

(21)

Prawidłowe i patologiczne obrazy badania optycznej koherentnej tomografii siatkówki – interpretacja w korelacji z obrazem histologicznym

The interpretation of normal and pathological optical coherence tomography retinal image as compared to their histological cross-sections

Michał Duchnik¹, Anna Machalińska^{1,2}, Barbara Wiszniewska¹

¹ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Barbara Wiszniewska

² Klinika Okulistyki SPSK-2 w Szczecinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wojciech Lubiński

Streszczenie:	Rozwój technologiczny, który dokonał się w ostatnich latach, sprawił, że obrazowanie siatkówki oka za pomocą optycznej koherentnej tomografii dostarcza jakościowych danych o wartości informacyjnej zbliżonej do wartości danych pozyskiwanych za pomocą konwencjonalnych technik histologicznych. Korelacja obrazów optycznej koherentnej tomografii z obrazami histologicznymi siatkówki o prawidłowej morfologii pozwala na identyfikację jej głównych struktur anatomicznych. W przypadku patologicznie zmienionej siatkówki możliwe jest uwidocznienie patofizjologicznych procesów odpowiedzialnych za zaburzenie jej refleksyjności, takich jak aktywacja apoptozy i nekrozy, naciek komórek fagocytarnych oraz akumulacja barwnika w komórkach glejowych.
Słowa kluczowe:	optyczna koherentna tomografia, anatomia siatkówki, obrazowanie siatkówki.
Summary:	Due to technological advances that have taken place in recent years, optical coherence tomography retinal imaging provides qualitative data of informational value similar to the one of data obtained with conventional histological techniques. Correlation of optical coherence tomography images with histological retinal cross-sections enables the identification of the major retinal layers and anatomical structures. If the retina is pathologically altered, it is possible to visualize pathophysiological processes responsible for reflectivity changes, such as: activation of apoptosis and necrosis, phagocytic cell infiltration and dye accumulation in glial cells.
Key words:	optical coherence tomography, retinal anatomy, retinal imaging.

Optyczna koherentna tomografia (Optical Coherence Tomography – OCT) jest narzędziem pozwalającym na pozyskanie obrazów wewnętrznej struktury obiektów częściowo przezroczystych dla światła w trzech wymiarach przestrzennych (1). Rozchodzenie się fal elektromagnetycznych w ośrodkach niehomogennych zależy od długości (częstotliwości) fal, stosunku współczynnika rozpraszania do współczynnika absorpcji oraz grubości warstwy (natężenie światła maleje wykładniczo wraz ze wzrostem grubości). Im bardziej sąsiadujące ośrodki różnią się pod względem właściwości optycznych, tym większy jest ich kontrast i wyraźniej zarysowana granica między nimi (2).

Globalny współczynnik załamania światła dla siatkówki wynosi 1,35 (3). Sygnał pochodzący z poszczególnych jej warstw jest uśrednionym współczynnikiem refrakcji komponentów wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych danej warstwy. Różnice współczynników refrakcji między poszczególnymi warstwami wynikają z różnic w ich architekturze i organizacji przestrzennej. Prowadzi to do niejednorodnej dystrybucji gęstości optycznej poszczególnych struktur tkankowych i modyfikacji

sygnału wiązki obiektowej pochodzącego z badanej okolicy (4). Gęstość optyczna zależy od przepuszczalności ośrodka, czyli stosunku mocy promieniowania padającego do mocy promieniowania po przejściu przez tkankę. Intensywność rozpraszanego światła jest kodowana w skali barwnej lub w skali odcieni szarości, to oznacza, że im większe jest rozpraszanie, tym jaśniejszy obrazowany ośrodek. W ośrodkach gęstych optycznie – hiperrefleksyjnych – wyraźnie dominuje zjawisko rozpraszania wiązki obiektowej. Na tomogramach są one widoczne w postaci jasnych prążków. Ośrodki o mniejszej gęstości optycznej – hiporefleksyjne – charakteryzują się mniejszym rozpraszaniem i w większym stopniu przepuszczają światło. Na tomogramach są one reprezentowane jako ciemne obszary. Podobna sytuacja może mieć miejsce w ośrodkach gęstych optycznie, o niskiej transmitancji i wysokim współczynniku absorpcji promieniowania, gdy większa część sondującej wiązki jest pochłaniana przez badany obiekt. Opisane zjawisko jest dobrze widoczne podczas obrazowania naczyń krwionośnych siatkówki. Hemoglobina zawarta we krwi jest chromoforem silnie absorbującym

promieniowanie, to sprawia, że naczynia rzucają „cień” na warstwy leżące poniżej. Należy podkreślić, że kolejne warstwy badanego obiektu w różnym stopniu rozpraszają światło, absorbują je i przepuszczają. Suma sygnałów z poszczególnych punktów przestrzennych składa się na obraz OCT (4, 5).

1. Interpretacja prawidłowego obrazu OCT siatkówki

1.1. Identyfikacja anatomiczna wewnętrznych warstw siatkówki

Skan B OCT siatkówki jest dowolnym przekrojem poprzecznym, który przedstawia mikrostruktury siatkówki zorganizowane w warstwy różniące się gęstością optyczną. Analogicznie na obrazach histologicznych siatkówki zlokalizowanej poza dołkiem środkowym można wyróżnić dziesięć podstawowych warstw. Na pograniczu siatkówki i ciała szklonego znajduje się błona graniczna wewnętrzna (Internal Limiting Membrane – ILM) utworzona przez podstawne części komórek Müllera i astrocycy. Staje się widoczna na skanach OCT dopiero w warunkach patologicznych, jako błona nasiatkówkowa (Epi-retinal Membrane – ERM) będąca wynikiem awaskularnej proliferacji komórek glejowych na powierzchni siatkówki. Poniżej jest widoczna hiperrefleksyjna warstwa włókien nerwowych (Retinal Nerve Fibre Layer – RNFL) składająca się z bezrdzennych aksonów komórek zwojowych. Intensywność sygnału pochodzącego z tej warstwy wynika z dużej gęstości optycznej ciasno upakowanych włókien nerwowych. Jest ona najgrubsza w okolicy tarczy nerwu wzrokowego i ulega stopniowemu ścięciu w kierunku siatkówki obwodowej. Analogicznie wszystkie warstwy aksodendrytyczne będące skupiskami wypustek komórek nerwowych charakteryzują się zwiększonym rozpraszaniem wiązki obiektowej. Kolejną warstwą, możliwą do odróżnienia na skanach wysokiej rozdzielczości, jest warstwa komórek zwojowych (Ganglion Cell Layer – GCL) składająca się z perikarionów komórek zwojowych. Jest ona warstwą hiporefleksyjną o mniejszej intensywności sygnału niż RNFL (optycznie gęste jądra komórkowe są od siebie równomiernie oddalone, a cytoplazma znajdująca się między nimi charakteryzuje się niskim współczynnikiem refrakcji). Przylegający hiperrefleksyjny prążek o znacznej grubości i pośredniej intensywności reprezentuje warstwę spłotową wewnętrzną (Inner Plexiform Layer – IPL), w obrębie której znajdują się połączenia między aksonami komórek dwubiegunowych i amakrynowych a dendrytami komórek zwojowych. Poniżej jest widoczna hiporefleksyjna warstwa ziarnista wewnętrzna (Inner Nuclear Layer – INL) o wyraźnie mniejszej intensywności sygnału, w jej skład wchodzi jądra komórek dwubiegunowych, poziomych i amakrynowych oraz jądra komórek glejowych Müllera (6).

Kierując się ku naczyniówce, napotykamy warstwę spłotową zewnętrzną (Outer Plexiform Layer – OPL) reprezentowaną przez prążek o intensywności sygnału zbliżonej do intensywności sygnału IPL, lecz znacznie cieńszy. W jej skład wchodzi aksony komórek pręcikonośnych i czopkonośnych łączące się z dendrytami komórek dwubiegunowych, amakrynowych i poziomych. Jądra komórek fotoreceptorowych układają się w kilkanaście warstw, którym odpowiada ciemny hiporefleksyjny obszar w obrazie OCT. Tworzą one warstwę ziarnistą zewnętrzną (Outer Nuclear Layer – ONL). W okolicy plamki na skanach OCT jest ona szersza w porównaniu do rzeczywistej grubości widocznej na obrazie histologicznym siatkówki. Dowie-

dzono, że obrazowanie tego obszaru pod zmiennym kątem padania wiązki obiektowej pozwala na rozróżnienie w nim obszaru szerszej części wewnętrznej prążka składającej się z aksonów komórek fotoreceptorowych – włókien Henlego (Henle's nerve fiber layer – HNFL), oraz części zewnętrznej, która odpowiada faktycznej warstwie ziarnistej zewnętrznej. Podobnego wzorca refleksyjności nie obserwuje się w części obwodowej siatkówki (7).

1.2. Identyfikacja anatomiczna zewnętrznych warstw siatkówki

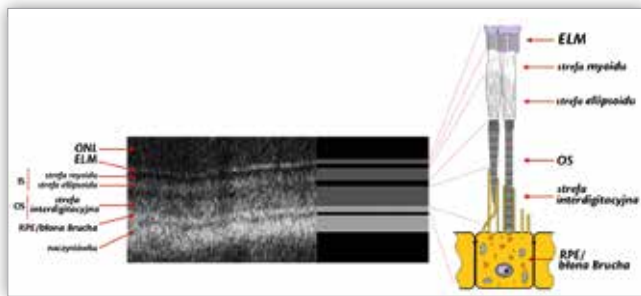
Niewątpliwie rozróżnienie wewnętrznych warstw siatkówki i ich identyfikacja są jednoznaczne, morfologiczna desygnacja struktur zewnętrznych warstw siatkówki na skanach OCT natomiast do niedawna budziła kontrowersje i była przedmiotem dyskusji (8).

Po raz pierwszy obraz OCT ludzkiej siatkówki *in vivo* opublikowano w 1993 roku, wówczas pojawiły się problemy z jego interpretacją (9, 10). Niska rozdzielczość osiowa aparatu była niewystarczająca do obrazowania zewnętrznej warstwy siatkówki. Jej złożona budowa była reprezentowana na skanach OCT jako dwa hiperrefleksyjne prążki. Ze względu na mały kontrast powodujący zatarcie granic między sąsiadującymi ośrodkami rozpraszania ich desygnacja anatomiczna była jedynie orientacyjna.

Poprawa rozdzielczości osiowej aparatów OCT umożliwiła wykazanie subtelnych różnic w refleksyjności struktur kompleksu nabłonka barwnikowego siatkówki i fotoreceptorów (Retinal Pigment Epithelium-Photoreceptor complex – RPE-PR complex), których reprezentację stanowiły trzy oddzielne hiperrefleksyjne prążki. Ówczesna ich interpretacja wskazywała odpowiednio na zewnętrzne segmenty fotoreceptorów, nabłonek barwnikowy siatkówki oraz naczyniówkę jako źródło intensywnego sygnału (11). Jednakże bezpośrednia korelacja uzyskanych obrazów z obrazem histologicznym siatkówki w modelu zwierzęcym wykazała, że stanowią one odpowiednio wewnętrzne i zewnętrzne segmenty fotoreceptorów oraz RPE (12, 13). Granica między IS (Inner Segment – IS) a OS (Outer Segment – OS) fotoreceptorów jedynie nieznacznie rozpraszała wiązkę obiektową. Należy podkreślić, że badający to zjawisko posłużyli się negatywem obrazu OCT siatkówki, na którym ośrodki silnie rozpraszające wiązkę obiektową w kierunku wstecznym były reprezentowane jako ciemne obszary. I odwrotnie, struktury o niskiej gęstości optycznej były widoczne w postaci jasnych prążków. Prążki odpowiadające IS i OS fotoreceptorów oraz RPE zatem były ciemne, granica między IS a OS natomiast była jasna, to odpowiadało względnie małemu rozpraszaniu wiązki obiektowej w tym obszarze. W 2003 roku Drexler i wsp. opublikowali obrazy OCT ludzkiej plamki w ultrawysokiej rozdzielczości (14). Opisy poszczególnych prążków zewnętrznej warstwy siatkówki zaadaptowali jednak z wcześniejszych publikacji i oznaczyli sekwencję ciemny–jasny–ciemny prążek jako IS fotoreceptorów, granica między IS a OS oraz OS fotoreceptorów. Niestety, wykonane przez nich skany siatkówki były pozytywami, to oznaczało, że ośrodki silnie rozpraszające wiązkę obiektową są reprezentowane przez jasne obszary, i doprowadziło do błędnej interpretacji prążków, których desygnację anatomiczną zaczerpnięto z negatywu. W konsekwencji granica między IS a OS została opisana jako struktura silnie rozpraszająca światło, a ten błąd był powielany przez innych autorów w późniejszych publikacjach (7, 8).

Komercyjnie dostępne nowoczesne aparaty OCT wysokiej rozdzielczości umożliwiają lepszą wizualizację zewnętrznych warstw siatkówki i pozwalają na rozdzielenie co najmniej czterech oddzielnych prążków w jej obszarze. W 2005 roku Zawadzki i wsp. zaproponowali następującą desygnację anatomiczną prążków zewnętrznej warstwy siatkówki: I prążek – błona graniczna zewnętrzna, II prążek – rzęśka łącząca zewnętrzną i wewnętrzną segmenty fotoreceptorów, III prążek – błona Verhoeffa (Verhoeff's membrane) stanowiąca kompleks ścisłych połączeń szczytowych powierzchni komórek RPE, i IV prążek – RPE (15). W 2011 roku Spaide i wsp. zakwestionowali ww. desygnację prążków II i III, wskazując, że rzęśka łącząca o średnicy zaledwie 0,25 μm oraz błona Verhoeffa nie mogą być reprezentowane jako oddzielne prążki (16).

W 2014 roku międzynarodowy zespół specjalistów z zakresu diagnostyki obrazowej siatkówki podjął próbę desygnacji anatomicznej prążków widocznych na skanach OCT oraz usystematyzował terminologię niezbędną do ich prawidłowej interpretacji (ryc. 1.) (7).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający interpretację i proponowaną desygnację anatomiczną prążków widocznych na skanie OCT siatkówki myszy szczepu C57BL6 o prawidłowej morfologii. ONL – warstwa ziarnista zewnętrzna, ELM – błona graniczna zewnętrzna, IS – wewnętrzny segment komórki fotoreceptorowej, OS – zewnętrzny segment komórki fotoreceptorowej, RPE – nabłonek barwnikowy siatkówki

Fig. 1. Proposed interpretation and anatomical designation of the bands seen on the OCT scans of normal C57BL6 mouse retina. ONL – outer nuclear layer, ELM – external limiting membrane, IS – photoreceptor inner segment, OS – photoreceptor outer segment, RPE – retinal pigment epithelium

Zgodnie z zaproponowaną interpretacją jasny prążek widoczny w zewnętrznej części ONL reprezentuje błonę graniczną zewnętrzną (External Limiting Membrane – ELM), którą tworzą cytoplazmatyczne wypustki cylindryczne komórek glejowych Müllera. Z kolei hiporefleksyjna strefa, zlokalizowana poniżej ELM, stanowi „myoid” wewnętrznego segmentu komórki fotoreceptorowej, w skład którego wchodzi organella komórkowe, m.in.: retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, rybosomy oraz pojedyncze mitochondria. Wyraźnie mniejsza intensywność sygnału pochodzącego z tego obszaru jest związana z niską gęstością optyczną struktur wchodzących w jego skład (7, 8). W przeciwieństwie do obrazu OCT „myoid” jest wyraźnie widoczny na obrazach histologicznych (zawiera ciała Nissla barwiące się fioletem krezylu) (17).

Dystalny odcinek IS komórki fotoreceptorowej nazwano „elipsoidem”. Zawiera on długie, cienkie i gęsto upakowane mitochondria ułożone równolegle do siebie. Taka organizacja przestrzenna zwiększa rozpraszanie wiązki obiektowej. Na skanach OCT „elipsoid” jest widoczny jako jasny, hiperrefleksyjny prążek i stanowi II prążek zewnętrznej części siatkówki (7, 8). Na granicy z zewnętrznym segmentem komórki fotoreceptorowej tworzy on przewężenie nazywane rzęśką łączącą (8, 12, 13).

Odcinek OS składa się z cylindrycznych pręcików i stożkowatych czopków utworzonych przez dyskowate uwypuklenia błony komórkowej, które zawierają światłoczuły barwnik. Niski współczynnik refrakcji ($n = 1,34$) powoduje, że warstwa ta jest hiporefleksyjna na skanach OCT. W części dystalnej zewnętrzne segmenty fotoreceptorów sąsiadują z RPE. Dane uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej sugerują jednak, że zakończenia OS komórek czopkowości nie kontaktują się bezpośrednio z apikalną powierzchnią komórek RPE, lecz kończą się tuż ponad nią, pozostawiając niewielką przestrzeń (8, 16). Wykazano, że wypustki komórek RPE otaczają zakończenia OS na około 1/3 ich długości (contact cylinder). Wypustki te zawierają mitochondria i rybosomy oraz ziarna melaniny o wysokim współczynniku refrakcji ($n = 1,41$) (3, 17) i razem z zakończeniami OS fotoreceptorów są widoczne na skanach OCT jako III hiperrefleksyjny prążek zewnętrznej części siatkówki – określane mianem strefy międzywypustkowej (interdigitation zone) (7, 8, 18).

Położony najbardziej zewnętrznym hiperrefleksyjny prążek widoczny na skanach OCT odzwierciedla warstwę nabłonka barwnikowego siatkówki i błonę Brucha. Warstwy te mają zbliżoną intensywność sygnału i w siatkówce o prawidłowej morfologii nie można ich odróżnić na obrazach OCT. Nabłonek barwnikowy siatkówki jest zbudowany z jednego rzędu sześciennych komórek, których powierzchnie podstawno-boczne tworzą ścisłe połączenia (tab. I) (8, 19).

Struktury hiporefleksyjne/ Hyporeflexive structures	Struktury hiperrefleksyjne/ Hyperreflexive structures
warstwa komórek zwojowych/ ganglion cell layer	warstwa włókien nerwowych/ nerve fiber layer
warstwa ziarnista wewnętrzna/ inner nuclear layer	warstwa splotowata wewnętrzna/ inner plexiform layer
warstwa włókien Henlego/ Henle's nerve fibre layer	warstwa splotowata zewnętrzna/ outer plexiform layer
warstwa ziarnista zewnętrzna/ outer nuclear layer	błona graniczna zewnętrzna/ external limiting membrane
strefa „myoidu” IS/ myoid zone of the photoreceptors	strefa „ellipsoid” IS/ ellipsoid zone of the photoreceptors
zewnętrzne segmenty fotoreceptorów/ outer segments of the photoreceptors	strefa interdigitacyjna/ interdigitation zone
	nabłonek barwnikowy siatkówki i błona Brucha/ retinal pigment epithelium and Bruch's membrane

Tab. I. Identyfikacja anatomiczna prążków widocznych na skanach OCT opracowana przez międzynarodowy zespół specjalistów z dziedziny diagnostyki obrazowej siatkówki (International Nomenclature for Optical Coherence Tomography Panel, 2014) (7).

Tab. I. Anatomical designation of bands visible in the OCT scans, developed by the international panel of retinal imaging experts (International Nomenclature for Optical Coherence Tomography Panel, 2014) (7).

Obrazowanie naczyńki metodami polegającymi na zwiększonej penetracji wiązki obiektowej pozwala na wyodrębnienie warstw o zróżnicowanej refleksyjności. Najbardziej wewnętrznym obszarem naczyńki odpowiadającym blaszce naczyń włosowatych

naczyniówki jest względnie hiporefleksyjny. Ograniczenia w rozdzielczości współczesnych metod obrazowania uniemożliwiają jej jednoznaczną identyfikację w warunkach fizjologicznych. Zlokalizowane dystalnie, małe i hiperrefleksyjne struktury reprezentują tętniczki odżywcze i żyłki drenujące do blaszki naczyń włosowatych. Dokładne rozróżnienie leżących poniżej naczyń krwionośnych naczyniówki średniego kalibru (warstwy Sattlera) i dużego kalibru (warstwy Hallera) jest trudne tym bardziej, że definicje histologiczne tych warstw również nie są jednoznaczne. Niemniej jednak najbardziej właściwe wydaje się przypisanie małych i dużych owalnych struktur, o hiperrefleksyjnych konturach i hiporefleksyjnym wnętrzu, przypominających przekroje przez naczynia krwionośne, odpowiednio do warstwy Sattlera i warstwy Hallera (7).

2. Interpretacja patologicznego obrazu OCT siatkówki

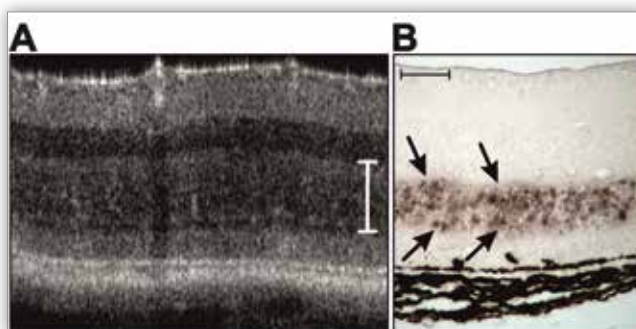
Badanie OCT umożliwia wczesną diagnostykę chorób siatkówki, monitorowanie ich progresji, ocenę odpowiedzi na terapię i ustalenie rokowania. Interpretacja patologii widocznych na obrazie OCT opiera się w dużej mierze na analizie obrazu klinicznego. Jednak dopiero korelacja obrazów OCT z obrazami histologicznymi pozwala na jednoznaczną identyfikację procesów patologicznych, które korespondują ze zmianami morfologicznymi obserwowanymi na dwuwymiarowych skanach OCT.

Wiele doniesień, w których opisano wpływ procesów apoptozy i martwicy na zmiany obrazu OCT, wskazuje na istotny wpływ tych zjawisk na refleksyjność objętych nimi obszarów siatkówki (20). W komórce podlegającej apoptozie dochodzi do odwodnienia cytoplazmy, kondensacji chromatyny, fragmentacji jądra komórkowego, obrzęku mitochondriów, zmian w składzie chemicznym i przebudowy cytoszkieletu, prowadzących do wytworzenia ciałek apoptotycznych. Procesy te skutkują zwiększeniem gęstości optycznej tkanki i zwiększeniem rozpraszania światła, jest to widoczne jako wzrost intensywności sygnału na obrazie OCT (21). Ponadto zaburzenie architektoniki komórek powoduje zmianę ich orientacji i organizacji przestrzennej (22). Jest to szczególnie istotne w warstwie pręcików i czopków, w obrębie której wewnętrzne i zewnętrzne segmenty fotoreceptorów są uporządkowane w sposób, który zapewnia maksymalną przepuszczalność padającej wiązki (23). Naruszenie tej konfiguracji przestrzennej jest czynnikiem powodującym zwiększone rozpraszanie światła w tej warstwie i determinuje zwiększoną refleksyjność na skanach OCT (ryc. 2.) (24).

Zwiększenie refleksyjności (hiperrefleksyjność) poszczególnych obszarów warstw może być spowodowane naciekiem z komórek zapalnych, włóknieniem i bliznowaceniem, wysiękami twardymi czy krwią (25). Korelacja obrazów OCT z obrazami histologicznymi pozwala jednoznacznie potwierdzić, że komórki fagocytarne znajdują odzwierciedlenie na skanach OCT jako silnie hiperrefleksyjne ośrodki rozpraszania (ryc. 3.) (26, 27).

Podobnie depozyty melaniny uwolnionej w następstwie destrukcji RPE są widoczne na skanach OCT w postaci hiperrefleksyjnych ośrodków rozciągających się w obszarze wewnętrznej warstwy siatkówki. Analiza histologiczna potwierdza, że odpowiadają one złogom melaniny rozmieszczonym wzdłuż wypustek komórek glijowych i wskazują bezpośrednio na miejsca uszkodzenia RPE (ryc. 4.) (26, 27).

Zmniejszenie refleksyjności (hiporefleksyjność) może wynikać z obrzęku siatkówki, obecności płynu surowiczego i hi-

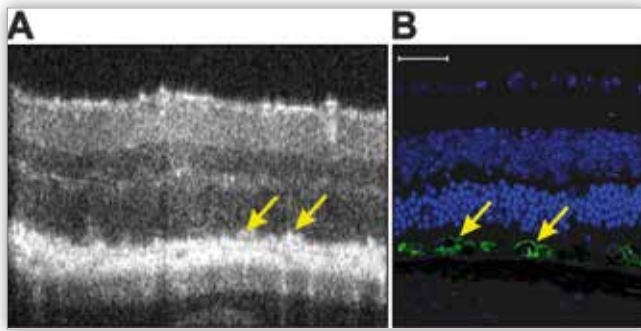


Ryc. 2. Obraz OCT (A) i obraz histologiczny (B) siatkówki myszy szczepu C57BL/6 w 3. dobie po indukcji uszkodzenia siatkówki. Obrazy przedstawiają identyczną lokalizację poszczególnych warstw w siatkówce oka, niezależnie od zastosowanej metody obrazowania. Preparat histologiczny zabarwiono metodą TUNEL w celu detekcji komórek apoptotycznych. Komórki i ciała apoptotyczne uległy zabarwieniu na kolor jasnobrązowy (czarne strzałki). Ich rozmieszczenie koreluje z organizacją przestrzenną ośrodków rozpraszania na skanach OCT widocznych w obszarze warstwy jądrazstej zewnętrznej (ONL). Refleksyjność prążka reprezentującego ONL stała się zbliżona do refleksyjności prążka, który odpowiada warstwie spłotowatej zewnętrznej (biały znacznik), to uniemożliwia jednoznaczną identyfikację powyższych warstw. Obszar rozciągający się między granicami prążków odpowiadających ONL i RPE jest jednorodnie hiperrefleksyjny, to może świadczyć o postępującej dezorganizacji przestrzennej struktur wchodzących w jego skład. Skala = 50 μm . Powiększenie obiektywu 40x (26, 27).

Fig. 2. Comparison of the OCT cross-sectional image (A) with a histological section (B) of C57BL/6 mouse retina on the 3rd day following retinal injury induction. Images show the same location of the individual retinal layers, regardless of the imaging method. The TUNEL assay was performed to detect apoptotic cells in histological section. Apoptotic cells and bodies were stained in brown (black arrows). The distribution and spatial organization of scattering centers within the outer nuclear layer (ONL) in the OCT scans correlates with TUNEL-positive structures in the histological images. The reflectivity of bands representing both ONL outer plexiform layer (OPL) has become similar and indistinguishable (white marker). The area extending between the boundaries of the bands representing ONL and RPE is homogeneously hyperreflective, which indicates their progressive decomposition. Scale bar = 50 μm . Magnification 40x (26, 27).

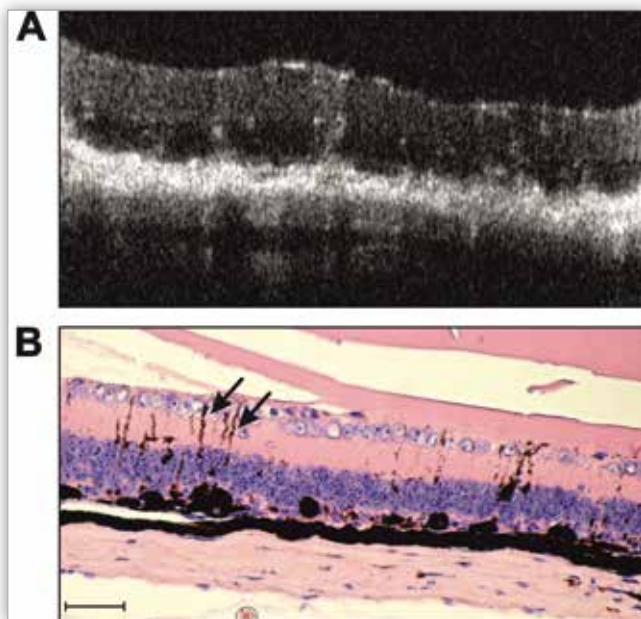
popigmentacji nabłonka barwnikowego siatkówki. Rozróżnienia między krwią, płynem surowiczym i wysiękiem twardym można dokonać poprzez analizę refleksyjności. Krew powoduje wzmocnienie refleksyjności i jednoczesną atenuację (osłabienie) sygnału. Jeśli wynaczyniona krew układa się w postaci cienkiej warstwy wewnątrz siatkówki, na obrazie OCT jest widoczna jako cienki hiperrefleksyjny prążek i powoduje jedynie nieznaczne osłabienie sygnału pochodzącego z niżej położonych warstw. W przypadku rozlanego krwotoku, zajmującego całą lub prawie całą grubość siatkówki, absorpcja hemoglobiny zawartej w erytrocytach powoduje całkowite wygaszenie sygnału pochodzącego z głębszych rejonów tylnego bieguna gałki ocznej. Płyn surowiczy jest optycznie przezroczysty. Na obrazie OCT przedstawia się jako ciemna i jednorodna przestrzeń. Wysięk twardy charakteryzuje się pośrednią refleksyjnością (28).

Podsumowując, optyczna koherentna tomografia jest nieinwazyjnym, powtarzalnym i czułym narzędziem do obrazowania



Ryc. 3. Obraz OCT siatkówki myszy szczepu C57BL6 w 14. dobie po indukcji uszkodzenia siatkówki. Żółte strzałki wskazują na hiperrefleksyjny obszar rozciągający się wzdłuż linii błony Brucha (A). Obraz z konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego przedstawia identyczną lokalizację poszczególnych warstw w siatkówce oka u tego samego osobnika. Reakcję immunofluorescencyjną wykonano w celu uwidocznienia zewnątrzkomórkowej ekspresji izolektyny IB4 (kolor zielony) – glikoproteiny obecnej na powierzchni aktywowanych makrofagów. Jądra komórkowe uwidoczniono za pomocą barwnika DAPI (kolor niebieski) (B). Skala = 50 μm . Powiększenie obiektywu 40x (26, 27).

Fig. 3. The OCT cross-sectional image of C57BL6 mouse retina on the 14th day after retinal injury induction. Yellow arrows indicate hyperreflective area extending along the Bruch's membrane (A). The immunofluorescence image represents the same location of the individual layers in the retina, in the same subject. Immunofluorescence analysis was performed to visualize the expression of isolectin IB4 (marked green) – the surface glycoprotein of activated macrophages. Cell nuclei were visualized with the DAPI staining (marked blue) (B). Scale bar = 50 μm . Magnification 40x(26,27).



Ryc. 4. Obraz OCT (A) i obraz histologiczny (B) siatkówki myszy szczepu C57BL6 w 3. miesiącu po indukcji uszkodzenia siatkówki. Widoczny znaczny zanik zewnętrznych warstw siatkówki. Czarne strzałki wskazują złoże melaniny rozmieszczone wzdłuż ciał komórkowych i wypustek komórek glejowych. Skala = 50 μm . Powiększenie obiektywu 40x (26, 27).

Fig. 4. Comparison of the OCT cross-sectional image (A) with a histological section (B) of C57BL6 mouse retina on the 3rd month after retinal injury induction. Massive loss of the outer retinal layers. Black arrows indicate melanin debris spread across the glial cell bodies and their processes. Scale bar = 50 μm . Magnification 40x (26, 27).

siatkówki zarówno prawidłowej, jak i patologicznie zmienionej. Znajomość morfologicznej identyfikacji hiperrefleksyjnych stref widocznych na skanach OCT, a także zrozumienie zjawisk patofizjologicznych, które leżą u podłoża obserwowanych nieprawidłowości siatkówki, są kluczem do prawidłowej interpretacji obrazów OCT.

Piśmiennictwo:

1. Benaron DA, Cheong WF, Stevenson DK: *Tissue optics*. Science. 1997; 276: 2002–2003.
2. Hermann B, Bizheva K, Unterhuber A, Považay B, Sattmann H, Schmetterer L, et al.: *Precision of extracting absorption profiles from weakly scattering media with spectroscopic time-domain optical coherence tomography*. Opt Express. 2004; 12: 1677–1688.
3. Sardar DK, Yow RM, Tsin AT, Sardar R: *Optical scattering, absorption and polarization of healthy and neovascularized human retinal tissues*. J Biomed Opt. 2005; 10: 051501.
4. Chauhan DS, Marshall J: *The interpretation of optical coherence tomography images of the retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: 2332–2342.
5. Choma M, Sarunic M, Yang C, Izatt J: *Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography*. Opt Express 2003; 11: 2183–2189.
6. Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N: *Cellular organization of the vertebrate retina*. Prog Brain Res. 2001; 131: 3–26.
7. Staurengi G, Sadda S, Chakravarthy U, Spaide RF: *Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: the International Nomenclature for Optical Coherence Tomography (IN-OCT) Panel*. Ophthalmol. 2014; 121: 1572–8. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.02.023.
8. Spaide RF, Curcio CA: *Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model*. Retina. 2011; 31: 1609–1619.
9. Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H: *In vivo optical coherence tomography*. Am J Ophthalmol. 1993; 116: 113–114.
10. Swanson EA, Izatt JA, Hee MR, Huang D, Lin CP, Schuman JS, et al.: *In vivo retinal imaging by optical coherence tomography*. Opt Lett. 1993; 18: 1864–1866.
11. Drexler W, Morgner U, Ghanta RK, Krtner FX, Schuman JS, Fujimoto JG: *Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography*. Nat Med. 2001; 7: 502–507.
12. Anger EM, Unterhuber A, Hermann B, Sattmann H, Schubert C, Morgan JE, et al.: *Ultrahigh resolution optical coherence tomography of the monkey fovea. Identification of retinal sublayers by correlation with semithin histology sections*. Exp Eye Res. 2004; 78: 1117–1125.
13. Gloesmann M, Hermann B, Schubert C, Sattmann H, Ahnelt PK, Drexler W: *Histologic correlation of pig retina radial stratification with ultrahigh-resolution optical coherence tomography*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44: 1696–1703.
14. Drexler W, Sattmann H, Hermann B, Ko TH, Stur M, Unterhuber A, et al.: *Enhanced visualization of macular pathology with the use of ultrahigh-resolution optical coherence tomography*. Arch Ophthalmol 2003; 121: 695–706.
15. Zawadzki RJ, Jones SM, Olivier SS, Zhao M, Bower BA, Izatt JA, et al.: *Adaptive-optics optical coherence tomography*

- for high-resolution and high-speed 3D retinal in vivo imaging. *Opt Express*. 2005; 13: 8532–8546.
16. Spaide RF: *Questioning optical coherence tomography*. *Ophthalmol* 2012; 119: 2203–2204.e1. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.09.009.
 17. Strauss O: *The role of retinal pigment epithelium in visual functions*. *Ophthalmologe*. 2009; 106: 299–304. doi: 10.1007/s00347-008-1869-x.
 18. Ehnes A, Wenner Y, Friedburg C, Preising MN, Bowl W, Sekundo W, et al.: *Optical coherence tomography (OCT) device independent intraretinal layer segmentation*. *Transl Vis Sci Technol*. 2014; 3: 1.
 19. Fernández EJ, Hermann B, Považay B, Unterhuber A, Sattmann H, Hofer B, et al.: *Ultrahigh resolution optical coherence tomography and pancorrection for cellular imaging of the living human retina*. *Opt Express* 2008; 16: 11083–11094.
 20. Farhat G, Mariampillai A, Yang VX, Czarnota GJ, Kolios MC: *Detecting apoptosis using dynamic light scattering with optical coherence tomography*. *J Biomed Opt*. 2011; 16: 070505. doi: 10.1117/1.3600770.
 21. Farhat G, Yang VX, Czarnota GJ, Kolios MC: *Detecting cell death with optical coherence tomography and envelope statistics*. *J Biomed Opt*. 2011; 16: 026017. doi: 10.1117/1.3544543.
 22. Secondi R, Kong J, Blonska AM, Staurengi G, Sparrow JR: *Fundus autofluorescence findings in a mouse model of retinal detachment*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 5190–5197.
 23. Cebulla CM, Ruggeri M, Murray TG, Feuer WJ, Hernandez E: *Spectral domain optical coherence tomography in a murine retinal detachment model*. *Exp Eye Res*. 2010; 90: 521–527.
 24. Machalińska A, Lejkowska R, Duchnik M, Kawa M, Rogińska D, Wiszniewska B, et al.: *Dose-dependent retinal changes following sodium iodate administration: Application of spectral-domain optical coherence tomography for monitoring of retinal injury and endogenous regeneration*. *Curr Eye Res*. 2014; doi: 10.3109/02713683.2014.892996.
 25. Machalińska A, Kawa MP, Pius-Sadowska E, Rogińska D, Klos P, Baumert B, et al.: *Endogenous regeneration of damaged retinal pigment epithelium following low dose sodium iodate administration: An insight into the role of glial cells in retinal repair*. *Exp Eye Res*. 2013; 112: 68–78.
 26. Ogino K, Murakami T, Tsujikawa A, Miyamoto K, Sakamoto A, Ota M, et al.: *Characteristics of optical coherence tomographic hyperreflective foci in retinal vein occlusion*. *Retina*. 2012; 32: 77–85. doi: 10.1097/IAE.0b013e318217ffc7.
 27. Uji A, Murakami T, Nishijima K, Akagi T, Horii T, Arakawa N, 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: 710–717. doi: 10.1016/j.ajo.2011.08.041.
 28. Gerendas BS, Waldstein SM, Simader C, Deak G, Hajnajeab B, Zhang L, et al.: *Three-dimensional automated choroidal volume assessment on standard spectral-domain optical coherence tomography and correlation with the level of diabetic macular edema*. *Am J Ophthalmol*. 2014; pii: S0002-9394(14)00481-4. doi: 10.1016/j.ajo.2014.08.001.

Praca wpłynęła do Redakcji 10.01.2015 r. (1507)
Zakwalifikowano do druku 28.05.2015 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr hab. n. med. Anna Machalińska
Klinika Okulistyki SPSK-2
ul. Powstańców Wilkp. 72
70-111 Szczecin
e-mail: annam@pum.edu.pl