'accordo tra l'esame "da remoto" effettuato dal revisore A e la visita medica del revisore A è moderato (kappa = 0,75). L'agreement tra il Reviewer A, B e C utilizzando l'OCT è riportato in basso- Tabella 7.

	Reviewer A -da remoto-	Reviewer B	Reviewer C
Reviewer A -da remoto-	1,00	0,82	0,81
Reviewer A -in vivo-	0,75	0,80	0,96
Reviewer B	0,82	1,00	0,90
Reviewer C	0,81	0,90	1,00

Tabella 7. La presente tabella mostra i K di Cohen degli agreement tra i vari Reviewers utilizzando l'OCT.

Pazienti con OCT

La correlazione tra il revisore A (remoto) e B era molto alta ($\kappa = 0,96$). È stata riscontrata una buona correlazione tra il Revisore B e l'esame clinico realizzato dal Revisore A ($\kappa = 0,96$). L'agreement tra il Reviewer C e il Reviewer B nella Fase 1 è totale ($\kappa = 1,0$). La concordanza tra il Reviewer C e il Reviewer A nella Fase 1 è molto buona ($\kappa = 0,95$); la correlazione tra il Reviewer A e il Reviewer C nella Fase 2 è eccellente ($\kappa = 0,90$). Un alto agreement tra le valutazioni realizzate tra il Reviewer A in entrambe le fasi è presente ($\kappa = 0,97$). La concordanza tra il Reviewer B e C è totale ($\kappa = 1,0$)- Tabella 8. L'agreement tra il Reviewer A, B e C senza l'utilizzo dell'OCT è riportato in basso.

	Reviewer A -da remoto-	Reviewer B	Reviewer C
Reviewer A -da remoto-	0,97	0,96	0,95
Reviewer A -in vivo-	0,97	0,96	0,90
Reviewer B	0,95	1,00	1,00
Reviewer C	0,81	1,00	1,00

Tabella 8. La presente tabella mostra i K di Cohen degli agreement tra i vari Reviewers senza l'utilizzo dell'OCT.

La regressione lineare del delta della PIO e dell'età del campione è stata in grado di spiegare solo lo 0,4% della varianza complessiva della variabile dipendente (Delta Compass). Allo stesso modo, il test ANOVA ha mostrato come entrambe le variabili (Delta IOP ed Età) abbiano avuto un effetto positivo sul Delta Compass, ma non statisticamente significativo (valore $p = 0,895$).

Come ultimo step, è stata valutata l'applicazione dell'apparecchio Compass nello studio delle atrofie geografiche retiniche, ai fini di stabilire la precisione nell'identificare le regioni di sensibilità retinica alterata.

56 occhi di 43 partecipanti sono stati arruolati in questo studio. 30 erano femmine e 13 maschi; l'età media era $79,31 \pm 9$ anni e BCVA $0,5 \pm 0,32$ (LogMar); MD era $-8,54 \pm 6,46$ dB e PSD $7,72 \pm 3,38$ dB (Figura 23). Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono riportate nella Tabella 9.

CARATTERISTICHE	TOTALE
Età	$79,31 \pm 9,3$
Caucasici	41
Ispanici	1
Europei dell'Est	1
Occhi destri/Sinistri	29/27
Donne/Uomini	30/13
Acuità visiva	$0,48 \pm 0,33$

Tabella 9. Caratteristiche demografiche dei pazienti

- Correlazione tra area GA utilizzando Compass e Heidelberg IR

La media dell'area GA vista su Compass IR era $30,7 \mu\text{m}^2 \pm 26,7$ (misura 1) e $31,4 \mu\text{m}^2 \pm 26,9$ (misura 2); la media della dimensione GA esaminata su Heidelberg IR era di $41,0 \mu\text{m}^2 \pm 30,7$ (misura 1) e $40,9 \mu\text{m}^2 \pm 30,2$ (misura 2).

La correlazione tra le misurazioni Compass 1 e Heidelberg 1 era significativa ($p=0,01$); la correlazione tra Compass 2 e misurazioni di Heidelberg 2 era significativa ($p = 0,01$); la correlazione tra i test intra-osservatore Compass era significativa ($p= 0,00$); la correlazione tra gli esami intra-osservatore Heidelberg era significativa ($p = 0,00$).

- Correlazione tra SRP Compass e immagini Heidelberg AF

Sono state effettuate 1173 misurazioni, di cui 76,1% nere e 23,4% bianche; 6 non mostravano alcun valore di bianco o nero (Figura 24). La media di SRP era $20,9 \pm 9,1$; la media della Pattern Deviation è stata del $3,5\% \pm 2,1$; la media di SG era $121,5 \pm 54,5$.

È stata trovata una correlazione significativa di SG con SRP e Pattern Deviation rispettivamente (valore $p < 0,00$). La correlazione tra SG e le variabili B/W era significativa (valore $p=0,00$) -Tabella 10.

-Correlazione tra SG e punti iper-autofluorescenti Heidelberg

È stata trovata una correlazione significativa tra SG e PRS Compass e la deviazione dal pattern dei bordi iper-autofluorescenti (valore $p=0,00$). La correlazione tra i punti iper-autofluorescenti SG e le variabili B/W non era significativa (valore $p = 0,4$) -Tabella 10.

-Correlazione tra SG e Heidelberg IR

Sono state effettuate 1175 misurazioni, di cui 18,6% nere e 80,9% bianche; 6 che non mostravano alcun valore Black o White (Figura 24).

La media della PRS era $21,6 \pm 9,3$; la media dei valori di Pattern Deviation era del $3,6\% \pm 2,0\%$; la media di SG era $155,7 \pm 49,3$. È stata trovata una correlazione significativa tra SG e Total Deviation e Pattern Deviation rispettivamente (valore $p < 0,001$). La correlazione tra SG e le variabili B/W era negativa e significativa (valore $p = 0,002$) -Tabella 10.

- Correlazione tra SRP del Compass e foto fundus

Il punteggio AOU-roc era fortemente significativo (93,4%). La correlazione tra la deviazione totale e la deviazione dal pattern è stata positiva e significativa ($p = 0,00$) (Figura 25).

La media dei FP è stata di $2,1 \pm 11,0$; la media dei FN era $8,0 \pm 8,9$; la media dei BS era $0,04 \pm 0,7$; la dimensione media della pupilla era di $4,3 \pm 1,7$ mm; la durata media del campo visivo è stata di $8,9 \pm 2,5$ minuti; la media della sensibilità foveale era $25,4 \pm 8,3$. 49 mostravano risparmio foveale: 5 occhi mostravano assenza di risparmio foveale.

K Cohen tra foto fundus Compass e Compass IR era 0,739; K Cohen tra foto fundus Compass e Heidelberg AF era -0,132; K Cohen tra foto fundus Compass e Heidelberg IR era 0,714; K Cohen tra Compass IR e Heidelberg AF era -0,133; K Cohen tra Compass IR e Heidelberg IR era 0,841 (Figura 25).

Abbiamo testato un campo visivo di 10° che corrisponde a $3000 \mu\text{m}$ di diametro e $14,15 \text{ mm}^2$ di area retinica; l'area retinica approssimativa coperta da ciascun punto testato era $14,15 / 34 = 0,21 \text{ mm}^2$.

	n	PRS	Pattern Deviation	B/W
SG di AF	1167	R=0,28 p=0,00	R=0,15 p=0,00	R=0,02 p=0,00
SG dei punti iperautofluorescenti AF	184	R=0,14 p=0,06	R=0,05 P=0,00	R=0,42 p=0,45
SG di IR	1170	R= -0,15 p= 0,00	R=-0,13 p=0,00	R=0,00 P=0,00

Tabella 10. Correlazioni tra punti totali, iper-fluorescenti e scale di grigi (SG) di Heidelberg AF e IR con “scores” e Pattern Deviation del Compass, rispettivamente.

Di seguito vengono riportati i grafici relativi alle singole variabili.

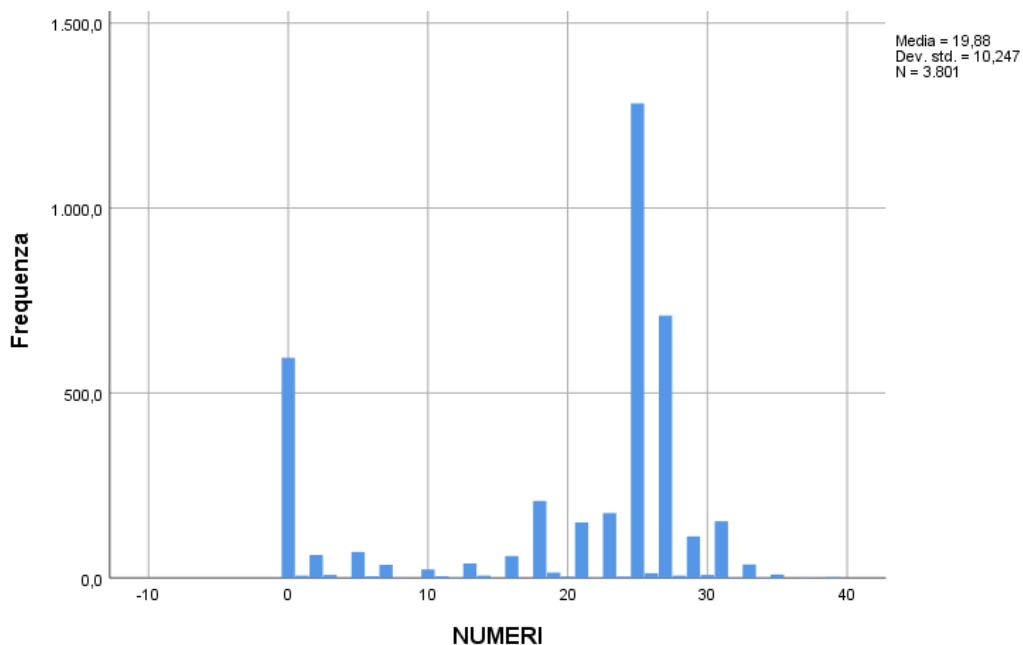


Figura 23. Istogramma descrittivo degli “scores” del Compass (indicato con numeri).

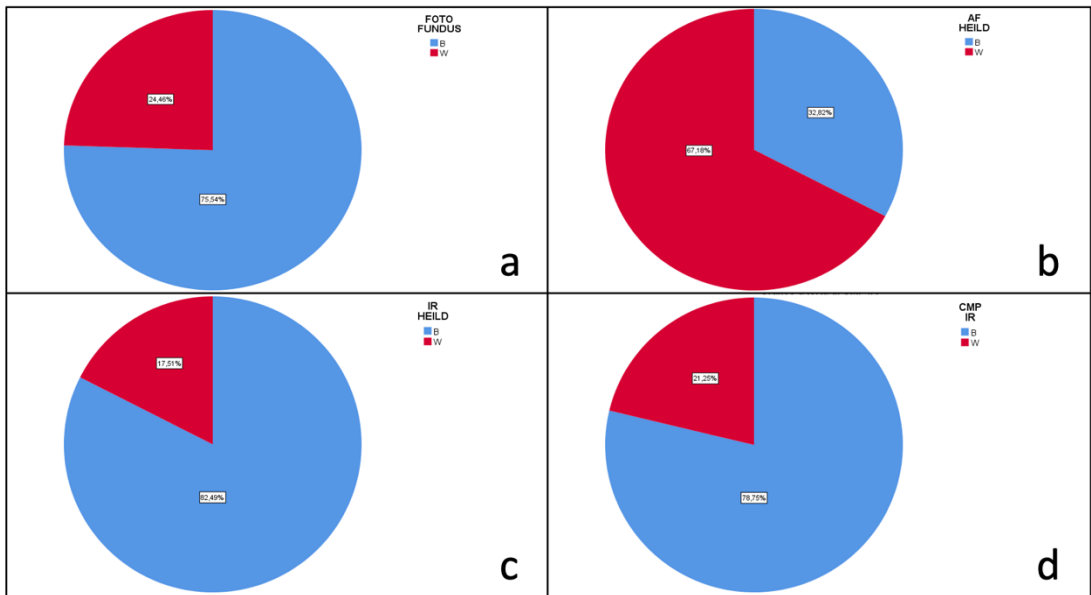


Figura 24. a. Grafico a torta sulla prevalenza delle variabili B and W nelle foto fundus Compass (CMP) nella popolazione dello studio. In rosso sono indicate le variabili “White” e in blu le variabili “Black”; b. grafico a torta sulla prevalenza delle variabili B and W nell’infrarosso del Compass nella popolazione dello studio. In rosso sono indicate le variabili “White” e in blu le variabili “Black”; c. grafico a torta sulla prevalenza delle variabili B and W nell’infrarosso Heidelberg nella popolazione dello studio. In rosso sono indicate le variabili “White” e in blu le variabili “Black”; d. grafico a torta sulla prevalenza delle variabili B and W nell’autofluorescenza Heidelberg nella popolazione dello studio. In rosso sono indicate le variabili “White” e in blu le variabili “Black”

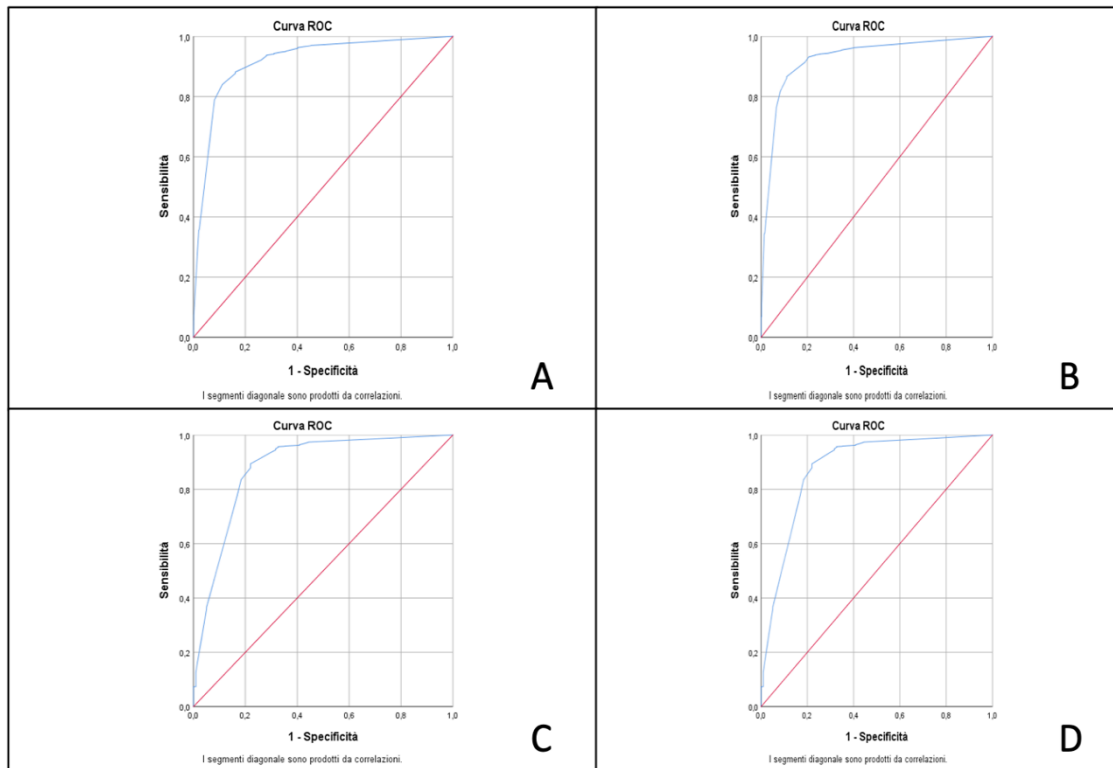


Figura 25. A. Curva di Roch rappresentante il K Cohen tra la foto del fondo oculare Compass e Compass IR: $K=0,739$; B. Curva di Roch rappresentante il K Cohen tra la foto del fondo oculare Compass e Heidelberg AF: $K=-0,132$; C. Curva di Roch rappresentante il K Cohen tra foto fundus Compass e Heidelberg IR: $K=0,714$; D. Curva di Roch rappresentante il K di Cohen tra Compass IR e Heidelberg IR: $K=0,841$.

Nello studio relativo alla valutazione della SO in pazienti glaucomatosi, sono stati inclusi 17 pazienti con una storia di trabeculectomia effettuata su un occhio e sotto terapia medica ipotonizzante nell'altro occhio. 11 pazienti erano maschi, l'età era di $67,7 \pm 12,6$ anni; 15 soggetti erano caucasici, 1 ispanica, 1 africano. La chirurgia è stata eseguita su 8 occhi destri e 9 occhi sinistri; l'intervento chirurgico è stato eseguito $31,6 \pm 39,0$ (range giugno 2006-ottobre 2019) mesi prima della conduzione dello studio. La durata del trattamento medico sull'altro occhio è stata di $34,7 \pm 37,8$ mesi (intervallo: giugno 2016-febbraio 2020). La

distribuzione dei trattamenti per abbassare la PIO sull'altro occhio è riportata nella tabella 11.

Molecole (esposizione quotidiana mg/die)	Percentuali
DORZOLAMIDE BID +TIMOLOLO Combinazione FISSA 2vv/die (1,35)	47%
BIMATOPROST+TIMOLOLO Combinazione FISSA (0,05)	18%
BRINZOLAMIDE BID (0,25)	6%
BRINZOLAMIDE+BRIMONIDINA Combinazione FISSA 2vv/die (0,062)	6%
DORZOLAMIDE BID (0,925)	12%
T AFLUPROST (0,1)	5%
TIMOLOLO BID (0,1)	6%
TRAVOPROST (0,01)	6%

Tabella 11. Distribuzione dei trattamenti ipotonizzanti

Confrontando Trab Eyes e Med Eyes, è stata trovata una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda l'iperemia ($p = 0,0006$) e lo staining corneale ($p=0,04$), che mostrano risultati migliori nei Trab Eyes. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata per osmolimetria, tBUT, test di Schirmer – Tabella 12. La correlazione tra IDEEL e OSDI era $R = 0,56$; $p = 0,02$.

Parametri	Trab Eyes Media +/- SD	Med Eyes Media +/- SD	p value
Questionario IDEEL	52,8±44,4		
Questionario OSDI	8,6±7,8		
Osmolimetria (μOsm)	307,1±16,1	310,9±22,5	p= 0,5
Iperemia congiuntivale	0,94±0,9	1,47±1,1	p=0,0
tBUT (sec)	5,9±3,8	4,6±3,08	p= 0,1
Positività della Scala di Oxford (n)	6	9	
Oxford Scale	0,82±1,1	1,3±1,4	p=0,04
Test di Schirmer (mm)	11,82±8,7	11,64±7,3	p= 0,8

Tabella 12. Risultati dei questionari e dei parametri della SO.

Le correlazioni tra i parametri oculari nei Med Eyes sono riassunte nella tabella 13.

	TFO dei MedEyes	tBUT Med Eyes	Schirmer Med Eyes	IDEEL	OSDI	Iperemia congiuntivale	Corneal Staining (Oxford Scale)
TFO dei Med Eyes	1	R=-0,13 p=0,61	R=0,48 p=0,04	R=0,06 p=0,82	R=0,10 p=0,70	R=0,01 p= 0,96	R=0,31 p=0,23
tBUT dei Med Eyes			R=-0,27 p=0, 29	R=-0,15 p=0,55	R=0,14 p=0,57	R=-0,09 p= 0,73	R=-0,17 p=0,51
Schirmer dei Med eyes				R=0,37 p=0,13	R=0,2 p=0,370	R= 0,06 p=0,08	R=0,02 p=0,92
IDEEL					R=0,56 p=0,02	R=0,38 p=0,13	R=0,43 p=0,09
OSDI						R=0,23 p=0,37	R=0,47 p=0,06

Tabella 13. Le correlazioni tra i parametri oculari in Med Eyes.

Le correlazioni tra i parametri oculari nei Trab Eyes sono riassunte nella tabella 14.

	TFO dei Trab Eyes	tBUT dei Trab Eyes	Schirmer dei Trab Eyes	IDEEL	OSDI	Iperemia congiuntivale	Corneal staining (Oxford Scale)
TFO dei Trab Eyes		R=-0,49 P=0,04	R=0,17 P=0,51	R=0,06 P=0,8	R=0,13 P=0,59	R=0,06 P=0,80	R=0,13 P=0,61
tBUT dei Trab Eyes			R=-0,23 P=0,36	R=-0,3 P=0,2	R=0,11 P=0,65	R=-0,20 P=0,44	R=0,03 P=0,90
Schirmer dei Trab Eyes				R=-0,1 P=0,5	R=0,09 P=0,72	R=-0,19 P=0,46	R=-0,12 P=0,64
IDEEL					R=0,56 P=0,02	R=0,57 P=0,02	R=0,62 P=0,01
OSDI						R=0,28 P=0,28	R=0,47 P=0,06

Tabella 14. Le correlazioni tra i parametri oculari nei Trab Eyes.

Le correlazioni tra i questionari e i parametri della SO negli occhi migliori (Best Eyes) sono riportate nella tabella 15.

	OSDI	IDEEL
TFO	R=0,09 p= 0,72	R=0,11 p= 0,68
tBUT	R=0,05 p= 0,83	R= -0,11 p= 0,68
Schirmer	R=0,01 p=0,95	R= 0,28 p=0,28
Iperemia congiuntivale	R=0,28 p= 0,28	R=0,57 p= 0,02
Corneal staining (Oxford Scale)	R= 0,45 p=0,06	R= 0,62 p=0,01

Tabella 15. Correlazioni tra i parametri negli occhi migliori.

E gli occhi peggiori sono riportati nella tabella 16.

	OSDI	IDEL
TFO	R=0,23 p= 0,38	R=0,26 p= 0,32
tBUT	R=0,58 p = 0,01	R= 0,14 p= 0,58
Schirmer	R=-0,01 p=0,95	R= 0,00 p=0,98
Iperemia congiuntivale	R=0,27 p= 0,30	R=0,38 p= 0,13
Corneal staining (Oxford Scale)	R= 0,32 p=0,21	R= 0,43 p=0,09

Tabella 16. Correlazioni tra i parametri negli occhi peggiori.

Per quanto riguarda l'analisi di correlazione, l'epiteliopatia è stato il parametro che ha influenzato i questionari in modo più coerente. Al fine di analizzare meglio i fattori che influenzano i punteggi dei questionari, abbiamo quindi diviso la coorte di studio in 3 gruppi a seconda della presenza del difetto epiteliale: colorazione bilaterale (n=5), colorazione unilaterale (n=5) e nessuna colorazione (n=7). Il punteggio del questionario IDEEL nel gruppo di colorazione bilaterale era $56,4 \pm 46,0$; l'OSDI nel gruppo di colorazione bilaterale era $7,8 \pm 7,6$. La media del questionario IDEEL nel gruppo di colorazione unilaterale era $54,7 \pm 44,8$; l'OSDI nel gruppo della colorazione unilaterale era $6,5 \pm 7,3$. La media del questionario IDEEL nel gruppo della colorazione assente era $50,6 \pm 46,9$; L'OSDI nel gruppo della colorazione assente era $8,5 \pm 7,8$.

La correlazione tra la quantità di molecole utilizzate per la terapia e l'iperemia congiuntivale è risultata significativa ($p=0,006$); la correlazione tra il questionario OSDI e la durata della terapia è risultata moderata ($p=0,07$).

Tabella 17.

	TFO	tBUT	IDEEL	OSDI	Schirmer test	Iperemia congiuntivale	Staining corneale
Totale delle molecole/die	R=0,10 p=0,68	R=-0,15 p=0,55	R=0,21 p=0,41	R=0,13 p=0,61	R=0,27 p=0,29	R=-0,04 p=0,87	R=0,22 p=0,38
Quantità dei conservanti	R=0,23 p=0,35	R=-0,31 p=0,22	R=-0,11 p=0,66	R=0,05 p=0,82	R=-0,09 p=0,72	R=-0,47 p=0,06	R=0,05 p=0,82
Durata della terapia	R=-0,19 p=0,44	R=0,08 p=0,76	R=-0,24 p=0,34	R=0,22 p=0,03	R=-0,25 p=0,32	R=0,12 p=0,64	R=-0,35 p=0,16

Tabella 17. Correlazioni tra il quantitativo di molecole, il totale dei conservanti e la durata della terapia con tutte le variabili prese in esame nello studio.

APPROCCIO BIOCHIMICO- MOLECOLARE AL GLAUCOMA

Materiali e metodi

ANALISI DELLA CONNESSINA 43 CON METODO ELISA

La prima analisi molecolare è stata l'analisi della Connexina (Cx) 43, maggiormente implicata sia nel processo di neurodegenerazione, sia nel blocco dell'outflow dell'umore acqueo a livello trabecolare.

Il presente studio è stato svolto presso la Clinica Oculistica dell'Ospedale San Paolo in collaborazione con il Dipartimento di Biochimica, Università di Milano. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell'Ospedale San Paolo, ed eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki. I pazienti sono stati arruolati tra coloro che sono stati sottoposti ad intervento di cataratta tra il 18 gennaio 2021 e il 3 febbraio 2021. Uno studio caso-controllo prospettico è stato realizzato: lo studio consiste nell'analisi di un campione di 0,2 µl di umore acqueo, prelevato da 6 occhi di pazienti affetti da glaucoma, e 5 occhi di pazienti privi di patologie oculari, durante l'intervento di facoemulsificazione del cristallino ed impianto della IOL (Figura 26). Al momento della visita, è stata raccolta l'anamnesi generale, oftalmologica e familiare, confermate successivamente dall'analisi delle cartelle cliniche. Sono stati inclusi nello studio pazienti affetti da cataratta e glaucoma (sia GPAA che GAC) o ipertono oculare, necessitanti di un intervento chirurgico di facoemulsificazione del cristallino. I criteri di esclusione clinici sono stati: essere affetti da altre forme di glaucoma (neovascolare, uveitico, etc.), degenerazione maculare senile attiva, recenti iniezioni intravitreali di anti-VEGF o desametasone, retinopatia diabetica, uveiti anteriori o posteriori, recente intervento chirurgico per distacco di retina con presenza o meno di olio di silicone in camera vitrea, recenti traumi oculari, infezioni attive del segmento anteriore, pazienti riceventi terapia di lunga data a base di corticosteroidi topici.

La preparazione all'intervento chirurgico a base di betametasone in gocce oculari-da somministrare il giorno precedente all'operazione-non è stata eseguita. In seguito a somministrazione di Novesina in collirio monodose, si è proceduto alla disinfezione del campo operatorio prima, con Iodopovidone 10% per 15 minuti e del fornice congiuntivale dopo, con Iodopovidone 5% per 3 minuti.



Figura 26. Intervento di facoemulsificazione del cristallino.

Prima di effettuare l'accesso di servizio, si è introdotta una siringa con ago da insulina in camera anteriore e si è prelevato un campione di 0,2 μ l di umore acqueo, che è stato, successivamente, instillato in una provetta di laboratorio. Per effettuare le analisi, è stata utilizzata la sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technology con kit ELISA Abbexa (Abbexa, Cambridge, Regno Unito). Un anticorpo è stato rivestito su una piastra 96-well. Soluzioni standard, campioni e il reagente coniugato alla biotina sono stati aggiunti alla piastra e incubati. Il reagente coniugato all'HRPT è stato in seguito aggiunto, e il tutto è stato incubato. Gli anticorpi che non si sono legati, sono stati lavati via usando lo wash buffer. Un substrato TMB è stato usato per quantificare la reazione enzimatica HRP. Dopo aver aggiunto il substrato TMB, solo le piastre con un

quantitativo sufficiente GJA1 hanno prodotto un colore blu, dapprima, e giallo poi – in seguito all'aggiunta di soluzione acida stop. L'intensità del giallo è stata proporzionale alla quantità di GJA1 sulla piastra. La densità ottica (DO) è stata misurata spettrofotometricamente a 450 nm con un lettore microplate, mediante il quale la concentrazione GJA1 può essere calcolata. La soluzione standard è stata ottenuta con lo Standard Diluent Buffer; in seguito, è stato aggiunto il tamponante per ottenere la diluizione. Il tampone di lavaggio è stato diluito con acqua distillata. I due reagenti di rilevazione (A e B) sono stati preparati, con una soluzione di 1:100.

Il protocollo di lavoro è stato il seguente:

I componenti del kit ELISA e i campioni sono stati sistemati a temperatura ambiente (18 - 25 ° C) prima dell'uso. Una curva standard è stata tracciata per ogni test.

1. I pozzetti standard, i campioni di prova e il controllo (zero) sono stati impostati rispettivamente sulla piastra prerivestita, quindi le loro posizioni sono state registrate. Ogni standard e ogni campione sono stati misurati.
2. 100 µL di ogni standard, controllo e campione sono stati aggiunti nei pozzetti appositi. La piastra è stata sigillata con un coperchio e incubata per 1 ora a 37°C.
3. Il coperchio è stato rimosso e il liquido inserito.
4. 100 µl della soluzione di lavoro del reagente di rilevamento A sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. La piastra è stata sigillata con un coperchio e incubata per 1 ora a 37°C.
5. Il coperchio è stato rimosso e la soluzione eliminata. La piastra è stata lavata 3 volte con 1X Wash Buffer.
6. 100 µl di soluzione del reagente B sono state aggiunte in ogni pozzetto, sigillate e incubate a 37°C per 30 min.
7. La soluzione è stata eliminata e la piastra è stata lavata 5 volte con il tampone di lavaggio.

8. 90 μ l di TMB Substrate sono state aliquotate in ogni pozzetto. La piastra è stata sigillata con un coperchio e incubata a 37° C per 10-20 min.

9. 50 μ l di soluzione bloccante sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e letti a 450 nm.

3 campioni con livelli bassi, medi e alti di Cx 43 sono stati testati rispettivamente 20 volte su una piastra. 3 campioni con livelli bassi, medi e alti di Cx 43 sono stati testati su 3 piastre diverse, con 8 repliche in ciascuna piastra. La media delle doppie letture DO 450 per ogni standard di riferimento, campione e substrato è stata calcolata. La curva standard è stata tracciata con DO 450 di ciascuna soluzione standard di riferimento [Y] rispetto alla rispettiva concentrazione di ciascuna soluzione standard (X). La concentrazione di GJA1 dei campioni è stata interpolata nella curva standard.

Il test t di Student per campioni accoppiati è stato eseguito per valutare la differenza tra le medie della concentrazione di Cx43. La correlazione lineare di Pearson è stata applicata per le restanti correlazioni.

APPROCCIO MOLECOLARE AL GLAUCOMA MEDIANTE METABOLOMICA

Lo studio dell'analisi del vitreo mediante metabolomica, è stato realizzato presso la Clinica Oculistica dell'Università di Cagliari tra marzo e giugno 2021. Il protocollo di ricerca è stato eseguito in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato scritto è stato ottenuto da ciascun partecipante dopo una spiegazione della natura dello studio. 16 pazienti sottoposti a intervento di vitrectomia per distacco di retina

regmatogeno, trazionale, proliferativo, e peeling della membrana limitante interna sono stati arruolati nello studio (Figure 27-28).

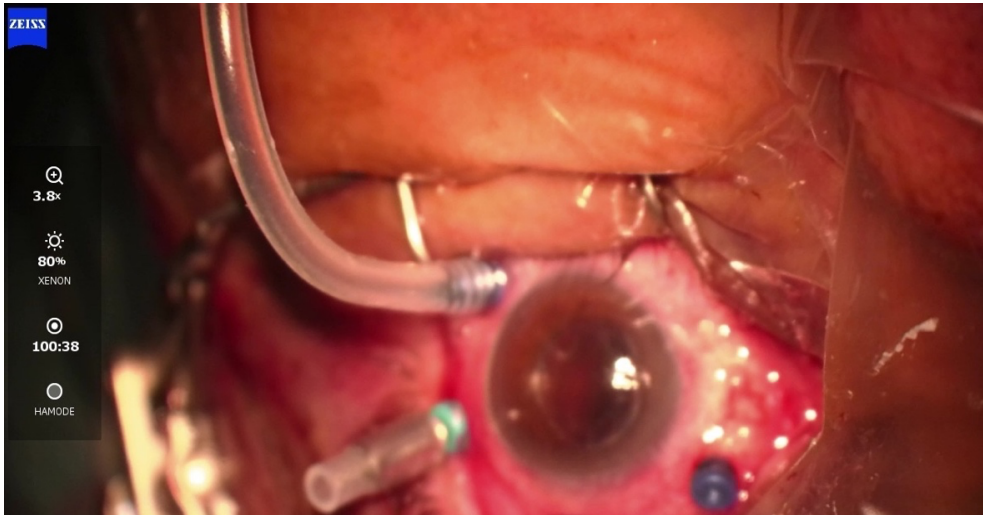


Figura 27. Posizione dei trocars nell'intervento di vitrectomia via pars plana

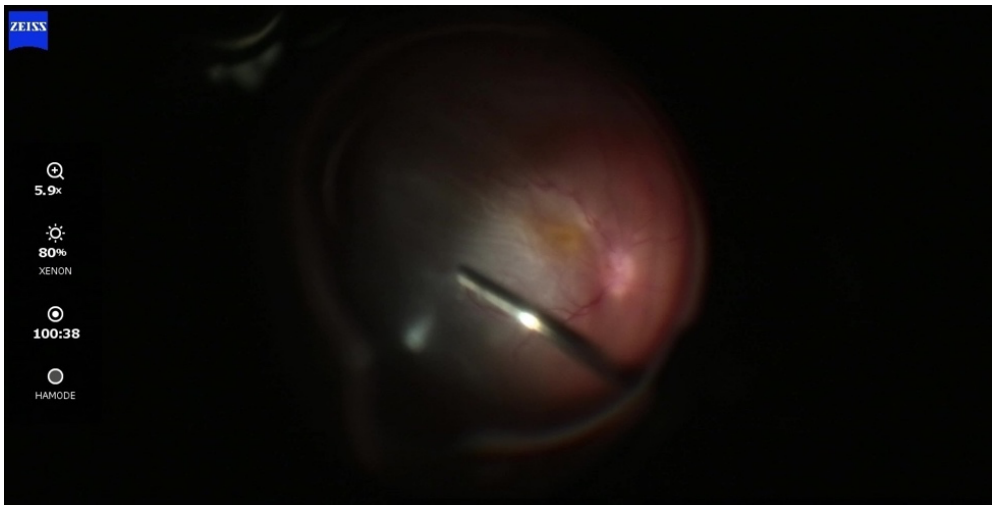


Figura 28. Immagine del fondo oculare durante l'intervento di vitrectomia

Da ciascun occhio è stato prelevato circa 1 ml di umor vitreo. A ciascun campione sono stati aggiunti 10 μ L di una soluzione acquosa (10% in peso) di sodio azide (NaN_3), per impedire la proliferazione batterica, dopodiché i campioni sono stati trasferiti nel freezer e mantenuti ad una temperatura

costante di -80 °C fino all'esecuzione dell'analisi avvenuta entro tre mesi dalla raccolta. Prima dell'analisi i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti e 4°C per eliminare eventuali residui solidi e sono stati filtrati con filtri da 30 kDa di cutoff molecolare (Amicon-30kDa; Merck Millipore, Darmstadt, Germania) mediante centrifugazione per 10 minuti a 12000 rpm e 4°C al fine di rimuovere macromolecole ed enzimi attivi. I filtri sono stati preventivamente privati del glicerolo mediante lavaggio con 500 µL di acqua distillata e centrifugazione per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente per 15 ripetizioni. Per l'analisi ^1H NMR, 300 µL di UV filtrato sono stati mescolati con 400 µL di una soluzione di tampone fosfato 0.33 M (pH=7.4) in acqua deuterata (D_2O 99,9%) contenente come standard interno il sale sodico dell'acido 3-(trimetilsilil) -2,2,3,3, d_4 propionico (TSP, 98% D) ad una concentrazione 1.30mM (concentrazione finale di 0.75 mM). 650 µl della soluzione così ottenuta sono stati trasferiti in un tubo NMR con diametro esterno di 5 mm.

Analisi ^1H -NMR

Gli esperimenti ^1H -NMR sono stati realizzati mediante l'utilizzo di uno spettrometro Varian 500 UNITY INOVA munito di autocampionatore con 50 posizioni. Gli spettri ^1H NMR sono stati acquisiti alla frequenza di 499,839 MHz con una sequenza 1D-NOESY che permette la soppressione del segnale residuo dell'acqua. Gli spettri sono stati registrati a 300 K con un'ampiezza spettrale di 6000 Hz, un pulso di 90° con un mixing time di 1 ms e un tempo di riciclo di 21.5 s e 128 scansioni. Prima della trasformata di Fourier i decadimenti a induzione libera (Free Induction Decay-FID) sono stati moltiplicati con un peso esponenziale equivalente a 0.5 Hz e zero a 64K. Tutti gli spettri sono stati riportati alla linea di base corretta utilizzando MestReNova. Dopo trasformata di Fourier del FID, la fase e la linea di base degli spettri sono state corrette con l'uso del software MestReNova (versione 9.0, Mestrelab Research S.L.). Lo spostamento chimico dei segnali NMR è stato riferito alla

risonanza dello standard interno (TSP, $\delta=0.00$ ppm). L'assegnazione dei segnali NMR è stata effettuata sulla base del confronto con i dati di letteratura, l'aggiunta di standard noti e l'utilizzo del software ChenomX. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ hanno una dimensione di circa 17000 punti distribuiti su una regione spettrale di ampiezza pari a circa a 9 ppm. Mediante l'utilizzo del software MestReNova (Versione 5.2.5, MestrelabResearch), è stato possibile ridurre il set di punti (dati) relativo ad ogni spettro attraverso lo spectral binning, con suddivisione dello spettro in sub-regioni di ampiezza costante (nel nostro caso 0.04 ppm). All'interno della regione spettrale in esame, la porzione di spettro compresa tra 4.5 e 5.1 ppm è stata eliminata a causa della presenza del segnale residuo dell'acqua. L'integrazione a bin nelle regioni spettrali selezionate ha portato ad una riduzione del numero di descrittori spettrali (variabili) da circa 17000 a 150. Per minimizzare le differenze di diluizione tra i diversi campioni l'area totale di ogni spettro è stata normalizzata a 100. La matrice dei dati spettrali è stata sottoposta ad analisi multivariata. Le analisi multivariate sono state eseguite utilizzando il software SIMCA (versione 13, Umetrics, Umeå, Svezia). Prima dell'esecuzione della PCA i dati sono stati scalati secondo il metodo Pareto.

Risultati del test ELISA per l'identificazione della Connessina 43

Per quanto riguarda l'analisi della Cx 43 nell'umor acqueo, sono stati arruolati nello studio 11 pazienti, di cui 5 sani e 6 affetti da glaucoma. 11 occhi sono stati esclusi in quanto il campione di umor acqueo prelevato non è stato sufficiente ai fini della analisi di laboratorio. 5 erano donne, 6 uomini, 4 occhi destri, 7 occhi sinistri. L'età media era $71,3 \pm 12,6$. Tutti i pazienti erano di etnia caucasica. Il visus medio era $0,4$ (LogMar) $\pm 0,2$, la correzione media (in diottrie) era $2,2 \pm 1,7$; la lunghezza assiale media era $23,9 \pm 2,9$ mm; la PIO media prima dell'intervento era $13,1 \pm 1,9$ mm Hg. La MD media era $-9,0 \pm 8,9$ dB; la PSD media era $5,6 \pm 5,5$ dB; la VFI media era $79,5 \pm 24,7\%$.

La media della PIO nel gruppo dei casi è stata $12,8 \pm 0,5$; la media della lunghezza assiale nel gruppo dei casi è stata $24,7 \pm 1,2$. La media della PIO nel gruppo dei controlli è stata $13,60 \pm 1,7$; la media della lunghezza assiale nel gruppo dei controlli è stata $23,15 \pm 0,9$ (Figura 29-30).

Nella tabella 18 sono riassunte le caratteristiche di popolazione del campione. 1 paziente del gruppo dei sani ha contratto l'infezione da Covid-19 nel mese di dicembre 2020. Nessuna alterazione è stata rilevata all'esame del fundus di tutti i pazienti. Un occhio presentava ambliopia. Un occhio aveva una storia di glaucoma acuto. Il 100% dei pazienti affetti da glaucoma effettuava terapia con colliri ipotonizzanti. Le molecole ipotonizzanti assunte dai malati di glaucoma sono riportate nella tabella 19. Nella figura 31 sono riassunte alcune caratteristiche di popolazione dei gruppi di studio.

Una concentrazione media di $2,32 \pm 13,4$ ng/ml è stata rilevata nell'umor acqueo dei soggetti sani; una concentrazione media di $4,02 \pm 3,8$ ng/ml è stata rilevata nell'umor acqueo dei soggetti glaucomatosi (Figura 32).

Una differenza non statisticamente significativa è stata riscontrata tra la concentrazione di Cx43 nei soggetti sani e i soggetti glaucomatosi ($p=0,23$).

Una correlazione non significativa è stata trovata tra la concentrazione di Cx43 e il quantitativo di molecole ipotonizzanti assunte al giorno dai pazienti glaucomatosi ($p=0,90$). Una correlazione non significativa è stata trovata tra la concentrazione di Cx43 e l'MD del campo visivo ($p=0,37$). Una correlazione non significativa è stata trovata tra la concentrazione di Cx43 e il PSD del campo visivo ($p=0,51$). Una correlazione non significativa è stata evidenziata tra i valori di Cx43 e la PIO precedente all'intervento ($p=0,53$). Una correlazione non significativa è stata evidenziata tra i valori di Cx43 e la lunghezza assiale nel gruppo dei sani ($p=0,97$) e nel gruppo dei glaucomatosi ($p=0,75$).

	CASI	CONTROLLI
Ipertensione arteriosa	5	3
Patologie cardiache	1	1
Dislipidemia	2	2
Diabete	1	1
Osteoporosi	0	1
Pregresse neoplasie	1	1
Patologie tiroidee	1	0
Terapia anticoagulante	1	2
Ipertrofia prostatica	2	0
Epatite	1	0
Sindrome depressiva	2	0
BPCO	0	1
Progressa chirurgia addominale	1	1
Intervento di cataratta controlaterale	1	2

Tabella 18. Caratteristiche metaboliche dei pazienti.

MOLECOLE	PERCENTUALI	CONCENTRAZIONE/DIE
TAFLUPROST	16%	0,1 mg/ml
TRAVOPROST	16%	0,03 mg/ml
PILOCARPINA DUE VOLTE AL GIORNO	16%	20 mg/ml
BRINZOLAMIDE+TIMOLOLO (COMBINAZIONE FISSA) DUE VOLTE AL GIORNO	33%	30 mg/ml
DORZOLAMIDE+TIMOLOLO (COMBINAZIONE FISSA) DUE VOLTE AL GIORNO	50%	50 mg/ml
BIMATOPROST	33%	0,03 mg/ml
BRIMONIDINA DUE VOLTE AL GIORNO	33%	4 mg/ml
BIMATOPROST	16%	0,1 mg/ml

Tabella 19. Terapie anti-glaucoma assunte dal gruppo dei casi.

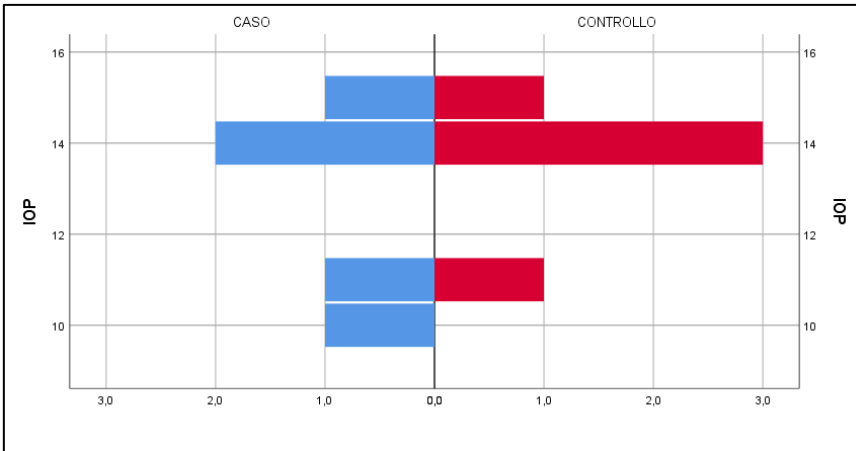


Figura 29. Piramide della popolazione concernente la frequenza della PIO nei casi e controlli.

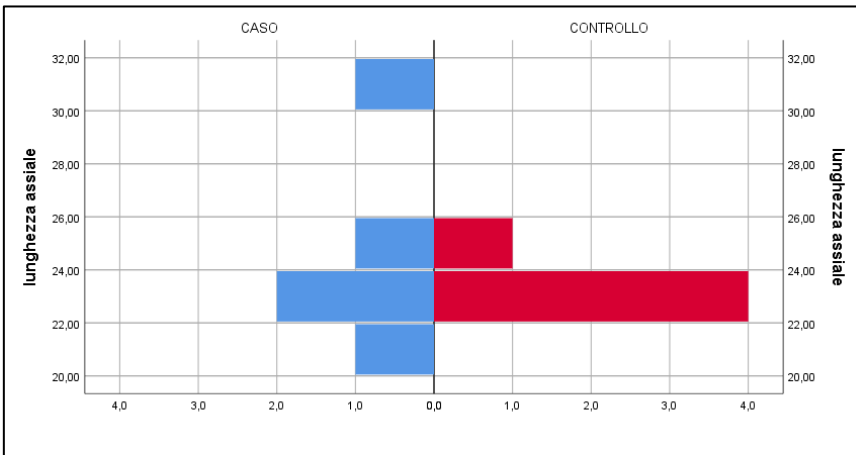


Figura 30. Piramide della popolazione concernente la frequenza della lunghezza assiale nei casi e controlli

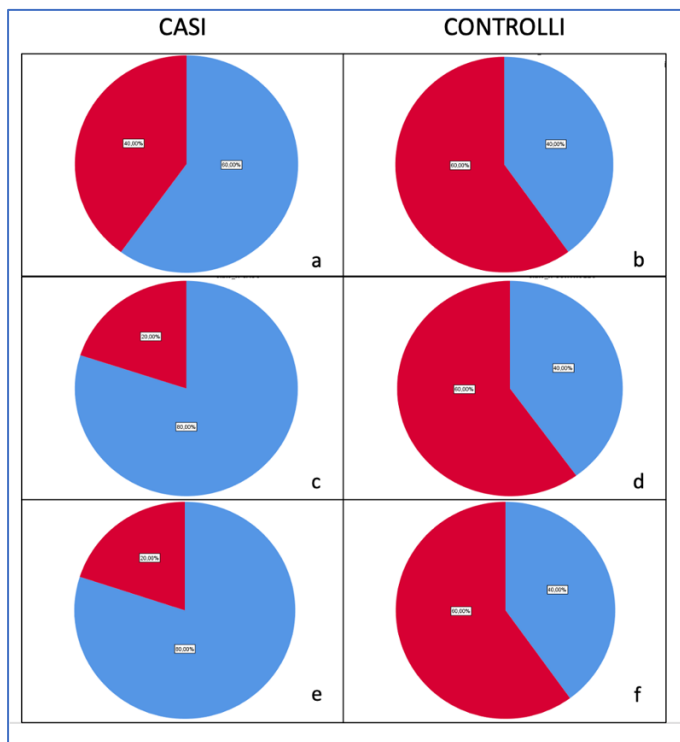


Figura 31. a. Grafico a torta della frequenza dell'ipercolesterolemia tra i casi. In blu è indicata l'assenza e in rosso la presenza. b. Grafico a torta della frequenza dell'ipercolesterolemia tra i controlli. In blu è indicata l'assenza e in rosso la presenza. c. Grafico a torta della frequenza di un pregresso intervento di FACO controlaterale tra i casi. In blu è indicata l'assenza e in rosso la presenza. d. Grafico a torta della frequenza di un pregresso intervento di FACO controlaterale tra i controlli. In blu è indicata l'assenza e in rosso la presenza. e. Grafico a torta della frequenza di assunzione di anticoagulanti tra i casi. In blu è indicata l'assenza e in rosso la presenza. f. Grafico a torta della frequenza di assunzione di anticoagulanti tra i controlli. In blu è indicata l'assenza e in rosso la presenza.

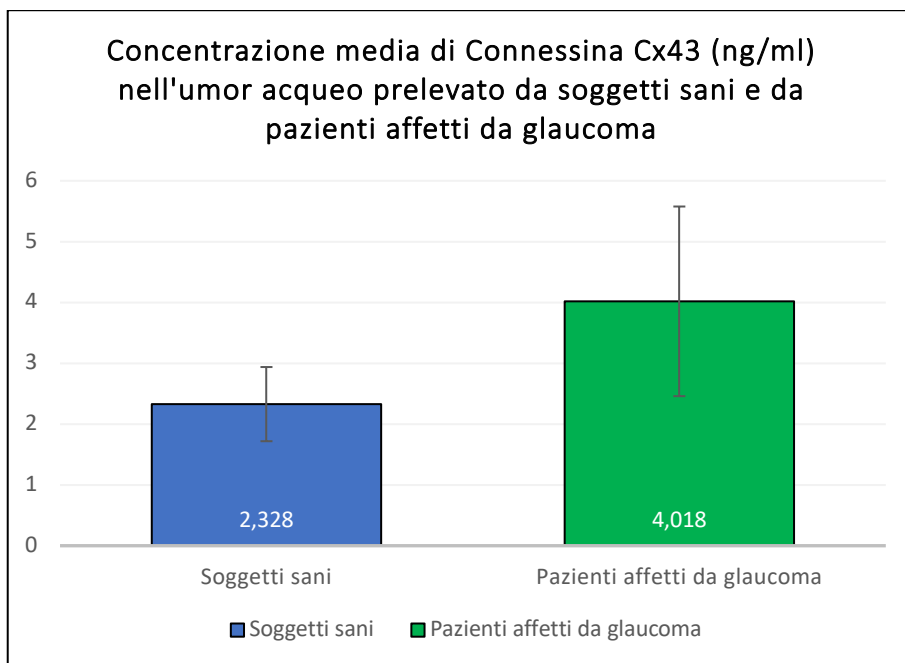


Figura 32. Rappresentazione grafica dei valori di Cx43 riscontrati nei due gruppi.

Risultati dell'analisi mediante metabolomica

Ai fini dell'analisi metabolomica, il vitreo di 16 pazienti è stato analizzato: 11 pazienti erano di sesso maschile e 5 di sesso femminile. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono riassunte nella tabella 20. La figura 33 mostra lo spettro 1H-NMR dei campioni raccolti.

n	ETA'	ANAMNESI PATOLOGICA PROSSIMA	ANAMNESI PATOLOGICA REMOTA	ANAMNESI OCULISTICA	FARMACI
1	72	Pucker maculare OD	Diabete Mellito II Ipertensione arteriosa IMA (2005) K colon (2012)	Foro maculare OD (2014)	Cardioaspirina Contramal Trental Candesartan Bisoprololo Idroclorotiazide
2	71	Emovitreo OD	Ipertensione arteriosa Fibrillazione atriale Portatore di pacemaker Insuff. renale cronica	Cataratta in OD Occlusione venosa retinica OD (2012) Trattamento con argon laser OD	Olpres Bisoprololo Sintron Didrogyl
3	58	Distacco retina OD	Asma	/	Cortisone spray
4	62	Distacco retina OS	/	/	/
5	58	Distacco retina OD	Ipertensione arteriosa Intervento per sclerosi trigono vescicale (2014)	Distacco retina OS Cheratocono OO	Losartan
6	59	Sublussazione cristallino OS	/	/	/
7	62	Distacco retina OD	Fumatore (20/die)	Trauma in OD (35 aa fa) Cataratta in OD (10 aa fa)	/
8	73	Distacco retina OD	/	Afachia chirurgica OD (10 aa fa) Glaucoma	Combigan
9	65	Pucker maculare OS	/	/	/
10	78	Distacco di retina OD	2010 ernia del disco	Cataratta in OD nel 2005 Rottura retinica in OD (barrage laser)	/
11	62	Distacco di retina OD	Ipertensione arteriosa Sindrome ansiosa	Rottura retina in OD trattata con laser	
12	59	Distacco di retina in OS	Fimosi 35aa fa Episodi comiziali	/	Tegretol
13	57	Distacco di retina in OD	HIV, HCV, trombosi v. porta (2014) meningite (1995) broncopolmonite (1995) infezioni da toxoplasma e CMV	/	Eduurant (nipivirina) Tivicay (dolutegravir) Inderal Seleparina
14	83	Distacco di retina in OS	Ipertensione arteriosa IMA circa 15aa fa Osteoporosi Asma	OO cataratta 5aa fa	Diladel Tareg Cardioaspirina Di Base Bentelan
15	66	Distacco di retina in OD	DM II	Cataratta in OS 2 anni fa Barrage laser in OO	/
16	68	Distacco di retina subtotale con PVR in OD	DM II	OD cataratta nel 2012 OS cataratta nel 2014 Glaucoma in OD dal 2012	Ipoglicemizzanti orali

Tabella 20. Caratteristiche cliniche dei pazienti.

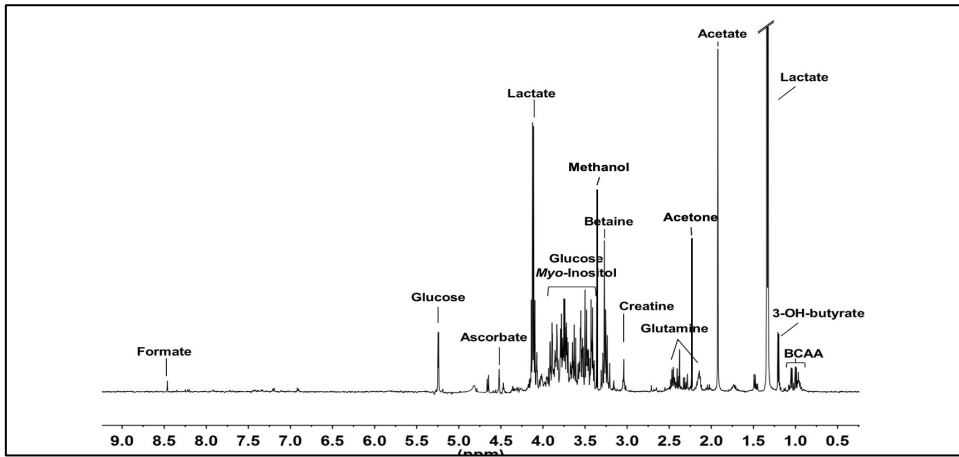


Figura 33. Spettro 1H NMR rappresentativo del campione oggetto dello studio con le attribuzioni delle risonanze NMR.

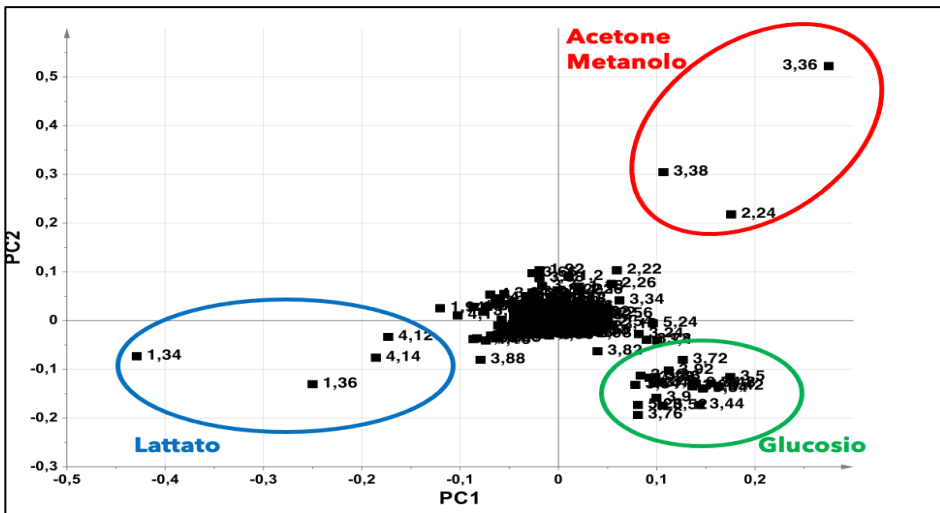


Figura 34. PCA "loading plot".

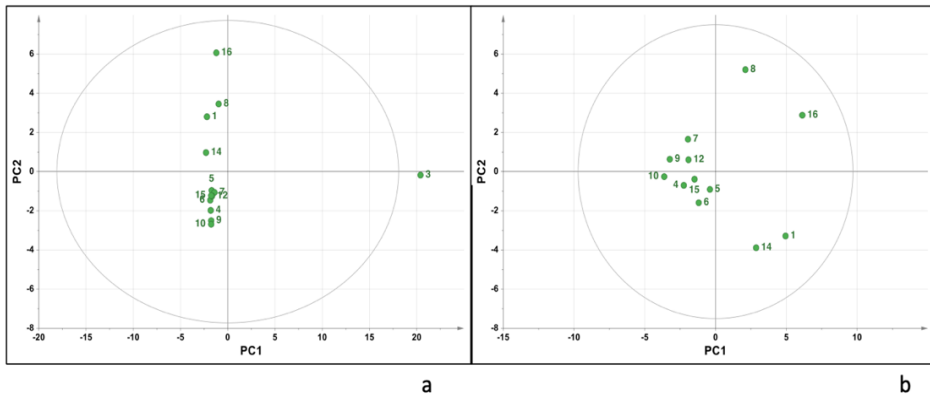


Figura 35. a. L'analisi PCA dei campioni analizzati mostra che il campione 3 è un outlier, in quanto caratterizzato dalla presenza di una massiva quantità di acetato e citrato presumibilmente esogeni. b. PCA Score Plot

Le analisi NMR sono riportate nella figura 33. Da un punto di vista quantitativo, i pazienti 1 e 14, sottoposti rispettivamente a vitrectomia per pucker maculare e distacco di retina, hanno mostrato elevati livelli di glucosio (media di 3,66 m/M); il paziente 8, sottoposto a intervento per distacco di retina e in terapia con Combigan, e il paziente 16, operato di vitrectomia per distacco di retina subtotale con PVR, con un'anamnesi positiva per trabeculectomia omolaterale, presentano valori di acetone e di metanolo più elevati (media di 2,99 m/M) nel gruppo di studio. Il resto del gruppo presenta valori elevati di lattato (media di 2,74 m/M). Il glucosio è il metabolita più concentrato, seguito da acetone e metanolo, e in ultimo il lattato (Figura 34). La figura 35 mostra come le 14 molecole mostrino una differenza significativa

($p=0,001$): lungo l'asse PC1, i valori sono ben separati significativamente ($p<0.01$). Il campione 3 è stato escluso dall'analisi.

DISCUSSIONE

Come è visibile nella Figura 14, il presente lavoro di tesi è stato articolato su più fronti, di seguito descritti. La numerazione dei capitoli e dei sottocapitoli è la medesima visibile nella flow-chart della Figura 14.

1. APPROCCIO CLINICO AL GLAUCOMA

1.1 e 1.2 DATABASE CLINICO E ANALISI CON PERIMETRIA COMPUTERIZZATA COMPASS

Il campo visivo Humphrey possiede un algoritmo full-threshold e un fastpac[101]. ZEST è uno stimatore bayesiano della sensibilità, che fa uso delle informazioni ottenute da ogni risposta in una data posizione quando si determina la stima finale della sensibilità[101]. La formazione di un database normativo richiede un campione di una certa numerosità: secondo Phu et al., un numero di soggetti tra 150 e 200 è valido per SITA-Standard e 60 soggetti per il full-threshold[102]: il nostro studio si è conformato con gli studi precedenti, avendo ottenuto una numerosità campionaria di 170 pazienti. La variabilità test-retest è già stata precedentemente calcolata mediante differenti statistiche (Ground Truth e Bootstrapped). Il bootstrapping è una tecnica statistica di campionamento con sostituzione e aumenta il

contenuto massimo di informazioni da una data dimensione del campione.

La perimetria automatica standard White-on-white (SAP) è il protocollo più assodato: esso prevede degli stimoli luminosi di durata di ~100–200 ms crescente su uno sfondo acromatico[103]. Il campo visivo Humphrey prevede l'applicazione di stimoli luminosi di cinque diverse taglie (dal Goldmann I al Goldmann V): il Goldmann III trova l'applicazione clinica più diffusa[104]. La legge di Ricco è determinante nel comprendere il campo visivo [86] la luminanza di uno stimolo (L) x l'area di stimolo (A) è una costante fino a un'area critica ($L \times A_k = C$: con $k = 1$). Cioè, L e A sono inversamente proporzionali e la pendenza di un grafico L vs. A tracciato in unità logaritmiche è -1 quando si applica la legge di Ricco. All'interno dell'area critica (A_c) o l'area di Ricco, la soglia opera con sommatoria parziale ($0 < k < 1$; nota anche come somma di probabilità) o senza sommatoria (quando $k = 0$)[105]. Un campo visivo Goldmann III prevede un'area critica = $-0.83 \log \text{deg}^2$ in SAP, che è determinata da un campo visivo di 15° : nell'ambito di tale area gli stimoli luminosi sono di dimensioni superiori alla legge di Ricco. In caso di applicazione del Goldmann V, la sommazione spaziale periferica decresce repentinamente. La sommazione spaziale è rappresentata da una curva, ricavata da funzioni bilineari[106]. La base fisiopatologica della Legge di Ricco prevede che, sebbene l'area critica aumenti, la sensibilità retinica resta costante, e questo è dovuto al fatto che si assiste a una riduzione

delle cellule ganglionari repentina dopo i 5° centrali[106]. Nel glaucoma, tuttavia, è presente una marcata alterazione dell'area di Ricco e della sommazione spaziale: secondo l'ipotesi di Glezer, nel glaucoma l'area critica aumenterebbe in quanto si utilizzano le cellule gangliari delle aree perimetriche limitrofe[107]. È stato dimostrato un aumento dell'area critica in varie patologie del nervo ottico[108]. Studi precedenti hanno messo in evidenza che la variabilità test-retest non si riduce molto dai 10° ai 4° centrali[109]. Nel nostro studio il modello "New Grid" prevede un'area di circa 24°. I fattori implicati nella variabilità test-retest sono l'età, la fatica, il fatto di occludere un occhio e di passare all'altro a causa dell'effetto abbagliamento (nel nostro studio l'occhio in esame è stato uno); secondo Choi et al. l'MD è correlato negativamente alla variabilità test-retest[110], dato non confermato nel nostro studio. Studi precedenti hanno mostrato che i falsi negativi sono positivamente correlati alla variabilità test-retest, mentre i falsi positivi e le perdite di fissazione non hanno impatto [111]. Il fatto di non oltrepassare gli 11 giorni tra una visita e la successiva, come è stato applicato nel nostro studio, trova conferma nel fatto che GHT e PSD sono correlati significativamente alla variabilità test-retest, la quale risulta aumentata se si esegue l'esame oltre un periodo di 30 giorni[110]. "Ganzfeld blankout" e il "graying out" sono stati descritti. Il "Gazenfeld effect" è uno scotoma che ha origine nel campo nasale periferico e si insinua nasotemporalmente [109]. La perimetria "New Grid", del tutto innovativa, si basa sul fatto che la variabilità test-retest

è molto bassa nella regione maculare, ma aumenta nelle zone periferiche[112]; ciò è valido per i soggetti glaucomatosi in rapporto ai soggetti sani. In ordine di importanza decrescente, i difetti perimetrici associati positivamente alla variabilità test-retest sono: difetti periferici concentrici, emianopsia temporale, difetti infero-temporali, perdita quasi totale del campo, difetti periferici superiori e scotomi centrali. Secondo alcuni studi, i difetti periferici, paracentrali e superiori sarebbero maggiormente implicati nella variabilità test-retest[113]. Redmond et al.[106] hanno dimostrato che la differenza tra soggetti normali e glaucomatosi risiede negli stimoli esercitati al di fuori della sommazione spaziale, mentre una differenza non significativa avviene nell'ambito della sommazione parziale (come nel Goldman V). Kalloniatis and Khuu mostrarono un risultato simile riguardo la perimetria 30-2, la quale è stato dimostrato avere un'area critica più piccola rispetto al GIII[114]. A differenza del Goldman V il Goldman III – standard- risulta più preciso[115]. Per quanto riguarda le isole perimetriche di soggetti sani, l'algoritmo svedese è ben corroborato; tuttavia, non esiste un algoritmo che possa quantificare la variabilità test-retest. Ai fini di diagnosticare un peggioramento del campo visivo, è importante saper identificare le fluttuazioni perimetriche: le fluttuazioni a breve e lungo termine influenzano i campi visivi dei soggetti affetti da glaucoma: per fluttuazioni a breve termine si intende la differenza di sensibilità perimetrica di un singolo punto o più punti del campo visivo, mentre le fluttuazioni a lungo termine riguardano le

differenze complessive dei punti tra due o più campi visivi[116]. Secondo Flammer et al., le fluttuazioni a lungo termine sono influenzate da una componente omogenea (che concerne tutti i punti allo stesso modo) e eterogenea (che varia da punto a punto) [117]. A causa della mancanza di un algoritmo computazionale, si è stabilito che un deterioramento del campo visivo è visibile nell'arco di anni, mentre le fluttuazioni sono studiate se l'esame viene ripetuto nell'arco di poche settimane, come accaduto nel nostro studio, in quanto un peggioramento della malattia in un così breve arco di tempo è inverosimile[118]. Il peggioramento clinico è valutato in 10 punti perimetrici; se il secondo campo visivo presenta un miglioramento, si tratta di una fluttuazione. Secondo Heji et al., infatti, è più facile stabilire una fluttuazione sui 10° centrali[119]. Sarebbe utile eseguire due volte il campo visivo per ogni visita, per poter stabilire se su due visite vi è un peggioramento o una fluttuazione, in quanto l'MD e il PSD non cambiano significativamente tra due campi visivi[112]. Per stabilire le fluttuazioni a lungo termine, Choi et al. suggeriscono che l'utilizzo dell'intervallo di confidenza può essere un indice affidabile per stabilire l'andamento della patologia [95], come applicato nel nostro studio.

Il presente lavoro di tesi mostra la validità di un approccio di telemedicina nei pazienti con glaucoma. Il ruolo della telemedicina è controverso: buoni risultati sono stati ottenuti in ambito psicologico e

psichiatrico[120]; riguardo programmi per insufficienza cardiaca cronica e malattie respiratorie, programmi per smettere di fumare basati sul web e su computer[121]; approcci di telemedicina alla prevenzione secondaria della malattia coronarica[122] sono stati descritti; la terapia robotizzata dell'arto superiore prossimale è annoverata in letteratura con telemedicina; la telemedicina domiciliare per diabete, malattie cardiache e broncopneumopatia cronica ostruttiva[123] e attività fisica basata su Internet sono applicate. Risultati promettenti includono la realtà virtuale nella riabilitazione dell'ictus[124]; miglioramento dei sintomi e del comportamento associati alla conoscenza di specifici disturbi mentali e condizioni correlate[125]; diabete[126]; intervento per la perdita di peso e possibilmente per il mantenimento della perdita di peso[127]; e l'abuso di alcol. Hersh e collaboratori hanno speculato che la telemedicina abbia buona validità per quanto riguarda l'oftalmologia e la dermatologia[128]. Nel nostro studio, tre revisori hanno esaminato separatamente i dati dei pazienti in momenti diversi senza comunicare l'un l'altro. Abbiamo evidenziato una forte corrispondenza tra la telemedicina e i risultati ottenuti con la pratica clinica. Il buon agreement tra i tre revisori suggerisce che una valutazione da remoto dell'imaging del glaucoma può essere applicabile in situazioni critiche, come la pandemia Covid-19. Sono stati eseguiti alcuni studi in precedenza sulla telemedicina nel follow-up del glaucoma. Il follow-up è essenziale per prevenire la disabilità visiva e l'handicap dovuti al

glaucoma: una diminuzione del 30% del tasso di progressione del campo visivo può avere un grande impatto sulla qualità della vita [39]. Nello studio condotto da Jones et al., è stato sperimentato il campo visivo implementato su un tablet laptop: hanno scoperto che la quasi totalità dei pazienti realizzava con una buona precisione la propria perimetria a casa[129]. Tsapakis et al. ha studiato alcuni pazienti, sottoposti con buona efficacia a un campo visivo domiciliare utilizzando un software che incorpora una web camera come “fotometro virtuale” e un sistema per analizzare l'affidabilità dei risultati in un PC; è possibile anche utilizzare degli occhiali virtuali su smartphone Android con display da 6 pollici[130]. Le statistiche sono efficaci per rilevare vari tassi di variazione della MD nel caso in cui vengano effettuati quattro e cinque esami. In un paziente con una rapida progressione del campo visivo (-2 dB / anno) e una bassa variabilità, il tempo necessario per rilevare il cambiamento perimetrico con una potenza dell'80% è di 5 anni se gli esami vengono eseguiti una volta all'anno, 2,5 anni con due esami all'anno e 1,7 anni se gli esami vengono effettuati tre volte all'anno[39]. Nel nostro studio, il tempo medio è stato di $24,1 \pm 9,5$ mesi, col quale siamo stati in grado di rilevare la presenza di progressione o di fluttuazioni del glaucoma in tutti i pazienti arruolati. Tuttavia, la disponibilità di soli due campi visivi durante questo lasso di tempo, può far presumere che un maggior numero di fluttuazioni perimetriche possa essere presente. Altri studi hanno confermato la validità clinica di una foto del fondo

oculare catturata con lo smartphone a casa: è possibile scattare una foto del nervo ottico per mezzo di alcuni dispositivi applicabili sullo smartphone, come il D-Eye, preceduto dall'instillazione di Midriatico (sotto prescrizione medica)[131, 132]. La visualizzazione del fondo fornita da Compass è molto importante per distinguere se gli scotomi sono dovuti all'aumento dell'escavazione papillare o ad altre malattie retiniche (atrofia retinica, maculopatia miopica o senile, emorragie retiniche). Inoltre, Mudie et al. hanno ipotizzato la sempre maggiore applicabilità della tonometria domiciliare, dopo aver ottenuto una certificazione per I-Care HOME: hanno scoperto che le misurazioni di I-Care non erano statisticamente differenti rispetto ai dati del tonometro Goldmann, anche se 1 persona su 6 non ha ottenuto la certificazione per difficoltà a terminare l'esame[133]. Sebbene alcuni studi abbiano già confermato uno studio struttura-funzione nel glaucoma, come la creazione della mappa di Garway-Heath[134], l'appropriatezza dell'utilizzo dell'OCT per valutare la progressione del glaucoma è controversa. Se da un lato le fluttuazioni possono ostacolare la valutazione accurata della progressione del glaucoma, non è stata trovata una corrispondenza tra i risultati SAP e OCT[135]. I limiti dell'OCT sono la mancanza di studi che convalidano la progressione del glaucoma: l'assottigliamento delle FNR dei diversi stadi della malattia non è intercambiabile con la gravità perimetrica. Tuttavia, Liu et al. hanno dimostrato che le immagini OCT per uno screening del glaucoma possono essere acquisite da non

professionisti senza esperienza precedente con una formazione limitata di meno di 30 minuti nella fotografia oftalmica. Pertanto, i pazienti non devono necessariamente raggiungere una clinica oculistica, ma solo un sito in cui si trova un macchinario OCT[136].

Questo studio presenta diversi limiti: 1) si tratta di uno studio pilota. 2) La telemedicina è un campo ambiguo, quindi le implicazioni non sono state validate. 3) Le fluttuazioni dal campo visivo nei pazienti con glaucoma possono essere interpretate erroneamente come una progressione della malattia. 4) Non sono stati considerati gli aspetti etici, legali, organizzativi.

Poiché la cinetica della progressione dell'AG è altamente variabile tra i singoli pazienti, attualmente non esiste un metodo validato per l'analisi della gravità dell'AG che studi le varie caratteristiche della lesione, in particolare quelle che interessano la funzione visiva. Come discusso in precedenza, i test come BCVA non sono affidabili e informativi per i pazienti con AG, specialmente per quelli con risparmio foveale; AF e OCT forniscono informazioni fuorvianti, poiché non analizzano gli aspetti funzionali della patologia, ma solo anatomici. Tutti i test attualmente disponibili non consentono una correlazione tra anatomia e risultati funzionali. Compass 10-2, grazie alla fotografia a colori del fondo oculare e IR come sfondo, fornisce una visualizzazione affidabile punto per punto della sensibilità retinica maculare, consentendo di abbinare di volta in volta i valori di

sensibilità perimetrica, espressi in Decibel, all'immagine retinica[137]. Nel presente lavoro, abbiamo abbinato la scala di grigi ottenuta con perimetria Compass 10-2, e con immagini AF e IR realizzate mediante retinografia di Heidelberg. In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle aree peri-lesionali confinanti con la AG, le cosiddette lesioni giunzionali, che rappresentano un'area critica per monitorare l'allargamento dell'atrofia retinica. Quest'area risulta essere iperfluorescente a causa dell'eccessivo accumulo di lipofuscina nelle cellule dell'epitelio pigmentato retinico, ed è associata a una sensibilità inferiore rispetto alla retina normale[138]. Nel nostro studio abbiamo individuato i punti SRP adiacenti all'area AG con Compass, e li abbiamo abbinati all'imaging Heidelberg per visualizzarli sulle immagini retiniche AF e IR, al fine di verificarne la corrispondenza. Abbiamo trovato una corrispondenza significativa tra la scala di grigi delle immagini AF e IR, e la Total Deviation e Pattern Deviation, rispettivamente, del campo visivo Compass. I pazienti senza risparmio foveale utilizzano i fotorecettori vicini alla lesione AG per fissare. In questo studio, abbiamo scoperto che Compass Eye Tracker fornisce un metodo di fissazione che concorda con i metodi di misurazione precedenti[139]: gli stimoli vengono riposizionati automaticamente prima e durante la proiezione in base alla posizione dell'occhio. Questo meccanismo riduce la variabilità test-retest e garantisce una correlazione accurata tra funzione (cioè valori di soglia retinica) e struttura (aspetto retinico). Sayegh e collaboratori hanno messo in

evidenza che i punti con stimoli di sensibilità superiore a 1 dB sono stati trovati principalmente ai margini dell'area di atrofia[140]. In uno studio condotto da Hartmann et al., sono stati realizzati test di sensibilità in pazienti con AG: è stata rilevata una sensibilità media di $5,29 \pm 2,49$ dB al margine della lesione rispetto a $14 \pm 2,4$ dB nell'area della retina non coinvolta[141]. Meleth et al. ha identificato dei punti peri-lesionali ed extra-lesionali intorno alla regione AG. È stato scoperto che i punti peri-lesionali, corrispondenti alla zona giunzionale, erano costantemente meno sensibili dei punti extra-lesionali in più valutazioni microperimetriche e diminuivano di sensibilità più rapidamente con il tempo di follow-up rispetto ai punti extra-lesionali[138]. La sensibilità retinica nelle aree al di fuori della lesione AG era significativamente inferiore a quella riscontrata in aree equivalenti in soggetti sani della stessa età e la sensibilità retinica, dopo aver abbinato tutti i punti di risposta, si è ridotta significativamente in funzione del tempo. Questo risultato ha indicato che il declino funzionale nelle AG corrisponde non solo a un aumento anatomico delle dimensioni di uno scotoma assoluto, ma anche a una diminuzione generale della sensibilità maculare nell'area testata. È stato ipotizzato che potrebbe essere dovuto a una perdita più generale di sensibilità maculare nelle aree intorno alla lesione AG, poiché si verifica come un processo a parte rispetto all'espansione locale della lesione AG stessa. Chen et al. hanno ripetuto la microperimetria alla visita basale, a 6 mesi e a 12 mesi a pazienti affetti da AG che non

hanno riportato cambiamenti significativi nell'acuità visiva, stabilità di fissazione e sensibilità maculare nell'arco di 1 anno: è stata riscontrata una significativa riduzione della sensibilità perimetrica all'interno della regione maculare e dei loci del test adiacenti allo scotoma denso[142]. Quindi, i punti della retina attorno all'AG rappresentano un indice di progressione. Allo stesso modo, abbiamo trovato una correlazione significativa tra i punti di confine iper-autofluorescenti e la SRP Compass vale a dire che Compass potrebbe essere considerato accurato quanto la microperimetria per lo studio delle lesioni giunzionali della retina. Questo studio presenta alcune limitazioni: un numero relativamente piccolo di partecipanti; la mancanza di follow-up; inoltre non abbiamo quantificato la variabilità del test - retest nella nostra popolazione di pazienti; Compass non consente di vedere la AF come sfondo per identificare il segnale iperfluorescente di giunzione, al fine di abbinare i punti del campo visivo.

1.3 ANALISI DELLA SUPERFICIE OCULARE

In ultimo, abbiamo affrontato l'importante tema clinico della SO e l'impatto quotidiano che essa comporta nei pazienti affetti da glaucoma sottoposti a terapia con colliri ipotonizzanti. Abbiamo confrontato i parametri della SO in Med Eyes e Trab Eyes. È stata trovata una buona correlazione tra il test di Schirmer e l'osmolimetria nei Med Eyes, come già dimostrato in altri studi. È stato descritto un

moderato accordo tra tBUT e osmolimetria nei Trab Eyes, a causa degli effetti dannosi della chirurgia sullo strato lipidico lacrimale, come descritto da Lajimi et al. [143] È stata trovata una differenza non significativa tra tBUT e il test di Schirmer tra Med Eyes e Trab Eyes. Sebbene l'utilità dell'osmolimetria nello studio dell'occhio secco sia stata dimostrata da Lemp et al.[144], abbiamo trovato una differenza non significativa nei valori di osmolimetria nei due gruppi. Ciò è probabilmente dovuto agli alti livelli di infiammazione nel film lacrimale nei Trab Eyes. La nostra ipotesi è corroborata da Lee et al.[145], i quali hanno riscontrato dei valori di osmolimetria più elevati in pazienti precedentemente operati di trabeculectomia. Complessivamente, IDEEL ha mostrato una buona correlazione con l'iperemia congiuntivale e la scala di Oxford nei Trab Eyes. È stata trovata una buona correlazione tra IDEEL e OSDI; pertanto, l'OSDI correla con la colorazione corneale in entrambi i gruppi, come già suggerito da Agnifili et al.[146]. Pochi studi hanno già confermato la validità del questionario IDEEL [152-153]: nel presente studio è emersa una migliore correlazione tra IDEEL e iperemia congiuntivale, e tra IDEEL e scala di Oxford, rispetto all'OSDI[147, 148]. Questo lascia ipotizzare un ruolo prezioso del questionario IDEEL nello studio DED. Una differenza significativa tra i due gruppi è emersa per quanto riguarda lo staining corneale e l'iperemia congiuntivale; l'epiteliopatia era il parametro che mostrava le migliori correlazioni con le altre variabili della SO, ragion per cui assume al ruolo di miglior descrittore di

danno. La SO mira al mantenimento dell'integrità epiteliale. L'epitelio corneale è un'importante barriera difensiva della SO: alti livelli di infiammazione rappresentano il meccanismo centrale della patogenesi della malattia da occhio secco, conseguentemente all'aumentata concentrazione di piccole proteine ed elettroliti, inclusi sodio, potassio e cloruro nello spazio extracellulare. La secchezza oculare provoca il danneggiamento dell'epitelio superficiale attivando le molecole di segnalazione epiteliale[149], le quali innescano una cascata di mediatori infiammatori [150, 151], che culmina nell'apoptosi cellulare[152, 153]. Questo circolo infiammatorio, scatenato da fattori ambientali (inquinanti interni ed esterni, particelle di polvere, pollini) e stimoli iatrogeni (farmaci topici e conservanti), possono portare all'assottigliamento del film lacrimale, alla riduzione del tBUT e all'aumento dell'osmolimetria. Precedenti studi hanno già dimostrato che la stessa trabeculectomia è associata a cambiamenti della SO: è stata dimostrata la spongiosi dell'epitelio congiuntivale e un numero ridotto di cellule globulari congiuntivali. Inoltre, l'uso di anti-metaboliti durante la chirurgia del glaucoma può danneggiare l'epitelio congiuntivale e corneale[154] e può causare un deficit di cellule staminali limbari[155]. La superficie corneale irregolare e l'aumento delle cellule infiammatorie possono causare anomalie dell'epitelio corneale[156]. Di conseguenza, la morfologia delle bozze nella trabeculectomia può influire negativamente sulla SO: le bozze cistiche possono interferire con la normale diffusione del film lacrimale e

possono favorire la formazione di Dellen. Le correlazioni tra i parametri della SO e i questionari erano più significative nei Best Eyes rispetto ai Trab Eyes, ed entrambi erano migliori dei Med Eyes. Possiamo quindi concludere che i sintomi sono nel complesso influenzati dallo stato dell'occhio migliore. Se entrambi gli occhi sono in uno stato di salute buono, è il migliore che guida i sintomi. Tuttavia, è intuitivo che in caso di danni molto gravi alla SO (che non si verificano in questa coorte), dovrebbe essere l'occhio peggiore a determinare la gravità dei sintomi. Il fatto di selezionare il miglior valore concernente la SO dell'occhio è utile per migliorare tutte le correlazioni e ridurre la perdita di dati, al fine di comprendere meglio tutti i complessi effetti dei colliri ipotonizzanti nella patogenesi dell'occhio secco. Le gocce per l'abbassamento della PIO alterano la SO a causa della presenza di conservanti e composti attivi, quindi il principale risultato clinico è la perdita dell'epitelio corneale. Questo segno è dovuto principalmente ai conservanti inclusi nelle formulazioni in gocce. La maggior parte dei farmaci multidose per abbassare la PIO attualmente disponibili contengono conservanti per inibire la crescita microbica nel flacone, per prevenire la biodegradazione e per supportare il mantenimento della potenza del farmaco[157]. Il benzalkonium cloruro (BAK) è il conservante più utilizzato. BAK altera principalmente le mucine associate alla superficie corneale (trans-membrana), un gruppo di glicoproteine ad alto peso molecolare che rivestono gli epitelii della SO, e che

rappresentano una componente principale del glicocalice[158]. In caso di alterazione strutturale di tali proteine, lo staining corneale è visibile alla lampada a fessura. Gli effetti del BAK nel modificare la struttura del film lacrimale sono stati ampiamente spiegati: Clouzeau et al.[159] hanno descritto un aumento dei livelli di apoptosi e di ossidazione a causa della depolarizzazione mitocondriale, rilascio del citocromo c e aumento dell'attività delle caspasi 3, 7 e 9. Altri studi hanno illustrato l'impatto del BAK sulle cellule caliciformi, sul plesso nervoso sub-basale della cornea e sulla risposta immunitaria corneale. Il lavoro scritto da Januleviciene et al.[160] è l'unico che illustra una riduzione dell'osmolimetria nei pazienti che passano da BAK+latanoprost a tafluprost senza conservanti. Tuttavia, nel nostro studio abbiamo trovato una correlazione unicamente tra OSDI e durata della terapia e una moderata correlazione tra la quantità di conservanti/die e l'iperemia congiuntivale, come già dimostrato da alcuni studi precedenti[161, 162]. I nostri risultati sono conformi a una meta-analisi pubblicata di recente e condotta da Trocme et al.[163], che ha confrontato l'incidenza della cheratite puntata tra 1694 pazienti trattati con farmaci anti-glaucoma contenenti BAK: le loro conclusioni indicano che il BAK non produce tossicità corneale significativa nella stragrande maggioranza dei pazienti in monoterapia con formulazioni di uso comune. Contrariamente a Xiong et al.[164] e Lin et al.[165] che hanno dimostrato il ruolo del BAK nella patogenesi della sindrome da occhio secco evaporativa, non possiamo affermare che le gocce di

glaucoma siano responsabili della DED evaporativa: la differenza non significativa tra tBUT e il test di Schirmer nel gruppo Med Eyes potrebbe essere stata correlata all'assenza di conservanti in molte formulazioni di colliri odierne. Possiamo affermare che il lieve effetto della durata del trattamento e dell'esposizione giornaliera al BAK, e l'effetto trascurabile attribuibile alla quantità di molecole/die sulla valutazione clinica è un dato ragionevole considerando la complessità della SO.

I limiti di questo studio sono: 1) il ridotto numero dei partecipanti: abbiamo revisionato un numero considerevole di cartelle cliniche, ma solo una piccola percentuale di pazienti ha presentato i criteri di inclusione; 2) soggettività e variabilità di alcune misurazioni; 3) variabilità del tempo intercorso dall'intervento chirurgico alla visita medica; 4) diversa quantità di molecole utilizzate per il trattamento. Vantaggi: 1) una panoramica di tutti gli aspetti della SO in relazione sia alla terapia del glaucoma che alla chirurgia del glaucoma; 2) correlare un nuovo questionario (IDEEL) con OSDI, un'indagine consolidata e di lunga data nella pratica clinica; 3) evidenziare l'utilità del questionario IDEEL per esplorare i sintomi dell'occhio secco; 4) sottolineare l'importanza della chirurgia filtrante ai fini di migliorare i sintomi della DED.

2.1 ANALISI DELLA CONNESSINA 43 MEDIANTE ELISA

Un aumento della PIO rappresenta il principale fattore di rischio nella patogenesi del glaucoma. Picchi di PIO, soprattutto se soggetti a fluttuazioni nel tempo, sono responsabili della compressione meccanica, e della conseguente ischemizzazione dei capillari retinici. Ciò non è valido per il glaucoma a pressione normale. Una bassa pressione di perfusione oculare (data dalla differenza tra la PIO e la pressione sanguigna), o ripetuti rialzi della PIO, conducono a uno stress ossidativo cronico o a un'inflammatione cronica[166]. Le GJ degli astrociti non mielinizzati del NO mantengono l'omeostasi extracellulare mediante il trasferimento di ioni e altre molecole di basso peso in supporto agli assoni delle CGR. In tale contesto, i segnali Calcio-mediati inviati agli astrociti della barriera emato-retinica giocano un ruolo importante nella regolazione locale del flusso sanguigno e nel traffico metabolico[167]. Le onde di calcio si propagano nella rete astrociti-endotelio attraverso due percorsi distinti: l'inositolo trifosfato diffuso attraverso le GJ (contenenti Cx43) e la diffusione extracellulare di ATP facilitata attraverso l'apertura degli emi-canali di ATP. Le GJ presenti tra gli astrociti sono di due tipi: quelli composti da Cx43 e Cx30 e quelli costituiti di Cx26 (localizzati a livello del midollo osseo)[167]. Alterazioni nei segnali del Calcio e aumento della fosforilazione di ATP conducono a un danno delle CGR, il quale si estende alle cellule circostanti [168], tra cui le cellule dello strato

nucleare interno ed esterno e del nucleo genicolato laterale, grazie a un aumento dell'eccitotossicità glutammato-indotta, alterazioni delle concentrazioni ioniche, aumento dei radicali liberi e deplezione di fattori di crescita[169]. È stato stabilito che l'infiammazione cronica è il principale fattore responsabile dell'evoluzione del glaucoma. Le GJ sono implicate nella propagazione dello stimolo che conduce a morte cellulare. Akopian et al. hanno osservato che l'iniezione di un agente apoptotico nelle CRG e nella glia conduce alla morte delle cellule circostanti attraverso le GJ[170]. Il blocco farmacologico delle GJ in seguito a insulti eccitotossici e ischemici aumenta la sopravvivenza delle CRG del 70%: tale fatto è indicativo del ruolo giocato dalle GJ nella perdita neuronale. Il blocco dei GJ impedisce la morte delle cellule amacrine presumibilmente eliminando la propagazione dei segnali tossici dalle CGR a cui queste sono accoppiate. In seguito a stress ischemico, è stato dimostrato che gli astrociti riducono rapidamente le GJ, le Cx43 esposte sulla membrana citoplasmatica si degradano e, al contempo, aumentano i livelli citoplasmatici di Cx43. Nello studio di Lu et al., le GJ risultano più permeabili al colorante Lucifer Yellow se sottoposte a un insulto esterno[168]; Zvalova et al. hanno dimostrato che le GJ si riducono a causa dell'aumento di pressione, e decrescono di numero nell'arco delle 24 ore successivo all'insulto pressorio[171]. L'effetto esercitato dall'aumento di PIO sulle GJ ha una durata molto maggiore rispetto alla stimolazione degli astrociti mediante citochine e shock osmotico. La chiusura delle GJ e

l'internalizzazione delle Cx43 mediante fosforilazione dei residui di tirosina è causata dall'attivazione della EGFR tirosina chinasi, in risposta all'aumento della PIO[172]. C-Src, un recettore per le tirosina-chinasi, è responsabile dei processi di fosforilazione. Gli astrociti del NO possono utilizzare un meccanismo autocrino EGFR-mediato per convertire un segnale meccanico, come l'elevata PIO, in risposte biochimiche[172]. L'attivazione di EGFR induce la fosforilazione di Cx43 sui residui di tirosina e la successiva chiusura della comunicazione delle GJ tra gli astrociti adiacenti. L'interruzione della comunicazione cellulare può facilitare l'ipertrofia degli astrociti, l'aumento della motilità e la perdita di adesione cellulare caratteristica degli astrociti reattivi[173]. La colocalizzazione di Cx43 fosforilata (pCx43) e non fosforilata nel citoplasma indica una coesistenza di questi due elementi, suggerendo che la pCx43 intracellulare venga riciclata e, in parte, degradata. Li et al.[172] hanno dimostrato l'associazione di Cx43 con la β -actina in astrociti esposti a ischemia/ipossia chimica suggerendo che questa interazione influenzerebbe la migrazione degli astrociti. Le Cx43, combinate con i processi astrociti "end-foot processes", hanno un intimo rapporto con i capillari di ogni grosso vaso sanguigno, costituendo un'interfaccia glio-vascolare. Dopo l'ischemia, il rilascio di Ossido Nitrico accentua la morte delle CGR; le cellule morenti generano un segnale apoptotico attuando il trasferimento intercellulare di ioni e metaboliti mediante le Cx43 [174]: tale rilascio aumenta la permeabilità delle GJ causando

la morte delle cellule vicine. Kerr et al. hanno valutato la relazione tra l'espressione di Cx43 e la risposta gliale retinica, e la conseguente perdita di CGR dopo un danno da riperfusione da ischemia retinica: i risultati hanno mostrato che l'immunoreattività di Cx43 era significativamente aumentata nelle CGR e negli strati di FNR ed è stata successivamente accompagnata da una significativa perdita di CGR[175]. È stato dimostrato in un modello ex vivo che l'inoculazione di Cx43 blocca l'up-regolazione di Cx43, e a sua volta riduce la morte cellulare, l'edema del nervo ottico, l'attivazione di astrociti e microglia e ha preservato l'integrità vascolare[176]. La Cx43 è responsabile del leakage visibile alla fluorangiografia; il picco di leakage si verifica 4 ore dopo l'insulto ischemico, ed è concomitante con l'up-regolazione della Cx43 a livello di astrociti (e probabilmente l'attivazione delle Cellule del Müller)[177]. Inoltre, la morte delle cellule endoteliali a seguito di ipossia può essere mediata direttamente dall'apertura dell'emichannel Cx43. Alcuni studi hanno testato l'iniezione a livello sistemico (intraperitoneale) e intravitreale di un peptide mimetico della Cx43, mettendo in evidenza che quest'ultimo attua un blocco dell'emicanale Cx43 con riduzione del drop-out capillare, diminuzione dell'infiammazione e significativo risparmio di neuroni[178]. L'ablazione genetica selettiva delle subunità Cx36 o Cx45 delle GJ ha determinato una significativa riduzione della perdita di CGR normalmente osservata dopo un insulto eccitotossico o ischemico [179]. Le lesioni focali indotte dalla fotocoagulazione laser hanno

prodotto una perdita di neuroni significativamente maggiore nei topi wild-type rispetto alle retine di topo Cx36 -/[180]. Sotto insulto ischemico, si è scoperto che la proteina Cx36 si accumula principalmente in una regione perinucleare delle CGR (l'immunomarcatura nell'IPL era assente), evidenziando un cluster di CGR dal quale sembrerebbe partire il segnale apoptotico destinato a tradursi in processo neurodegenerativo una volta coinvolte le cellule adiacenti[71].

Le Cx sono state individuate nel trabecolato. Il trabecolato filtra l'umor acqueo in seguito al rilascio di ATP, il quale costituisce una risposta allo swelling cellulare anisosmotico[181]. La Pannessina-1(PX1), la Cx26, la Cx31, la Cx43 e la P2RX₇ partecipano attivamente a tale processo[181]. Il blocco selettivo di PX1 e delle Cx con carbenoxolone e etanolo induce una riduzione della filtrazione dell'umor acqueo dell'80±5%[181]. L'ipossia, l'ipercapnia e l'ischemia (attraverso l'attivazione degli emi-canali di Cx36 e Cx43) sono implicate nell'aumento del rilascio di ATP e, di conseguenza, nell'incremento di drenaggio di umor acqueo[182]. La Cx46 è responsabile dell'aumento βB1-crystallin-MYOC αB-crystallin nei modelli murini [183]; il Basic fibroblast growth factor (FGF-2) stimola l'attività degli emi-canali delle Cx [184]; l'Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) attiva la PX1 e gli emi-canali Cx [185]. Le Cx e la PX1 sono sensibili agli stimoli meccanici[186]: in ragione di ciò, la PIO subisce delle fluttuazioni circadiane 2.4 ± 0.7 mm Hg sincrone col ciclo cardiaco (Evans et al.,

2002), le, quali possono dislocare o modificare la outflow pathway. Lo stress meccanico ciclico induce l'espressione genica di MMP-3[187]. Le cellule del trabecolato drenano umor acqueo mediante le seguenti vie chimiche: Gi/o, fosfolipasi C, protein chinasi C α , c-Raf chinasi, mitogen-activated protein chinasi, extracellular signal-regulated chinasi (ERK1/2), e metalloproteinasi della matrice (MMP-2), rilascio di ioni, (per esempio, potassio) e piccole molecole (metaboliti, zuccheri, lattato e butirato) e attivazione della cascata intracellulare (attraverso i nucleotidi ciclici)[187]. Le cellule del tessuto iuxta-canalicolare (JCT) si legano alle cellule della parete interna del canale di Schlemm attraverso delle connessioni citoplasmatiche. Il desametasone può causare un aumento della PIO in soggetti "responders". Esso, infatti serra le tight junction, aumentando l'espressione della proteina ZO-1 nel trabecolato e nelle cellule endoteliali del Canale di Schlemm[188]. ZO-1 interagisce con Cx43, influenzando la contrattilità cellulare; legandosi all'actina del citoscheletro attraverso l'anchoring protein α -actinin [189]. Le cellule trabecolari sono delle cellule poligonali, in cui il citoscheletro ha la funzione di mantenere la polarità, l'orientamento e la trasduzione dei segnali metabolici. Tali modifiche a livello delle tight-junctions condurrebbero a un aumento della rigidità e a un incremento della resistenza nell'outflow dell'umor acqueo[190].

I limiti del presente studio sono: 1) la ridotta numerosità del campione; 2) soggettività nel prelevamento del campione; 3) variabilità nella

durata e nel numero di molecole del trattamento; 4) variabilità nel grado di deterioramento del campo visivo.

I vantaggi dello studio sono: 1) una overview sulla patogenesi del glaucoma; 2) una maggiore attenzione ai meccanismi molecolari nel glaucoma; 3) risalto dell'importanza dell'infiammazione nella patogenesi glaucomatosa.

2.2 METABOLOMICA NEL GLAUCOMA

Il lattato è il metabolita principalmente presente nella corteccia vitreale, in quanto in corrispondenza della superficie retinica vi è una carenza di ossigeno, un aumento della glicolisi anaerobia, alto consumo di ossigeno. Un aumento della PIO nei conigli suscita un aumento del lattato intravitreale, sottendendo una deplezione di ossigeno concomitante[191]. Il glucosio e l'acetato sono i metaboliti caratterizzanti del core vitreale, i più rappresentativi nel nostro studio. Il glucosio è il principale substrato per la produzione di ATP: durante la vita, i livelli di glucosio nel vitreo corrispondono alla concentrazione sierica e il range normale di glucosio vitreale è da 0 a 180 mg / dL. Per omeostasi, nei pazienti diabetici, l'occhio è in grado di mantenere una concentrazione vitreale inferiore a 100 mg / dL, anche se la glicemia raggiunge i 500 mg / dL[192]. Il glucosio è il principale metabolita utilizzato dalla retina, e fornito dalla coriocapillare attraverso la Membrana di Bruch e dall'epitelio pigmentato retinico[193]. Il metabolismo retinico, tuttavia, cambia in base a

cambiamenti interni ed esterni, e in base alla presenza di luce/buio [193]. Il metabolismo retinico è molto differente a seconda dei compartimenti retinici: la concentrazione di glucosio decresce dall'epitelio pigmentato verso la superficie vitreale[193]: è stato dimostrato che la retina interna metabolizza la maggior parte (~70%) del suo glucosio attraverso la glicolisi aerobia, il ciclo dell'acido tricarbossilico e la fosforilazione ossidativa. Al contrario, la retina esterna metabolizza circa il 60% del suo glucosio attraverso la glicolisi[193]. Il glucosio viene convertito in lattato a una velocità paragonabile alle cellule tumorali [194] nella retina avascolare [194], che trova riscontro nel nostro lavoro, in cui gli occhi operati di vitrectomia per distacco di retina ne mostravano un'importante concentrazione: in caso di forte degradazione dell'ATP da parte delle pompe ioniche localizzate tra i mitocondri dei fotorecettori centrali e le sinapsi terminali [195], la retina utilizza delle fonti di approvvigionamento energetico alternative all'ATP; la fosfocreatina è in tal caso utilizzata, sebbene non rappresenti un elemento essenziale per il metabolismo retinico, cosa che è stata dimostrata avvenire nelle malattie retiniche degenerative, come la retinite pigmentosa, la Malattia di Stargardt, il glaucoma etc., in cui i mitocondri non riescono ad accedere ai substrati necessari. L'alto tasso di sintesi aerobica di ATP nei fotorecettori, infatti, può portare alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dannose, che sono implicate nella progressione delle malattie degenerative della retina, soprattutto

perché alcune zone retiniche -come la macula o il nervo ottico- sono particolarmente suscettibili allo stress ossidativo. Il metabolismo del glucosio nella via del pentoso fosfato porta alla produzione di glutazione intracellulare, che previene la morte delle cellule neuronali attraverso l'inattivazione redox delle vie di apoptosi mediate dal citocromo [196]. Il metabolismo del glucosio alimenta anche la sintesi degli acidi grassi e le vie del metabolismo dei lipidi, che sono responsabili del mantenimento della corretta composizione lipidica di membrana nelle cellule neuronali[197]. L'interruzione della lipogenesi (eliminando la sintasi degli acidi grassi) nella retina neurale porta a una struttura sinaptica anormale e all'apoptosi[198]. Questo dato è corroborato dal riscontro di aumento dell'acetone nel nostro campione. L'acetato è un acido organico coinvolto nel metabolismo dell'acetilcolina e in quello dei lipidi e dei carboidrati: è stato dimostrato che la sintesi degli acidi grassi è circa 30 volte più abbondante nel vitreo degli occhi affetti da malattie retiniche degenerative. Il core vitreale è metabolicamente più inattivo: il suo compito è di nutrire la retina per diffusione passiva dei suoi metaboliti. Il vitreo basale è a contatto con il cristallino e con il trabecolato: esso è ricco di aminoacidi a catena ramificata, betaina, alanina, ascorbato, lisina e mioinositolo. La trasparenza del cristallino è garantita dall'ascorbato, molto attivo nella regolazione dell'ossigeno mediante i trasportatori della vitamina C Na^+ dipendenti, che impediscono la diffusione dei ROS dalla retina verso il segmento anteriore[199]. La betaina e il mioinositolo

(molecole regolatrici dell'osso) contribuiscono alla regolazione metabolica del vitreo basale: la loro funzione è di garantire un'omeostasi vitreale in caso di fluttuazione dei valori sierici, regolando l'assorbimento di diverse molecole (ad esempio, taurina, mio-inositolo e betaina) insieme all'acqua osmoticamente legata a diversi tipi di cellule tra cui l'epitelio pigmentato retinico[199]. Gli aminoacidi a catena ramificata sono presenti nel vitreo basale, in quanto svolgono una funzione suppletiva alla produzione di ossigeno in caso di danno o assenza della corteccia vitreale[199].

Un approccio metabolomico è stato applicato per il glaucoma, vista la gravità della patologia (che conduce alla cecità) e a fini economici – per ridurre i costi relativi alla frequenza delle visite, degli interventi chirurgici etc. Studi caso-controllo realizzati su metabolomica in campioni di sangue di individui affetti da glaucoma ad angolo aperto vs individui sani hanno evidenziato differenze nella concentrazione di palmitoilcarnitina, sfingolipidi, composti correlati alla vitamina D e precursori di steroidi, come conseguenza della disfunzione mitocondriale e dei cambiamenti del metabolismo energetico[200]. Sono stati riscontrati cambiamenti significativi nelle concentrazioni dei metaboliti tipici N-acetilaspargato (NAA), creatina/fosfocreatina e colina/fosfocolina/glicerofosfocolina nell'area striata rispetto ai controlli sani e nella corteccia visiva dei topi 6 settimane dopo l'inizio dell'ipertensione oculare[201]. Agudo-Barriuso

et al. hanno analizzato mediante la metabolomica la retina di topi sottoposti a traumatismo del nervo ottico, constatando una riduzione dei livelli di metaboliti intermedi del ciclo di Krebs (citrato, cis-aconitato, succinato, fumarato e malato), mentre i metaboliti associati a stress osmotico (ipotaurina, urea, sorbitolo, mioinositolo ed eritritolo), stress ossidativo (acido ascorbico), ergotioneina, cisteina-glutatione disolfuro) e il metabolismo del glucosio (fruttosio, glucosio, glucosio-6-fosfato, maltosio) sono risultati aumentati[202]. Livelli aumentati di sfinganina e fosfocolina sono stati trovati, suggerendo un'attivazione della via di segnalazione apoptotica della ceramide[203]. I nostri risultati sono coerenti con lo studio di Mayordomo-Febrer et al., i quali hanno analizzato con ^1H NMR l'umor acqueo di topi affetti da glaucoma cronico, trovandovi un aumento di aminoacidi, acetone e citrato[204]. Ciò è corroborato dal fatto che l'acetone è coinvolto nella sintesi di altre biomolecole come il colesterolo. Disregolazioni del profilo fosfolipidico, glicosfingolipidico (un aumento della C17 sfingosina, C17 sfinganina, e ridotti livelli della C19 sfingosina-1-fosfato) e del colesterolo, sono state descritte nel vitreo, umor acqueo e trabecolato di pazienti affetti da glaucoma. È stato anche riportato che le concentrazioni della maggior parte delle diacilglicerofosfocoline e 1-etero, 2-acilglicerofosfocoline sono aumentate nei pazienti con glaucoma ad angolo aperto rispetto ai controlli sani[205]. Negli esseri umani, il metanolo è considerato un veleno perché l'alcol deidrogenasi 1b (ADH1b) metabolizza

principalmente il metanolo in formaldeide tossica. Il metanolo stesso non è tossico per le cellule animali; tuttavia, la formaldeide è responsabile della carcinogenesi, dei danni ai neuroni cerebrali legati all'età. L'intossicazione da metanolo può causare gravi disfunzioni visive e i derivati chiave del metanolo che portano alla tossicità oculare includono la formaldeide[206]. Sono stati segnalati casi di atrofia ottica indotta da metanolo insieme a aumento del C/D dei dischi ottici simile al glaucoma. È stato dimostrato che il metabolismo degli astrociti nelle culture è alterato dopo l'esposizione alla formaldeide[207]. Sebbene le cellule ossidino efficacemente la formaldeide per costituire formato, probabilmente utilizzando ALDH2 e FDH, è stato osservato un aumento della glicolisi a causa dell'inibizione della respirazione mitocondriale. Nei granuli cerebellari coltivati esposti alla formaldeide, è stato rilevato un alto tasso di ossidazione accompagnato da aumenti significativi delle concentrazioni di formiato cellulare ed extracellulare, con conseguente incremento del consumo di glucosio e rilascio di lattato e, in ultimo, accelerazione dell'esportazione dell'antiossidante glutatione[208]. L'aumento del metanolo che è stato evidenziato nel presente studio per quanto riguarda i pazienti glaucomatosi, è compatibile con lo studio effettuato da Cui et al. i quali hanno speculato che nei soggetti glaucomatosi vi sia un aumento di produzione endogena di formaldeide. Esistono, infatti, plurime fonti di formaldeide cellulare, tra cui la deaminazione endogena della

metilammina, la demetilazione dell'istone, l'ossidazione del metanolo e l'assunzione esogena della formaldeide ambientale[206]. Anche gli enzimi nello smaltimento della formaldeide cellulare sono alterati nel glaucoma. Il gruppo carbonile polarizzato della formaldeide reagisce con il gruppo amminico della lisina o dell'arginina, formando basi di Schiff e producendo complessi legati in modo irreversibile e covalente tra proteine, nonché tra proteine e DNA a filamento singolo: in questo modo si assiste ad aumento della produzione di formaldeide nell'ippocampo di individui anziani con problemi di memoria o nelle malattie neurodegenerative tra cui l'Alzheimer[207]. La presenza di un aumento del metanolo in tale studio corrobora tale ipotesi.

CONCLUSIONI

Questa tesi di dottorato presenta i risultati degli studi effettuati utilizzando nuove tecnologie di diagnostica clinica strumentale e di ricerca biomolecolare nell'ambito della malattia glaucomatosa.

In particolare sono stati raggiunti i seguenti obiettivi:

- implementazione di un prototipo di perimetro Compass con un database normativo di soggetti sani per quanto riguarda la griglia 30-2;
- valutazione dell'affidabilità del perimetro Compass nel tempo;
- utilizzo del perimetro Compass nell'indagine funzionale delle patologie retiniche;
- attuazione di un programma di telemedicina mediante osservazione da remoto dei campi visivi e foto fundus;
- utilizzo del questionario IDEEL nello studio dei pazienti glaucomatosi (valutando il forte impatto sulla vita quotidiana dei colliri ipotonizzanti), in abbinamento con la valutazione osmometrica del film lacrimale;
- analisi spettrofotometrica della Cx 43 nell'umor acqueo di soggetti sani e glaucomatosi;
- utilizzo di un approccio innovativo, come la metabolomica, nello studio del glaucoma.

I risultati del presente lavoro indicano la validità della perimetria Compass nella diagnostica e nel follow-up della malattia glaucomatosa, anche se necessitano di ulteriori studi per la definitiva validazione della metodica. Per quanto riguarda gli studi di biologia molecolare, i risultati ottenuti devono intendersi preliminari, ma offrono una importante indicazione di interesse in un settore innovativo quale è la ricerca di biomarkers nella patologia glaucomatosa.

SVILUPPI FUTURI

I futuri sviluppi del perimetro Compass sono rappresentati dall'implementazione nel software dello strumento di nuovi indici di danno glaucomatoso basati su pattern spaziali delle perdite del campo visivo centrale, e dall'inserimento dell'esame OCT, creando quindi una piattaforma unica integrata che permetterà la visualizzazione simultanea di 3 esami clinici fondamentali nella diagnostica del glaucoma e delle malattie retiniche in generale: la perimetria, la retinografia e la tomografia retinica. Inoltre, la sua capacità di trasferire immagini e dati clinici via Internet, permetterà il suo utilizzo nelle reti di telemedicina.

La ricerca di tipo molecolare concernente le analisi della Connexina 43 con metodo ELISA nell'umor acqueo di soggetti normali e glaucomatosi, permetterà di valutare l'importanza di questa subunità proteica della "gap junction" come biomarcatore del glaucoma, e migliorare le conoscenze dei meccanismi molecolari della malattia. Inoltre, un tale marcatore rappresenterebbe un utile strumento diagnostico e di stratificazione del rischio di malattia, permettendo di effettuare un trattamento personalizzato precoce.

La spettroscopia H1-NMR del corpo vitreo rappresenta uno strumento interessante per la ricerca metabolomica nel glaucoma, sia per la semplicità della preparazione dei campioni, sia per l'elevata riproducibilità e rapidità di analisi. Il corpo vitreo è a diretto contatto con l'elemento critico della patogenesi glaucomatosa, rappresentato dalle cellule gangliari, le quali vanno incontro ad un processo degenerativo attraverso una complessa sequenza di eventi patologici in cui intervengono diversi fattori (alterazione del segnale delle neurotrofine, eccitotossicità, stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, "misfolding" delle proteine, fenomeni ipossici ed ischemici, autoimmunità, ed autofagia). Nel vitreo quindi vanno a depositarsi vari prodotti metabolici che ricapitolano i vari stadi della progressione della degenerazione neuronale glaucomatosa. Lo studio dei metaboliti presenti nel liquido vitreale

e parallelamente nel sangue e nelle urine in una coorte adeguata di pazienti, permetterebbe quindi di valutare la possibilità di identificare un profilo chimico specifico nei pazienti affetti, che potrebbe essere utilizzato per una diagnostica di laboratorio della malattia. Inoltre tali informazioni metaboliche costituirebbero un evidente progresso nelle conoscenze sulla patogenesi degenerativa glaucomatosa e sulle possibili soluzioni terapeutiche, specialmente nel campo della neuroprotezione.

PRODOTTI DELLA RICERCA

- Farci R, Carta A, Cocco E, Frau J, Fossarello M, Diaz G. Optical coherence tomography angiography in multiple sclerosis: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2020 Jul 23;15(7):e0236090.
- Capuano V, Sacconi R, Borrelli E, Miere A, Gelormini F, Farci R, Bandello F, Souied EH, Querques G. Dimple in vascularized serous pigment epithelial detachment secondary to neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2020 Aug;258(8):1597-1605.
- Farci R, Sellam A, Coscas F, Coscas GJ, Diaz G, Napoli PE, Souied E, Galantuomo MS, Fossarello M. Multimodal OCT Reflectivity Analysis of the Cystoid Spaces in Cystoid Macular Edema. *Biomed Res Int*. 2019 Mar 20;2019:7835372.
- Capuano V, Farci R, Miere A, Amoroso F, Bandello F, Souied EH, Querques G. Centrifugal Extension of Retinal Atrophy in Retinal Pigment Epithelium Tears Secondary to Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2017 Sep 1;48(9):705-710.
- Carta A, Mora P, Aldigeri R, Gozzi F, Favilla S, Tedesco S, Calzetti G, Farci R, Barboni P, Bianchi-Marzoli S, Fossarello M, Gandolfi S, Sadun AA. Optical coherence tomography is a useful tool in the differentiation between true edema and pseudoedema of the optic disc. *PLoS One*. 2018 Nov 29;13(11):e0208145.
- Farci R, Napoli PE, Fossarello M. An uncommon case of intermittent Pourfour du Petit Syndrome associated with acute

- angle-closure glaucoma successfully treated by laser iridotomy. *Int Ophthalmol.* 2018 Aug;38(4):1779-1781.
- Carta A, Favilla S, Calzetti G, Casalini MC, Ferrari PF, Bianchi B, Simonelli MB, Farci R, Gandolfi S, Mora P. The epidemiology of Moebius syndrome in Italy. *Orphanet J Rare Dis.* 2021 Apr 7;16(1):162.
 - Optical Coherence Tomography Angiography of Central Serous Chorioretinopathy: quantitative evaluation of vascular pattern and capillary flow density. "Van Graefe's" – in press.
 - "Ocular surface parameters in glaucoma patients surgically treated on one eye and medically treated on fellow eye" (sottomesso a "Journal of Clinical Medicine").
 - "Compass fundus-guided perimetry in geographic atrophy" (sottomesso a "Acta Ophthalmologica").
 - "X linked retinoschisis (XLJR): OCT Angiography features in two brothers from a four-generation Italian family with a p.Arg197Cys missense mutation in the RS1 gene" (sottomesso a "BMC Ophthalmology").
 - "Blepharospasm as a tardive manifestation of Covid-19 disease" (sottomesso a "International Ophthalmology").
 - "OCT-Angiography in Optic Disk Pit after inverted ILM flap" (sottomesso a "Indian Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology").

Poster:

- ARVO Annual Meeting Abstract | June 2020

Effect of a spatial filter on test-retest variability in glaucomatous patients

CHIARA RUI; Francesco Oddone; Antonio Modarelli; Roberta Farci; Paolo Fogagnolo; Luca Mario Rossetti

Comunicazione orale:

- **OCT-Angiography in Optic Disk Pit after inverted ILM flap**

6th Global Pediatric Ophthalmology Congress held at March 08, 2021 | Webinar.

REFERENZE

1. Anderson, D.R., *Pathology of the glaucomas*. Br J Ophthalmol, 1972. **56**(3): p. 146-57.
2. Buckingham, B.P., et al., *Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma*. J Neurosci, 2008. **28**(11): p. 2735-44.
3. Friedman, D.S., et al., *Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(4): p. 532-8.
4. Day, A.C., et al., *The prevalence of primary angle closure glaucoma in European derived populations: a systematic review*. Br J Ophthalmol, 2012. **96**(9): p. 1162-7.
5. Quigley, H.A. and A.T. Broman, *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. Br J Ophthalmol, 2006. **90**(3): p. 262-7.
6. Sathyamangalam, R.V., et al., *Determinants of glaucoma awareness and knowledge in urban Chennai*. Indian J Ophthalmol, 2009. **57**(5): p. 355-60.
7. Budenz, D.L., et al., *Prevalence of glaucoma in an urban West African population: the Tema Eye Survey*. JAMA Ophthalmol, 2013. **131**(5): p. 651-8.
8. Nickells, R.W., et al., *Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 153-79.
9. Hollands, H., et al., *Do findings on routine examination identify patients at risk for primary open-angle glaucoma? The rational clinical examination systematic review*. Jama, 2013. **309**(19): p. 2035-42.
10. Tham, Y.C., et al., *Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis*. Ophthalmology, 2014. **121**(11): p. 2081-90.

11. Rudnicka, A.R., et al., *Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(10): p. 4254-61.
12. Monemi, S., et al., *Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(6): p. 725-33.
13. Stone, E.M., et al., *Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma*. Science, 1997. **275**(5300): p. 668-70.
14. Aung, T., et al., *Clinical features and course of patients with glaucoma with the E50K mutation in the optineurin gene*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(8): p. 2816-22.
15. Kwon, Y.H., et al., *Primary open-angle glaucoma*. N Engl J Med, 2009. **360**(11): p. 1113-24.
16. Thorleifsson, G., et al., *Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 906-9.
17. Wiggs, J.L., et al., *Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma*. PLoS Genet, 2012. **8**(4): p. e1002654.
18. Takamoto, M., et al., *Common variants on chromosome 9p21 are associated with normal tension glaucoma*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40107.
19. Quigley, H.A., et al., *Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage*. Arch Ophthalmol, 1981. **99**(4): p. 635-49.
20. Burgoyne, C.F., et al., *The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(1): p. 39-73.
21. Ju, W.K., et al., *Intraocular pressure elevation induces mitochondrial fission and triggers OPA1 release in glaucomatous optic nerve*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(11): p. 4903-11.

22. Gabelt, B.T., et al., *Effects of serotonergic compounds on aqueous humor dynamics in monkeys*. *Curr Eye Res*, 2001. **23**(2): p. 120-7.
23. Green, K., et al., *Beta adrenergic effects on ciliary epithelial permeability, aqueous humor formation and pseudofacility in the normal and sympathectomized rabbit eye*. *Curr Eye Res*, 1981. **1**(7): p. 419-23.
24. Weinreb, R.N. and P.T. Khaw, *Primary open-angle glaucoma*. *Lancet*, 2004. **363**(9422): p. 1711-20.
25. Kim, J.A., et al., *Comparison of Lamina Cribrosa Morphology in Eyes with Ocular Hypertension and Normal-Tension Glaucoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020. **61**(4): p. 4.
26. Abadia, B., et al., *Effect of the Eye Tracking System on the Reproducibility of Measurements Obtained With Spectral-domain Optical Coherence Tomography in Glaucoma*. *J Glaucoma*, 2017. **26**(7): p. 638-645.
27. Kim, Y.K., et al., *Topographic characteristics of optic disc hemorrhage in primary open-angle glaucoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014. **55**(1): p. 169-76.
28. Balazsi, G. and E.B. Werner, *Relationship between baring of circumlinear vessels of the optic disc and glaucomatous visual field loss*. *Can J Ophthalmol*, 1983. **18**(7): p. 333-6.
29. Herschler, J. and R.H. Osher, *Baring of the circumlinear vessel. An early sign of optic nerve damage*. *Arch Ophthalmol*, 1980. **98**(5): p. 865-9.
30. Jonas, J.B., *Clinical implications of peripapillary atrophy in glaucoma*. *Curr Opin Ophthalmol*, 2005. **16**(2): p. 84-8.
31. Rezaie, T., et al., *Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin*. *Science*, 2002. **295**(5557): p. 1077-9.
32. Kotowski, J., et al., *Glaucoma discrimination of segmented cirrus spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) macular scans*. *Br J Ophthalmol*, 2012. **96**(11): p. 1420-5.
33. Ganekal, S., *Ganglion cell complex scan in the early prediction of glaucoma*. *Nepal J Ophthalmol*, 2012. **4**(2): p. 236-41.

34. Kansal, V., et al., *Optical coherence tomography for glaucoma diagnosis: An evidence based meta-analysis*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190621.
35. Elish, N.J. and E.J. Higginbotham, *Evaluating a visual field screening test for glaucoma: how the choice of the gold standard affects the validity of the test*. Ophthalmic Epidemiol, 2001. **8**(5): p. 297-307.
36. Fogagnolo, P., et al., *The effects of intraocular pressure reduction on perimetric variability in glaucomatous eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p. 4557-63.
37. Kim, J.M., et al., *Location of Initial Visual Field Defects in Glaucoma and Their Modes of Deterioration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(13): p. 7956-62.
38. Abe, R.Y., et al., *Predicting Vision-Related Disability in Glaucoma*. Ophthalmology, 2018. **125**(1): p. 22-30.
39. De Moraes, C.G., J.M. Liebmann, and L.A. Levin, *Detection and measurement of clinically meaningful visual field progression in clinical trials for glaucoma*. Prog Retin Eye Res, 2017. **56**: p. 107-147.
40. Fogagnolo, P. and L. Rossetti, *Medical treatment of glaucoma: present and future*. Expert Opin Investig Drugs, 2011. **20**(7): p. 947-59.
41. Stewart, W.C., et al., *Meta-analysis of 24-hour intraocular pressure studies evaluating the efficacy of glaucoma medicines*. Ophthalmology, 2008. **115**(7): p. 1117-1122.e1.
42. Kass, M.A., et al., *The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol, 2002. **120**(6): p. 701-13; discussion 829-30.
43. Heijl, A., et al., *Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial*. Arch Ophthalmol, 2002. **120**(10): p. 1268-79.
44. Rossetti, L., et al., *Can Treatment With Citicoline Eyedrops Reduce Progression in Glaucoma? The Results of a*

- Randomized Placebo-controlled Clinical Trial.* J Glaucoma, 2020. **29**(7): p. 513-520.
45. Ottobelli, L., et al., *Citicoline oral solution in glaucoma: is there a role in slowing disease progression?* Ophthalmologica, 2013. **229**(4): p. 219-26.
 46. Odberg, T. and L. Sandvik, *The medium and long-term efficacy of primary argon laser trabeculoplasty in avoiding topical medication in open angle glaucoma.* Acta Ophthalmol Scand, 1999. **77**(2): p. 176-81.
 47. Lichter, P.R., et al., *Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery.* Ophthalmology, 2001. **108**(11): p. 1943-53.
 48. Rulli, E., et al., *Efficacy and safety of trabeculectomy vs nonpenetrating surgical procedures: a systematic review and meta-analysis.* JAMA Ophthalmol, 2013. **131**(12): p. 1573-82.
 49. Howell, G.R., et al., *Intrinsic axonal degeneration pathways are critical for glaucomatous damage.* Exp Neurol, 2013. **246**: p. 54-61.
 50. Dandona, L., A. Hendrickson, and H.A. Quigley, *Selective effects of experimental glaucoma on axonal transport by retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(5): p. 1593-9.
 51. Whitmore, A.V., R.T. Libby, and S.W. John, *Glaucoma: thinking in new ways-a rôle for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes?* Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(6): p. 639-62.
 52. Barrientos, S.A., et al., *Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore.* J Neurosci, 2011. **31**(3): p. 966-78.
 53. Levkovitch-Verbin, H., *Retinal ganglion cell apoptotic pathway in glaucoma: Initiating and downstream mechanisms.* Prog Brain Res, 2015. **220**: p. 37-57.
 54. Coughlin, B.A., D.J. Feenstra, and S. Mohr, *Müller cells and diabetic retinopathy.* Vision Res, 2017. **139**: p. 93-100.

55. Dapper, J.D., et al., *Proximal inhibition of p38 MAPK stress signaling prevents distal axonopathy*. Neurobiol Dis, 2013. **59**: p. 26-37.
56. Hänninen, V.A., et al., *Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma*. Curr Eye Res, 2002. **25**(6): p. 389-95.
57. Tschumperlin, D.J., et al., *Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 83-6.
58. De Franceschi, N., et al., *Integrin traffic - the update*. J Cell Sci, 2015. **128**(5): p. 839-52.
59. Solomon, M.J. and A. Varshavsky, *Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(19): p. 6470-4.
60. Nie, C.L., et al., *Changes in conformation of human neuronal tau during denaturation in formaldehyde solution*. Protein Pept Lett, 2005. **12**(1): p. 75-8.
61. Vinken, M., et al., *Connexins: sensors and regulators of cell cycling*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1815**(1): p. 13-25.
62. Vinken, M., et al., *Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(8): p. 2002-8.
63. Decrock, E., et al., *Connexin-related signaling in cell death: to live or let die?* Cell Death Differ, 2009. **16**(4): p. 524-36.
64. Alstrom, J.S., et al., *Protein kinase C-dependent regulation of connexin43 gap junctions and hemichannels*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(3): p. 519-23.
65. Srinivas, M., et al., *Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations*. J Gen Physiol, 2006. **127**(1): p. 67-75.
66. Wang, N., et al., *Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury*. Basic Res Cardiol, 2013. **108**(1): p. 309.
67. Shimaoka, M., et al., *Connexins and Integrins in Exosomes*. Cancers (Basel), 2019. **11**(1).
68. Nielsen, M.S., et al., *Gap junctions*. Compr Physiol, 2012. **2**(3): p. 1981-2035.

69. Hessvik, N.P. and A. Llorente, *Current knowledge on exosome biogenesis and release*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(2): p. 193-208.
70. Leithe, E., et al., *Endocytosis and post-endocytic sorting of connexins*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(8): p. 1870-9.
71. Danesh-Meyer, H.V., et al., *Connexin43 mimetic peptide reduces vascular leak and retinal ganglion cell death following retinal ischaemia*. Brain, 2012. **135**(Pt 2): p. 506-20.
72. Kimura, K., et al., *Role of the JNK signaling pathway in downregulation of connexin43 by TNF- α in human corneal fibroblasts*. Curr Eye Res, 2013. **38**(9): p. 926-32.
73. Lusso, J.N., R.E. Truax, and G. Richard, *trans-resveratrol inhibits hyperglycemia-induced inflammation and connexin downregulation in retinal pigment epithelial cells*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(14): p. 8246-52.
74. Guo, C.X., et al., *Gap junction proteins in the light-damaged albino rat*. Mol Vis, 2014. **20**: p. 670-82.
75. Grupcheva, C.N., et al., *Improved corneal wound healing through modulation of gap junction communication using connexin43-specific antisense oligodeoxynucleotides*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(3): p. 1130-8.
76. Moore, K., et al., *A synthetic connexin 43 mimetic peptide augments corneal wound healing*. Exp Eye Res, 2013. **115**: p. 178-88.
77. Ormonde, S., et al., *Regulation of connexin43 gap junction protein triggers vascular recovery and healing in human ocular persistent epithelial defect wounds*. J Membr Biol, 2012. **245**(7): p. 381-8.
78. Becker, D.L., et al., *Translating connexin biology into therapeutics*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **50**: p. 49-58.
79. Patti, G.J., O. Yanes, and G. Siuzdak, *Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 263-9.
80. Nicholson, J.K., J.C. Lindon, and E. Holmes, *'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of*

- biological NMR spectroscopic data*. Xenobiotica, 1999. **29**(11): p. 1181-9.
81. Nicholson, J.K. and I.D. Wilson, *Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(8): p. 668-76.
 82. Hassan, M.A., et al., *Integration of Transcriptome and Metabolome Provides Unique Insights to Pathways Associated With Obese Breast Cancer Patients*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 804.
 83. Zhan, X., Y. Long, and M. Lu, *Exploration of variations in proteome and metabolome for predictive diagnostics and personalized treatment algorithms: Innovative approach and examples for potential clinical application*. J Proteomics, 2018. **188**: p. 30-40.
 84. Holmes, E., et al., *Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 396-400.
 85. Goodacre, R., et al., *Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 245-52.
 86. Li, S., A. Todor, and R. Luo, *Blood transcriptomics and metabolomics for personalized medicine*. Comput Struct Biotechnol J, 2016. **14**: p. 1-7.
 87. Rossetti, L., et al., *Compass: clinical evaluation of a new instrument for the diagnosis of glaucoma*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0122157.
 88. Wong, W.L., et al., *Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Glob Health, 2014. **2**(2): p. e106-16.
 89. Fleckenstein, M., et al., *The Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration*. Ophthalmology, 2018. **125**(3): p. 369-390.
 90. Fleckenstein, M., et al., *High-resolution spectral domain-OCT imaging in geographic atrophy associated with age-related*

- macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(9): p. 4137-44.
91. Holz, F.G., et al., *Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol, 2007. **143**(3): p. 463-72.
 92. Csaky, K.G., et al., *Microperimetry for geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration*. Surv Ophthalmol, 2019. **64**(3): p. 353-364.
 93. Luke, S.G., *Evaluating significance in linear mixed-effects models in R*. Behav Res Methods, 2017. **49**(4): p. 1494-1502.
 94. Abetz, L., et al., *Development and validation of the impact of dry eye on everyday life (IDEEL) questionnaire, a patient-reported outcomes (PRO) measure for the assessment of the burden of dry eye on patients*. Health Qual Life Outcomes, 2011. **9**: p. 111.
 95. Schiffman, R.M., et al., *Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index*. Arch Ophthalmol, 2000. **118**(5): p. 615-21.
 96. Wolffsohn, J.S., et al., *TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report*. Ocul Surf, 2017. **15**(3): p. 539-574.
 97. Nolfi, J. and B. Caffery, *Randomized comparison of in vivo performance of two point-of-care tear film osmometers*. Clin Ophthalmol, 2017. **11**: p. 945-950.
 98. Murphy, P.J., et al., *How red is a white eye? Clinical grading of normal conjunctival hyperaemia*. Eye (Lond), 2007. **21**(5): p. 633-8.
 99. Bron, A.J., V.E. Evans, and J.A. Smith, *Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests*. Cornea, 2003. **22**(7): p. 640-50.
 100. Stevens, S., *Schirmer's test*. Community Eye Health, 2011. **24**(76): p. 45.
 101. Spahr, J., *Optimization of the presentation pattern in automated static perimetry*. Vision Res, 1975. **15**(11): p. 1275-81.
 102. Phu, J., et al., *How Many Subjects are Needed for a Visual Field Normative Database? A Comparison of Ground Truth and*

- Bootstrapped Statistics*. *Transl Vis Sci Technol*, 2018. **7**(2): p. 1.
103. Bosworth, C.F., et al., *Current practice with standard automated perimetry*. *Semin Ophthalmol*, 2000. **15**(4): p. 172-81.
 104. Swanson, W.H., *Stimulus size for perimetry in patients with glaucoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013. **54**(6): p. 3984.
 105. Anderson, A.J., et al., *Characteristics of the normative database for the Humphrey matrix perimeter*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. **46**(4): p. 1540-8.
 106. Redmond, T., et al., *Sensitivity loss in early glaucoma can be mapped to an enlargement of the area of complete spatial summation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(12): p. 6540-8.
 107. Glezer, V.D., *The receptive fields of the retina*. *Vision Res*, 1965. **5**(9): p. 497-525.
 108. Kalloniatis, M. and S.K. Khuu, *Equating spatial summation in visual field testing reveals greater loss in optic nerve disease*. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2016. **36**(4): p. 439-52.
 109. Johnson, C.A., G.A. Cioffi, and E.M. Van Buskirk, *Frequency doubling technology perimetry using a 24--2 stimulus presentation pattern*. *Optom Vis Sci*, 1999. **76**(8): p. 571-81.
 110. Choi, E.Y., et al., *Predicting Global Test-Retest Variability of Visual Fields in Glaucoma*. *Ophthalmol Glaucoma*, 2020.
 111. Yohannan, J., et al., *Evidence-based Criteria for Assessment of Visual Field Reliability*. *Ophthalmology*, 2017. **124**(11): p. 1612-1620.
 112. Heijl, A., G. Lindgren, and J. Olsson, *Normal variability of static perimetric threshold values across the central visual field*. *Arch Ophthalmol*, 1987. **105**(11): p. 1544-9.
 113. Gardiner, S.K., *Differences in the Relation Between Perimetric Sensitivity and Variability Between Locations Across the Visual Field*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018. **59**(8): p. 3667-3674.
 114. Khuu, S.K. and M. Kalloniatis, *Standard Automated Perimetry: Determining Spatial Summation and Its Effect on Contrast*

- Sensitivity Across the Visual Field*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(6): p. 3565-76.
115. Young, W.O., et al., *Static threshold variability in the peripheral visual field in normal subjects*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1990. **228**(5): p. 454-7.
 116. Hutchings, N., et al., *The long-term fluctuation of the visual field in stable glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3429-36.
 117. Flammer, J., S.M. Drance, and M. Zulauf, *Differential light threshold. Short- and long-term fluctuation in patients with glaucoma, normal controls, and patients with suspected glaucoma*. Arch Ophthalmol, 1984. **102**(5): p. 704-6.
 118. Katz, J. and A. Sommer, *A longitudinal study of the age-adjusted variability of automated visual fields*. Arch Ophthalmol, 1987. **105**(8): p. 1083-6.
 119. Heijl, A., A. Lindgren, and G. Lindgren, *Test-retest variability in glaucomatous visual fields*. Am J Ophthalmol, 1989. **108**(2): p. 130-5.
 120. Norman, S., *The use of telemedicine in psychiatry*. J Psychiatr Ment Health Nurs, 2006. **13**(6): p. 771-7.
 121. Myung, S.K., et al., *Effects of Web- and computer-based smoking cessation programs: meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2009. **169**(10): p. 929-37.
 122. Neubeck, L., et al., *Telehealth interventions for the secondary prevention of coronary heart disease: a systematic review*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2009. **16**(3): p. 281-9.
 123. Prange, G.B., et al., *Systematic review of the effect of robot-aided therapy on recovery of the hemiparetic arm after stroke*. J Rehabil Res Dev, 2006. **43**(2): p. 171-84.
 124. Henderson, A., N. Korner-Bitensky, and M. Levin, *Virtual reality in stroke rehabilitation: a systematic review of its effectiveness for upper limb motor recovery*. Top Stroke Rehabil, 2007. **14**(2): p. 52-61.
 125. Rogers, M.A., et al., *Internet-Delivered Health Interventions That Work: Systematic Review of Meta-Analyses and*

- Evaluation of Website Availability.* J Med Internet Res, 2017. **19**(3): p. e90.
126. Jackson, C.L., et al., *A systematic review of interactive computer-assisted technology in diabetes care. Interactive information technology in diabetes care.* J Gen Intern Med, 2006. **21**(2): p. 105-10.
 127. Weinstein, P.K., *A review of weight loss programs delivered via the Internet.* J Cardiovasc Nurs, 2006. **21**(4): p. 251-8; quiz 259-60.
 128. Hersh, W.R., et al., *Diagnosis, access and outcomes: Update of a systematic review of telemedicine services.* J Telemed Telecare, 2006. **12 Suppl 2**: p. S3-31.
 129. Jones, P.R., et al., *Glaucoma Home Monitoring Using a Tablet-Based Visual Field Test (Eyecatcher): An Assessment of Accuracy and Adherence Over 6 Months.* Am J Ophthalmol, 2021. **223**: p. 42-52.
 130. Tsapakis, S., et al., *Home-based visual field test for glaucoma screening comparison with Humphrey perimeter.* Clin Ophthalmol, 2018. **12**: p. 2597-2606.
 131. Russo, A., et al., *Comparison of Smartphone Ophthalmoscopy With Slit-Lamp Biomicroscopy for Grading Vertical Cup-to-Disc Ratio.* J Glaucoma, 2016. **25**(9): p. e777-81.
 132. Wintergerst, M.W.M., et al., *Undilated versus dilated monoscopic smartphone-based fundus photography for optic nerve head evaluation.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10228.
 133. Mudie, L.I., et al., *The Icare HOME (TA022) Study: Performance of an Intraocular Pressure Measuring Device for Self-Tonometry by Glaucoma Patients.* Ophthalmology, 2016. **123**(8): p. 1675-1684.
 134. Garway-Heath, D.F., et al., *Mapping the visual field to the optic disc in normal tension glaucoma eyes.* Ophthalmology, 2000. **107**(10): p. 1809-15.
 135. Nouri-Mahdavi, K., R. Zarei, and J. Caprioli, *Influence of visual field testing frequency on detection of glaucoma progression with trend analyses.* Arch Ophthalmol, 2011. **129**(12): p. 1521-7.

136. Liu, M.M., et al., *Use of Optical Coherence Tomography by Nonexpert Personnel as a Screening Approach for Glaucoma*. J Glaucoma, 2018. **27**(1): p. 64-70.
137. Fogagnolo, P., et al., *Compass fundus automated perimetry*. Eur J Ophthalmol, 2018. **28**(5): p. 481-490.
138. Meleth, A.D., et al., *Changes in retinal sensitivity in geographic atrophy progression as measured by microperimetry*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(2): p. 1119-26.
139. Forte, R., et al., *Multimodal imaging of dry age-related macular degeneration*. Acta Ophthalmol, 2012. **90**(4): p. e281-7.
140. Sayegh, R.G., et al., *A systematic correlation of morphology and function using spectral domain optical coherence tomography and microperimetry in patients with geographic atrophy*. Br J Ophthalmol, 2014. **98**(8): p. 1050-5.
141. Hartmann, K.I., et al., *Scanning laser ophthalmoscope imaging stabilized microperimetry in dry age-related macular degeneration*. Retina, 2011. **31**(7): p. 1323-31.
142. Chen, F.K., et al., *Nidek MP1 is able to detect subtle decline in function in inherited and age-related atrophic macular disease with stable visual acuity*. Retina, 2011. **31**(2): p. 371-9.
143. Lajmi, H., et al., *Antiglaucomatous treatments and ocular surface*. Tunis Med, 2017. **95**(7): p. 477-481.
144. Lemp, M.A., et al., *Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease*. Am J Ophthalmol, 2011. **151**(5): p. 792-798.e1.
145. Lee, S.Y., et al., *Effect of chronic anti-glaucoma medications and trabeculectomy on tear osmolarity*. Eye (Lond), 2013. **27**(10): p. 1142-50.
146. Agnifili, L., et al., *The ocular surface after successful glaucoma filtration surgery: a clinical, in vivo confocal microscopy, and immune-cytology study*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11299.
147. Oguz, H., *Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma*. Am J Ophthalmol, 2012. **153**(5): p. 1003; author reply 1003-4.

148. Garcia-Feijoo, J. and J.R. Sampaolesi, *A multicenter evaluation of ocular surface disease prevalence in patients with glaucoma*. Clin Ophthalmol, 2012. **6**: p. 441-6.
149. Lee, J.H., et al., *NFAT5 induction and its role in hyperosmolar stressed human limbal epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(5): p. 1827-35.
150. Pflugfelder, S.C., et al., *Epithelial-immune cell interaction in dry eye*. Cornea, 2008. **27 Suppl 1**(0 1): p. S9-11.
151. Corrales, R.M., et al., *Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(8): p. 3293-302.
152. Luo, L., et al., *Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(12): p. 4293-301.
153. Yeh, S., et al., *Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(1): p. 124-9.
154. Hau, S. and K. Barton, *Corneal complications of glaucoma surgery*. Curr Opin Ophthalmol, 2009. **20**(2): p. 131-6.
155. Sauder, G. and J.B. Jonas, *Limbal stem cell deficiency after subconjunctival mitomycin C injection for trabeculectomy*. Am J Ophthalmol, 2006. **141**(6): p. 1129-30.
156. Wilson, S.E., M. Netto, and R. Ambrósio, Jr., *Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease*. Am J Ophthalmol, 2003. **136**(3): p. 530-6.
157. Shimazaki, J., et al., *Changes in ocular surface caused by antiglaucomatous eyedrops: prospective, randomised study for the comparison of 0.5% timolol v 0. 12% unoprostone*. Br J Ophthalmol, 2000. **84**(11): p. 1250-4.
158. Rasmussen, C.A., P.L. Kaufman, and J.A. Kiland, *Benzalkonium chloride and glaucoma*. J Ocul Pharmacol Ther, 2014. **30**(2-3): p. 163-9.
159. Clouzeau, C., et al., *Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 851-63.

160. Janulevičienė, I., et al., *Effects of preservative-free tafluprost on tear film osmolarity, tolerability, and intraocular pressure in previously treated patients with open-angle glaucoma*. Clin Ophthalmol, 2012. **6**: p. 103-9.
161. Pérez-Bartolomé, F., et al., *Ocular Surface Disease in Patients under Topical Treatment for Glaucoma*. Eur J Ophthalmol, 2017. **27**(6): p. 694-704.
162. Skalicky, S.E., I. Goldberg, and P. McCluskey, *Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma*. Am J Ophthalmol, 2012. **153**(1): p. 1-9.e2.
163. Trocme, S., et al., *The role of benzalkonium chloride in the occurrence of punctate keratitis: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials*. Ann Pharmacother, 2010. **44**(12): p. 1914-21.
164. Xiong, C., et al., *A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(5): p. 1850-6.
165. Lin, Z., et al., *A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 257-64.
166. Nickells, R.W., *From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma*. Can J Ophthalmol, 2007. **42**(2): p. 278-87.
167. Garré, J.M., et al., *FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(52): p. 22659-64.
168. Lu, C., et al., *Involvement of gap junctions in astrocyte impairment induced by manganese exposure*. Brain Res Bull, 2018. **140**: p. 107-113.
169. Vohra, R., J.C. Tsai, and M. Kolko, *The role of inflammation in the pathogenesis of glaucoma*. Surv Ophthalmol, 2013. **58**(4): p. 311-20.
170. Akopian, A., et al., *Gap junction-mediated death of retinal neurons is connexin and insult specific: a potential target for neuroprotection*. J Neurosci, 2014. **34**(32): p. 10582-91.

171. Zvalova, D., et al., *p38/SAPK2 controls gap junction closure in astrocytes*. *Glia*, 2004. **46**(3): p. 323-33.
172. Li, W., E.L. Hertzberg, and D.C. Spray, *Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7941-8.
173. Kerr, N.M., et al., *Immunolocalization of gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human retina and optic nerve*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(8): p. 4028-34.
174. Kaur, C. and E.A. Ling, *Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions*. *Curr Neurovasc Res*, 2008. **5**(1): p. 71-81.
175. Kerr, N.M., et al., *High pressure-induced retinal ischaemia reperfusion causes upregulation of gap junction protein connexin43 prior to retinal ganglion cell loss*. *Exp Neurol*, 2012. **234**(1): p. 144-52.
176. Cotrina, M.L., et al., *Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions*. *J Neurosci*, 1998. **18**(7): p. 2520-37.
177. Cusato, K., et al., *Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina*. *J Neurosci*, 2003. **23**(16): p. 6413-22.
178. Danesh-Meyer, H.V., et al., *Connexin43 antisense oligodeoxynucleotide treatment down-regulates the inflammatory response in an in vitro interphase organotypic culture model of optic nerve ischaemia*. *J Clin Neurosci*, 2008. **15**(11): p. 1253-63.
179. Perez Velazquez, J.L., M.V. Frantseva, and C.C. Naus, *Gap junctions and neuronal injury: protectants or executioners?* *Neuroscientist*, 2003. **9**(1): p. 5-9.
180. Striedinger, K., et al., *Loss of connexin36 increases retinal cell vulnerability to secondary cell loss*. *Eur J Neurosci*, 2005. **22**(3): p. 605-16.
181. Fleischhauer, J.C., et al., *Common actions of adenosine receptor agonists in modulating human trabecular meshwork cell transport*. *J Membr Biol*, 2003. **193**(2): p. 121-36.

182. Bergfeld, G.R. and T. Forrester, *Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(1): p. 40-7.
183. Kimura, S., et al., *Regulation of connexin phosphorylation and cell-cell coupling in trabecular meshwork cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(8): p. 2222-8.
184. Paper, W., et al., *Elevated amounts of myocilin in the aqueous humor of transgenic mice cause significant changes in ocular gene expression*. Exp Eye Res, 2008. **87**(3): p. 257-67.
185. De Vuyst, E., et al., *Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 34-46.
186. Bao, L., F. Sachs, and G. Dahl, *Connexins are mechanosensitive*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(5): p. C1389-95.
187. Luna, C., et al., *Extracellular release of ATP mediated by cyclic mechanical stress leads to mobilization of AA in trabecular meshwork cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(12): p. 5805-10.
188. Husain, S., T.W. Shearer, and C.E. Crosson, *Mechanisms linking adenosine A1 receptors and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human trabecular meshwork cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(1): p. 258-65.
189. Singh, D., et al., *Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30416-21.
190. Zhuo, Y.H., et al., *Dexamethasone disrupts intercellular junction formation and cytoskeleton organization in human trabecular meshwork cells*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 61-71.
191. Doganay, S., C. Cankaya, and A. Alkan, *Evaluation of corpus geniculatum laterale and vitreous fluid by magnetic resonance spectroscopy in patients with glaucoma; a preliminary study*. Eye (Lond), 2012. **26**(8): p. 1044-51.
192. Osuna, E., et al., *Glucose and lactate in vitreous humor compared with the determination of fructosamine for the*

- postmortem diagnosis of diabetes mellitus*. Am J Forensic Med Pathol, 2001. **22**(3): p. 244-9.
193. Pieczenik, S.R. and J. Neustadt, *Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(1): p. 84-92.
 194. Vaughn, A.E. and M. Deshmukh, *Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1477-83.
 195. Robertson, J.P., A. Faulkner, and R.G. Vernon, *Regulation of glycolysis and fatty acid synthesis from glucose in sheep adipose tissue*. Biochem J, 1982. **206**(3): p. 577-86.
 196. Rajagopal, R., et al., *Retinal de novo lipogenesis coordinates neurotrophic signaling to maintain vision*. JCI Insight, 2018. **3**(1).
 197. Locci, E., et al., *A metabolomic approach to animal vitreous humor topographical composition: a pilot study*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97773.
 198. Ngumah, Q.C., S.D. Buchthal, and R.F. Dacheux, *Longitudinal non-invasive proton NMR spectroscopy measurement of vitreous lactate in a rabbit model of ocular hypertension*. Exp Eye Res, 2006. **83**(2): p. 390-400.
 199. Burgess, L.G., et al., *Metabolome-Wide Association Study of Primary Open Angle Glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(8): p. 5020-8.
 200. Agudo-Barriuso, M., et al., *Metabolomic changes in the rat retina after optic nerve crush*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(6): p. 4249-59.
 201. Edwards, G., et al., *Sphingolipids and ceramides of mouse aqueous humor: Comparative profiles from normotensive and hypertensive DBA/2J mice*. Biochimie, 2014. **105**: p. 99-109.
 202. Mayordomo-Febrer, A., et al., *Metabolomics of the aqueous humor in the rat glaucoma model induced by a series of intracameral sodium hyaluronate injection*. Exp Eye Res, 2015. **131**: p. 84-92.

203. Chen, L., et al., *Recent advances in the applications of metabolomics in eye research*. *Anal Chim Acta*, 2018. **1037**: p. 28-40.
204. Tulpule, K. and R. Dringen, *Formate generated by cellular oxidation of formaldehyde accelerates the glycolytic flux in cultured astrocytes*. *Glia*, 2012. **60**(4): p. 582-93.
205. Sharma, M., N.J. Volpe, and E.B. Dreyer, *Methanol-induced optic nerve cupping*. *Arch Ophthalmol*, 1999. **117**(2): p. 286.
206. Cui, Y., et al., *Elevated urine formaldehyde in elderly patients with primary open angle glaucoma*. *Int J Ophthalmol*, 2016. **9**(3): p. 411-6.
207. Chen, K., J. Maley, and P.H. Yu, *Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis*. *J Neurochem*, 2006. **99**(5): p. 1413-24.
208. Dorokhov, Y.L., et al., *Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles*. *Physiol Rev*, 2015. **95**(2): p. 603-44.

FIGURE E TABELLE

Figura 1. Stereo-fotografia eseguita con Compass.

Figura 2. OCT Heidelberg di un paziente glaucomatoso.

Figura 3. Follow-up di paziente glaucomatoso con OCT Spectralis.

Figura 4. Compass 24-2 con scotoma arciforme.

Figura 5. Creazione dello sportello sclerale durante trabeculectomia.

Figura 6. Rappresentazione grafica della Connessione 43 (fotografia estrapolata dall'articolo "Gap Junctions" di Nielsen MS et al.).

Figura 7. Device Compass.

Figura 8. Campo visivo 24-2 Compass.

Figura 9. Foto fundus a colori, Infrarosso e Red Free Compass.

Figura 10. Dettagli sul device Compass.

Figura 11. Stero-foto del fundus con Compass.

Figura 12. Foto fundus con Compass con dettaglio del Cup/Disc.

Figura 13. Caratteristiche descrittive della perimetria Compass.

Figura 14. Flow-chart del lavoro eseguito.

Figura 15. Campo visivo Compass 30-2.

Figura 16. Campo visivo Compass "New Grid".

Figura 17. Imaging multimodale delle atrofie geografiche.

Figura 18. “Merged image” di Heidelberg AF e CMP Compass con GIMMP.

Figura 19. Scatterplot dei valori della sensibilità retinica.

Figura 20. Mean Absolute Difference di ogni paziente oggetto dello studio.

Figura 21. Variabilità test-retest nel gruppo di pazienti in studio.

Figura 22. Plot Bland-Altman della variabilità test-retest di ogni coppia di campi visivi.

Figura 23. Istogramma descrittivo degli “scores” del Compass.

Figura 24. Grafico a torta sulla prevalenza delle variabili B e W.

Figura 25. Curve di Roch di tutti gli agreement.

Figura 26. Intervento di facoemulsificazione del cristallino.

Figura 27. Posizione dei trocars nell'intervento di vitrectomia via pars plana.

Figura 28. Immagine del fondo oculare durante l'intervento di vitrectomia.

Figura 29. Piramide della popolazione concernente la frequenza della PIO nei casi e controlli.

Figura 30. Piramide della popolazione concernente la frequenza della lunghezza assiale nei casi e controlli.

Figura 31. Frequenza dell'ipercolesterolemia, pregresso intervento di FACO e assunzione di anticoagulanti nella popolazione.

Figura 32. Rappresentazione grafica dei valori di Cx43 riscontrati nei due gruppi.

Figura 33. Spettro ^1H NMR rappresentativo del campione di umor vitreo oggetto dello studio.

Figura 34. Analisi PCA dei campioni analizzati.

Figura 35. PCA loading plot.

Tabella 1. Distribuzione delle connessine nel corpo umano.

Tabella 2. Confronto tra Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare e la Spettrometria di Massa.

Tabella 3. Distribuzione dei test eseguiti nelle varie sedi.

Tabella 4. Parametri in studio.

Tabella 5. Durata media dei campi visivi “New Grid” per ogni visita.

Tabella 6. I K di Cohen degli agreement tra i vari Reviewers.

Tabella 7. I K di Cohen degli agreement tra i vari Reviewers utilizzando l'OCT.

Tabella 8. I K di Cohen degli agreement tra i vari Reviewers senza l'utilizzo dell'OCT.

Tabella 9. Caratteristiche demografiche dei pazienti.

Tabella 10. Correlazioni tra punti totali, iper-fluorescenti e scale di grigi IR con Compass.

Tabella 11. Distribuzione dei trattamenti ipotonizzanti.

Tabella 12. Risultati dei questionari e dei parametri della SO.

Tabella 13. Correlazioni tra i parametri oculari nei Med Eyes.

- Tabella 14. Correlazioni tra i parametri oculari nei Trab Eyes.
- Tabella 15. Correlazioni tra i parametri negli occhi migliori.
- Tabella 16. Correlazioni tra i parametri negli occhi peggiori.
- Tabella 17. Correlazioni tra il quantitativo di molecole, il totale dei conservanti e la durata della terapia con tutte le variabili.
- Tabella 18. Caratteristiche metaboliche dei pazienti.
- Tabella 19. Terapie anti-glaucoma assunte dal gruppo dei casi.
- Tabella 20. Caratteristiche cliniche dei pazienti.

Research integrity declaration

I declare that my Phd project fulfills research integrity good practices:

- Research Environment ✓
- Training, Supervision and Mentoring ✓
- Research Procedures ✓
- Safeguards ✓
- Data Practices and Management ✓
- Collaborative Working ✓
- Publication and Dissemination ✓
- Reviewing, Evaluating and Editing ✓

I Reviewers che hanno esaminato e valutato il presente lavoro di tesi sono il Prof. Arturo Carta (Università di Parma), il Dott. Pietro Emanuele Napoli (Università degli Studi di Cagliari) e un terzo Reviewer che ha preferito mantenere l'anonimato.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Maurizio Fossarello per la supervisione della tesi e del lavoro di ricerca.

Ringrazio la Professoressa Cristina Battaglia e la Professoressa Antonia Ratti per l'attività di revisione della tesi.

Ringrazio il Prof. Michele Samaja per la proroga delle mie attività di dottorato.

Ringrazio la Professoressa Anna Caretti e il Dottor Michele Dei Cas per le analisi di laboratorio sulla Connessina 43.

Ringrazio la Professoressa Emanuela Locci per le analisi di metabolomica.

Ringrazio i Reviewers (il Prof. Arturo Carta, il Dottor Pietro Emanuele Napoli e il Reviewer Anonimo) per il tempo dedicato a leggere e redigere la valutazione del mio lavoro di tesi, nonché per i loro gentili commenti.