

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	2
<b>1. L'edema maculare diabetico</b> .....	4
1.1 Epidemiologia.....	5
1.2 Clinica.....	6
1.3 Fisiopatologia.....	10
1.4 Terapia.....	17
<b>2. L'OCT spectral-domain e l'edema maculare diabetico</b> .....	24
<b>3. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)</b> .....	35
<b>4. Il ranibizumab (Lucentis)</b> .....	39
4.1 somministrazione intravitreale.....	41
<b>5. Il ranibizumab in monoterapia o combinato con     lasermaculare</b> .....	42
<b>6. I foci iperreflettenti nell'edema maculare diabetico</b> .....	48
<b>7. L'efficacia del ranibizumab associato al laser maculare     nell'edema maculare diabetico e sui foci iperreflettenti</b> .....	51
7.1 Risultati .....	57
7.2 Discussione .....	63
<b>8. Conclusioni</b> .....	70
<b>Bibliografia</b> .....	71

## INTRODUZIONE

*La maculopatia diabetica è una patologia in costante aumento nei Paesi industrializzati; rappresenta la causa più comune di calo del visus nei pazienti diabetici ed è una delle principali cause di minorazione visiva nei pazienti con retinopatia diabetica.*

*Una delle manifestazioni cliniche più temibili della retinopatia diabetica è rappresentata dall'edema maculare diabetico - ad elevata incidenza in soggetti giovani e spesso in età lavorativa – i cui effetti sono potenzialmente invalidanti a causa della grave e progressiva perdita visiva. In questi pazienti, la formazione dell'edema è causata dalla rottura della barriera emato-retinica interna che causa l'aumento della permeabilità vascolare e, conseguentemente, la formazione di edema intercellulare: l'edema, gli essudati e/o l'ischemia, che coinvolgono la fovea, sono responsabili del conseguente quadro clinico, caratterizzato da una variabile e progressiva perdita della visione centrale.*

*Il carattere altamente invalidante della patologia ha dato origine alla ricerca di strategie terapeutiche alternative, orientate a contenere gli esiti della storia naturale della malattia.*

*Ad oggi, le terapie impiegate nell'edema maculare diabetico sono: la fotocoagulazione con laser ad argon (focale o a griglia maculare), la vitrectomia per via pars-plana (con e senza rimozione della membrana limitante interna), la terapia iniettiva intravitreale con corticosteroidi e con molecole anti-VEGF in monoterapia o in combinazione con il laser.*

*La finalità di questo lavoro è quella di dimostrare la superiorità anatomo-funzionale a lungo termine (24 mesi) della terapia che associa anticorpi monoclonali (Ranibizumab) diretti contro i fattori di crescita endoteliali-vascolari (anti-VEGF), iniettati per via*

*intravitreale in combinazione con fotocoagulazione laser maculare, rispetto alla terapia che prevede la sola fotocoagulazione laser retinica.*

*La valutazione della terapia dell'edema maculare diabetico che associa Ranibizumab alla fotocoagulazione laser riguarda da un lato l'efficacia in termini di outcome visivo, dall'altro, l'efficacia in termini di outcome anatomico nel ridurre lo spessore maculare centrale e nell'influenzare altri fattori presenti negli strati retinici esterni - studiati per mezzo della tomografia a coerenza ottica spectral domain (SD-OCT) - quali i cosiddetti foci iperreflettenti.*

*Ed infatti, l'ulteriore obiettivo di questo lavoro è comprendere se i foci iperreflettenti della retina esterna, studiati nei pazienti affetti da edema maculare diabetico, possono essere considerati dei marker in grado di predire il danno a carico dei fotorecettori e la prognosi funzionale dopo il trattamento.*

## 1. L'edema maculare diabetico

L'edema maculare è una condizione caratterizzata da un accumulo di liquido negli strati retinici plessiforme esterno e nucleare interno (neuroretina), che spesso si organizza in spazi simil-cistoidi determinando un quadro noto come “edema maculare cistoide”.

L'edema inizialmente localizzato nella neuroretina, successivamente, può coinvolgere anche lo strato plessiforme interno, lo strato delle fibre nervose e, alla fine, l'intero spessore della retina (fig. 1).

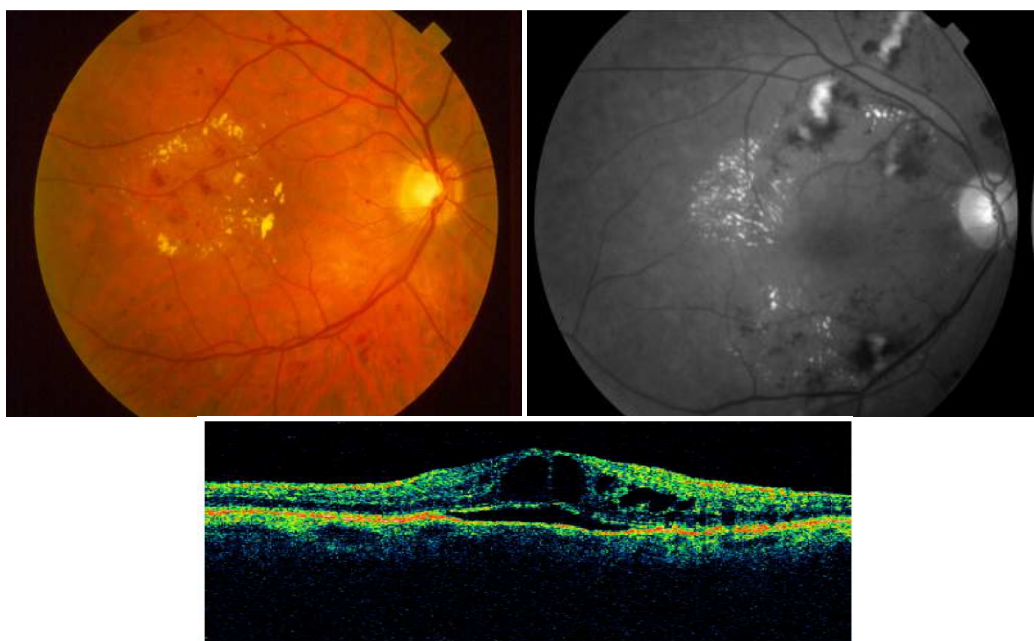


Fig. 1: Edema maculare diabetico, foto a colori (in alto a sx), foto aneritra (in alto a dx) e scansione OCT (in basso).

L'edema maculare può rappresentare una via comune finale come risposta della retina ad una varietà di possibili insulti tra cui: retinopatia diabetica, occlusioni venose retiniche, sindrome da trazione vitreo-maculare, chirurgia oculare, trattamenti laser, farmaci (es.: adrenalina, etc...), infiammazioni intraoculari (uveiti), etc...

Il diabete rappresenta la prima causa di formazione dell'edema maculare. La retinopatia diabetica è una delle più comuni complicanze microvascolari del diabete mellito; è definita sulla base delle lesioni caratteristiche, che vanno da microaneurismi retinici a neovascolarizzazione intra-retinica, in due tipi: non proliferante (NPDR) e proliferante (PDR).

L'edema maculare diabetico è una complicanza che può coesistere in entrambe le forme di retinopatia diabetica.

## **1.1 Epidemiologia**

La prevalenza della retinopatia diabetica in pazienti diabetici è legata alla durata della malattia: i pazienti affetti da diabete da meno di 5 anni raramente mostrano segni di retinopatia diabetica; mostrano segni di retinopatia diabetica il 27 % di quelli che sono diabetici da 5-10 anni; il 71-90% di quelli che sono diabetici da più di 10 anni; dopo 20-30 anni, l'incidenza arriva al 95% [1].

Negli USA e nei Paesi industrializzati, l'edema maculare diabetico è una delle principali cause di ipovisione grave e cecità nella popolazione in età lavorativa (nei soggetti con un'età compresa tra 20-75 anni di età)[2].

La maculopatia diabetica è la causa più comune di calo del visus in pazienti diabetici [3] ed è una delle principali cause di minorazione visiva in pazienti con retinopatia diabetica [4].

La prevalenza dell'edema maculare diabetico nei Paesi industrializzati è in costante aumento: ogni anno circa il 2 % dei pazienti diabetici sviluppa edema maculare diabetico [5]. Si stima che, a causa dell'aumento della prevalenza del diabete in Europa, l'incidenza dell'edema maculare diabetico sia in crescita e ci si attende un incremento dal'8.5% del 2013 al 10.3% nel 2035 [6].

Poiché la popolazione dei diabetici è in rapida crescita, la perdita della vista causata dalla retinopatia diabetica rappresenta un significativo problema per la salute pubblica, con un notevole impatto socioeconomico e anche sulla qualità della vita dei soggetti colpiti.

L'edema maculare diabetico, se lasciato al suo decorso naturale, provoca molto spesso una condizione di ipovisione grave o di cecità legale, nella maggioranza dei casi entro 2 anni dall'esordio [7].

Il Winsconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR), riporta un'incidenza dell'EMD del 20,1% nella popolazione diabetica giovanile insulino-dipendente, del 25,4% nella popolazione adulta insulino-dipendente e del 13,9% nei pazienti adulti non insulino-dipendenti [8].

## **1.2. Clinica**

L'edema maculare diabetico può presentarsi in due forme: la forma focale e la forma diffusa. La forma focale è caratterizzata da un ispessimento ben circoscritto della macula; quella diffusa da un ispessimento esteso [9].

Nella forma focale, cluster di microaneurismi determinano le aree di edema retinico focale. L'edema focale cronico può portare alla formazione di essudati duri, costituiti da lipoproteine e macrofagi con contenuto lipidico. [10].

La forma diffusa deriva da una rottura generalizzata della barriera ematoretinica interna; in questa forma, non solo i microaneurismi, ma anche i capillari retinici, diffondono diffusamente [11].

Una grave riduzione dell'acuità visiva può essere determinata dalla possibile evoluzione e dalla cronicizzazione dell'edema maculare. Da un lato, un prolungato edema maculare può indurre atrofia dei fotorecettori maculari, dall'altro, nell'edema maculare cistoide,

l'arottura della cisti della retina interna può provocare la formazione di un foro maculare: in entrambi i casi vi è una conseguente, grave riduzione dell'acuità visiva [9].

Un'altra condizione che determina grave riduzione dell'acuità visiva è l'ischemia maculare; l'allargamento della zona foveale avascolare, dovuta a chiusura capillare, è presente in numerosi occhi di pazienti diabetici anche in assenza di edema maculare. Più il grado di chiusura capillare è esteso, peggiore è la prognosi visiva [12].

L'ETDRS (the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study)[13] ha stabilito che l'edema maculare diabetico può essere definito clinicamente significativo se include una qualsiasi delle seguenti lesioni:

- Ispessimento retinico entro 500  $\mu\text{m}$  dal centro della fovea;
- Essudati duri entro 500  $\mu\text{m}$  dal centro della fovea, se vi è ispessimento della retina adiacente;
- Una o più aree di ispessimento retinico, di grandezza di un diametro papillare (1500  $\mu\text{m}$ ) o più, e con almeno una parte che si trovi entro un diametro papillare dal centro della fovea.

Sulla base del meccanismo eziopatogenetico, l'edema maculare diabetico può essere classificato anche in: EMD a componente prevalentemente retinovascolare; EMD con ialoide posteriore strettamente adesa; EMD trazionale ed EMD secondario a epitelopatia retinica.

Nella maggior parte dei casi, i vari meccanismi eziopatogenetici possono essere concomitanti, per cui risulta difficile determinare quale meccanismo sia predominante e, di conseguenza, scegliere il trattamento più indicato.

La prima forma è caratterizzata da un'alterata permeabilità capillare: un flusso passivo di plasma o sangue passa dal compartimento vascolare nello spazio extracellulare.

Nell'EMD associato a ialoide posteriore strettamente adesa si suppone che la ialoide posteriore adesa alla regione maculare, determini una trazione, che è responsabile dell'edema. Questa teoria è supportata dal fatto che una separazione spontanea del vitreo, oppure la vitrectomia, determinano un miglioramento dell'edema maculare[14].

Nell'edema maculare trazionale, l'OCT evidenzia la presenza di trazioni vitreo-retiniche che possono associarsi a distacchi satelliti del neuroepitelio.

Nell'EMD da epitelopatia retinica, l'ipotesi patogenetica alla base di questo tipo di edema sostiene che il diabete possa indurre delle modificazioni a livello dell'epitelio pigmentato retinico tali da determinare una rottura della barriera ematoretinica esterna [15].

Il sintomo maggiormente presente nell'edema maculare diabetico è la diminuzione dell'acuità visiva centrale. Infatti, l'edema, interessando la regione maculare, comporta una riduzione globale delle funzioni visive centrali. I sintomi di accompagnamento possono includere le metamorfopsie, la micropsia, lo scotoma e la fotofobia.

Clinicamente, l'edema maculare diabetico è evidenziabile usando la lampada a fessura con l'ausilio di una lente a contatto di 60 D, 78 D o 90 D oppure con una lente non a contatto. Visualizzando la regione maculare, possono essere anche presenti microaneurismi, microemorragie, essudati, trazioni vitreo-maculari (fig. 2). Gli essudati possono essere diffusamente presenti nella macula oppure possono accumularsi ad anello intorno ad un gruppo di microaneurismi.

La fluorangiografia retinica riesce ad evidenziare meglio l'edema maculare rispetto all'esame alla lampada a fessura; è un esame fondamentale al fine d'individuare le lesioni maculari da trattare con la fotocoagulazione laser maculare.



La fluorangiografia fornisce solo informazioni di tipo qualitativo, a differenza dell'OCT (tomografia a coerenza ottica), che è un'indagine diagnostica che sfrutta un raggio laser infrarosso e fornisce anche un dato quantitativo sullo spessore maculare [16].

Nell'EMD a componente prevalente retinovascolare, la fluorangiografia dimostra che i microneurismi sono la fonte maggiore del leakage (forma focale), oppure che i capillari retinici diffondono diffusamente (forma diffusa).

Nell'EMD associato a ialoide posteriore strettamente adesa, in FAG si evidenzia un'ipofluorescenza nelle fasi precoci a cui corrisponde una marcata iperfluorescenza con diffusione nelle fasi tardive.

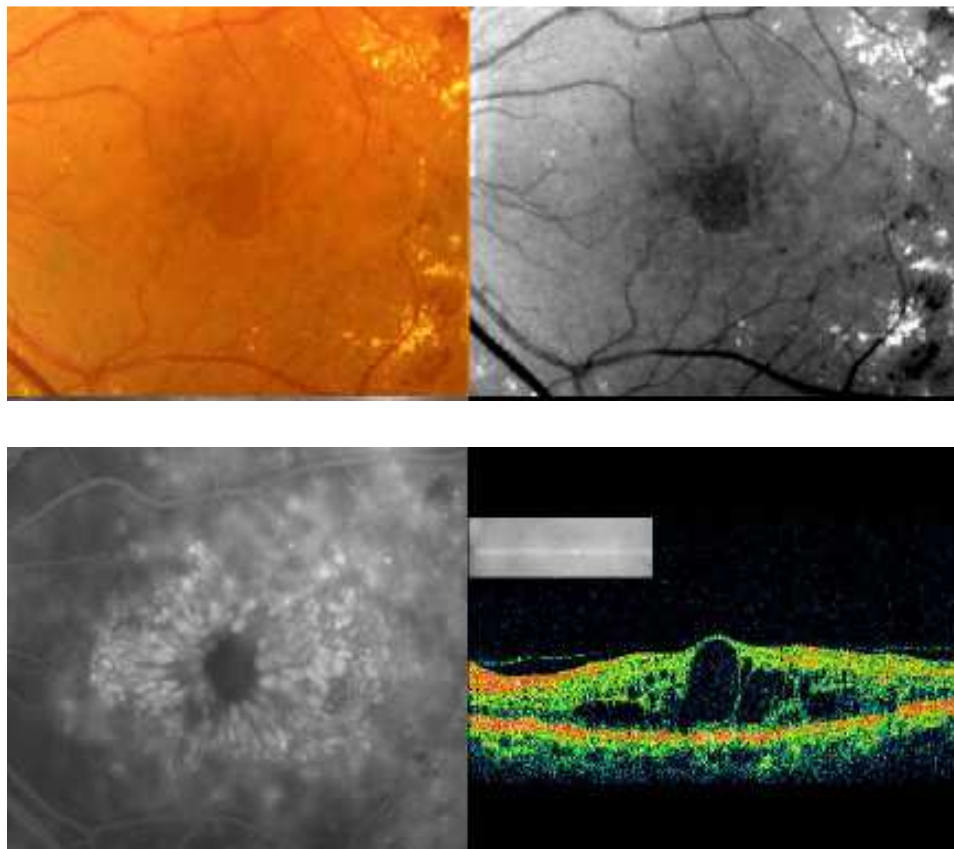


Fig. 2: edema maculare diabetico evidenziato per mezzo di una foto a colori, foto aneritra, immagine fluorangiografica e OCT maculare.

### 1.3 Fisiopatologia

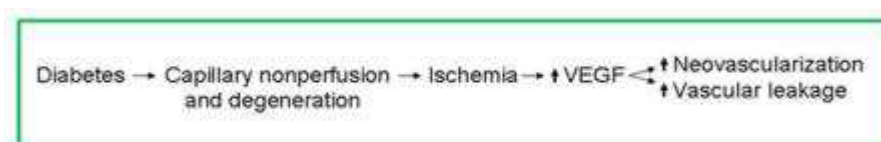
Nella retinopatia diabetica, le lesioni clinicamente visibili sono principalmente di natura vascolare; proprio per tale ragione, per molti anni, la retinopatia diabetica è stata considerata una malattia vascolare.

Successivamente, in seguito al riconoscimento di anomalie neuronali, è stata avviata una fase di studio per determinarne il significato clinico.

I microaneurismi sono dilatazioni localizzate del microcircolo; essi sono stati ipotizzati come una possibile conseguenza di alterazioni a carico dei periciti della parete vascolare, di alterazioni della pressione sanguigna o delle modificazioni della componente gliale perivassale [17].

Tali alterazioni del microcircolo e, tra queste soprattutto la scarsa perfusione capillare, determinano un aumento dell'ipossia tissutale che stimola il rilascio di un fattore vasoproliferativo ipossia-regolato, conosciuto come fattore di crescita endoteliale vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF).

Livelli aumentati di VEGF sono stati riscontrati in retine di animali diabetici anche prima della degenerazione capillare, indicando che, oltre l'ipossia, anche altri fattori regolano la produzione di VEGF nel diabete [18].



Schema esplicativo: [18]

Nella patogenesi dell'edema maculare sono importanti tre meccanismi: l'aumento della permeabilità dei capillari maculari,

l'alterazione del cosiddetto sistema pompa dell'epitelio pigmentato retinico e l'alterazione del flusso di sangue nei capillari maculari.

Il processo di formazione dell'edema maculare è regolato da un complesso insieme di fattori: VEGF, TNF, interleuchine, prostaglandine e leucotrieni, che determinano l'aumento della permeabilità dei capillari maculari.

Si ipotizza che l'edema maculare diabetico sia dovuto alla rottura della barriera emato-retinica, con conseguente incremento localizzato della permeabilità vascolare che supera la capacità di pompa dell'epitelio pigmentato retinico. Questo aumento della permeabilità avviene a livello dell'endotelio vascolare ed è correlato con aumenti di espressione del VEGF.

Nei pazienti con retinopatia diabetica non proliferante, inizialmente l'iperpermeabilità endoteliale origina soprattutto dai microaneurismi, con conseguente edema maculare focale. Tuttavia, a tal proposito, è stato dimostrato che il liquido intercellulare proviene sia dai microaneurismi ma anche da una permeabilità diffusa dei capillari [19].

Nella retina dei pazienti diabetici la funzione e la struttura neuronale risultano alterate; infatti, in questi pazienti la sensibilità al contrasto e l'elettroretinogramma (ERG) mostrano alterazioni [20].

Si è evidenziato che, nel ratto diabetico la perdita di cellule gangliari della retina (RGC) è associata al cambiamento morfologico delle stesse. Le RGC superstiti nella retina diabetica mostrano un significativo allargamento del campo dendritico; questa plasticità dei dendriti sopravvissuti delle RGC può rappresentare una risposta compensatoria alla perdita complessiva di RGC nel diabete [17].

A dimostrazione di tale neurodegenerazione, utilizzando, in vivo, in pazienti diabetici, la tomografia a coerenza ottica (OCT-SD) si è riscontrato un assottigliamento dello spessore dello strato delle fibre

nervose retiniche, conseguente alla perdita di cellule gangliari retiniche e dei loro assoni[21].

Per spiegare la patogenesi dell'edema maculare, sono stati ipotizzati diversi meccanismi, ma molti di questi si concentrano sull'ipotesi che i processi infiammatori giochino un ruolo fondamentale nello sviluppo di tutte le fasi di tale patologia [18].

Le cellule retiniche di microglia sono considerate le principali cellule sensoriali retiniche coinvolte nella patogenesi della retinopatia diabetica; esse, quando vengono attivate, rilasciano sostanze proinfiammatorie e neurotossiche. Infatti, l'attivazione della microglia è stata osservata negli ultimi studi su animali con retinopatia diabetica precoce [17].

A dimostrazione di ciò, nella retina e nel vitreo di animali e di pazienti diabetici sono state riscontrate una serie di alterazioni fisiologiche e molecolari correlate ai processi infiammatori(tab. 1).

<b>Inflammatory molecule</b>	<b>Capillary degeneration</b>	<b>Pericyte loss</b>	<b>Permeability</b>	<b>Neurc degenera</b>
NF-κB	(Zheng et al., 2007b)*	(Zheng et al., 2007b)*		(Zheng et 2007b)*
iNOS	(Zheng et al., 2007a)	(Zheng et al., 2007a)	(Leal et al., 2007)	
COX	(Kern et al., 2007; Zheng et al., 2007b)	(Kern et al., 2007; Zheng et al., 2007b)	(Ayalasomayajula and Kompella, 2003; Jousseen et al., 2002)	
ICAM	(Jousseen et al.,	(Jousseen et al.,	(Jousseen et al., 2004; Rao	

Tab.1: Molecole infiammatorie coinvolte nello sviluppo di lesioni clinicamente evidenti della retinopatia diabetica [18].

Un altro dato a conferma dell'ipotesi patogenetica infiammatoria dell'edema maculare diabetico è l'aumento di produzione di eicosanoidi [22].

Gli eicosanoidi, metaboliti dell'acido arachidonico, noti mediatori dell'infiammazione, si distinguono in due grandi famiglie: le prostaglandine (sintetizzati dalla ciclossigenasi, COX) e i leucotrieni (sintetizzati dalla lipossigenasi).

Infatti, in retine di animali diabetici, è stata evidenziata l'induzione di ciclossigenasi-2 (COX-2), nonché un aumento della produzione di prostaglandine e dei livelli di interleuchina-1beta (IL-1 $\beta$ ) e fattore di necrosi tumorale (tumor necrosis factor, TNF) [23].

La stessa COX-2 è stata identificata nelle cellule endoteliali vascolari di membrane epiretينية fibrovascolari, asportate in pazienti con retinopatia diabetica avanzata [23].

Sebbene non siano del tutto chiari i meccanismi attraverso cui vengono prodotti i fattori angiogenetici, è certamente nota la presenza del fattore di crescita dell'endotelio vascolare di tipo A (VEGF-A), ritenuto il principale responsabile della formazione di edema mediante l'aumento della permeabilità vascolare retinica.

Il VEGF è prodotto in gran parte dalle cellule retiniche di Muller (cellule gliali); nei topi diabetici l'inibizione del VEGF prodotto da queste cellule determinava una diminuzione significativa dell'espressione di TNF, ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare -1, intercellular adhesion molecule-1) e NF-kB (nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells).

Altre proteine infiammatorie, incluse iNOS (inducibile nitric oxide synthase) e l'ossido nitrico, ICAM, citochine e PGE2 (prostaglandine-E2) sono prodotte da cellule Müller esposte a livelli elevati di glucosio [24].

Nel vitreo di pazienti con PDR ed edema maculare diabetico sono state riscontrate concentrazioni significativamente più alte di citochine proinfiammatorie (TNF-alfa, IL-8, e IL-6), chemochine (monociti chemotattica proteina-1 (MCP-1) e di altre proteine(endotelina-1, sE-selectina, VEGF, ICAM-1)[25].

In modelli animali, le proteine infiammatorie descritte sono state associate alle lesioni microvascolari tipiche della malattia diabetica e l'inibizione di queste proteine riduce lo sviluppo della malattia microvascolare retinica [24].

Si pensa che queste proteine infiammatorie possano far parte dei passaggi di un comune percorso sequenziale riassunto nella fig. 3.

Questa sequenza di fasi molecolari è stata dedotta inibendo o eliminando alcuni enzimi, evidenziando poi quali anomalie molecolari ne conseguono.

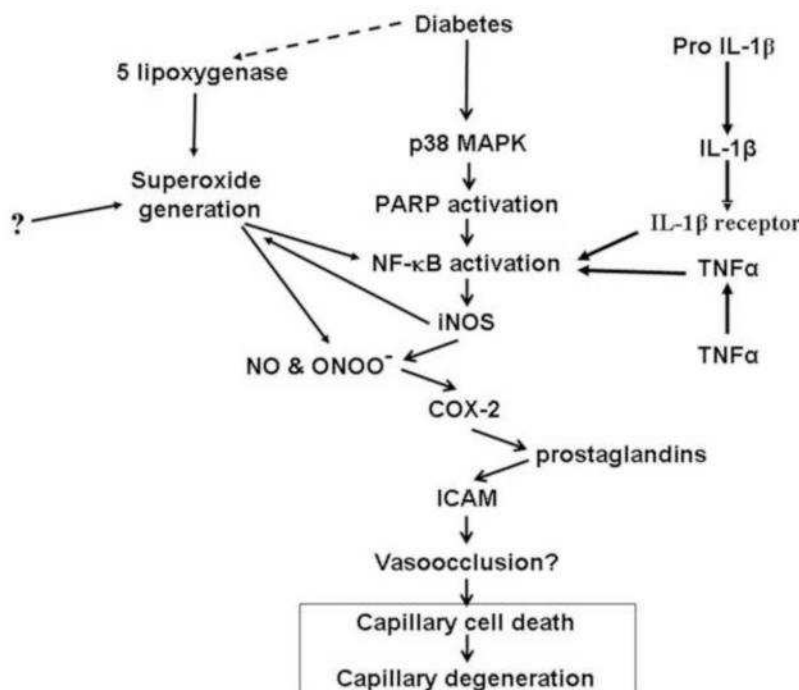


Fig.3: percorso sequenziale che riassume il ruolo delle diverse proteine infiammatorie nella malattia diabetica[18].

Un buon controllo glicemico rimane il mezzo migliore riconosciuto per ridurre le complicanze diabetiche, ma l'inibizione dell'infiammazione potrebbe aiutare a inibire la comparsa della retinopatia, anche in presenza di iperglicemia. Tuttavia, sulla base di studi sugli animali, ad oggi, non si è riscontrato un vantaggio nè uno svantaggio dall'utilizzo di qualsiasi particolare terapia anti-infiammatoria nell'inibire la permeabilità dei capillari retinici indotta dal diabete [18].

Inoltre, si ritiene che i processi infiammatori potrebbero contribuire anche alla degenerazione dei neuroni nella retinopatia diabetica. Infatti, da qualche tempo viene studiato il potenziale ruolo dell'infiammazione nella neurodegenerazione retinica; è stato evidenziato che i farmaci ad azione anti-infiammatoria (salicilati) inibiscono la morte delle cellule gangliari retiniche in animali diabetici [26].

A conferma che l'infiammazione contribuisce effettivamente allo sviluppo della retinopatia e dell'edema maculare diabetico, è noto che le terapie anti-VEGF e gli steroidi intravitreali hanno effetti potenti sull'edema e / o sulla neovascolarizzazione della retina [27].

Inoltre, è stato evidenziato che nella retina dei diabetici si verifica una morte cellulare che potrebbe indurre una risposta infiammatoria. La morte cellulare retinica sembra verificarsi principalmente per apoptosi, aumentando così il segnale necessario per indurre lo stato infiammatorio.

Sembra probabile che, nel diabete l'infiammazione sistemica non causa l'infiammazione retinica, ma l'ambiente pro-infiammatorio responsabile dell'avvio della retinopatia si sviluppi localmente nella retina. Una dimostrazione di questo è che, gli aumenti, diabeto-indotti, della permeabilità vascolare della retina vengono

inibiti, bloccando l'attivazione di NF-kB esclusivamente nelle cellule gliali (come le cellule retiniche di Muller) [Bethea e Kern, non pubblicato].

In diversi studi è stato dimostrato che i cambiamenti molecolari pro-infiammatori sono causa dell'iperpermeabilità endoteliale e della degenerazione dei capillari retinici [18] (fig.4). È possibile che con il termine "infiammazione" non si riescano a spiegare perfettamente tutti i meccanismi patogenetici della retinopatia e dell'edema maculare diabetico, ma questo concetto possa permettere la scoperta di nuove terapie sempre più mirate della retinopatia diabetica e delle sue complicanze [18].

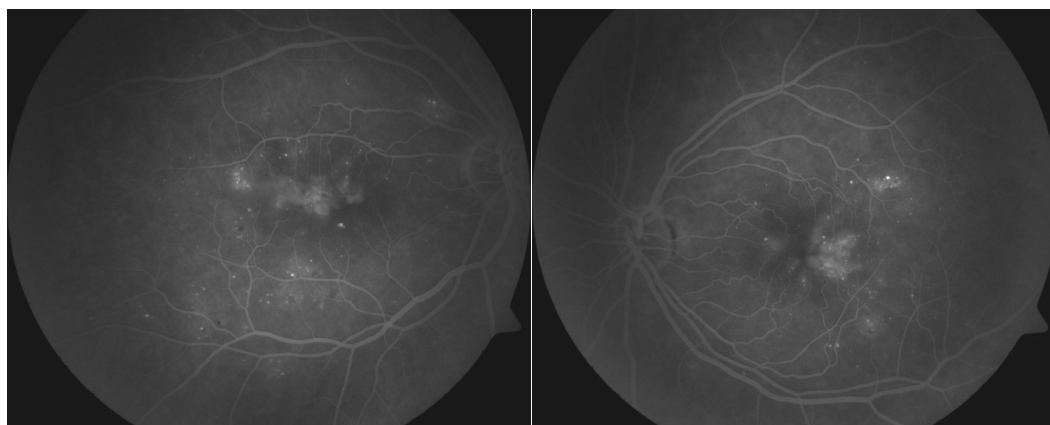


Fig. 4: iperpermeabilità endoteliale dei capillari maculari evidente in fluorangiografia nell'edema maculare diabetico.

La somministrazione di steroidi e inibitori del VEGF riduce l'edema maculare diabetico, ma non è stato adeguatamente studiato se queste o altre terapie antinfiammatorie inibiscano fasi anche precedenti della retinopatia diabetica.

Concludendo, si può affermare che la retinopatia diabetica e l'edema maculare diabetico non sono la conseguenza di una vasculopatia pura, ma la conseguenza di un disordine infiammatorio e neurodegenerativo.



Il diabete agisce a carico di molte cellule retiniche: sulle cellule dell'endotelio retinico (alterando la barriera ematoretinica), sulle cellule della glia (attivandole), sulle cellule neuronali (causandone la morte per apoptosi). Pertanto, la retinopatia diabetica può essere considerata una degenerazione/infiammazione della componente vascolare e nervosa della retina.

## **1.4 Terapia**

I pazienti diabetici sono colpiti da più comorbidità sistemiche; spesso, le terapie praticate comprendono numerosi farmaci da assumere per tutta la vita. Per questo motivo è particolarmente importante identificare strategie di trattamento per l'edema maculare diabetico facilmente gestibili e che forniscono profili di sicurezza ed efficacia a lungo termine.

### **Fotocoagulazione laser**

La fotocoagulazione laser retinica è utilizzata nel trattamento dell'edema maculare diabetico di tipo retino-vascolare.

Il trattamento viene eseguito su pazienti affetti da edema maculare diabetico clinicamente significativo sulla base della diagnosi eseguita alla biomicroscopia. Anche se non è necessaria nella diagnosi di edema maculare diabetico clinicamente significativo, la fluorangiografia risulta utile nell'individuare le lesioni trattabili e nel definire l'eziologia prevalentemente retinovascolare dell'edema, oltre che nel valutare la componente ischemica. Invece, l'OCT è utile nel quantificare lo spessore maculare e nell'individuare eventuali componenti trazionali responsabili dell'edema [28].

Nel 1985, l'Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, a fronte di prove cliniche di efficacia, ha sancito che la fotocoagulazione laser maculare (focale o a griglia) rappresenta lo standard nella terapia

per l'edema maculare diabetico clinicamente significativo. L'ETDRS dimostrava che i pazienti con DME clinicamente significativo trattati con il laser subivano una riduzione del 50% del rischio di calo del visus moderato, nel corso del tempo, a confronto con i pazienti non laser-trattati.

Nonostante l'uso diffuso del laser maculare, il suo meccanismo d'azione rimane ancora in gran parte sconosciuto. Le alterazioni laser-indotte della barriera emato-retinica profonda stimolano la replicazione dell'endotelio della barriera emato-retinica superficiale e dell'epitelio pigmentato retinico, determinandone una migliore *performance* [29].

E inoltre, la distruzione delle zone di ischemia retinica, determinata dalla fotocoagulazione laser, migliora l'apporto metabolico e l'apporto di ossigeno dell'endotelio della barriera emato-retinica superficiale [30].

Tuttavia, uno dei possibili esiti della fotocoagulazione laser maculare è l'ampliamento degli spots laser in direzione della fovea; questo può determinare un peggioramento dell'acuità visiva del paziente.

Diverse lunghezze d'onda possono essere utilizzate per eseguire il trattamento laser: il verde (argon, DF-Nd: YAG) è meglio assorbito dall'emoglobina; il rosso (krypton, diodo) produce un danno minore a livello dei fotorecettori e penetra i mezzi diottrici opachi; il giallo; il blu e l'arancione. La profondità raggiunta dallo spot negli strati retinici è diversa a seconda della lunghezza d'onda utilizzata.

Nessuno studio clinico ha evidenziato differenze in termini di efficacia tra le lunghezze d'onda utilizzate [31].

L'esecuzione della fotocoagulazione laser retinica avviene con l'ausilio di lenti ad immagine diretta (tre specchi di Goldmann) o ad immagine inversa (panfunduscopiche, Volk, Mainster).

Il tipo di trattamento, focale o a griglia, dipende dal quadro clinico e dal tipo di diffusione edematosa evidente alla fluorangiografia.

Il trattamento focale richiede l'obliterazione diretta dei microaneurismi e delle lesioni microvascolari che diffondono (i punti focali di dispersione in FAG) oltre i 500  $\mu\text{m}$  dal centro della fovea.

Il trattamento focale è consigliato per le aree di ispessimento retinico localizzato.

La dimensione dello spot è di 50-100  $\mu\text{m}$ , con un tempo di 0,10 secondi e una potenza sufficiente a occludere il microaneurisma, ottenendo un lieve sbiancamento dello spot.

Il trattamento a griglia consiste nel piazzare una griglia di spots nell'area di diffusione estesa o di non perfusione capillare o in caso di edema maculare cistoide. È consigliato per le aree di ispessimento retinico diffuso localizzate a oltre 500  $\mu\text{m}$  dal centro della fovea.

La dimensione dello spot è di 100-200  $\mu\text{m}$ , il tempo di esposizione 0,10 secondi; 3 file di spots fino ed incluso il limite della FAZ, a distanza l'uno dall'altro di 100  $\mu\text{m}$ , insieme a ulteriori file di spots di 200  $\mu\text{m}$ , 0,10 secondi a distanza di 200  $\mu\text{m}$  uno dall'altro, su tutta la restante area di ispessimento retinico o di non perfusione (fig. 5).

Secondo il "DRCR.net", uno studio clinico randomizzato, multicentrico, la fotocoagulazione laser focale/griglia in occhi con DME e acuità visiva inferiore o uguale a 20/40 produce un graduale aumento dell'acuità visiva di 2 linee in circa un terzo degli occhi dopo 2 anni di follow-up [32].

Tuttavia, l'ETDRS dimostra che dopo trattamento con laser sono relativamente pochi i pazienti con calo del visus che avevano miglioramenti significativi della migliore acuità visiva corretta (BCVA) [13].

Ciò considerato, è necessario individuare altri trattamenti più sicuri e che potessero migliorare maggiormente la visione in pazienti con edema maculare diabetico.

### **Vitrectomia**

Il ruolo del vitreo nello sviluppo dell'edema maculare diabetico era stato riconosciuto per la prima volta da Nasrallah *et al.* nel 1988 [14] che dimostrarono, mediante studi retrospettivi, un numero inferiore di distacchi posteriori di vitreo in pazienti affetti da edema maculare rispetto al gruppo di controllo.

Ad oggi, sono in corso diversi studi finalizzati a dimostrare gli effetti benefici della vitrectomia via pars plana (VVP) nel trattamento dell'edema maculare diabetico. Sembra che in casi selezionati la VVP possa ridurre lo spessore maculare e migliorare l'acuità visiva in maniera duratura, rimuovendo eventuali trazioni maculari esercitate da una ialoide ormai divenuta rigida ed ispessita e/o migliorando l'ossigenazione retinica attraverso la rimozione del vitreo corticale posteriore[33].

Il principale argomento di discussione riguarda la necessità di eseguire o meno il peeling della membrana limitante interna. A questo proposito, infatti, è stato dimostrato un miglioramento dell'acuità visiva sia dopo VVP con sola asportazione di ialoide posteriore sia con VVP e peeling della membrana limitante interna [34].

### **I farmaci Anti-VEGF**

Il lavoro pionieristico di Folkman sull'angiogenesi ha portato alla scoperta di precisi meccanismi molecolari che potrebbero diventare specifici bersagli delle terapie nelle malattie oncologiche, nella degenerazione maculare e nella retinopatia diabetica.

La successiva clonazione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF- A) da Ferrara ed Henzel e la creazione di antagonisti altamente specifici per il VEGF ha portato alla terapia mirata per le suddette patologie [35].

Considerando che, diversi studi hanno dimostrato livelli elevati del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) nel vitreo e nella retina degli occhi con retinopatia diabetica ed, inoltre, che è stato dimostrato che il VEGF aumenta i livelli di permeabilità dell'endotelio vascolare diabetico, la terapia che inibisce il VEGF rappresenta una modalità terapeutica utile e interessante per l'edema maculare diabetico.

Inoltre, la terapia con anti-VEGF sta assumendo un ruolo importante nel trattamento dell'edema maculare diabetico anche in funzione di quanto evidenziato nel "DRCR.net"[33]: dopo 2 anni di follow-up, circa il 20% degli occhi trattati con laser sono peggiorati di 2 linee con rischio di sviluppare scotomi.

Tra gli anti-VEGF, il pegaptanibè stato il primo farmaco con azione sull'edema maculare [36]; in seguito è stata valutata anche l'azione di altri farmaci anti-VEGF come il ranibizumab e il bevacizumab.

Il ranibizumab è un frammento di anticorpo monoclonale umanizzato specificamente progettato per uso oftalmico, che inibisce potentemente il VEGF.

Studi clinici prospettici randomizzati fino a 24 mesi hanno dimostrato che l'inibizione del VEGF con ranibizumab intravitreale determina miglioramenti anatomici e funzionali, rapidi e importanti, in pazienti con diminuzione della visione dovuta ad edema maculare diabetico [da 37 a 46].

Il ranibizumab si lega al fattore di crescita endoteliale vascolare(VEGF-A) con alta affinità e ne inibisce multiple isoforme; esso ha una diffusione sistemica minima dopo l'iniezione intravitreale. Il ranibizumab intravitreale è approvato in molti paesi per quattro importanti indicazioni: degenerazione maculare legata all'età in forma neovascolare, deficit visivo causato da edema maculare diabetico, deficit visivo da edema maculare secondario a occlusione della vena centrale della retina o di branca e deficit visivo causato da neovascolarizzazione coroidale secondaria a miopia patologica.

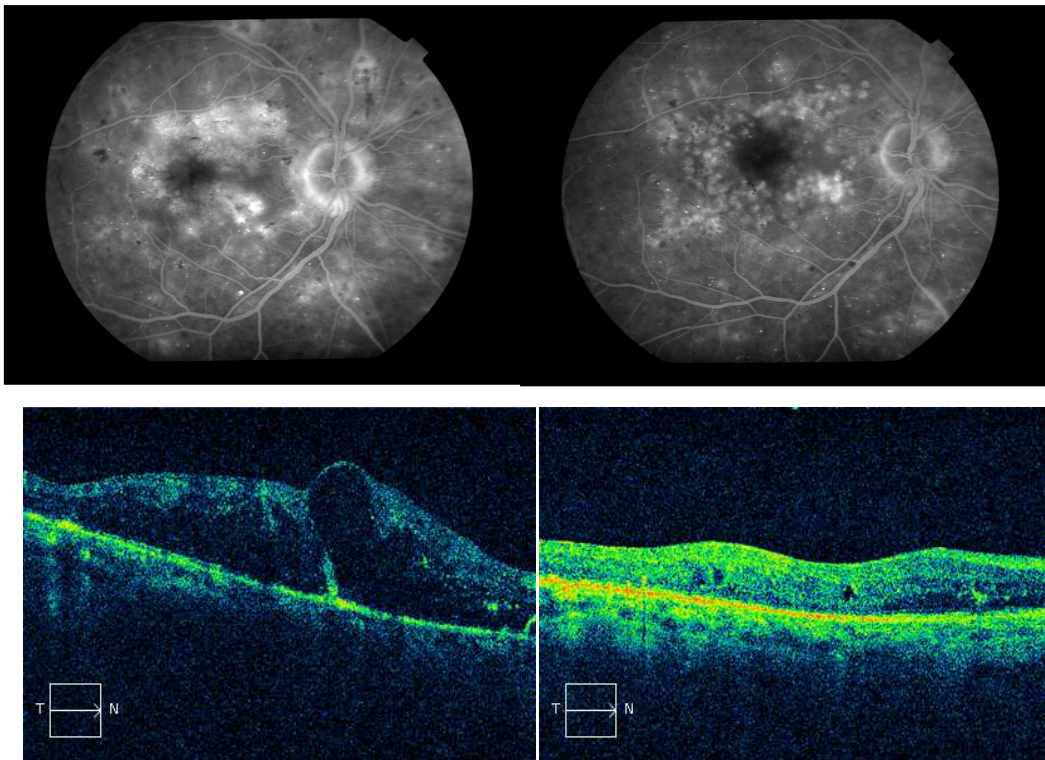


Fig. 5: edema maculare diabetico prima (a sinistra) e dopo 12 mesi (a destra) dal trattamento intravitreale con ranibizumab (7 iniezioni intravitreali) associato a fotocoagulazione laser maculare. FAG: riduzione dei punti di dispersione dopo fotocoagulazione laser a griglia. OCT: Visibile la riduzione dello spessore maculare centrale.

### **Corticosteroidi e trattamenti combinati**

Nello studio randomizzato “DRCR.net” sono stati evidenziati risultati interessanti con l'utilizzo di triamcinolone intravitreale associato al

laser nel trattamento dell'DME. Tuttavia, nello stesso studio è anche evidente che il trattamento con triamcinolone non è risultato superiore alla sola fotocoagulazione focale/griglia [38].

La combinazione del trattamento intravitreale (con triamcinolone con un farmaco anti-VEGF) con fotocoagulazione focale /griglia, teoricamente, potrebbe essere più efficace di ciascun trattamento da solo: il trattamento intravitreale potrebbe rapidamente ridurre l'edema maculare e portare a un più rapido miglioramento dell'acuità visiva, rispetto al miglioramento del trattamento laser, più lento nel tempo.

Inoltre, il trattamento combinato potrebbe aumentare l'effetto della fotocoagulazione focale /griglia. Infatti, il trattamento laser potrebbe essere più efficace se somministrato su una retina più asciutta, qualche tempo dopo l'iniezione intravitreale, dopo che si sia già ridotto l'edema maculare.

Inoltre, il trattamento laser teoricamente potrebbe ridurre il numero di iniezioni intravitreali necessarie per ottimizzare l'esito del trattamento dell'DME.

## **2.L'OCT con tecnologia spectral-domain e l'edema maculare diabetico**

La tomografia a coerenza ottica (OCT) fornisce immagini di sezioni della retina (fig. 6) ed è utile per la valutazione qualitativa e quantitativa delle patologie retiniche.

L'OCT, negli anni, ha permesso uno studio soprattutto quantitativo dell'edema maculare con la misurazione dello spessore retinico foveale complessivo.

A tal proposito, è stato, però, evidenziato da diversi studi che, in certi casi lo spessore foveale è modestamente correlato con la disabilità visiva; questo suggerisce la rilevanza clinica di altri fattori presenti negli strati retinici che possono avere influenza sull'acuità visiva in pazienti con DME [47].

Per mezzo dell'OCT è anche possibile evidenziare i diversi tipi di edema maculare diabetico, che potrebbero rappresentare gli altri fattori da cui dipende la funzione visiva.

Tra i diversi tipi di DME, morfologicamente, si può distinguere l'edema maculare cistoide (CME), il distacco sieroso retinico (SRD), e l'edema maculare spugnoso (Fig. 7).

Per mezzo dell'OCT si possono identificare tre pattern per l'edema maculare diabetico di origine retinovascolare [48].



L'alterazione tomografica più frequente è rappresentata dall'ispessimento retinico (88%). All'OCT la retina appare diffusamente ispessita, con aree iporeflettenti intraretiniche.

La seconda caratteristica visibile all'OCT è l'edema maculare cistoide (CME)(47%), caratterizzato dalla presenza di cisti iporeflettenti all'interno del tessuto retinico in sede maculare.

Il terzo pattern è costituito dalla presenza di un distacco sieroso del neuroepitelio e può associarsi a entrambe le forme di edema precedentemente descritte (15%).

Nella forma di EMD associato a ialoide posteriore ispessita e strettamente adesa, l'OCT rileva una banda ad alta riflettività adesa al polo posteriore che determina un'elevazione del profilo retinico. All'interno dello spessore retinico si possono evidenziare degli spazi cistici iporeflettenti.

Nella forma di EMD a componente prevalentemente trazionale, l'OCT mostra la presenza di trazioni vitreo-maculari [48].

I progressi della tecnologia dei tomografi a coerenza ottica hanno permesso la produzione di nuovi OCT spectral-domain (SD-OCT) che, avendo una risoluzione maggiore rispetto a quelli utilizzati in precedenza, forniscono una migliore definizione dei cambiamenti strutturali e consentono di evidenziare chiaramente i confini tra i singoli strati retinici.

L'OCT spectral-domain nell'edema maculare diabetico può evidenziare altri reperti caratteristici:

- un distacco sieroso dell'EPR, a volte accompagnato da foci iperreflettenti nel fluido sottoretinico;
- il danno ai fotorecettori foveali, che si pensa sia evidenziato dalla rottura della membrana limitante esterna o della giunzione del segmento interno ed esterno;

- foci iperreflettenti negli strati retinici esterni.

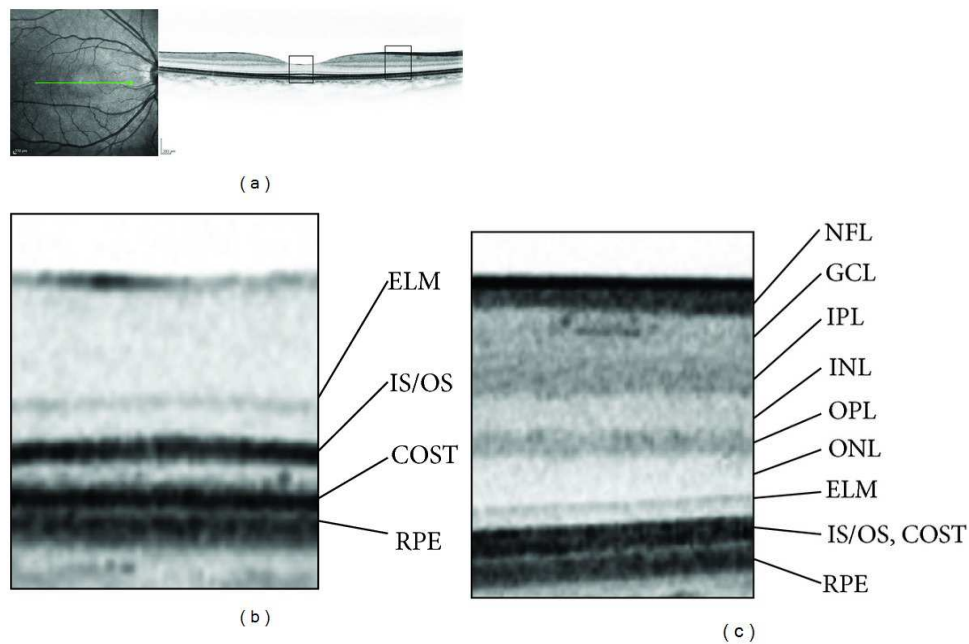


Fig. 6 [47]:

a) immagine OCT-SD con scansione sulla fovea e relativa fotografia del fondo oculare; b) e c) immagini ingrandite di sezioni retiniche (contrassegnate dai riquadri nell'immagine a)

È interessante notare che lo spessore degli strati della retina interna è correlato positivamente con la disabilità visiva, mentre lo spessore della retina esterna è associato negativamente con la prognosi visiva dopo vitrectomia per DME [49].

Ciò suggerisce che l'assottigliamento degli strati esterni della retina è secondario a degenerazione dei fotorecettori (o atrofia) e contribuisce, almeno in parte, ai disturbi visivi nell'DME.

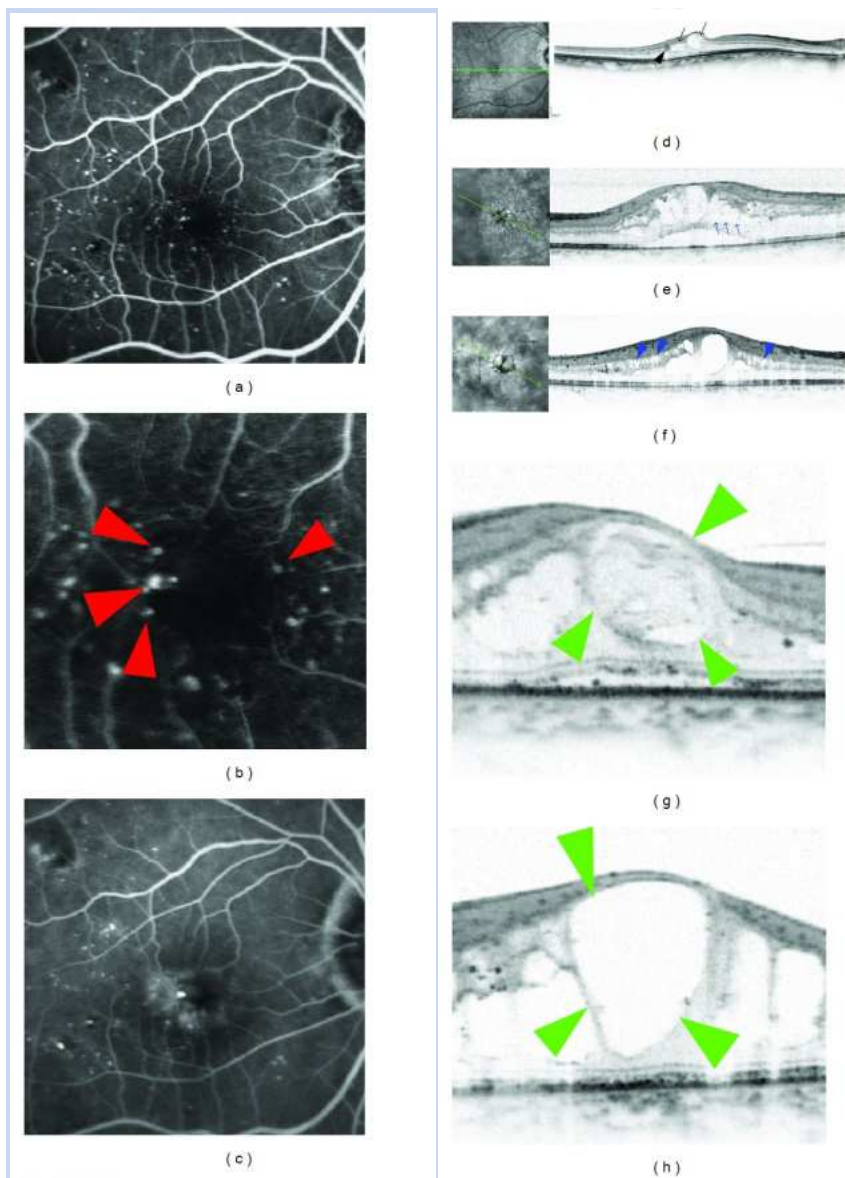


Fig. 7 [47]: Caratteristiche degli spazi cistici nell’DME. (A) e (b) nella fase precoce della FA si evidenzia una zona foveale avascolare allargata e microaneurismi circostanti (freccie).(C) Un’immagine della fase tardiva mostra pooling della fluoresceina nella fovea.(D) I microaneurismi (freccia)sono accompagnati dagli spazi cistici (freccie).In una fase tardiva l’immagine FA mostra il pooling della fluoresceina evidenziando un aspetto a petalo (e) e a nido d’ape(f), a queste corrispondono nelle immagini OCT rispettivamente gli spazi cistici in OPL (freccia) o INL (freccia). Gli spazi cistici della fovea (freccie) possono presentare all’OCT maggiore riflettività con una certa eterogeneità (g) o riflettività inferiore ma omogenea (h).

L’OCT nell’DME, molto frequentemente, mostra spazi cistici principalmente negli strati retinici nucleare interno (INL) e plessiforme esterno (OPL).

Per quanto riguarda i tipi di edema maculare cistoide (CME), l’OCT può documentare numerosi quadri(fig. 7). In fluorangiografia, se gli spazi cistici si formano nello INL assumono un aspetto“a nido d’ape”

di pooling della fluoresceina; se gli spazi cistici si formano nello OPL assumono un aspetto fluorangiografico “a petalo”.

La trazione vitreomaculare, a volte, modula l'ispessimento maculare nell'edema maculare diabetico; infatti, eliminare la trazione vitreoretinica, durante la vitrectomia, può essere una strategia efficace in occhi con DME.

A tal proposito, il “DRCRnet” ha riportato un maggiore miglioramento dell'AV in occhi con membrana epiretinica (ERM) preoperatoria e una maggiore riduzione di spessore foveale in occhi con anomalie vitreoretiniche.

Spesso, l'edema maculare diabetico di tipo spugnoso è accompagnato da alterazioni patologiche dell'interfaccia vitreomaculare (fig.8) e le anomalie vitreomaculari contribuiscono all'ispessimento del parenchima retinico nello strato OPL subfoveale.

La proliferazione fibrovascolare progredisce lungo la membrana ialoidea posteriore e ne induce la contrazione. Forze trazionali tangenziali aumentano lo spessore della retina e contribuiscono contemporaneamente alla formazione dell'edema maculare, mentre forze orizzontali provocano la maculopatia trazionale.

E' stato anche evidenziato che le anomalie dell'interfaccia vitreomaculare potrebbero indurre anche un distacco sieroso retinico (SRD) nell'DME.

Con l'OCT-SD, si sono evidenziati diversi tipi di anomalie dell'interfaccia vitreomaculare, ovvero, la trazione vitreomaculare senza o con distacco posteriore di vitreoparziale, con distacco posteriore di vitreo completo, e con membrana epiretinica (ERM), oltre alle loro combinazioni [47].

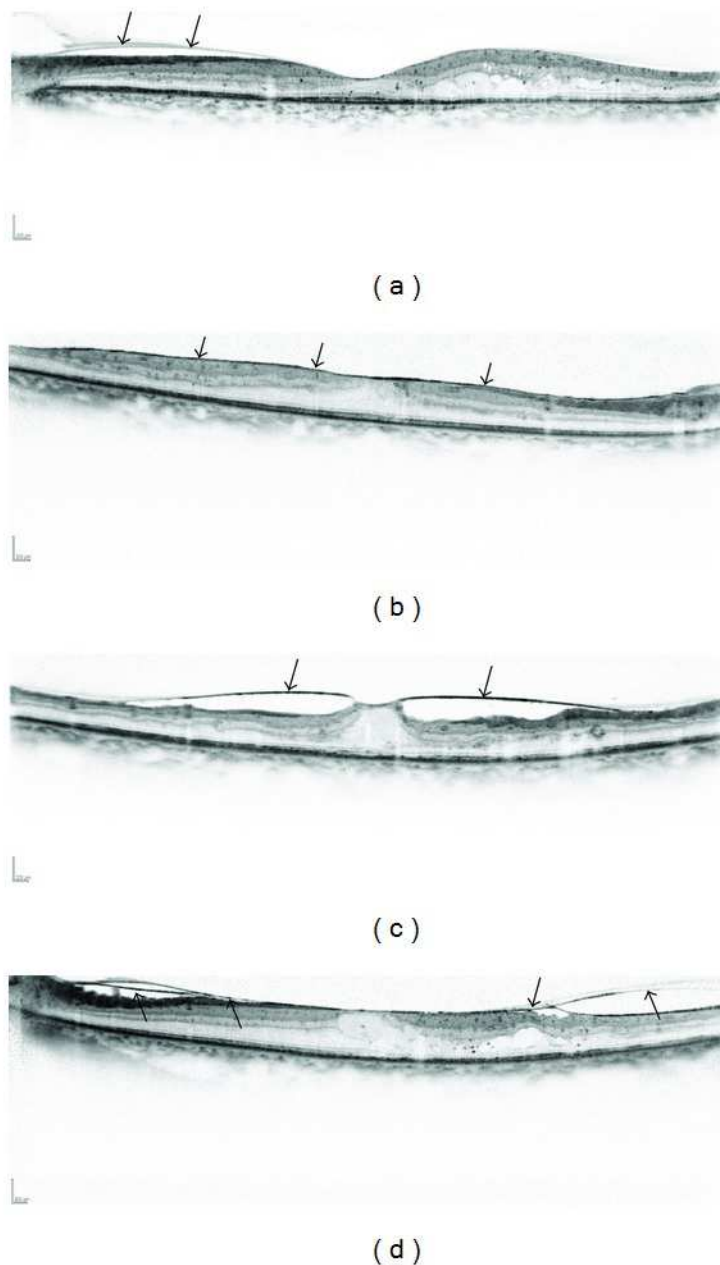


Fig. 8: Diversi modelli di anomalie dell'interfaccia vitreomaculare nell'DME. (A) la membrana ialoidea posteriore è particolarmente evidente (freccie).(B) La membrana epiretinica (ERM) è spesso accompagnata da un gonfiore spugnoso della macula (freccie).(C) Un distacco posteriore di vitreo a volte induce trazione verticale, come nei fori idiopatici maculari (freccie). (D) Alcuni occhi hanno la separazione di una membrana vitrea posteriore (freccie) [47].

L'OCT-SD spesso evidenzia nel fluido sottoretinico presenza di lesioni puntiformi iperreflettenti, detti foci iperreflettenti (fig.9).

Nella maggior parte dei casi, dopo la risoluzione dell'edema maculare, possono formarsi gli essudati duri subfoveali, a cui

corrispondono la formazione di nuovi foci iperreflettenti e una concomitante alterazione della funzione visiva.

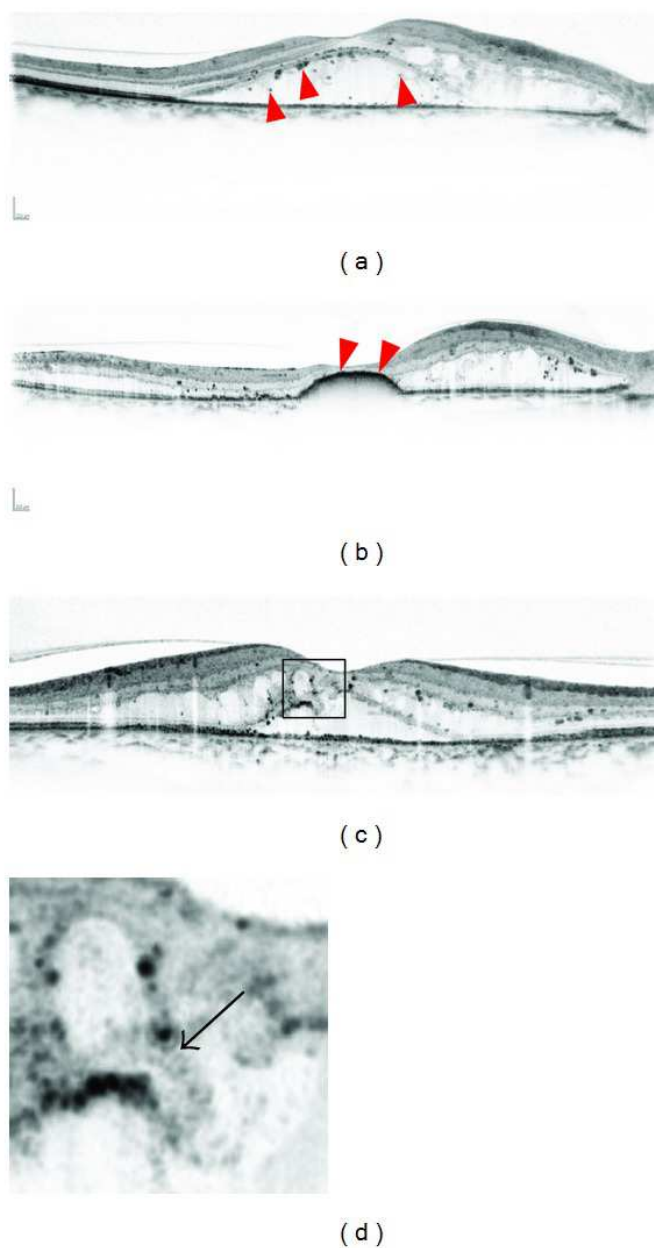


Fig. 9: Un caso rappresentativo di foci iperreflettenti (punte di freccia) nel fluido sottoretinico (a). L'edema maculare diabetico sta migliorando dopo fotocoagulazione focale/griglia, anche se i foci iperreflettenti (b) si sono accumulati sulla fovea (punte di freccia) [47].

La tecnologia spectral-domain degli OCT ha permesso anche di studiare e valutare dei marker dello stato dei fotorecettori, quali la membrana limitante esterna (ELM) e la giunzione tra i segmenti interni ed esterni (IS/OS) (Fig. 10).

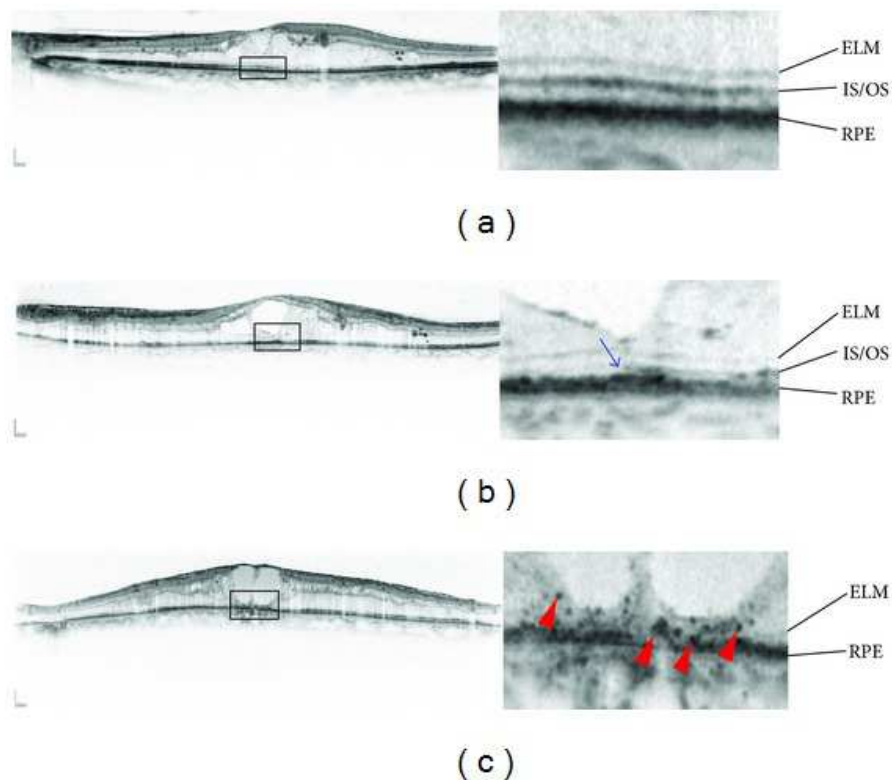


Fig. 10: Le alterazioni patologiche negli strati dei fotorecettori nell'DME. (A) Sia la banda dell'ELM che quella IS / OS sono continue. (B) La banda ELM appare quasi continua, mentre la banda IS/ OS è discontinua a sinistra (freccia). (C) La banda ELM è interrotta, e la banda IS/OS è assente in sede foveale, tale quadro è accompagnato dai foci iperreflettenti negli strati retinici esterni (freccie) [47].

In alcuni studi su pazienti affetti da edema maculare diabetico, si è evidenziato che lo spessore dello strato esterno dei fotorecettori può essere associato alla funzione visiva; inoltre, si è evidenziato che l'estensione dell'alterazione o l'assenza della banda IS/OS può essere correlata alla disabilità visiva [50].

Tuttavia, non è noto se la banda IS/OS evidenziata su immagini OCT corrisponde alla reale giunzione istologica dei segmenti interni ed esterni dei fotorecettori.

A tal proposito, Spaide e Curcio hanno evidenziato che la riflettività di questa banda alle immagini OCT cambiava dopo esposizione alla luce; ciò suggerisce che tale banda può rappresentare realmente la funzione dei fotorecettori [51].

La banda della ELM è un altro indicatore di integrità dei fotorecettori e la sua interruzione può essere associata anche alla disabilità visiva nell'DME [50].

Secondo Shin *et al.*, l'interruzione della ELM comporta risultati visivi scarsi dopo il trattamento con triamcinolone intravitreale [52].

Dato che l'ELM è una giunzione intercellulare tra le cellule Müller e i fotorecettori ed agisce da barriera contro le macromolecole, in caso di ELM alterata, gli emocomponenti potrebbero migrare negli strati retinici esterni e aggravare il danno ai fotorecettori.

Anche se è poco chiaro come la ELM venga alterata, si ipotizzano alcuni possibili meccanismi: si pensa che spazi cistici di edema estesi dallo INL allo OPL possono determinare alterazione della ELM e, conseguentemente, determinare alterazioni delle cellule di Müller.

L'OCT-SD nella retinopatia diabetica può evidenziare i cosiddetti foci iperreflettenti (fig. 11), lesioni puntiformi iperreflettenti.

I foci presenti negli strati retinici esterni, in particolare, sono correlati ad una scarsa funzione visiva nei pazienti con DME [52]. Bolz *et al.* hanno ipotizzato che i foci iperreflettenti nella retinopatia diabetica corrispondano ai macrofagi carichi di lipidi e siano i precursori degli essudati duri [53].

I foci iperreflettenti, inoltre, sono considerati fotorecettori degenerati in corso di DME e zone di iperplasia e/o metaplasia dell'RPE in altre malattie. Infatti, l'interruzione della banda della ELM o della IS/OS è correlata alla presenza dei foci iperreflettenti; ciò indica che la presenza dei foci è alla base della degenerazione dei fotorecettori.



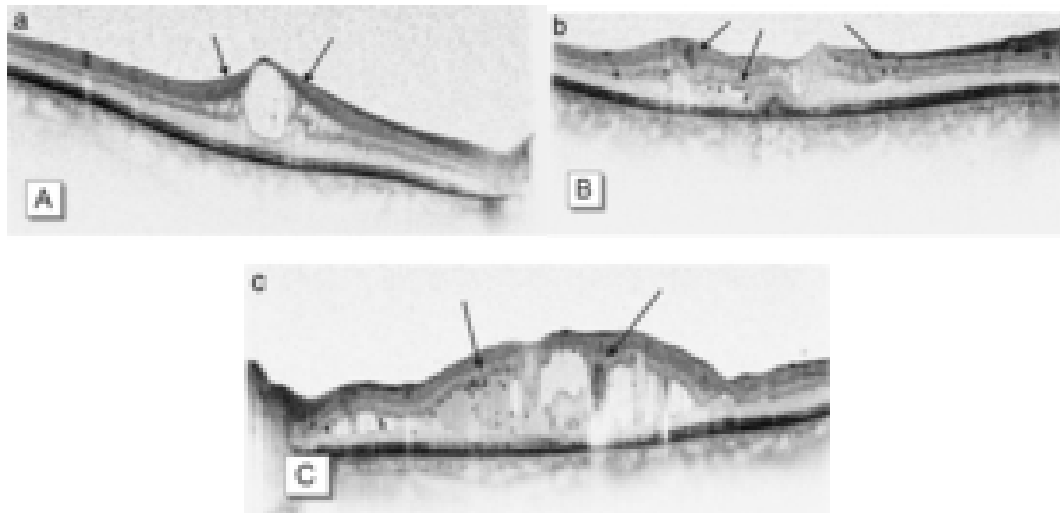


Fig. 11: Distribuzione dei foci iperreflettenti negli strati neurosensoriali della retina per mezzo di SD-OCT [54].

Inoltre, Midena *et al.* hanno recentemente dimostrato che i punti iperreflettenti potrebbero corrispondere a cellule di microglia o a cellule di Müller attivate e, quindi, i foci iperreflettenti potrebbero essere considerati un biomarcatore di attivazione gliale nella retinopatia diabetica [55].

I foci iperreflettenti, con l'utilizzo dell'OCT spectral domain, sono stati frequentemente osservati nella retina neurosensoriale anche nei pazienti con degenerazione maculare neovascolare legata all'età (AMD) [54].

L'origine dei foci iperreflettenti nella AMD è poco chiara; è stato ipotizzato che possano essere leucociti o cellule dell'RPE danneggiate in seguito all'infiammazione della retina [54].

È interessante notare che nella AMD la quota di foci iperreflettenti risultava significativamente ridotta dopo il trattamento con ranibizumab intravitreale; tale riduzione era correlata positivamente alla migliore acuità visiva corretta (BCVA)[54]. Inoltre, in pazienti con AMD, un numero iniziale maggiore di foci iperreflettenti ha rivelato migliori risultati della terapia con ranibizumab nella risoluzione dell'edema e nel migliorare l'acuità

visiva. Pertanto, è stato ipotizzato che la quota basale di foci iperreflettenti possa essere un fattore predittivo dell'esito della terapia [54].

Utilizzando l'OCT-SD rimane ancora difficile valutare lo stato delle fibre nervose (NFL); questo comprende gli assoni originano dalle cellule gangliari. In pazienti diabetici, per mezzo dell'OCT, sono stati individuati difetti dello NFL: la ricerca in quest'ambito ha evidenziato l'apoptosi delle cellule gangliari [21].

Nella retinopatia diabetica, la diminuzione degli assoni delle cellule gangliari e l'assottigliamento della retina interna, evidenziabile all'OCT, è la dimostrazione della neurodegenerazione e della perdita cellulare per apoptosi [17].

### **3. Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)**

Il VEGF, conosciuto anche come VEGF-A, ha un ruolo fondamentale nel controllo dell'angiogenesi fisiologica e patologica.

Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) è il principale induttore diretto dell'angiogenesi insieme ad altri cofattori di crescita solubili, alcuni dei quali hanno effetti biologici ancora poco chiari.

Inizialmente, il VEGF fu considerato come fattore di permeabilità vascolare, ma studi successivi - condotti soprattutto da Ferrara *et al.* nei laboratori di biologia molecolare della Genentech (CA, USA) - hanno evidenziato che esso determina uno stimolo angiogenico come fattore mitogeno specifico per le cellule endoteliali. Dal punto di vista biochimico, il VEGF è una proteina glicosilata dimerica a basso peso molecolare (36-46 KD). Nell'uomo sono state isolate diverse isoforme di VEGF, rispettivamente di 121, 165, 189, e 206 aminoacidi.

La specie molecolare principale che stimola la crescita della neovascolarizzazione patologica oculare retinica e coroideale è la VEGF165 che si presenta come una glicoproteina omodimerica basica con elevata affinità per l'eparina.

Le forme VEGF189 e VEGF121 sono state identificate nella maggior parte delle cellule che esprimono il gene per VEGF; la forma VEGF206 è presente solo in epatociti fetali.

Nella retina, studi *in vitro* hanno dimostrato che il VEGF può essere secreto da diverse tipi di cellule retiniche come le cellule dell'EPR, i periciti, gli astrociti, le cellule di Muller e le cellule endoteliali; l'isoforma 121, a carattere leggermente acido, viene interamente secreta; l'isoforma 165 è anch'essa secreta, ma parte della molecola

rimane legata alla membrana cellulare e alla matrice; le altre isoforme 189 e 206 rimangono associate alla matrice extracellulare.

Il dominio di legame dell'eparina del VEGF165 è localizzato nei 55 residui carbossi-terminali ed è critico per l'attività mitogena nei confronti delle cellule endoteliali. La rimozione di questo dominio non altera l'affinità di legame del VEGF nei confronti dei suoi recettori, ma è associata con una notevole perdita di attività biologica.

Il VEGF 121 ed il frammento da 110 aminoacidi - rilasciato dal taglio operato dalla plasmina sul VEGF 165, 189 o 206 - non si legano in modo significativo all'eparina e mostrano una capacità di 10-100 volte più debole, rispetto al VEGF165, nell'indurre proliferazione dell'endotelio.

Il VEGF possiede quindi la potenzialità di esprimere un'eterogeneità strutturale e funzionale finalizzata ad ottenere una risposta graduata e controllata.

Il VEGF-A (isoforme 165, 121, 189, 145, 206) è il capostipite di una vasta famiglia di proteine correlate, che include il fattore di crescita della placenta (PlGF), il VEGF-B, il VEGF-C, il VEGF-D ed e il VEGF-E.

Il PlGF è una glicoproteina dimerica capace di fissarsi ad uno dei recettori per VEGF, ma ha scarsa attività mitogenica. La presenza di eterodimeri tra VEGF e PlGF suggerisce un meccanismo di regolazione negativa dell'attività biologica del VEGF.

Il VEGF-B è espresso prevalentemente nel cuore embrionale, ma non nei cuscinetti endocardici; è espresso come proteina legata alla membrana e sembra possa essere rilasciata dopo clivaggio con eparina. Il VEGF-B potrebbe modulare l'attività biologica del VEGF-A, formando eterodimeri con quest'ultimo.

Il VEGF-C ha scarsa attività proliferativa per le cellule endoteliali, ma si pensa possa essere coinvolto nei processi di linfoangiogenesi.

Il VEGF-D è secreto dai fibroblasti in fase proliferativa e, come il VEGF-A, induce migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali. Si ritiene che lo stimolo principale alla produzione di VEGF sia la condizione di ipossia. Un fattore di trascrizione ipossia-inducibile (HIF-1) si lega, infatti, alla regione promotrice del gene VEGF determinando un aumento dell'mRNA e quindi della sintesi di questa proteina.

È stato riportato che il messaggero del VEGF è regolato, a livello trascrizionale e post trascrizionale, anche da un deficit di glucosio, suggerendo che il VEGF è un gene indotto da diversi stimoli stressanti. Queste osservazioni mostrano come due eventi differenti, indotti da ischemia tissutale, ipossia e deprivazione di glucosio, inducono l'espressione di VEGF attraverso meccanismi simili.

Numerose citochine sono, inoltre, in grado di operare indirettamente una up-regulation dell'mRNA di VEGF, con conseguente sintesi proteica e secrezione del fattore di crescita endoteliale.

Il Transforming Growth Factor (TGF)-A, il TGF-B e l'Epidermal Growth Factor (EGF) inducono l'espressione di VEGF da parte di vari tipi cellulari.

I mediatori della risposta infiammatoria, quali l'interleuchina (IL)-1b e la prostaglandina E-2, sono in grado di indurre l'espressione di VEGF, suggerendo la partecipazione di quest'ultimo ai processi infiammatori. L'Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I), fattore di crescita tumorale in vivo ed in vitro, grazie al suo effetto proliferativo induce l'espressione di VEGF da parte di cellule tumorali, stimolando non solo la proliferazione, ma anche la vascolarizzazione.

I recettori ad attività tirosinocinasica presenti a livello cellulare sono fortemente specifici per il VEGF. FLT-1 (fms-like tyrosine-kinase) e KDR (kinase domain region) rappresentano i due recettori

maggiormente affini per VEGF e sono espressi a livello endoteliale, ma anche su cellule tumorali.

Il legame con questi recettori determina proliferazione delle cellule endoteliali e modificazioni nelle giunzioni serrate.

E' noto che l'azione biologica del VEGF è fortemente influenzata dall'interazione con entrambi i recettori. Il legame del ligando con i recettori è seguito da una successione di fosforilazioni che portano all'attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale.

Numerosi studi hanno dimostrato come l'interazione tra l'uno e l'altro recettore attivi vie di trasduzione diverse, concludendo che FLK-1/KDR è essenziale affinché possano esprimersi la maggior parte degli effetti biologici del VEGF.

L'interazione di VEGF con FLK-1/KDR è seguita dalla proliferazione delle cellule endoteliali; nessun effetto mitogenico segue il legame con FLT-1.

In virtù della sua capacità di formare eterodimeri con KDR e di legare varianti di VEGF, è stato ipotizzato che FLT-1 possa esercitare una regolazione negativa della trasduzione del segnale dipendente da KDR.

In seguito al legame del VEGF-A con i suoi recettori si assiste ad un'attiva secrezione di citochine da parte dell'endotelio che porta alla progressiva distruzione della membrana basale grazie anche all'induzione di metalloproteinasi della matrice. Alla rottura della membrana seguirà da un lato l'aumento della permeabilità vascolare e, quindi, la formazione di edema e dall'altro la proliferazione delle cellule endoteliali che si aggregano in formazioni tubulari e, di conseguenza, la formazione di neovasi. Il processo di neovascolarizzazione si completa con il richiamo di periciti di supporto che si dispongono all'esterno del vaso.

#### **4. Il ranibizumab (Lucentis)**

Il ranibizumab è un frammento di anticorpo monoclonale umanizzato che si lega con elevata affinità a tutte le isoforme del VEGF. E' stato prodotto specificatamente per uso oftalmico, inizialmente nella terapia della degenerazione maculare legata all'età.

Il ranibizumab è ottenuto da un precursore di un anticorpo monoclonale murino anti-VEGF-A: la rimozione della porzione fc dell'anticorpo murino ha consentito di ridurre l'immunogenicità verso gli umani e di facilitarne la penetrazione attraverso tutti gli strati del tessuto retinico.

La molecola è stata poi sottoposta ad un processo di maturazione per aumentare l'affinità di legame per il VEGF-A: questo frammento è stato denominato ranibizumab e commercializzato come Lucentis®.

Il ranibizumab si lega con un'elevata affinità alle isoforme del VEGF-A, prevenendo così il legame del VEGF-A ai suoi recettori e determinando così l'inibizione della crescita neovascolare e la riduzione della permeabilità vascolare.

Il ranibizumab e il bevacizumab sono degli inibitori di tutte le isoforme di VEGF.

Il ranibizumab sembrerebbe avere alcuni vantaggi rispetto al bevacizumab: ranibizumab è una molecola più piccola (piccolo raggio e minor peso molecolare), che giustifica la maggior capacità di penetrare tutti gli strati della retina e quindi di diffondere nello spazio sottoretinico. Esso è ottenuto da specifiche tecniche di ingegneria genetica; è formulato per esclusivo uso oftalmico e ha maggiore affinità per il VEGF.

A sostegno però di questa affermazione mancano informazioni precise sulla farmacodinamica oculare del bevacizumab, molecola non prodotta per uso oculare e il cui uso è stato preso in prestito dall'oncologia.

Studi di farmacocinetica, su animali di laboratorio, hanno dimostrato che dopo iniezione intravitreale, la biodisponibilità del ranibizumab è molto elevata (50 – 60%) in quanto il farmaco si distribuisce rapidamente nella retina nell'arco di 6 – 24 ore e viene eliminato da tutti i compartimenti oculari con due principali modalità di eliminazione:

1) verso la camera anteriore;

2) verso la retina.

L'emivita del farmaco è breve, circa 3 giorni. Le concentrazioni del ranibizumab nel plasma sono molto basse, riflettendo una biodistribuzione più alta e una clearance più bassa del farmaco nell'occhio. Tuttavia, non abbiamo dati disponibili sulla clearance del farmaco dal vitreo umano, anche se si può ipotizzare che potrebbe essere più lenta a causa del maggior volume del vitreo umano (4.5 mL) rispetto al quello degli occhi di coniglio o di scimmia (1.5 mL), utilizzati per gli studi. Allo stato attuale delle conoscenze, vi sono dei dati contrastanti sulla presenza di ranibizumab nel plasma dopo iniezione del farmaco e sull'assorbimento sistemico. A tal proposito, nello studio "IVAN", studio randomizzato ad un anno, che confronta l'efficacia e la sicurezza di bevacizumab e ranibizumab, nei pazienti che venivano trattati con bevacizumab sono stati riscontrati meno eventi trombotici arteriosi e di insufficienza cardiaca. Inoltre, nei pazienti trattati con bevacizumab risultavano inferiori i livelli sierici di VEGF.

In definitiva, tale studio ha dimostrato un profilo di sicurezza del bevacizumab più elevato[56].



## **4.1 Somministrazione intravitreale**

Gli antiangiogenetici sono i farmaci più utilizzati per via intravitreale. La somministrazione per via intravitreale consente l'impiego efficace di concentrazioni minime di antiangiogenetici con significativa riduzione dei gravi effetti collaterali sistemici, tipici della somministrazione per via parenterale di questi farmaci.

La somministrazione intravitreale, se condotta correttamente e nel rigoroso rispetto delle norme di asepsi, non rappresenta un fattore di rischio rilevante per gravi complicanze oculari.

## **5. Il ranibizumab in monoterapia o combinato con laser maculare**

Il trattamento dell'edema maculare diabetico è ancor oggi oggetto di dibattito e lasciaspazio ad ulteriori studi e ricerche.

Dal 1985 fino ad oggi, la fotocoagulazione laser maculare (focale o a griglia) è stata considerata lo standard nella terapia per l'edema maculare diabetico clinicamente significativo. Se da un lato il "DRCR.net" ha riportato un guadagno di 10 lettere nel 31% dei pazienti trattati con laser, nello stesso studio si è evidenziato anche che il 19% dei pazienti trattati con laser avevano una progressiva perdita dell'acuità visiva (peggioramento di 2 righe dopo 2 anni di follow-up) e avevano un rischio di sviluppare scotomi.

Alla luce di quest'ultimo dato, negli anni, si è cercato di trovare una terapia con migliori risultati dal punto di vista funzionale.

Considerato, altresì, che nel vitreo di occhi con retinopatia diabetica i livelli del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) sono elevati, la terapia con anti VEGF è considerata una buona opzione terapeutica nell'DME.

Nei pazienti affetti da edema maculare diabetico, la sicurezza e l'efficacia del ranibizumab in monoterapia o associato al laser maculare sono state oggetto di studio in diversi lavori: RISE, RIDE, READ-2, RESOLVE, RESTORE e DRCRnet.

Gli studi "RISE" e "RIDE" sono due studi randomizzati, in parallelo, di fase III, multicentrici, in doppio cieco, controllati, metodologicamente identici [42-43].

Nello studio "RISE", sono stati trattati 377 adulti con riduzione dell'acuità visiva da DME, randomizzati nel modo seguente: 127 pazienti con finta iniezione intravitreale (sham), 125 pazienti con 0,3

mg di ranibizumab intravitreale e 125 pazienti con 0,5 mg ranibizumab intravitreale.

A 24 mesi, guadagnavano 15 lettere: il 18,1% dei pazienti trattati con iniezione sham, il 44,8% ( $p < 0,0001$ ) dei pazienti trattati con 0,3 mg di ranibizumab e il 39,2% ( $p < 0,001$ ) dei pazienti trattati con ranibizumab 0,5 mg.

Nello studio "RIDE", sono stati trattati 382 pazienti affetti da DME, randomizzati: 130 con sham, 125 trattati con 0,3 mg di ranibizumab e 127 pazienti trattati con 0,5 mg di ranibizumab.

Un numero significativamente più elevato di pazienti trattati con ranibizumab hanno guadagnato 15 lettere: il 12,3% dei pazienti trattati con sham, il 33,6% ( $p < 0,0001$ ) dei pazienti trattati con 0,3 mg di ranibizumab e il 45,7% ( $p < 0,0001$ ) dei pazienti trattati con ranibizumab 0,5 mg.

In entrambi gli studi, il ranibizumab migliorava l'acuità visiva rapidamente, riduceva il rischio di un'ulteriore riduzione del visus e migliorava l'edema maculare nei pazienti con DME, con bassa incidenza di danni oculari e non oculari.

Lo studio "RESOLVE" ha dimostrato che ranibizumab in monoterapia è stato ben tollerato ed è stato più efficace del trattamento sham, fornendo miglioramenti rapidi e continui dell'acuità visiva [46].

Si tratta di uno studio a 12 mesi, randomizzato, in doppio cieco, multicentrico, di fase II, controllato verso sham, studio in doppio mascherato.

I pazienti sono stati assegnati in modo casuale a ranibizumab intravitreale (0,3 o 0,5 mg; 51 pazienti per ciascun gruppo) o sham (49 pazienti).

Al 12° mese, l'acuità visiva media migliorava rispetto a quella basale di  $10,3 \pm 9,1$  lettere con ranibizumab e diminuiva di  $1,4 \pm 14,2$  lettere con sham ( $p < 0,0001$ ). La riduzione media dello spessore maculare

centrale medio era  $194,2 \pm 135,1$  micron con ranibizumab e  $48,4 \pm 153,4$  micron con sham ( $p < 0,0001$ ).

Un guadagno di 10 o più lettere rispetto al basale si è verificato nel 60,8% dei pazienti trattati con ranibizumab e nel 18,4% degli occhi trattati con sham.

I dati sulla sicurezza di ranibizumab intravitreale sono stati coerenti con gli studi precedenti.

Nello studio "READ-2", studio clinico prospettico, randomizzato, controllato, multicentrico, si è valutata l'efficacia e la sicurezza di ranibizumab in monoterapia rispetto al laser in monoterapia [40-41].

Hanno partecipato allo studio 126 pazienti con DME. I soggetti sono stati randomizzati in tre gruppi. I pazienti del gruppo 1 sono stati trattati con 0,5 mg di ranibizumab al basale e al mese 1, 3 e 5; i pazienti del gruppo 2 trattati con fotocoagulazione laser focale o griglia al basale e al terzo mese se necessario; i pazienti del gruppo 3 trattati con una combinazione di 0,5 mg ranibizumab e laser focale o griglia al basale e al terzo mese. A partire dal sesto mese, tutti i soggetti potevano essere trattati con ranibizumab, se necessario.

Il numero medio di iniezioni nel corso del periodo di follow-up di 18 mesi era 5.3, 4.4 e 2.9 rispettivamente nei gruppi 1, 2 e 3.

Per i 33 pazienti del gruppo 1, 34 pazienti del gruppo 2, e 34 pazienti nel gruppo 3, in 24 mesi, il miglioramento medio della BCVA era rispettivamente di 7.4, 0.5 e 3.8 lettere a 6 mesi e di 7.7, 5.1 e 6.8 lettere al 24° mese. La percentuale di pazienti che miglioravano la BCVA di 3 linee o più, era rispettivamente di 21%, 0% e 6% a 6 mesi, rispetto a 24%, 18% e 26% al mese 24°.

La percentuale di pazienti con spessore centrale maculare di 250 micron o meno era rispettivamente 36%, 47%, e 68% al mese 24°.

In questo studio si conclude che il ranibizumab rappresenta una terapia efficace per i pazienti con DME e, in combinazione con i

trattamenti laser, la quantità di edema residuo si riduce, così come il numero delle iniezioni necessarie per controllare l'edema.

In questo studio non è stato evidenziato se ranibizumab in monoterapia è superiore o almeno equivalente alla terapia combinata.

Il gruppo di studio "DRCR.net" ha riportato che ranibizumab 0,5 mg in combinazione con laserterapia, immediata o differita, è stato significativamente più efficace rispetto al laser da solo nel miglioramento dell'acuità visiva nei pazienti con DME [37-38-39].

Si tratta di uno studio clinico randomizzato multicentrico a cui hanno partecipato 854 occhi di 691 soggetti. 293 occhi sono stati trattati con iniezione sham e laser immediato (entro 3-10 giorni dall'iniezione); 187 occhi trattati con 0,5 mg ranibizumab e laser immediato; 188 occhi trattati con 0,5 mg ranibizumab e laser ritardato (a 24 settimane dall'iniezione); 186 occhi sono stati trattati con 4 mg di triamcinolone e laser immediato.

Ad 1 anno la variazione media della acuità visiva rispetto a quella basale era significativamente maggiore nel gruppo ranibizumab e laser immediato (+9 +/- 11,  $p < 0,01$ ) e nel gruppo ranibizumab e laser differito (+9 +/- 12,  $p < 0,01$ ), rispetto al gruppo triamcinolone e laser immediato (+4 +/- 13,  $p = 0,31$ ) e al gruppo trattato con iniezione sham e laser immediato (+3 +/- 13).

La riduzione media dello spessore maculare centrale nel gruppo triamcinolone e laser immediato era simile a quella di entrambi i gruppi trattati con ranibizumab e superiore a quella del gruppo sham e laser immediato.

Lo stesso studio è stato esteso prima a 2 anni [38] e poi a 3 anni [39] di follow-up.

I risultati a 2 anni sono simili ai risultati pubblicati in precedenza.

I risultati a 3 anni suggeriscono, per quanto riguarda l'acuità visiva, che il trattamento laser focale/griglia immediato non è migliore, ma

forse peggiore, rispetto al trattamento laser dopo 24 settimane (ritardato) [39].

Lo studio “RESTORE” è uno studio di confronto, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, della durata di dodici mesi, esteso a 24 mesi, per valutare l’efficacia e la sicurezza di ranibizumab, in monoterapia o in combinazione al trattamento laser, rispetto al solo trattamento laser in monoterapia. Lo studio ha valutato 345 pazienti con diminuzione visiva conseguente a DME [44-45].

I pazienti sono stati trattati random con un rapporto 1:1:1, con ranibizumab 0,5 mg e laser sham, con ranibizumab associato alla fotocoagulazione laser, oppure con iniezioni sham e fotocoagulazione laser. Le iniezioni di ranibizumab sono state somministrate al basale e poi ogni 4 settimane per 12 settimane; dal terzo mese, ranibizumab è stato somministrato al bisogno (PRN). Il trattamento laser è stato somministrato al giorno 1; se necessario il laser poteva essere somministrato in due sedute (a 4 settimane di distanza l’una dall’altra). A 12 mesi rispetto al basale, ranibizumab in monoterapia (+6,1) e associato al laser (+5,9) migliorava significativamente la BCVA media (in lettere) rispetto al laser (+0,8) (entrambi  $p < 0,0001$ ).

A 12 mesi, il 22,6% dei pazienti nel gruppo ranibizumab in monoterapia e il 22,9% dei pazienti del gruppo ranibizumab in combinazione con il laser hanno guadagnato 15 o più lettere rispetto all’8,2% dei pazienti del gruppo laser in monoterapia.

A 12 mesi rispetto al basale, è stata rilevata una significativa riduzione del valore medio dello spessore maculare centrale (CRT) nei gruppi ranibizumab (-118,7  $\mu\text{m}$ ;  $p = 0,0002$ ) e ranibizumab + laser (-128,3  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ), rispetto al gruppo trattato con laser (-61,3  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$ ).

Lo studio è proseguito con una fase di estensione della durata di 24 mesi. Dei 303 pazienti che hanno completato lo studio, 240 sono entrati nella fase di estensione e 208 l'hanno completata [45].

In questa fase, ranibizumab è risultato efficace nel migliorare la BCVA e nel mantenere nel tempo tali miglioramenti. Anche i pazienti inizialmente trattati con laser in monoterapia hanno evidenziato un beneficio nel passaggio alla terapia con ranibizumab; tale beneficio è tuttavia risultato ritardato (graduale e non rapido) rispetto a quello ottenuto nei pazienti trattati immediatamente con ranibizumab.

La riduzione del CRT ottenuta a 12 mesi è stata mantenuta fino a 24 mesi. Nel gruppo inizialmente trattato con solo laser, il CRT medio osservato a 12 mesi si è ridotto ulteriormente dopo il passaggio al trattamento con ranibizumab.

Nei paesi dell'Unione Europea il ranibizumab(Lucentis®) in base ai risultati positivi dei dati ottenuti da questo ampio programma di studi di fase II e di fase III è stato approvato come trattamento per la diminuzione visiva causata da edema maculare diabetico.

## **6. I foci iperreflettenti nell'edema maculare**

Solo qualche articolo scientifico (Framme C *et al.*[54], Pemp Bet *al.*[57]) riporta le esperienze cliniche sull'azione degli anti-VEGF sui foci iperreflettenti evidenziati con l'OCT-SD negli strati retinici esterni dei pazienti con edema maculare diabetico. Peraltro, si tratta soprattutto di studi su un numero esiguo di pazienti e non ci sono esperienze cliniche sull'azione della terapia combinata ranibizumab e laser sui foci iperreflettenti.

Secondo Framme C. *et al.*, i foci iperreflettenti (HF) sono osservabili nella retina neurosensoriale nell'edema maculare diabetico, utilizzando l'OCT-SD [54].

I foci iperreflettenti si riducevano in modo significativo durante la terapia con anti-VEGF e il loro numero basale sembrava correlato con il successo del trattamento.

In questo studio 51 pazienti (età media: 67 anni) sono stati sottoposti a SD-OCT prima e un mese dopo l'iniezione intravitreale di anti-VEGF (ranibizumab: n = 30; bevacizumab: n = 21). Gli HF erano semiquantitativamente contati, assegnati a tre gruppi (gruppo A: HF n = 1-10; gruppo B: n = 11-20; gruppo C: n > 20) e si è ricercata una possibile correlazione con l'acuità visiva e lo spessore della fovea.

Il numero medio di HF si è ridotto significativamente da 16,02 a 14,32 in tutti i pazienti (P = 0.000), lo spessore foveale si è ridotto da 445,5 a 373,9 micron (P = 0.000) e l'acuità visiva è aumentata da 62,0 a 66,0 lettere ETDRS (P = 0.003).

Per quanto riguarda i 3 gruppi HF, una riduzione dei livelli di HF è stata osservata nel 43,1% (stabile: 54,9%; aumentati: 2,0%). Si è evidenziato un cambiamento di distribuzione dei HF dal 31,4% al 62,7% (gruppo A), dal 45,1% al 31,4% (gruppo B) e dal 23,5% al 5,9% (gruppo C).



Secondo Pemp B.*et al.*, la riduzione dell'edema maculare diabetico durante la terapia con anti-VEGF intravitreale è stata accompagnata da una riorganizzazione dinamica degli essudati intraretinici. Gli aggregati intraretinici di microessudati rilevabili come foci iperreflettenti all'OCT-SD possono precedere la formazione di essudati duri (HE), prima che diventino clinicamente visibili [57].

In questo studio, sono stati valutati i cambiamenti nella distribuzione e nella morfologia dei microessudati intraretinici e degli essudati duri (HES) durante la terapia intravitreale con anti-VEGF, nei pazienti con persistente edema maculare diabetico.

Si tratta di uno studio prospettico di coorte che comprende ventiquattro pazienti con edema maculare diabetico persistente dopo fotocoagulazione laser. Ogni occhio è stato assegnato a una dose di carico di tre trattamenti con anti-VEGF ad intervalli mensili. Altri trattamenti singoli sono stati eseguiti se l'edema maculare diabetico persisteva o recidivava. Gli essudati intraretinici sono stati analizzati oltre 6 mesi utilizzando l'OCT-SD.

Prima del trattamento, i microessudati sono stati rilevati dall'OCT-SD come foci iperreflettenti in 24 occhi; durante la terapia, sono aumentati in modo significativo in numero e dimensioni. Una rapida riduzione dell'edema maculare diabetico è stato osservato in tutti i pazienti, ma a livelli diversi.

Secondo Nishijima K.*et al.* [49], i foci iperreflettenti preoperatori negli strati retinici esterni, rilevati dall'OCT-SD, potrebbero predire il danno ai fotorecettori e una prognosi peggiore dopo vitrectomia per edema maculare diabetico.

Analizzando retrospettivamente 32 occhi sottoposti a vitrectomia per edema maculare diabetico, dieci occhi avevano accumulato molti foci iperreflettenti negli strati retinici esterni prima dell'intervento; 22 occhi non avevano i foci iperreflettenti.

L'AV è stata significativamente migliore in occhi senza foci iperreflettenti rispetto a quelli con foci iperreflettenti a 3 mesi e 6 mesi e a l'ultima visita ( $P = 0,029, 0,010$  e  $<0.001$ , rispettivamente).

## **7. L'efficacia del ranibizumab associato al laser maculare nell'edema maculare diabetico e sui foci iperreflettenti**

Nel nostro lavoro sono riportati i risultati di uno studio clinico, randomizzato, svolto presso l'Unità Operativa di Oculistica del Presidio Ospedaliero San Giovanni di Dio di Agrigento, con un follow-up minimo di 24 mesi, su pazienti affetti da edema maculare diabetico.

La finalità di questo lavoro è dimostrare la superiorità anatomico-funzionale a lungo termine (24 mesi) di ranibizumab 0,5 mg intravitale in combinazione con fotocoagulazione laser maculare rispetto alla sola fotocoagulazione laser maculare nell'edema maculare diabetico.

L'endpoint primario è rappresentato dalla variazione media della migliore acuità visiva corretta (BCVA) e dalla variazione media dello spessore maculare centrale dal basale al mese 24 nei due gruppi di pazienti trattati con due approcci terapeutici diversi.

Obiettivi specifici dello studio sono la verifica da un lato dell'efficacia in termini di outcome visivo e dall'altro dell'efficacia in termini di outcome anatomico nel ridurre lo spessore maculare centrale e nell'influenzare altri indicatori presenti negli strati retinici esterni, quali i cosiddetti foci iperreflettenti in relazione all'utilizzo del ranibizumab associato alla fotocoagulazione laser rispetto alla sola fotocoagulazione laser nell'edema maculare diabetico.

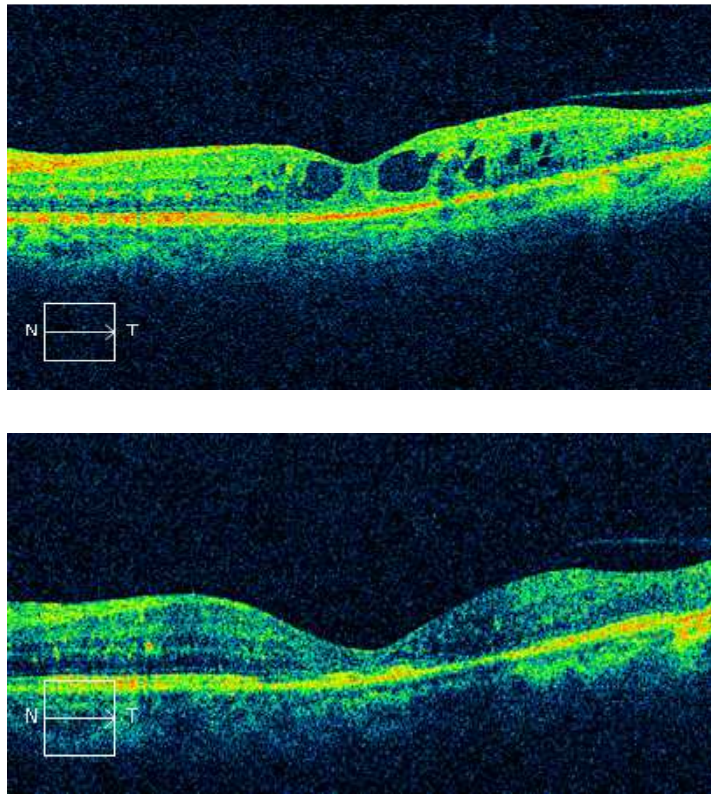


Fig. 12: esame OCT di edema maculare diabetico prima (in alto) e dopo 24 mesi (in basso) il trattamento intravitreale con ranibizumab associato a fotocoagulazione laser maculare. Visibile la riduzione dello spessore maculare centrale e la scomparsa degli spazi cistici iporeflettenti intraretinici.

Criteri di inclusione: 1) diminuzione visiva causata da edema maculare diabetico diffuso o focale; 2) edema maculare documentato da un aumento dello spessore maculare all'OCT; 3) spessore maculare centrale (CRT) inferiore a 500  $\mu\text{m}$ ; 4) età superiore a 18 anni; 5) diabete mellito tipo I e tipo II; 6) terapia con ipoglicemizzanti orali e/o insulina; 7) emoglobina glicosilata (HbA1c) inferiore o uguale a 10%; 8) follow-up minimo di 24 mesi.

Criteri di esclusione: 1) concomitanti condizioni cliniche nello stesso occhio che potrebbero impedire il miglioramento della AV con i trattamenti in studio; 2) ispessimento e/o trazione della MLI (pucker maculare); 3) infiammazione/infezione intraoculare; 4) glaucoma cronico in terapia (pressione intraoculare superiore a 24 mmHg nonostante terapia); 5) fotocoagulazione laser panretinica eseguita nei

precedenti 6 mesi all'arruolamento;6)pregresso trattamento con fotocoagulazione laser focale/griglia; 7) pregresso trattamento con farmaci anti-angiogenici; 8) storia di precedenti IMA o di altri eventi tromboembolici nei precedenti 6 mesi; 9) presenza di altre patologie che interessano la regione maculare (degenerazione maculare legata all'età ed edema maculare secondario ad occlusione venosa retinica); 10) presenza di essudati duri in sede maculare, visibili alla biomicroscopia del fundus e/o alla retinografia; 11) pressione arteriosa sistolica maggiore di 160 mmHg e/o diastolica maggiore di 110 mmHg; 12) colesterolemia (colesterolo totale) superiore a 220; 13) trigliceridemia superiore a 200.

Preliminarmente, in tutti i pazienti selezionati sono stati eseguiti esami quali biomicroscopia (esame standard del segmento anteriore e biomicroscopia del fondo oculare), misurazioni della pressione intraoculare, OCT-SD, acuità visiva con tavole ETDRS e fluorangiografia al fine di valutare le principali variabili anatomico-funzionali inerenti lo studio.

Al basale, per mezzo dell'OCT-SD è stato misurato lo spessore maculare centrale e, se presenti, il numero di foci iperreflettenti presenti negli strati retinici esterni.

La visualizzazione e la numerazione dei foci iperreflettenti degli strati retinici esterni è stata eseguita al basale e al 24° mese dall'inizio del trattamento.

Per la misurazione dello spessore maculare centrale (central subfield thickness ILM-RPE) si è utilizzata la scansione "macular cube" (scansione 6 X 6 mm) ed i dati estrapolati con programma "macular thickness analysis"; per la visualizzazione dei foci iperreflettenti negli strati retinici esterni si è utilizzata la scansione "5 linee raster" (lunghezza della scansione 6 mm, spazio tra le cinque linee di

scansione 0.25 mm) con analisi “high definition image”, esaminando la scansione foveale centrale.

L'utilizzo delle terapie, i loro rischi ed i loro benefici potenziali sono stati ampiamente discussi con tutti i pazienti arruolati che hanno firmato il consenso informato.

Gli occhi sono stati randomizzati in due gruppi di trattamento: 25 pazienti sono stati inseriti random nel gruppo di terapia tradizionale con l'impiego della sola fotocoagulazione laser maculare (gruppo A); gli altri 26 nel gruppo che associa alla fotocoagulazione laser maculare il trattamento chirurgico di somministrazione di ranibizumab intravitreale (gruppo B).

Nei pazienti del gruppo A, è stata eseguita fotocoagulazione con argon laser in sede maculare con tre possibili tipi di trattamento: a griglia maculare, focale maculare, griglia maculare modificata.

Nei pazienti del gruppo B, il trattamento chirurgico di somministrazione intravitreale di ranibizumab è stato eseguito ogni mese per i primi 3 mesi e poi secondo schema individualizzato (PRN), cioè si è somministrato ranibizumab mensilmente, fino a che l'acuità visiva non risultava stabile per 3 controlli mensili consecutivi.

La somministrazione di ranibizumab veniva ripresa in caso di diminuzione dell'acuità visiva dovuta all'edema maculare e veniva continuata mensilmente fino a quando non si raggiungeva l'acuità visiva stabile per 3 controlli mensili consecutivi.

Dopo 7 giorni dalla prima iniezione è stata eseguita fotocoagulazione laser maculare con tre possibili tipi di trattamento: a griglia maculare, focale maculare, griglia maculare modificata.

I pazienti del gruppo A sono stati sottoposti a controllo a cadenza mensile fino al 24° mese.

I pazienti del gruppo B sono stati sottoposti a controllo a distanza di 24h e dopo 1 settimana dai trattamenti intravitreali; successivamente, sono stati sottoposti a controllo mensile, fino al 24° mese.

In entrambi i gruppi, durante il controllo mensile è stata misurata la migliore acuità visiva corretta con tavole ETDRS, esame biomicroscopico (esame del segmento anteriore, biomicroscopia maculare con lampada a fessura) e valutazione OCT.

La migliore correzione dell'acuità visiva è stata registrata utilizzando la Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) e misurata a 4 metri di distanza, calcolando il logaritmo del minimo angolo di risoluzione (scala logMAR); i risultati sono stati registrati come valori decimali, logMAR e contando il numero di lettere lette dai pazienti.

La fluorangiografia retinica è stata eseguita al basale e poi, secondo il giudizio del medico oculista, lungo il periodo del follow-up.

L'esame OCT è stato eseguito con "Cirrus HD-OCT 4000, spectral-domain technology (Carl Zeiss Meditec Dublin, CA, USA)".

La fotocoagulazione laser è stata eseguita con laser ad argon "Visulas 532 (Carl Zeiss Meditec Dublin CA)".

I pazienti del gruppo B hanno ricevuto la dose di 0,5 mg (0,05 ml) di ranibizumab, utilizzando la procedura standard di iniezione, in sala operatoria (Fig. 13). La tecnica di iniezione intravitreale è una modalità chirurgica mininvasiva che permette l'introduzione del farmaco in camera vitrea con il minimo traumatismo a carico delle strutture oculari.

La terapia intravitreale è stata eseguita in regime operatorio, previa preparazione del paziente con terapia antibiotica (per via generale e topica), ipotonizzante (topico) ed anestesia (topica).

La zona periorbitaria, le palpebre e le ciglia sono state accuratamente pulite con iodopovidone al 5%; dopodiché, è stato applicato un telino chirurgico ed uno speculum palpebrale sterile.

Dopo l'anestesia topica con gocce di lidocaina sulla superficie oculare, il ranibizumab intravitreale è stato somministrato, utilizzando un ago da 30G, 3,5-4 mm posteriormente al limbus nell'area della pars plana attraverso la congiuntiva e la sclera.

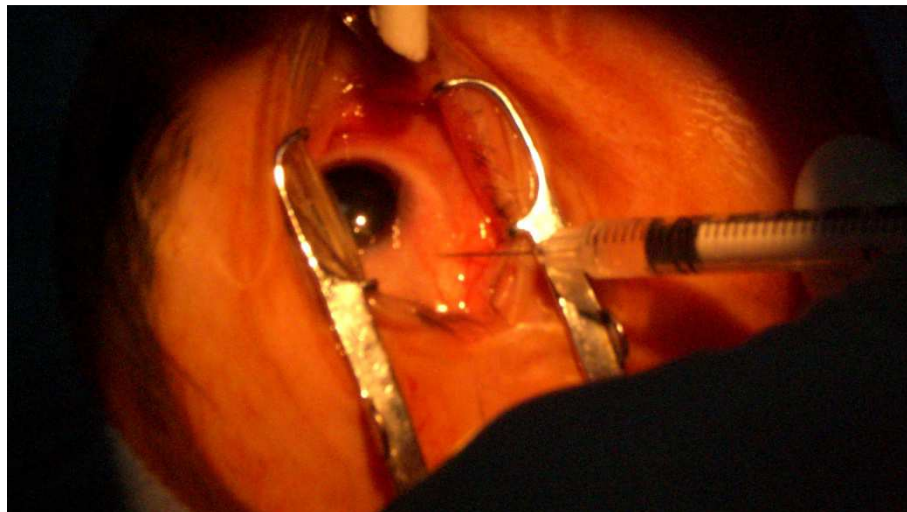


Fig. 13: procedura standard di iniezione intravitreale

I pazienti del gruppo B sono stati riesaminati il giorno dopo la procedura chirurgica e dopo 7 giorni; per i 7 giorni successivi alla procedura sono stati somministrati antibiotici e steroidi topici.

Tutti i pazienti hanno ricevuto istruzioni dettagliate ed è stato chiesto di chiamare tempestivamente nella eventualità di cambiamenti significativi nella visione.

Negli occhi del gruppo B, dopo 7 giorni dalla prima iniezione è stata eseguita fotocoagulazione laser maculare.

L'obiettivo primario è stato il miglioramento dell'acuità visiva minimo di 5 lettere ETDRS, ovvero di 1 linea; obiettivo secondario la stabilizzazione dell'AV.

Il valore alfa ( $p$ ) della valutazione statistica è stato posto pari a 0,05 con probabilità del 95%. L'analisi statistica per valutare le modificazioni della AV, dello spessore retinico centrale e del numero medio di foci iperreflettenti è stata eseguita per mezzo di



testparametrici tipo “test t di student”, eseguiti mediante programma Office Excel per Windows 7.0 (Microsoft Corp, USA) e il risultato ottenuto è stato verificato su una curva di probabilità di t a 2 code.

Il miglioramento dell’AV è stato definito come guadagno di 5 lettere, ovvero 1 linea dell’ottotipo ETDRS; il peggioramento come la perdita di 1 linea; la stabilizzazione come la variazione compresa tra +- 4 lettere.

I foci iperreflettenti sono stati considerati come presenti negli strati retinici esterni se in numero uguale o superiore a 5 al basale. Dopo il trattamento, sono stati considerati ridotti se diminuiti in un numero uguale o superiore a 5; sono stati considerati aumentati se vi è stato un incremento di un numero uguale o superiore a 5; sono stati considerati stabili se i foci iperreflettenti variano in un numero compreso +-4.

### **7.1 Risultati (Tabella 2-3; Fig. 17, 18, 19, 20)**

In questo studio sono stati arruolati 36 pazienti e trattati 51 occhi: 27 pazienti sono uomini e 9 donne; l’età media al momento della verifica iniziale era di 63,8 anni, con un’età compresa tra i 40 e 84 anni (SD 11,1 anni).

Tutti i pazienti sono affetti da diabete mellito in trattamento con ipoglicemizzanti orali; 9 di questi sono in trattamento anche con insulina.

Dei 51 occhi selezionati per lo studio - tutti affetti da retinopatia diabetica con edema maculare - 25 sono occhi destri e 26 occhi sinistri.

Su 42 dei 51 occhi (82,3 %) era stato eseguito, in precedenza (almeno 6 mesi prima dell’arruolamento), il trattamento della retinopatia diabetica con fotocoagulazione laser ad argon in periferia retinica.

Nei pazienti del gruppo A, la media ETDRS VA basale era di 0,57 logMAR (SD 0,1; range 0,8-0,3), 0,27 decimale (SD 0,1; range 0,16-0,5), e 25 lettere (SD 6.7; range 12-38).

Nei pazienti del gruppo B, la media ETDRS VA basale era di 0,67 logMAR (SD 0,1; range 0,8-0,5), 0,21 decimale (SD 0,0; range 0,12-0,32), e 20 lettere (SD 4.8; range 10-30) di 0,67 logMAR, 0,21 decimale e 20 lettere.

Nei pazienti del gruppo A, lo spessore maculare centrale medio basale era di 434  $\mu\text{m}$ .

Nei pazienti del gruppo B lo spessore maculare centrale medio basale era di 477  $\mu\text{m}$ .

Per quanto riguarda il numero medio di foci iperreflettenti negli strati retinici esterni visualizzati e conteggiati per mezzo dell'OCT-SD, nel gruppo A si evidenzia un numero medio di foci iperreflettenti al basale di 17,44 (range 0-35 SD 11,9); nel gruppo B, al basale si evidenzia un numero di foci di 16,96 (range 0-44 SD 15,6).

Dopo i primi 12 mesi, sono stati raccolti i dati ed eseguita una valutazione ad interim delle principali variabili esaminate.

Nel gruppo A, dopo il trattamento, a 12 mesi, l'acuità visiva media è di 0,46 logMAR, 0,36 decimale e 29 lettere.

Nel gruppo B, dopo il trattamento, a 12 mesi, l'acuità visiva media è di 0,39 logMAR, 0,41 decimale e 33 lettere.

A 12 mesi, per quanto riguarda, invece, la variabile anatomica, nei pazienti del gruppo A, lo spessore maculare centrale medio è diminuito da 434  $\mu\text{m}$  a 381  $\mu\text{m}$ ; nel gruppo B è diminuito da 477  $\mu\text{m}$  a 353  $\mu\text{m}$ .

Per quanto riguarda i risultati finali, nei pazienti del gruppo A, dopo il trattamento, a 24 mesi, l'acuità visiva media è di 0,52 logMAR (SD 0,18; range 0,8-0,0) (p= 0,08), 0,31 decimale (SD 0,12; range 0,16-0,63) (p= 0,07) e 26,8 lettere (SD 6,37; range 15-42) (p= 0,04).

Nei pazienti del gruppo B, dopo il trattamento, a 24 mesi, l'acuità visiva media è di 0,4 logMAR (SD 0,22; range 0,8-0,1) ( $p < 0,0001$ ), 0,41 decimale (SD 0,16; range 0,12-0,63) ( $p < 0,0001$ ) e 32,8 lettere (SD 10,08; range 10-44)( $p < 0,0001$ ).

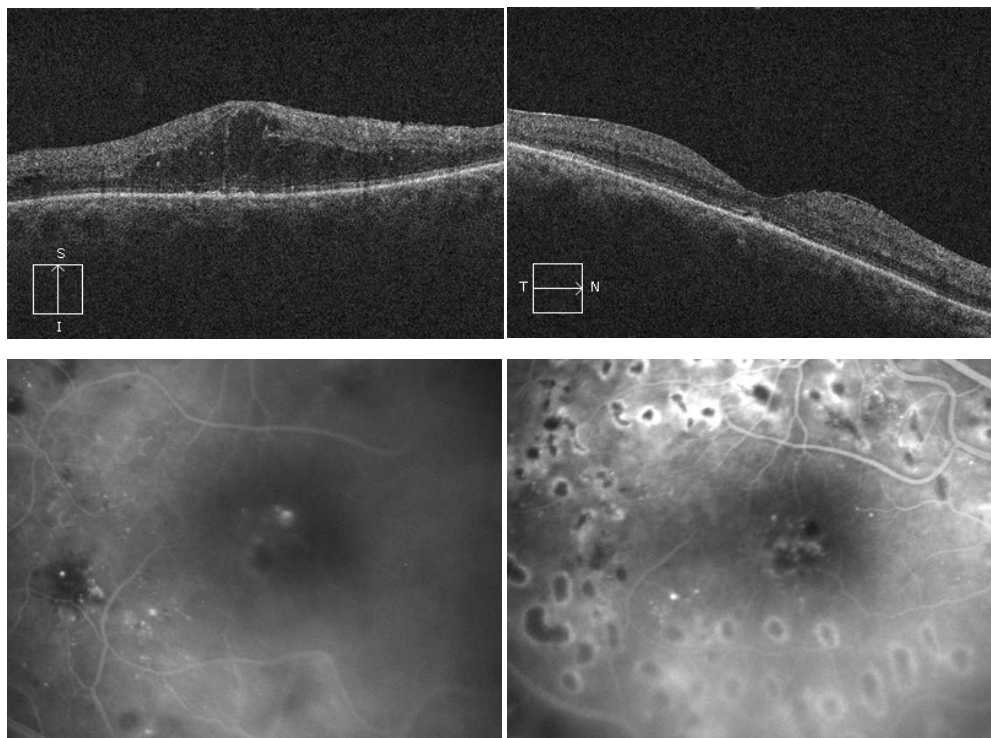


Fig. 14: edema maculare diabetico prima (a sinistra) e dopo 24 mesi (a destra) dal trattamento intravitreale con ranibizumab associato a fotocoagulazione laser maculare. OCT (in alto): visibile la riduzione dello spessore maculare centrale e il ripristino della depressione foveale. FAG (in basso): visibili gli spots della fotocoagulazione laser a griglia sui microaneurismi e sulle altre lesioni micro vascolari maculari.

L'acuità visiva finale, confrontata con quella basale, nel gruppo A è aumentata in 8 occhi su 25 (32%), è diminuita in 5 occhi (20%) ed è rimasta stabile in 12 occhi (48%).

L'acuità visiva finale, confrontata con quella basale, nel gruppo B è aumentata in 19 occhi su 26 (73%), è diminuita in 2 occhi (7,7%) ed è rimasta stabile in 5 occhi (19,3%).

Nel gruppo A si è evidenziato un aumento del numero medio di linee rispetto al basale di 1,45; nel gruppo B l'aumento medio di linee è di 3,56.

Nel gruppo A su 8 occhi migliorati, in 4 occhi (50%) vi è stato un aumento di 2 linee; 4 occhi (50%) sono migliorati di una sola linea. Nel gruppo B sui 19 occhi migliorati, in 16 (84%) vi è stato un aumento di 3 o più linee; in 3 occhi (16%) si è verificato un aumento di 2 linee.

Nel gruppo A, in 5 occhi su 25 si è verificato un peggioramento dell'AV nonostante la terapia, rispettivamente in 1 caso di due linee e in 4 casi di una linea. In tutti questi casi l'AV si è mantenuta tra 0,7 e 0,3 logMAR.

Nel gruppo B, in 2 occhi su 26 si è verificato un peggioramento dell'AV nonostante la terapia, in entrambi i casi di una linea. In entrambi i casi l'AV si è mantenuta tra 0,8 e 0,7 logMAR.

Nel gruppo B, in 1 occhio la AV iniziale era pari ad 0,9 logMAR: alla fine del follow-up nessun occhio presentava AV così bassa.

Lo spessore maculare centrale, analizzato per mezzo dell'OCT, nel gruppo A si riduce in media da 434  $\mu\text{m}$  (SD 49,4) a 373  $\mu\text{m}$  (SD 35,2) ( $p= 0,001$ ).

Nei pazienti del gruppo B lo spessore maculare centrale si riduce (Fig.14-15) da 477  $\mu\text{m}$ (SD 53,8) a 349  $\mu\text{m}$ (SD 31,6) ( $p<0,0001$ ).

Per quanto riguarda il numero medio di foci iperreflettenti negli strati retinici esterni visualizzati e conteggiati per mezzo dell'OCT-SD, nel gruppo A si evidenzia una riduzione del numero medio da 17,44 al basale (range 0-35 SD 11,9) a 16,6 a 24 mesi (range 0-34 SD 9,06): riduzione non statisticamente rilevante ( $p= 0,58$ ).

Per quanto riguarda il numero medio di foci iperreflettenti negli strati retinici esterni, nel gruppo B si evidenzia una riduzione del numero

medio da 16,96 al basale (SD 15,6) a 13,84 a 24 mesi (range 0-50SD16,04): riduzione statisticamente rilevante ( $p=0,005$ ).

Nel gruppo A, su 25 occhi analizzati, i foci iperreflettenti si sono ridotti in 8 occhi (32%), sono aumentati in 7 occhi (28%) e sono rimasti stabili in 10 (40%).

Nel gruppo B, su 26 occhi analizzati, i foci iperreflettenti si sono ridotti in 11 occhi (42,3%), sono aumentati in 2 occhi (7,7%) e sono rimasti stabili in 13 (50%).

Al fine della ricerca della possibile influenza dei foci iperreflettenti sull'acuità visiva basale e su quella finale, si sono presi in esame i foci degli occhi del gruppo B (ranibizumab+laser) e non quelli del gruppo A (laser), poiché solo nel gruppo B si è rilevata una riduzione media del numero di foci statisticamente significativa ( $p=0,005$ ), a 24 mesi dal basale, dopo il trattamento combinato.

Gli occhi di questo gruppo sono stati divisi in 2 sottogruppi: quelli con un numero di foci inferiore e uguale a 15 e quelli con un numero superiore a 15 foci, al basale e al mese 24.

Al basale, 18 occhi presentavano un numero di foci inferiore o uguale a 15; 8 occhi presentavano un numero di foci superiore a 15.

Al basale, l'AV media (in lettere) nei pazienti con un numero inferiore o uguale a 15 foci era pari a 21,88 lettere; al basale nei pazienti con un numero di foci maggiore di 15, l'AV media era pari a 14,75.

Tale dato dimostra che nel sottogruppo con un minor numero di foci ( $\leq 15$ ) il dato dell'AV media di partenza (basale) è nettamente migliore rispetto al sottogruppo di occhi con un numero maggiore di foci ( $> 15$ ). Pertanto, l'AV di partenza era notevolmente migliore in occhi con pochi foci iperreflettenti rispetto a quelli con molti foci iperreflettenti.

A 24 mesi dall'inizio del follow-up, nello stesso gruppo (ranibizumab+laser), 18 occhi presentavano un numero di foci

inferiore o uguale a 15; 8 occhi presentavano un numero di foci superiore a 15.

A 24 mesi, l'AV media (in lettere) nei pazienti con un numero inferiore o uguale a 15 foci era pari a 34 lettere; nei pazienti con un numero di foci maggiore di 15, l'AV media era pari a 30,12.

Considerando i 16 occhi del gruppo ranibizumab + laser in cui l'AV è aumentata in media di 3 o più linee, in questi occhi i foci iperreflettenti si riducono in 8, sono stabili in 6 e aumentano in 2.

Il numero medio di foci in questi 16 occhi è di 17,62 al basale e 14,5 al 24 mese.

Nel corso dei 24 mesi, il numero medio di iniezioni intravitreali è di 9,8 (range 3-19 SD 4,12).

Non sono stati riscontrati effetti indesiderati locali e complicanze post-operatorie e neanche effetti indesiderati sistemici.

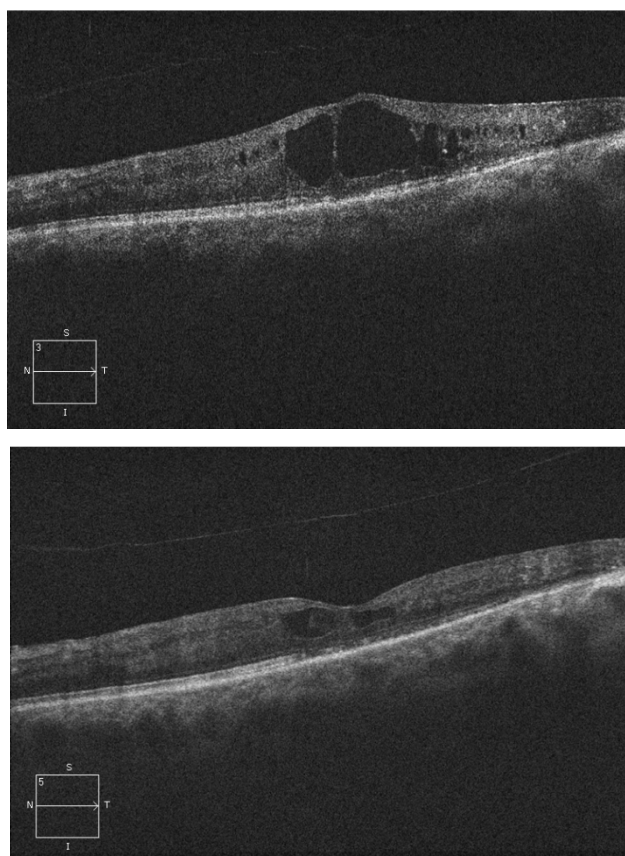


Fig. 15: Esame OCT di un occhio con edema maculare diabetico, prima (in alto) e dopo 24 mesi dall'inizio del follow-up (in basso), trattato con ranibizumab associato a fotocoagulazione laser maculare. Visibile la riduzione dello spessore maculare centrale.

## 7.2 Discussione

Il nostro lavoro conferma l'efficacia del ranibizumab intravitreale associato alla fotocoagulazione laser retinica nei pazienti con ridotta acuità visiva causata dall'edema maculare diabetico.

I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con ranibizumab in combinazione con il trattamento laser determina un miglioramento rapido dell'AV e tale miglioramento è mantenuto nel tempo.

Inoltre, la terapia combinata è risultata più efficace della sola fotocoagulazione laser sia nel migliorare la AV media finale (+12,8 Vs +1,8 lettere) rispetto a quella basale sia nel mantenere nel tempo (24 mesi) tali miglioramenti.

Al 24° mese, nel gruppo ranibizumab + laser (B), una percentuale pari all'84,2% ha raggiunto un'AV pari o superiore a 15 lettere (3 linee), rispetto al gruppo A nel quale nessun paziente ha guadagnato 15 lettere.

Nel gruppo ranibizumab+laser (B), nel 92% dei casi l'AV finale migliorava o si stabilizzava con un guadagno medio di 3,56 linee.

Nel gruppo laser in monoterapia (A), l'AV finale migliorava o si stabilizzava nell'80% dei casi.

Nel gruppo B, dopo il trattamento, non si è riscontrato nessun caso di AV con valori di cecità legale e si sono riscontrati 6 occhi con valori di ipovisione lieve (range 0,9-0,7 logMAR); di quest'ultimi, 4 casi avevano già un'AV iniziale compatibile con ipovisione lieve e, pertanto, questi casi sono stati considerati come stabilizzati.

Anche nel gruppo A, dopo il trattamento, non si è riscontrato nessun caso di AV con valori di cecità legale e si sono riscontrati 6 occhi con valori di ipovisione lieve (range 0,9-0,7 logMAR); di quest'ultimi, 3 casi avevano già un'AV iniziale compatibile con ipovisione lieve.

Negli altri 3 casi l'AV è peggiorata, assestandosi su valori pari 0,7 logMAR.

I miglioramenti funzionali dell'AV sono stati accompagnati da significativi miglioramenti anatomici: è stata riscontrata una riduzione dello spessore retinico centrale statisticamente significativa dopo il trattamento, maggiore nel gruppo ranibizumab + laser ( $p < 0,0001$ ).

Il miglioramento dell'outcome funzionale è accompagnato anche dalla riduzione del numero medio, statisticamente significativo, di foci iperreflettenti nella retina esterna, evidenziata solo nel gruppo ranibizumab + laser (- 3.12) ( $p = 0,005$ ).



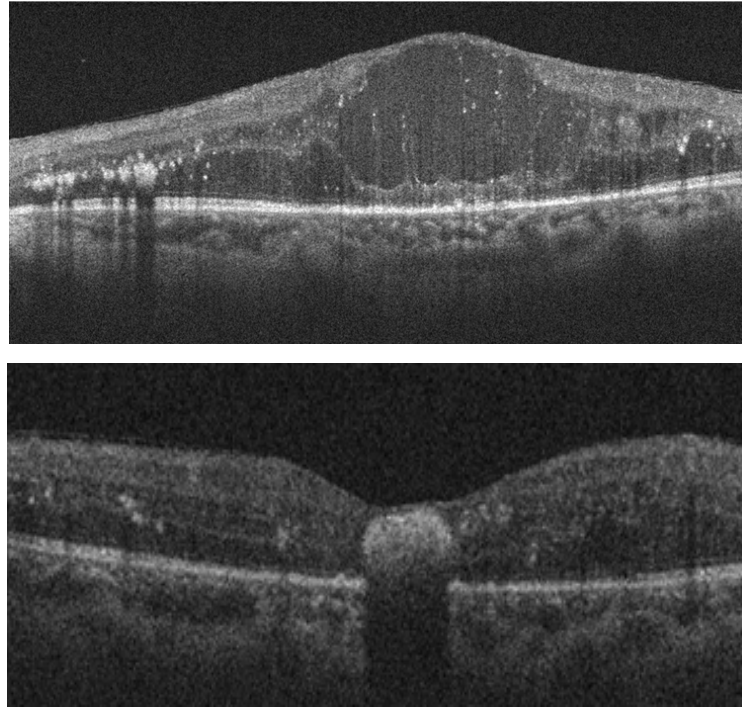


Fig. 16: Un caso rappresentativo di foci iperreflettenti. Dopo trattamento combinato ranibizumab + laser maculare (a 24 mesi dall'inizio del follow-up), è evidente la riduzione dell'edema maculare diabetico; i foci iperreflettenti si riducono di numero ma aumentano di volume e si accumulano sulla fovea.

La percentuale di pazienti in cui i foci si riducono è nettamente maggiore nel gruppo trattato con ranibizumab+laser (42,3%).

Questo dato evidenzia che la terapia con ranibizumab associata al laser, a differenza del laser in monoterapia, determina una riduzione significativa dei foci iperreflettenti (Fig. 16).

Inoltre, si è cercata una possibile influenza dei foci iperreflettenti sull'acuità visiva basale e su quella finale; in altre parole, si è cercata una possibile correlazione tra il numero di foci iniziali e la risposta al trattamento con anti-VEGF+laser.

I dati ottenuti dimostrano che nel sottogruppo con un minor numero di foci ( $< o = a 15$ ) l'AV media di partenza (basale) è nettamente migliore rispetto al sottogruppo di occhi con un numero maggiore di foci ( $> a 15$ ). Pertanto, l'AV di partenza era notevolmente migliore in

occhi con pochi foci iperreflettenti rispetto a quelli con molti foci iperreflettenti.

I dati raccolti sottolineano che, a 24 mesi dall'inizio del follow-up, negli occhi trattati con ranibizumab + laser, non solo si riduce significativamente il numero medio di foci iperreflettenti, ma nel sottogruppo con pochi foci ( $< 0 = a 15$ ), l'AV media rimane superiore (così come al basale) rispetto all'altro sottogruppo (34 Vs 30,12).

Uno dei punti critici della terapia con ranibizumab intravitreale rimane il numero elevato di iniezioni intravitreali a cui i pazienti devono sottoporsi.

A tal proposito, sarebbe interessante confrontare, in occhi con edema maculare diabetico, la terapia combinata ranibizumab + laser con il trattamento ranibizumab in monoterapia. Tale confronto permetterebbe di valutare se l'associazione del laser al ranibizumab determina una riduzione del numero medio complessivo di iniezioni utilizzate in ogni singolo paziente.

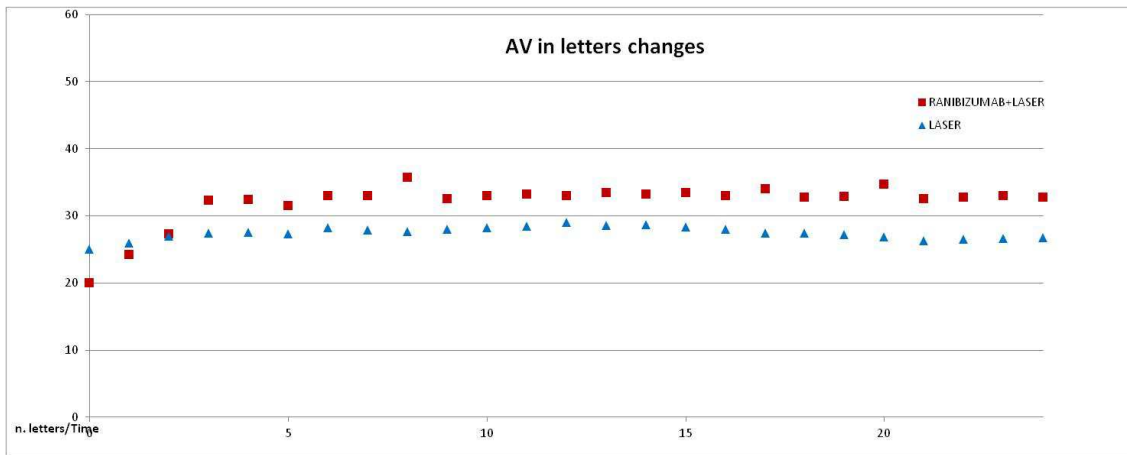
Inoltre, andrebbero approfonditi altri aspetti sul reale ruolo dei foci iperreflettenti presenti negli strati esterni della retina nei pazienti con DME. Considerata l'ipotesi che la flogosi sia alla base del meccanismo patogenetico dell'edema maculare diabetico, bisognerebbe indagare se i foci sono segni indiretti della flogosi stessa.

A fronte dei risultati ottenuti nel nostro studio, la riduzione del numero medio di foci iperreflettenti statisticamente rilevante nel gruppo ranibizumab + laser potrebbe essere la dimostrazione dell'azione degli anti-VEGF sui foci e della relazione che intercorre tra foci e flogosi.

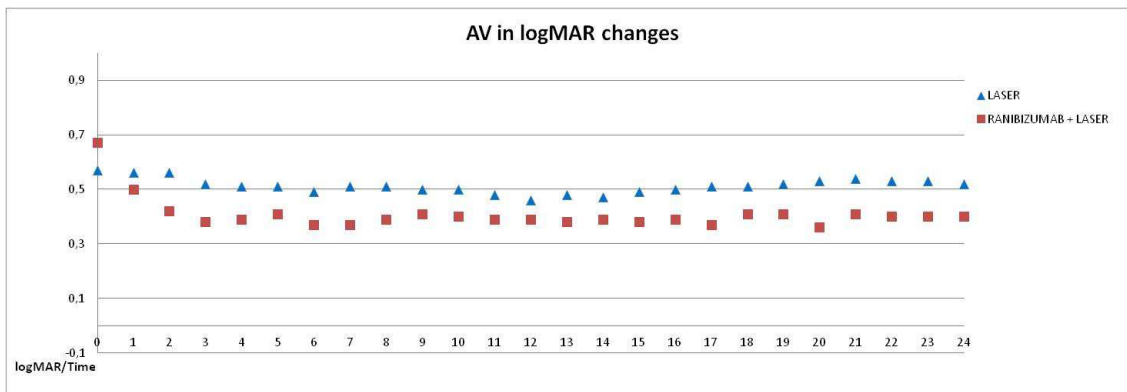
A tal proposito, sarebbe anche interessante individuare l'azione che i corticosteroidi intravitreali potrebbero svolgere nel modificare il numero e la distribuzione dei foci.

<b>Tabella 2: caratteristiche della popolazione arruolata al tempo basale</b>	
Findings	Values
N.of eyes (patients)	51 (36)
Eyes: right/left	25/26
Mean age $\pm$ SD (y)	63.8 ( $\pm$ 11.1)
Gender: Men / Woman	27/9
Diabetes therapy: insulin/oral hypoglycaemic	9/36
N. previously periphery laser treated	42(82,3 %)
Mean decimal BCVA $\pm$ SD Laser(A) Ranibizumab+laser (B)	0.27 ( $\pm$ 0.1) 0.21 ( $\pm$ 0.0)
Mean logMAR BCVA $\pm$ SD Laser(A) Ranibizumab+laser (B)	0.57 ( $\pm$ 0.1) 0.67 ( $\pm$ 0.1)
Mean letter BCVA $\pm$ SD Laser (A) Ranibizumab+laser (B)	25( $\pm$ 6.7) 20 ( $\pm$ 4.8)
Mean OCT CRT* $\pm$ SD (microns) Laser (A) Ranibizumab+laser (B)	434( $\pm$ 49.4) 477 ( $\pm$ 53.8)

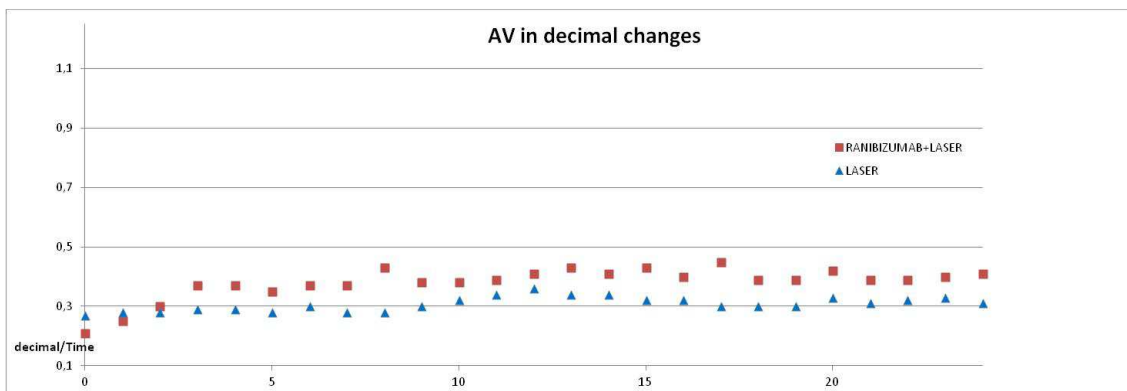
\*CRT = Central Retinal Thickness misurato in OCT



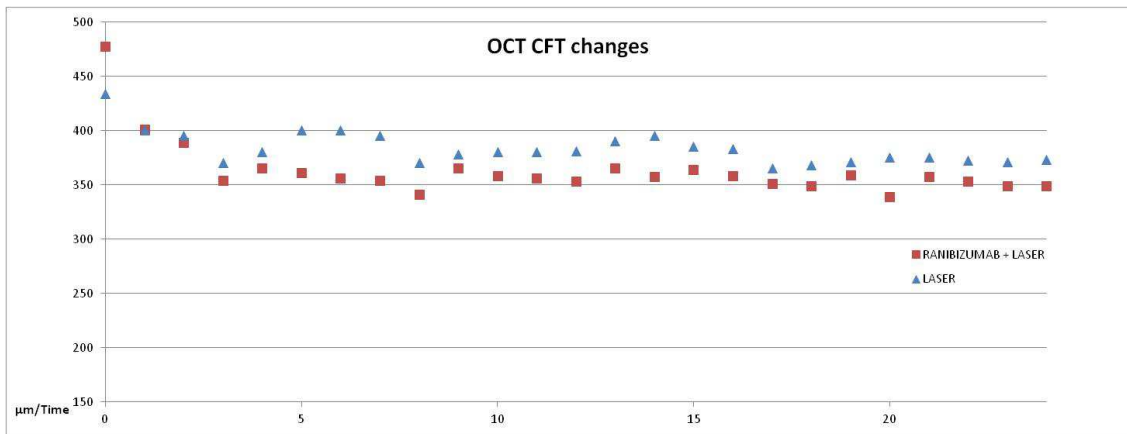
**Fig. 17:** variazioni della acuità visiva media valutata in lettere ETDRS dal primo esame fino alla fine del follow-up, al controllo mensile.



**Fig. 18:** variazioni della acuità visiva media valutata in logMAR ETDRS dal primo esame fino alla fine del follow-up, al controllo mensile.



**Fig. 19:** variazioni della acuità visiva valutata in decimale ETDRS dal primo esame fino alla fine del follow-up, al controllo mensile.



**Fig. 20: modificazioni dello spessore centrale foveale medio (CFT) espresse in micron in OCT durante il follow-up.**

**Tabella 3: risultati alla fine del follow-up**

Findings	Values	p values §
Mean decimal BCVA ± SD		
Laser (A)	0.31(±0.12)	0.07
Lucentis+laser (B)	0.41 (±0.16)	0,0000002
Mean logMAR BCVA ± SD		
Laser (A)	0.52(±0,18)	0.08
Lucentis + laser (B)	0.4 (±6,37)	0,0000002
Mean letter BCVA ± SD		
Laser (A)	26.8 (±14)	0.04
Lucentis + laser (B)	32.8 (±10,08)	0,0000003
Improvement (gain ≥ 1 line) (n. eyes (%))		
Laser (A)	8/25 (32)	Gruppo A =1 line 4/25 (50) = 2 lines 4/25 (50) ≥ 3 lines 0/25 Gruppo B =1 line 0/26 = 2 lines 3/26 (15,8) ≥ 3 lines 16/26 (84,2)
Ranibizumab+laser (B)	19/26 (73)	
Stability (n. eyes (%))		
Laser (A)	12/25 (48)	
Ranibizumab+laser (B)	5/26 (19,3)	
Worsening (loss ≤ 1 line)(n. eyes (%))		
Laser (A)	5/25 (20)	
Ranibizumab +laser (B)	2/26 (7,7)	
Mean OCT* CRT ± SD (microns)		
Laser (A)	373(±35,2)	0,001
Ranibizumab+laser (B)	349 (±31,6)	0,0000003
Mean n. injections	9.8	

§ valore di p nella comparazione tra valori basali e valori alla fine del follow-up

\* CRT = Central Retinal Thickness misurato in OCT

## 8. CONCLUSIONI

Le conclusioni sull'outcome funzionale ottenute da questo lavoro sono perfettamente in linea con i risultati di altri studi portati avanti in precedenza.

La terapia combinata ranibizumab intravitreale associato alla fotocoagulazione laser maculare può essere considerata un'opzione terapeutica più efficace al fine di ottenere un miglioramento dell'acuità visiva nei pazienti affetti da edema maculare diabetico, rispetto alla monoterapia con fotocoagulazione laser maculare.

Oltre al dato funzionale dell'acuità visiva, nei pazienti con DME trattati con ranibizumab e laser, vi è associato un risultato anatomico. Infatti, l'azione della terapia combinata, rispetto alla monoterapia, determina, non solo una maggiore riduzione dello spessore maculare centrale, quale effetto della riduzione della iperpermeabilità vascolare, ma anche una riduzione del numero dei foci iperreflettenti presenti negli strati retinici esterni.

Inoltre, nell'edema maculare diabetico, i foci iperreflettenti possono essere considerati dei marker di bassa acuità visiva.

Pertanto, la presenza dei foci iperreflettenti negli strati retinici esterni, in pazienti con DME da sottoporre a trattamento, da un lato è correlata con un'acuità visiva iniziale più bassa e dall'altro può predire una peggiore prognosi post-trattamento.

In definitiva, nonostante il numero esiguo di pazienti esaminati, il nostro studio ha prodotto dei risultati sicuramente interessanti; tuttavia, sarebbe opportuno analizzare un campione più grande di pazienti. Nello stesso tempo, sarebbe altresì opportuno trovare un metodo standardizzato che consenta una precisa valutazione del numero dei foci, oltre al comportamento degli stessi foci in funzione delle diverse terapie utilizzate.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112: 1217-28.
2. Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122:552-63.
3. Petrella RJ, et al. Prevalence, demographics, and treatment characteristics of visual impairment due to diabetic macular edema in a representative Canadian cohort. *Journal of Ophthalmology.* 2012; 2012: 159167
4. Mohamed Q, et al. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 2007; 298: 902-916.
5. Klein R et al. Diabetics cataracts: mechanism and management. *Diabetes metab Res Rev* 2010; 26: 172-180.
6. International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas- 2013; Sixth Edition: 1-160.*
7. Chen E, et al. Burden of illness of diabetic macular edema: literature review. *Current Medical Research & Opinion* 2010; 26: 1587-1597.
8. Hirai FE, Moss SE, Klein BE. Relationship of glycemic control, exogenous insulin, and C-peptide levels to ischemic heart disease mortality over a 16-year period in people with older-onset diabetes: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR). *Diabetes Care.* 2008 Mar;31(3):493-7. Epub 2007 Nov 19.
9. Yanoff M., Duker J.S., *Trattato di Oftalmologia, Vol. 2, Antonio Delfino Editore.*

10. Kearns M, Hamilton AM, Kohner EM. Excessive permeability in diabetic maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1979; 63: 489-97.
11. Bresnick GH. Diabetic retinopathy. In Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF, eds. *Principles and practice of ophthalmology*. Philadelphia: WB Saunders 1980, pp. 1237-41.
12. Tico U, Patz A. The role of capillary perfusion in the management of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 1973; 76: 880-6.
13. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation therapy for diabetic eye disease. *JAMA*. 1985 Dec 6; 254(21):3086.
14. Nasrallah FP, Jalkh AE, Van Coppenolle F et al. The role of the vitreous in diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 1988 Oct; 95(10):1335-9.
15. Weinberger D, Fink-Cohen S, Gatton DD, et al. Non-retinovascular leakage in diabetic maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 728-31.
16. Hee MR, Puliafito CA, Wong C, et al. Quantitative assessment of macular edema with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 1995, 113: 1019-29.
17. Qin Y, Xu G, Wang W. Dendritic abnormalities in retinal ganglion cells of three-month diabetic rats. *Curr Eye Res*. 2006 Nov; 31(11):967-74.
18. Tang J, Kern TS, inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2011; 30: 343-58
19. Ehrlich R, Harris A, Ciulla TA, et al. Diabetic macular oedema: physical, physiological and molecular factors contribute to this pathological process. *Acta Ophthalmol*. 2010; 88: 279-91.
20. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, et al. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin invest*. 1998. 102: 783-91.



21. Kern TS, Baber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol*. 2008; 15; 586: 4401-8.
22. Tikhonenko M, Lydic TA, Wang Y, et al. Remodelling of retinal Fatty acids in an animal model of diabetes: a decrease in long-chain polyunsaturated fatty acids is associated with a decrease in fatty acid elongases Elov12 and Elov14. *Diabetes*. 2010; 59: 219-27.
23. El-Asrar AM, Missotten L, Geboes K. Expression of ciclo-oxygenase-2 and downstream enzymes in diabetic fibrovascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 1534-9.
24. Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287: R735-41.
25. Kocak N, Alacacioglu I, Kaynak S et al. Comparison of vitreous and plasma levels of vascular endothelial growth factor, interleukin-6 and hepatocyte growth factor in diabetic and non-diabetic retinal detachment cases. *Ann Ophthalmol*. 2010;42 Spec No:10-4.
26. Krady JK, Basu A, Allen CM et al. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2005;54(5):1559-65.
27. Wang XH<sup>1</sup>, Chen SF, Jin HM et al. Differential analyses of angiogenesis and expression of growth factors in micro- and macrovascular endothelial cells of type 2 diabetic rats. *Life Sci*. 2009 Feb 13;84(7-8):240-9.
28. Bandello F, Roman Pognuz D, Menchini F, et al. Maculopatia diabetica. *G It Diabetol Metab* 2006; 26: 125-134.
29. Wilson DJ, Finkelstein D, Quigley HA, et al. Macular grid photocoagulation. An experimental study on the primate retina. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:100-5.

30. Ogata N, Tombran-Tink J, Jo N et al. Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation. *Am J Ophthalmol* 2001; 132:427-9.
31. Akduman L, Olk J. Diode laser (810 nm) versus Argon green (514 nm) modified grid photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. *Ophthalmology* 1977; 104: 1433-41.
32. Aiello LP<sup>1</sup>, Edwards AR, Beck RW, et al. Factors associated with improvement and worsening of visual acuity 2 years after focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2010 May;117(5):946-53.
33. Lewis H, Abrams GW, Blumenkranz MS, Campo RV. Vitrectomy for diabetic macula traction and edema associated with posterior hyaloidal traction. *Ophthalmology* 1992; 99: 753-9.
34. Harbour JW, Smiddy WE, Flynn HW, Rubsamen PE. Vitrectomy for diabetic macular edema associated with a thickened and taut posterior hyaloid membrane. *Am J Ophthalmol* 1996; 121:405-13.
35. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 391– 400.
36. Sivaprasad S, Browning RC, Starita C. An open label, one year, noncomparative study to evaluate the safety and tolerability of intravitreal pegaptanib sodium in patients with diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*. 2014; 8: 1565-71.
37. Elman MJ, Aiello LP, Beck RW, et al. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. The Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. *Ophthalmology* 2010;117:1064–1077
38. Elman MJ, Bressler NM, Qin H, et al. Expanded 2-Year Follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus

- prompt laser for diabetic macular edema. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. *Ophthalmology* 2011;118:609–614.
39. Elman MJ, Qin H, Aiello LP et al. Intravitreal Ranibizumab for Diabetic Macular Edema with Prompt versus Deferred Laser Treatment. Three-Year Randomized Trial Results. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. *Ophthalmology* 2012;119:2312–2318
40. Nguyen QD, Shah SM, Heier JS et al. Primary end point (six months) results of the ranibizumab for edema of the macula in diabetes. Read-2 Study. *Ophthalmology*. 2009;116:2175-81.
41. Nguyen QD, Shah SM, Khwaja AA et al. Two-year outcomes of the ranibizumab for edema of the macula in diabetes. Read-2 Study. *Ophthalmology* 2010; 117: 2146-52
42. Brown DM, Nguyen QD, Marcus DM et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: Results from 2 Phase III Randomized trials: Rise and Ride. *Ophthalmology* 2012;119:789–801
43. Brown DM, Nguyen QD, Marcus DM et al. Long-term Outcomes of Ranibizumab Therapy for Diabetic Macular Edema: The 36-Month Results from Two Phase III Trials. RISE and RIDE. *Ophthalmology* 2013; 1-10
44. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U et al. The RESTORE Study. Ranibizumab Monotherapy or Combined with Laser versus Laser Monotherapy for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* 2011;118:615–625
45. Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Holz FG. Three-Year Outcomes of Individualized Ranibizumab Treatment in Patients with Diabetic Macular Edema. The RESTORE Extension Study. *Ophthalmology* 2014;121:1045-1053
46. Massin P, Bandello F, Garweg JG, et al. Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-

- month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. *Diabetes Care*. 2010 Nov;33(11):2399-405
47. Murakami T e Yoshimura N. structural changes in individual retinal layers in diabetic edema. *J Diabetes Res*. 2013; 2013: 920.713
48. Otani T, Kishi S, Maruyama Y. Patterns of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 1999; 127: 688-93.
49. Nishijima K, Murakami T, Hirashima T, et al. Hyperreflective foci in outer retina predictive of photoreceptor damage and poor vision after vitrectomy for diabetic macular edema. *Retina*. 2014;34(4):732-40.
50. Ito S, Miyamoto N, Ishida K et al. Association between external limiting membrane status and visual acuity in diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol*. 2013 Feb;97(2):228-32.
51. Spaide RF, Curcio CA. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina*. 2011 Sep;31(8):1609-19.
52. Shin HJ , Lee SH , Chung H et al. Association between photoreceptor integrity and visual outcome in diabetic macular edema. 2012 Jan; 250 (1): 61-70.
53. Bolz M, Schmidt-Erfurth U, Deak G et al. Optical coherence tomographic hyperreflective foci: a morphologic sign of lipid extravasation in diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2009 May;116(5).
54. Framme C, Schweizer P, Imesch M. Behavior of SD- OCT- detected hyperreflective foci in the retina of antiVEGF-treated patients with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 24; 53: 5814-8.

55. Vujosevic S<sup>1</sup>, Bini S<sup>1</sup>, Midena G. Hyperreflective intraretinal spots in diabetics without and with nonproliferative diabetic retinopathy: an in vivo study using spectral domain OCT. *J Diabetes Res.* 2013;2013:491835
56. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology.* 2012;119.
57. Pemp B, Deák G, Prager S et al. Distribution of intraretinal exudates in diabetic macular edema during anti-vascular endothelial growth factor therapy observed by spectral domain optical coherence tomography and fundus photography. *Retina.* 2014 Dec;34(12):2407.
58. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber et al S. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2007 Feb;3(1):3-14.
59. Uji A, Murakami T, Nishijima K, et al. Association between hyperreflective foci in the outer retina, status of photoreceptor layer, and visual acuity in diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2012;153:710-7, 717.
60. Ogino K, Murakami T, Tsujikawa A et al. Characteristics of optical coherence tomographic hyperreflective foci in retinal vein occlusion. *Retina.* 2012;32(1):77-85.
61. Deák GG, Bolz M, Kriechbaum K et al. Effect of retinal photocoagulation on intraretinal lipid exudates in diabetic macular edema documented by optical coherence tomography. *Diabetic Retinopathy Research Group Vienna. Ophthalmology.* 2010; 117(4):773-9.