

Angio-OCT e Glaucoma

di Amedeo Lucente

Introduzione

Le tecnologie d'imaging angio-OCT non invasive e label free sono molto utili per quantificare il flusso ematico a livello della rete capillare neuro-retinica. Queste tecnologie sono legate allo sviluppo degli OCT e all'implementazione di opportuni e raffinati algoritmi nei loro software [1]. La flussimetria non invasiva sta acquistando sempre più valore e spazio nella ricerca scientifica in ogni campo della diagnostica medica. L'oftalmologia, con ancor maggior enfasi iconografica, è investita pienamente da questo straordinario e positivo sviluppo Hi-Tech, con non pochi e sensibili vantaggi nella diagnosi e terapia di molte patologie neuro-corio-retiniche.

La visualizzazione dei networks microvascolari e la quantificazione della perfusione emoreologica con angio-OCT, infatti, stanno condizionando fortemente aspetti diagnostici, valutazioni prognostiche e nuove strategie terapeutiche con crescente razionalità iconografica (Fig. 1).

La perfusione della testa del nervo ottico è stata per lungo tempo studiata secondo l'età, nella malattia iperbarica e, segnatamente, nel glaucoma. Le notizie più copiose sulla perfusione della papilla ottica pervengono dall'angiografia con fluoresceina FA. Nei pazienti con glaucoma ad angolo aperto la FA rivela l'alterata perfusione retinica insieme alla non perfusione della testa del nervo ottico, con aumento del leakage in relazione ai cambiamenti strutturali della lamina cribrosa e della vascolarizzazione delle fibre ottiche [2].

I dati forniti dalla FA, inoltre, rivelano in prevalenza tempi aumentati del passaggio arterovenoso nei glaucomi normo-tensivi e iperbarici ad angolo aperto, deficit di riempimento di frequente settoriali e/o focali nelle forme normotensive, ipoperfusioni diffuse nei glaucomi ipertensivi di lunga data [3,4]. La richiesta di un esame FA in corso di glaucoma se poteva essere in parte giustificata negli anni Ottanta e Novanta, è oggi improponibile, oltre che per le note controindicazioni generali, per le crescenti problematiche medico-legali.

Entrati da poco nella semeiologia strumentale oftalmologica, gli angio-OCT stanno rivoluzionando non poco l'approccio diagnostico delle malattie neuro-retiniche. Il glaucoma non si sottrae ad essere rivalutato con tale

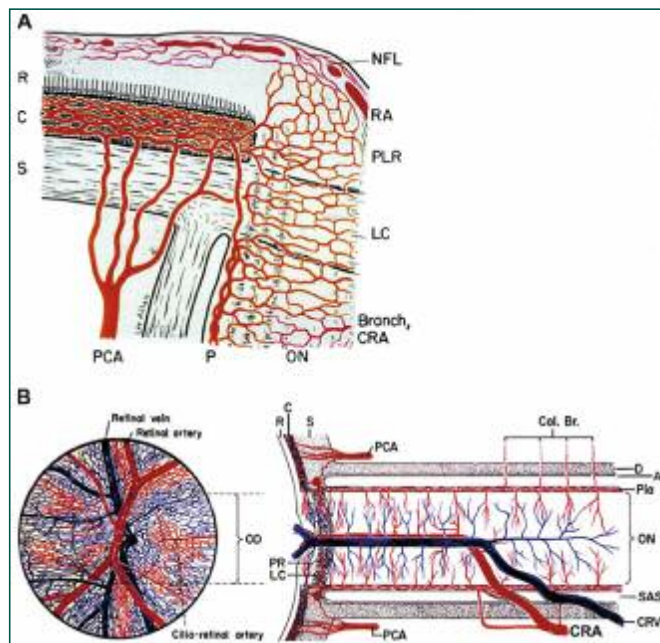


Fig. 1 - Schema della vascolarizzazione della testa del nervo ottico(A), e del nervo ottico (B) (da Hayreh).

Abbreviazioni: A = arachnoid; C = choroid; CRA = central retinal artery; Col. Br. = Collateral branches; CRV = central retinal vein; D = dura; LC = lamina cribrosa; NFL = surface nerve fiber layer of the disc; OD = optic disc; ON = optic nerve; P = pia; PCA = posterior ciliary artery; PR / PLR = prelaminar region; R = retina; RA = retinal arteriole; S = sclera; SAS = subarachnoid space.

tecnologia, e il dato flussimetrico è riemerso come essenziale e predittivo nella diagnosi precoce di questa neuropatia.

Quest'articolo ha lo scopo di fornire informazioni e chiarimenti, per quanto è possibile, sull'imaging del nervo ottico che gli angio-OCT oggi permettono, in modo efficace, diffuso, non invasivo e, segnatamente, di tracciare come questa nuova metodica d'indagine possa aiutare la diagnosi precoce nel glaucoma.

Flussimetria laser-doppler v/s angio-OCT

Il Laser Doppler Flowmetry LDF e il Laser Speckle Flowgraphy LSFG sono due metodiche non invasive per misurare il flusso ematico retinico e della papilla ottica. Studi non isolati con tali tecniche hanno confermato i dati emersi dalla FA, mettendo in evidenza la diminu-

zione della perfusione ematica del disco ottico nei pazienti glaucomatosi rispetto ai soggetti normali. Più di uno studio scientifico ha formulato l'ipotesi che l'ipoperfusione della testa del nervo ottico possa anticipare ed essere causa dei successivi deficit al Campo Visivo [5→7]. Il punto debole comune di queste due metodiche è la scarsa ripetibilità intra-visita e inter-visita. Il LSFSG ha, infatti, un Coefficiente di Variazione (CV) nella riproducibilità intra-visita tra 1.9% e 11.9% e di ripetibilità inter-visita del 12.8%, valori troppo alti perché un esame strumentale possa essere considerato affidabile su larga scala. Il LDF è ancor meno attendibile del LSFSG almeno nelle sue prime applicazioni strumentali, con range di CV intra-visita tra il 6.6% e il 21.2% e ripetibilità inter-visita tra il 25.2% e il 30.1%.

Oltre alla FA, al LDF e al LSFSG, anche la Risonanza Magnetica Nucleare, utilizzata nello studio flussimetrico papillare, non ha dato grande affidabilità a causa del ristretto campo d'indagine e del suo limite di risoluzione [8].

La metà dei pazienti glaucomatosi alla prima osservazione, com'è noto, ha valori pressori spesso non elevati, e non sempre i danni funzionali sono proporzionali al regime pressorio oculare. Numerosi sono i lavori scientifici che partendo da questi dati avvalorano la genesi vascolare del danno strutturale in corso di glaucoma, piuttosto che affidarsi al solo dato meccanico IOP dipendente [9,10].

Il laboratorio di fisiopatologia oculare diretto da Michele Virno e Maria Josè Pecori Giraldi della Clinica Oculistica di Roma con lungimiranza e acume scientifico, direttore Giovan Battista Bietti, già negli anni Settanta con forza ha sostenuto e studiato la patogenesi vascolare del glaucoma. Numerosi altri gruppi di ricerca, non solo italiani, hanno creduto nel ruolo patogenetico del flusso ematico secondario a IOP come *primum movens* del danno assonale nel glaucoma [11].

I non pochi lavori sperimentali su cavie prodotti da queste ricerche hanno trovato, tuttavia, difficile convalida sull'uomo, e la teoria vascolare, pur sempre in auge, è rimasta oggetto di studio senza riscontri clinici universalmente utilizzabili.

Nel 1995 Schuman, Puliafito e Fujimoto affermavano in "*Optical coherence tomography: a new tool for glaucoma diagnosis*" l'importanza e futuro sviluppo diagnostico nel glaucoma della nascente tomografia a coerenza ottica [12].

Da allora gli OCT hanno avuto uno straordinario sviluppo e diffusione, e sono diventati fondamentali nell'indagine strutturale quantitativa in corso di glaucoma per lo spessore dello strato delle fibre ottiche retiniche intorno alla papilla ottica RNFL Retinal Nerve Fiber

Layer, per lo spessore selettivo delle cellule ganglionari in macula GCC Ganglionar Complex Cells, per la determinazione dell'area della rima neurale Rim Area, oltre che per informazioni sulla forma del disco ottico, sul Cup-Disc e, non ultimo per importanza, sulla lamina cribrosa [13]. Inoltre, con l'indagine tomografica è stato possibile stabilire in modo più preciso il rapporto tra Struttura/Funzione, tra le alterazioni tomografiche della papilla, dell'area peripapillare e il Campo Visivo, con Reports molto suggestivi e iconograficamente accattivanti [14,15].

Tutto questo progresso Hi-Tech, straordinario e affascinante, nel glaucoma lasciava poco esplorato il dato vascolare. Lo studio degli indici di flusso ematico, elaborati con varie metodologie, come accennato, è stato spesso limitato dall'esperienza del singolo operatore, decisivo ai fini dei risultati ottenuti, scoraggiando successive ricerche in questo settore [16].

Con i nuovi angio-OCT questi limiti e variabilità individuali sembrano superati, e affidabili network di flusso sono ottenibili durante l'esecuzione di una comune tomografia, con modalità dyeless, poco operatore dipendente, e con imaging di straordinaria chiarezza.

Cionondimeno l'esperienza, la competenza nella lettura dei tomogrammi, l'accuratezza e l'ottimizzazione dei tempi d'esecuzione non possono essere sottovalutati, elevando ulteriormente la qualità finale dei risultati ottenuti [17].

Flussimetria del nervo ottico e glaucoma

Alon Harris et al. pubblicavano nel 1996 su *J. Glaucoma* in un gruppo omogeneo di pazienti la variazione del flusso ematico del nervo ottico a differenti concentrazioni di anidride carbonica. In ipercapnia il flusso aumentava del 28%, il volume ematico del 22% e la velocità di circolo del 9% rispetto a normali condizioni di saturazione d'ossigeno. Concludevano che il Laser Doppler Flowmetry, da loro utilizzato, permetteva efficacemente e in modo non invasivo la misurazione del flusso ematico del nervo ottico [18]. Questo gruppo di ricerca, come vedremo, ha investito molto tempo nello studio flussimetrico in corso di glaucoma.

Larry Kagemann et al. del gruppo di studio di Harris, su *British Journal of Ophthalmology* due anni dopo, studiando in 12 soggetti la flussimetria del nervo ottico, affermavano che il Confocal Scanning Laser Doppler Flowmetry (cSLDF, Heidelberg retinal flowmetry HRF) era un promettente metodo per la determinazione del flusso ematico neuro-retinico su campi d'indagine nel tessuto peripapillare di 100µm x 100µm x 400µm, equivalenti a 10x10 pixels (box of peripapillary retinal tissue) [19].

Alon Harris et al. nello stesso anno su *Jama Ophthalmol-*

mology, dissertando sull'autoregolazione del flusso ematico del nervo ottico al variare della IOP, della pressione arteriosa sistemica e delle condizioni metaboliche, asserivano che molti aspetti dell'autoregolazione osservati sperimentalmente e in vivo in differenti condizioni, restavano ancora non adeguatamente esplorati e conosciuti, particolarmente nel glaucoma [20].

Il nervo ottico Optic Nerve Head ONH è irrorato da un plesso di vasi superficiali per gli strati iuxta-retinici *superficial layers* (fibre ottiche e strato superficiale del nervo ottico), tributario dell'arteria centrale della retina, e da un plesso di vasi profondi per gli strati iuxta-coroideali *deeper layers* (regione prelaminare, lamina cribrosa, regione retrolaminare), tributario delle arterie ciliari profonde. Anche se iniziali rapporti indicavano il plesso delle arterie ciliari profonde come maggiormente coinvolto nel danno glaucomatoso, altre ricerche hanno rivalutato il ruolo del plesso superficiale di pertinenza dell'arteria centrale retinica (Fig. 1) [21].

Come vedremo più avanti le metodiche laser-doppler oltre ad essere più indaginose, sono in affanno nel distinguere questi differenti plessi nella patogenesi del danno iperbarico.

Hana Leiba et al., utilizzando Heidelberg retinal flowmeter, descrivono su Eye nel 2000 che il decremento del flusso ematico nell'ONH è un indice di rischio importante per neuropatie ottiche ischemiche non infiammatorie (non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy, NAION) [22], allargando l'interesse dell'indagine vascolare oltre il campo del glaucoma.

M. Nagahara et al. in successivi studi e ricerche riaffermano che il *Laser Speckle Flowgraphy (LSFG)*, rinnovato ed aggiornato, è una promettente tecnica metodologica per la valutazione della microcircolazione dell'ONH, capace di quantificare, anche se non senza difficoltà, separatamente in vivo la quota ematica pertinente al letto coroideale e retinico, confermando le iniziali ricerche di Harris e collaboratori del 1996 e 1998 [23].

Wataru Kobayashi et al. in uno studio pubblicato su Journal of Ophthalmology nel 2014 sono arrivati a simili conclusioni [24].

Com'è noto oltre 70 milioni di persone sono affetti da glaucoma, seconda causa di cecità nel mondo [25]. Il glaucoma a bassa tensione Normal Tension Glaucoma NTG, nonostante sia molto diffuso e la forma di glau-

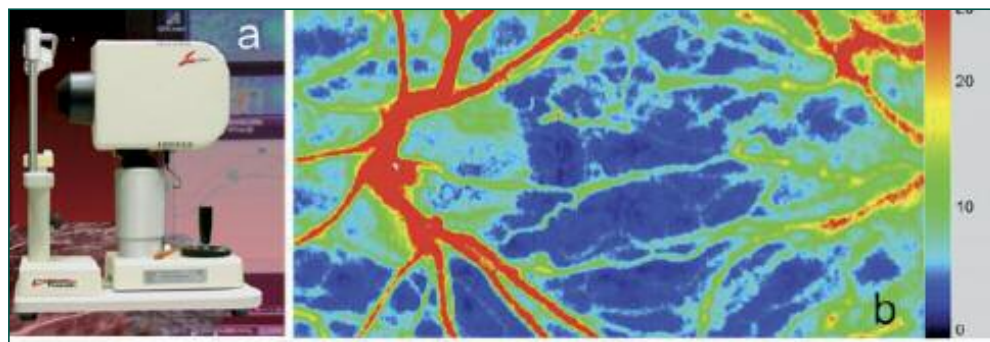


Fig. 2 - Device LSFG-NAVI-OPE in (a); imaging della vascolarizzazione nell'area dell'ONH con tecnologia Laser Speckle Flowgraphy in (b).
LSFG= Laser Speckle Flowgraphy.

coma ad angolo aperto più comune in Asia, resta nella patogenesi, per molti aspetti, ancora controverso e oscuro [26]. Numerosi rapporti scientifici hanno dimostrato la relazione tra la diminuzione della circolazione emoreologica dell'ONH e il glaucoma, in particolare per la forma NTG con varie metodiche.

La metodologia con maggiori e recenti sviluppi per lo studio flussimetrico neuro-retinico è il laser speckle (speckle=chiazza, macchiolina, puntino) in precedenza citato. Introdotto nel 1980 con applicazioni soprattutto nelle neuroscienze, in dermatologia, e meno utilizzato in oftalmologia, è un potente strumento nell'imaging ad ampio campo del flusso ematico. Il termine speckle imaging significa "creare immagini a partire da macchie" (Wikipedia). Questa tecnologia è stata perfezionata dall'astronomo americano David L. Fried nel 1966 per migliorare la risoluzione dei telescopi nelle osservazioni delle galassie e delle stelle. Nonostante esista un copioso numero di report su questa tecnica per la quantificazione della flussimetria retinica negli animali, poche sono le immagini nell'uomo. La maggior parte degli studi ha, oltretutto, riportato valori medi di flusso calcolati senza mostrare le relative mappe spaziali neuro-retiniche.

L'agenzia *Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices*, pur con le incertezze espresse, ha approvato dal 2008 un device che si basa su tale metodo flussimetrico, il LSFG-NAVI (LSFG-NAVI, Softcare Co., Ltd., Fukuoka, Japan; LSFG=Laser Speckle Flowgraphy), di recente ulteriormente migliorato e modificato (LSFG-NAVI-OPE) (Fig. 2) [27].

Lo studio di *H. Isono et al.* è uno dei pochi che mostra le mappe di flusso della retina umana utilizzando tale tecnica, con elaborazione di aree adiacenti per un'estensione complessiva di 3mm²[28]. Le ragioni delle difficoltà di questa metodologia risiedono essenzialmente nella sua limitata e ristretta risoluzione spaziale, dovuta ai sensori della fotocamera, con un potere limitato a 100x100 pixels.

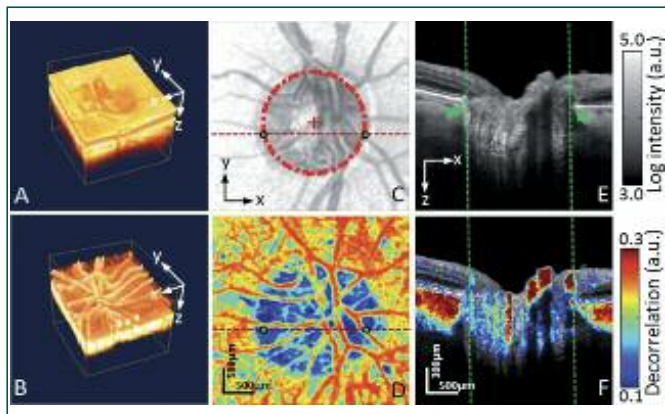


Fig. 3 - Immagini quantitative angio-OCT del flusso di ONH. Immagini di ONH in 3D (3mm x 3mm x 2,9mm sugli assi XYZ) di un soggetto normale. In (E) e (F) le immagini sono state tagliate da 2.9mm a 1.8mm. (A) Immagine della riflettività del volume del disco ottico. (B) Immagine 3D del flusso. (C) Immagine di massima riflettenza dei rami dell'arteria centrale. (D) Immagine angiografica di massima decorrelazione. (E) Cross-Section del piano tracciato dalla linea rossa in(C). Il bordo del canale neurale (linee verdi verticali), determinato dalla terminazione del complesso Epitelio Pigmentato Retinico/Membrana di Bruch, è evidenziato dalle due frecce verdi che corrispondono ai punti verdi in (C) e (D). La Cross-Section con intensità in scala dei grigi (E)sovrapposta all'immagine a colori (F), mostra che la massima circolazione avviene nella regione della lamina cribrosa (da Yali et al; rif. Bibl. [31]).

Un recente studio di *Tetsuya Sugiyama* del 2014 sembra però dileguare dubbi ed incertezze sulla bontà di tale tecnologia. Infatti, con l'utilizzo di una camera CCD Charge-Coupled Device e l'elaborazione dei segnali con Mean Blur Rate MBR (Tasso di sfocatura media), il nuovo device, rispetto al primo modello, dimostra una risoluzione spaziale delle mappe di flusso 24 volte migliore, con buona riproducibilità nelle misurazioni [29].

Angiografia-OCT del nervo ottico

Il flusso emoreologico dell'ONH è indissolubilmente associato alla fisiopatologia della malattia iperbarica IOP dipendente. La valutazione quantitativa degli indici di flusso ematico, come da letteratura presa in esame, rimaneva effettuabile sostanzialmente in un ambito di ricerca, nei laboratori particolarmente attrezzati, non fruibile certamente su larga scala. L'introduzione degli Spectral Domain SD-OCT e degli Swept Source SS-OCT ha aperto nuove e più ampie prospettive d'indagine nel glaucoma nei confronti dell'aspetto biomeccanico e vascolare[30].

L'algoritmo Split-Spectrum Amplitude-Decorrelation Angiography SSADA, brevettato da David Huang nel

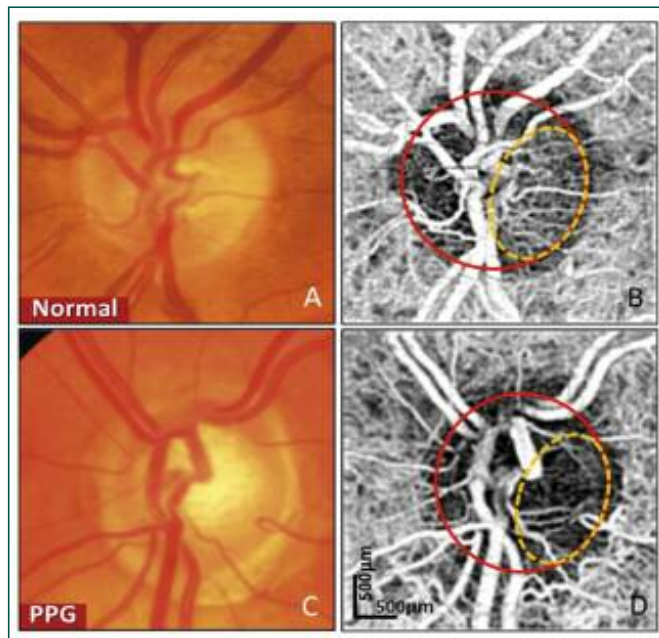


Fig. 4 - Fotografia di dischi ottici (A,C) e angiogrammi en face(B,D) di soggetto normale (NORMAL) (A,B) e con glaucoma pre-perimetrico (PPG) (C, D). La linea circolare continua indica il disco ottico per intero, la linea tratteggiata la zona ellittica temporale. Il network denso è ben visibile nel disco normale, appare molto attenuato nel disco glaucomatoso (da Yali Jia et al; rif. Bibl. [31]).

2012, è utilizzato su larga scala da RTVue-XR Optovue, primo angio-OCT in commercio in Europa con marchio CE. L'analisi dei plessi vascolari corio-retinici, la facilità e la rapidità d'imaging vascolare hanno grandemente contribuito, in modo definitivo, a porre nuovamente in discussione l'importanza del flusso ematico nelle varie forme di glaucoma cronico ad angolo aperto, con particolare attenzione nelle forme pre-perimetriche (Early Glaucoma) e normotensive.

Yali Jia et al. su *Biomedical Optics Express* nel dicembre 2012 indicano la possibilità di determinare in modo dettagliato, con angiogrammi en-face in 2D, i valori medi di decorrelazione del flusso, *average flow index*, e le aree occupate dai vasi, *vessel density*, sull'intero ONH e/o sue parti, fornendo valori differenziali di questi parametri rispetto a soggetti normali.

Da questo studio pilota emerge che nei pazienti con glaucoma pre-perimetrico esiste un'indicativa riduzione di perfusione rispetto a soggetti normali, confermando l'efficacia diagnostica e prognostica nell'indagine dei flussi vascolari nell'Early Glaucoma con gli angio-OCT (Fig. 3, Fig. 4) [31]. Quest'iniziale indagine, pur limitata nel numero di soggetti coinvolti (4 normali e 4 con glaucoma pre-perimetrico) che ha avuto ulteriori conferme e riscontri su più vaste platee di soggetti, rende evidente e propone l'utilizzo degli angio-OCT come

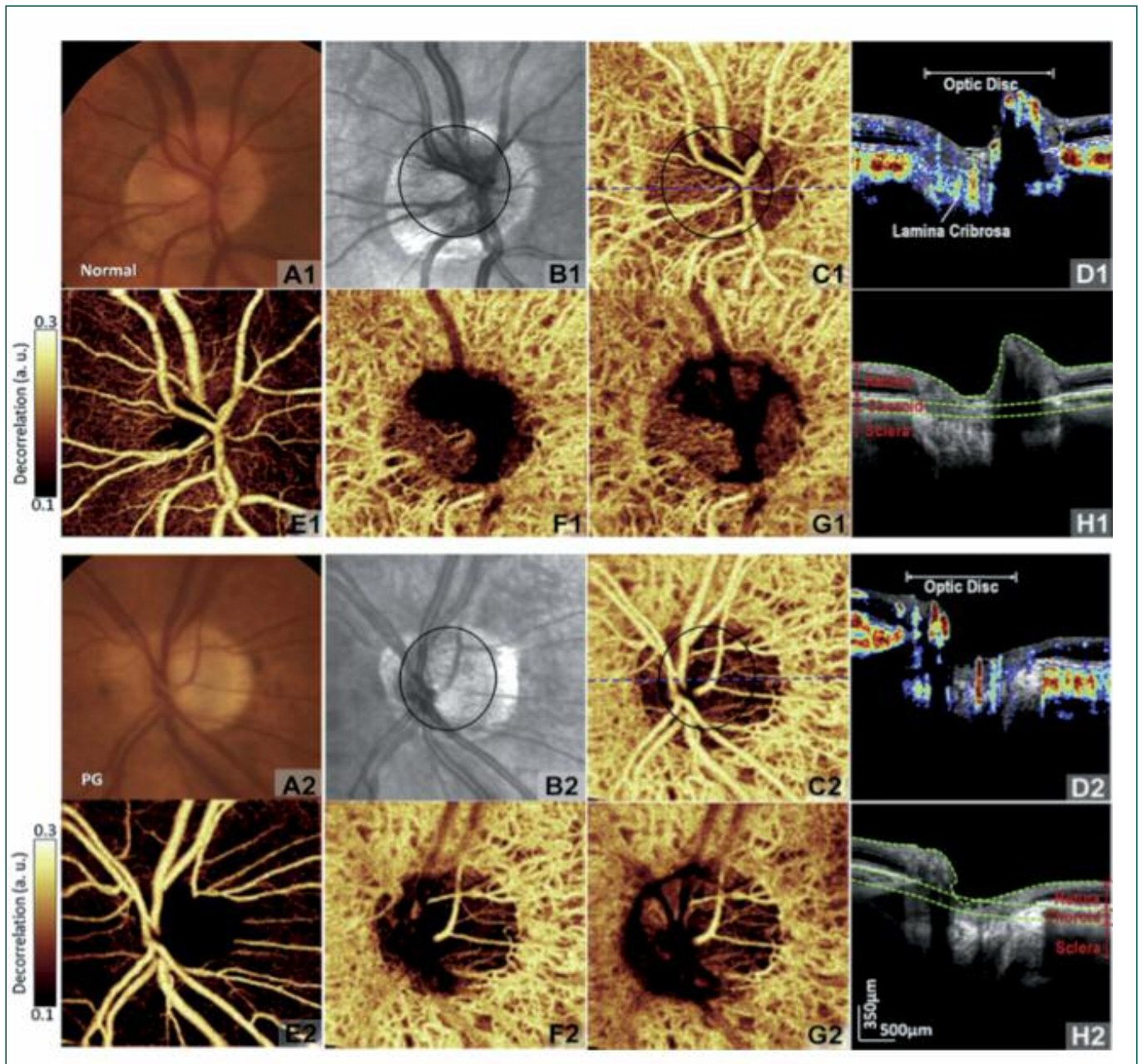


Fig. 5 - Fotografia di due dischi ottici (A1, A2), riflettività OCT (B1, B2), angiogrammi en-face per la complessiva profondità (C1, C2) e angiogrammi cross-sectional sovrapposti alla riflettività OCT in scala di grigi (D1, D2) in occhio destro di soggetto normale (A1→H1) e in occhio sinistro di soggetto con glaucoma pre-perimetrico (A2→H2). I margini del disco sono marcati con una linea nera ellittica (B1, B2, C1, C2). La posizione della cross-section è segnata da una linea tratteggiata blu (C1, C2). Un denso network microvascolare è visibile negli angio-OCT del disco normale (C1), che risulta attenuato nel glaucoma pre-perimetrico (C2). Si apprezza la capacità angio-OCT nel determinare angiogrammi di flusso ematico nei vari strati vascolari, retinico (E1, E2), coroideale (F1, F2) e sclerale/lamina cribrosa (G1, G2). I confini utilizzati per la segmentazione sono indicati dalle linee grigie tratteggiate nelle riflettività cross-sectional OCT (H1, H2) (da Yali Jia et al ; rif. Bibl.[32]).

nuova possibilità di diagnosi precoce nel glaucoma, e apre nuove strade, ora ampiamente praticabili oltre i ristretti laboratori di ricerca.

Yali Jia et al. su Ophthalmology del 2014, con un nuovo studio svolto al Casey Eye Institute at Oregon Health & Science University, a conferma di quanto citato, infatti affermano, con un'indagine osservazionale cross-

sectional su 24 soggetti normali e 11 glaucomatosi, che il network vascolare angio-OCT (OCT Swept-Source Fourier-domain, 1050 nm) è ben visibile nei soggetti normali, mentre è attenuato nel gruppo dei glaucomatosi. La riproducibilità intra-visita è del 1,2%, la ripetibilità inter-visita del 4,2%, la variabilità dei flussi dell'ONH nella popolazione sana del 5% al CV

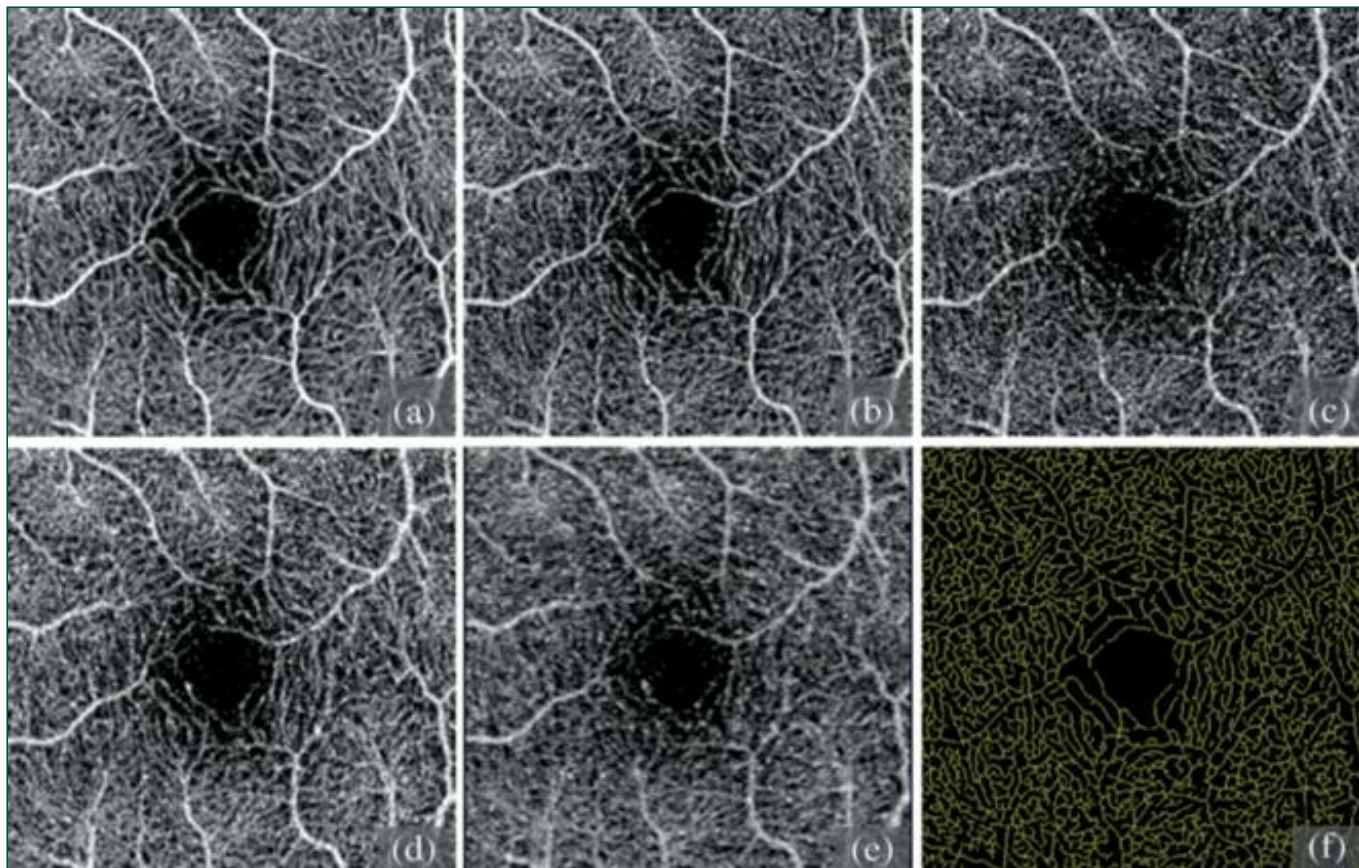


Fig. 6 - Performance dei networks vasali retinici in soggetto sano con OMAG (a), Speckle Variance(b), Phase Variance (c), SSADA (d) e Correlation Mapping (e). In (f) la rete dei capillari in giallo-verde per valutare meglio la loro connessione con la tecnica skeletonized vascular network mask (da Anqi Zhang et al. rif. Bibl.[39]).

(Coefficiente di Variabilità). L'indice di flusso dell'ONH, principale oggetto di studio, è ridotto del 25% nel gruppo dei glaucomatosi ($P=0.003$), la sensibilità e specificità in entrambi i gruppi è del 100% una volta ottimizzato adeguatamente il cut-off e, inoltre, gli indici di flusso sono correlati con la Pattern Standard Deviation PSD del Campo Visivo ($R^{22}=0.752, P=0.001$).

Significative sono le correlazioni trovate dopo aver considerato età, Cup/Disc ratio, RNFL e Rim Area [32]; l'algoritmo utilizzato è stato il SSADA (Fig. 5). Il SSADA non è l'unico algoritmo a permettere la decorrelazione del segnale tomografico e la visualizzazione del microcircolo in modo non invasivo.

OMAG *Optical Microangiography* è l'algoritmo utilizzato da Zeiss per HD-Cirrus 5000 Angio-Plex, disponibile in Europa da gennaio 2016 e già in commercio in USA [33]. Rispetto al SSADA che decorrela i frame considerando le variazioni dell'ampiezza del segnale tomografico rispetto al tempo, OMAG decorrela rispetto alle variazioni della fase.

L'AngioPlex Zeiss (68-kHz) è stato il primo angio-OCT ad avere avuto l'approvazione in USA dalla FDA Food and Drug Administration [510(K), FDA clearance for AngioPlex], mentre è in attesa del marchio CE per

l'Unione Europea (CE Marking is pending from the European Union).

Al contrario RTVue-XR ha ottenuto da tempo il marchio CE e in data 16/02/16 l'approvazione da parte della FDA.

Sulle caratteristiche degli algoritmi ho già ampiamente scritto nell'articolo "Principi tecnologici ed imaging degli Angio-OCT" di questa Rivista (N.2-Anno 2015). Al momento gli algoritmi utili per visualizzare il network vascolare corio-retinico con modalità dyeless sono:

- OMAG [34]
- Speckle Variance [35]
- Phase Variance [36]
- SSADA [37]
- Correlation Mapping [38]

La decorrelazione dyeless del segnale tomografico può avvenire con differenti tecnologie:

- a) Angiografia basata sull'ampiezza del segnale OCT
- b) Angiografia basata sulla fase del segnale OCT
- c) Angiografia basata sull'ampiezza e sulla fase del segnale OCT (complex signal)

Vista la rapida evoluzione della tecnologia angio-OCT, nonostante l'estesa letteratura già esistente, risulta arduo dare un giudizio, anche parziale, sulla validità complessiva delle tecnologie applicate. La Zeiss su Angio-Plex, d'altra parte, decorrela il segnale per fase e intensità, implementando e migliorando l'originale algoritmo OMAG (OMAGc; c = complex).

Anqi Zhang et al. in una recente Review su Journal of Biomedical Optics (Ottobre 2015), discutono e confrontano per la prima volta in modo esaustivo la validità e la resa degli algoritmi utilizzati nella decorrelazione del segnale, tracciandone le principali caratteristiche d'applicazione. Da tale attenta disamina emerge che l'algoritmo OMAG, fino al momento del loro studio, offre le migliori performance applicative (Fig. 6). In questa Review, di non facile lettura, gli algoritmi idonei alla decorrelazione del segnale sono ampiamente tra loro confrontati. I parametri presi in esame sono la connettività, il contrasto, il signal-to-noise ratio (SNR) e i relativi tempi computazionali.

Tutti questi parametri ottico-informatici in sostanza sono indici di qualità degli algoritmi di decorrelazione, e ne riassumono l'efficienza, la praticabilità informatico-tomografica e la capacità finale di resa iconografica (Fig. 7), (Tab.1, Tab. 2) [39].

Network vascolari angio-OCT

Le possibilità d'imaging vascolare che i nuovi angio-OCT permettono affascinano e, nello stesso tempo sconcertano, tanto alta è la possibilità di definizione dei plessi vascolari e la facilità a ottenere imaging selettive per strati. Com'è accaduto per gli OCT, anche per gli angio-OCT l'interesse dalla retina si è esteso all'ONH, con angio-tomografie dettagliate della papilla ottica, lamina cribrosa compresa. Per il momento non sono disponibili molti studi sul flusso ematico angio-OCT dell'ONH oltre a quelli citati.

Su IOVS del 2012 Huang JC et al. utilizzando Ultra-high-Speed Swept-Source OCT (100,000 axial

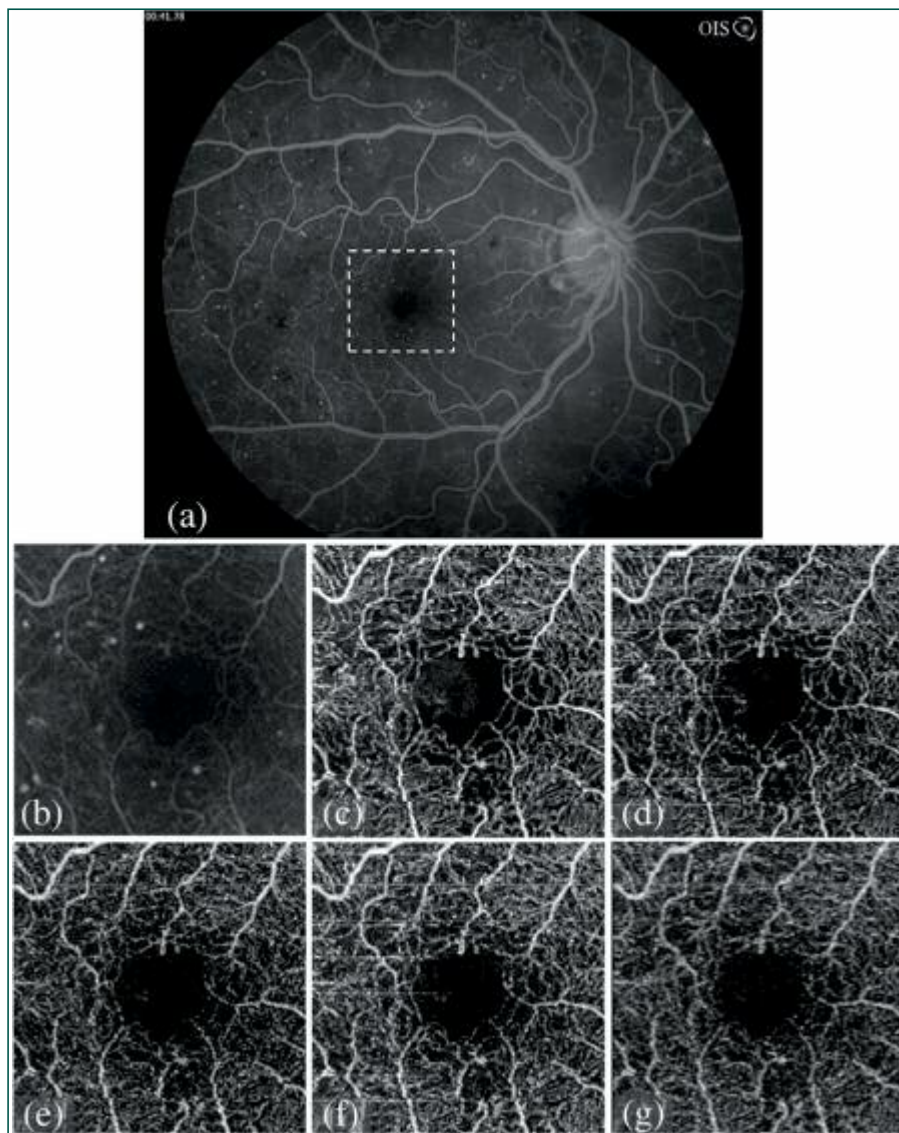


Fig. 7 - Retinopia diabetica. (a) Angiogramma con fluoresceina con selezione di box tratteggiato in macula, (b) zoom del box image con fluoresceina. (c-g) Rete network visualizzata con OMAG, Speckle Variance, SSADA, Correlation Mapping (da Anqi Zhang et al. rif. Bibl. [39]).

scans/sec, 1050 nm tunable laser, 6 μ m axial resolution in tissue), device sviluppato inizialmente da Fujimoto e David Huang con utilizzo di SSADA, mettono in relazione in un gruppo di pazienti glaucomatosi e normali, il Campo Visivo, il flusso ematico e le misure delle strutture neurali.

I risultati emersi da tale studio sono così riassunti dagli autori: "Total retinal blood flow and vascular caliber were reduced in glaucoma subjects".

Parameter	Normal	Glaucoma	p-value
Total-Retinal Blood-Flow (μ l/min)	45.5 \pm 9.5	34.9 \pm 8.5	<0.001
Arterial-Area	0.033 \pm 0.0077	0.028 \pm 0.0074	0.006 (mm ²)
Venous-Area	0.047 \pm 0.012	0.041 \pm 0.0086	0.01 (mm ²)

Tabella 1**Comparazione per il tempo d'utilizzo di ciascun algoritmo (da Anqi Zhang et al. rif. Bibl.[39]).**

	OMAG	Speckle variance	Phase variance	SSADA	Correlation mapping
Time (s)	0.0149	0.0150	0.0152	0.231	0.444

Tabella 2**Comparazione degli algoritmi per connettività, contrasto e signal-to noise SNR (da Anqi Zhang et al. rif. Bibl.[39]).**

	OMAG	Speckle Variance	Phase variance	SSADA	Correlation mapping
Connectivity	0.1693	0.1761	0.1972	0.1934	0.1769
Contrast	3.3602	2.7863	2.2019	2.7276	2.3891
SNR	3.8165	3.3517	2.7282	2.9538	2.5655

Note: OMAG, optical microangiography; SSADA, split-spectrum amplitude-decorrelation angiography.

Dalla tabella chiaramente si deduce che nei pazienti glaucomatosi il flusso ematico espresso in $\mu\text{l}/\text{min}$ e il calibro vascolare arterioso e venoso in mm^2 sono entrambi ridotti.

Utilizzando il metodo statistico di Spearman (Charles Edward Spearman 1863-1945; Spearman's correlation coefficient R) gli autori hanno inoltre reso evidente che l'età, la pressione del sangue, la IOP e la pressione di perfusione non erano significativamente correlate con il Campo Visivo, il flusso ematico e le misure strutturali neurali.

Questi ricercatori affermano, inoltre, che la riduzione del flusso sanguigno nei pazienti glaucomatosi ha una significatività con valore doppio rispetto alle variabili strutturali neurali nel giustificare il peggioramento di MD del Campo Visivo, e che la variazione di flusso ha un effetto diretto sulla funzione visiva, indipendente dai danni strutturali rilevati sull'ONH [40].

David Huang e i suoi collaboratori nell'articolo su Ophthalmology Management "A new view for an old disease" del Novembre 2015, facendo seguito alle loro numerose pubblicazioni in parte citate, dissertano sui metodi Hi-Tech utili per la diagnosi precoce del glaucoma. Riferiscono che lo spessore peripapillare delle fibre assonali retiniche RNFL e delle cellule ganglionari in macula GCC, pur essendo efficaci mezzi per monitorare il danno strutturale, mostrano una limitata sensibilità nell'Early Glaucoma e una relativa modesta correlazione con i danni al Campo Visivo (Fig. 8) [41].

Confermano la validità del LDF Laser Doppler Flowmetry e del LSFG Laser Speckle Flowgraphy nel distinguere le variazioni flussimetriche tra soggetti normali e glaucomatosi ma, nello stesso tempo, ne evidenziano le difficoltà applicative, e affermano la validità e ripetibilità degli angio-OCT nella diagnosi precoce di glaucoma.

bilità degli angio-OCT nella diagnosi precoce di glaucoma.

Di assoluto rilievo è altresì il riscontro in questo studio pilota (9 soggetti con glaucoma pre-perimetrico, 3 perimetrico e 12 soggetti normali per età) dell'efficacia di SSADA per il flusso dell'ONH, sia implementato su SS-OCT che su SD-OCT (RTVue-XR Optovue), attraverso scansioni $3\text{mm} \times 3\text{mm}$. I deficit di flusso sono stati infine paragonati con i difetti al Campo Visivo (Humphrey Field Analyzer II).

Nel gruppo con glaucoma, all'analisi statistica con coefficiente di Pearson (Karl Pearson, Londra 1857 - Londra 1936), si evidenziava un'elevata correlazione tra diminuzione degli indici di flusso, densità vasale e deficit del Campo Visivo, mentre era presente solo una moderata correlazione tra indici del Campo Visivo e lo spessore RNFL, similmente a quanto riferito da altri studi.

Da questa ricerca risulta altresì che gli indici di flusso e la densità vasale erano altamente correlati agli stadi del glaucoma, predefiniti in pre-perimetrico, moderato e severo, mentre non c'era correlazione significativa con lo spessore RNFL secondo il Glaucoma Staging System2 di Brusini [42→44].

Gli indici di flusso con angio-OCT si rivelano, in definitiva, come indicatori maggiormente significativi nel determinare la severità del glaucoma rispetto alle misure strutturali, con conferma anche nel follow-up.

In un'altra ricerca di settembre 2015 Liu L., David Hang et al. in 12 occhi normali per età e 12 glaucomatosi, utilizzando angio-OCT Spectral, Scan di 70-KHz, lunghezza d'onda di 840nm, doppio passaggio sul disco ottico e campi di $3\text{mm} \times 3\text{mm}$, in tutti gli occhi normali individuano un denso network microvascolare peripa-

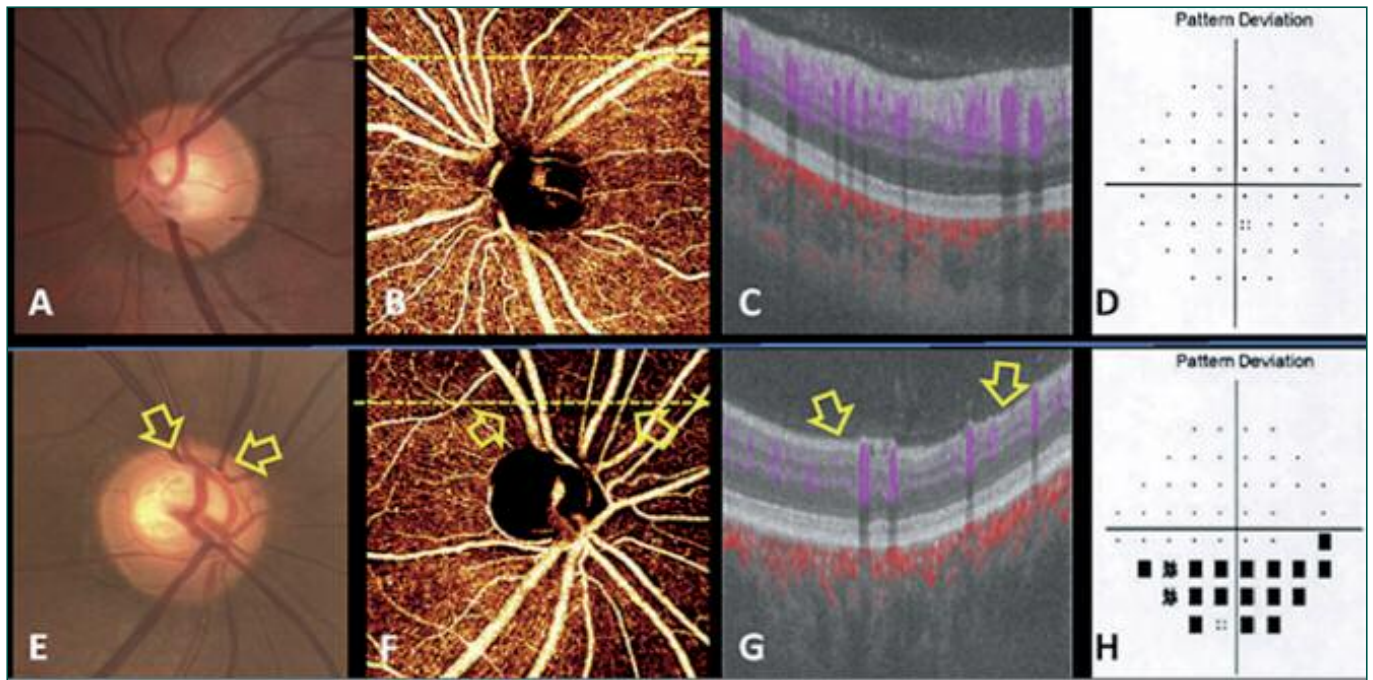


Fig. 8 - Disco ottico normale e glaucomatoso. Le fotografie (A, E) mostrano una rima neurale normale in (A) e con notch nel disco glaucomatoso (E). Un denso network microvascolare è ben visibile in angi-OCT intorno al disco dell'occhio normale (B), che risulta attenuato nell'occhio glaucomatoso con un deficit capillare e dropout, (freccia in F). Le cross-sections OCT (C, G) sovrapposti al flusso retinico (in rosso) e alla riflettanza (scala dei grigi) mostrano i difetti di perfusione associati con la diminuzione di spessore delle fibre ottiche retiniche (freccie). Le mappe della pattern deviation al CV (D, H) evidenziano una depressione inferiore corrispondente al deficit di perfusione nell'occhio glaucomatoso (H) (da D. Huang et al. rif. Bibl. [41]).

pillare, che risulta invece globalmente e focalmente attenuato nei 12 occhi glaucomatosi.

Negli occhi normali la riproducibilità inter-visita degli indici di flusso e della densità vasale peripapillare erano 4,3% e 2,7% del coefficiente di variazione CV, mentre le percentuali di variabilità nella popolazione erano 8,2% e 3% rispettivamente.

Gli indici di flusso e la densità vasale peripapillari erano più bassi negli occhi glaucomatosi ($P < .001$ per entrambi i parametri), dove era presente alta correlazione con la PSD al Campo Visivo (Fig. 9) [45].

Come si evince gli studi confermano di concerto la validità dell'indagine vascolare angi-OCT nel glaucoma.

Chieh-Li Chen et al. sono stati tra i primi ad utilizzare l'algoritmo OMAG con HD-Cirrus 5000 AngioPlex Zeiss nei soggetti glaucomatosi (245 x 245 raster cube scan per un'area di 2.4 mm² x 2.4 mm² centrata su ONH). In 25 occhi di 13 soggetti con glaucoma (MD al CV -4.43±5.19 dB) e 15 occhi di 8 soggetti sani non sono state riscontrate differenze significative tra normali e glaucomatosi per l'età (normali v/s glaucoma: 59.0±6.6 v/s 70.9±3.7 anni, $p=0.11$, t-test).

Gli occhi normali avevano un maggior spessore di RNFL rispetto ai glaucomatosi (normali v/s glaucoma: 85.1±13.2µm v/s 72.1±10.4µm, $p=0.03$, t-test), la per-

fusione dell'ONH era statisticamente più deficitaria nei glaucomatosi rispetto ai normali nello strato pre-laminare (normali v/s glaucoma: 0.29±0.03 v/s 0.26±0.03, $p=0.024$) e sull'intero ONH (0.30±0.03 v/s 0.27±0.03, $p=0.022$), ma non sulla lamina cribrosa (0.17±0.02 v/s 0.17±0.03, $p=0.79$). Quest'ultimo risultato è probabilmente dovuto alle limitate possibilità in *deep resolution and penetration* del device Spectral domain utilizzato [46, 47] (Fig. 10).

Michel Puech dell'Explore Vision di Parigi, afferma che esistono tre zone emoreologiche angio-tomografiche in cui verificare gli indici di flusso nell'ONH:

- Peri-Optic Disc Blood Flow
- Optic Disc Blood Flow
- Lamina Cribrosa

La lamina cribrosa, infatti, secondo la sua profondità di posizione nel canale neurale, può essere più difficilmente indagata dagli SD-OCT rispetto agli SS-OCT. Dalla disamina di questi indici si potrà avere una diagnosi flussimetrica dello stadio del glaucoma che certamente, in un prossimo futuro, integrata a data base normativi validati su grandi numeri, agevolerà la diagnosi e migliorerà la prognosi della malattia IOP dipendente [48].

Ultimate Goal & angio-OCT

La visualizzazione e l'analisi delle proprietà morfologiche degli oggetti nell'ambito della computer vision sono obiettivi strategici utili a migliorare la definizione delle forme analizzate, con notevoli performance e comprensione finale dell'imaging. Come in molti campi della medicina, gli algoritmi applicativi degli angio-OCT si stanno velocemente sviluppando con grande successo iconografico.

La "scheletrizzazione" delle immagini informatiche tomografiche è un'importante tecnica d'approccio per la rappresentazione e comprensione di una forma strutturata, riducendo l'imaging ad un grafo.

Questa procedura algoritmica permette una semplificazione e trasformazione da una struttura complessa a forme più semplici e schematiche. E', in altri termini, un'elaborazione matematico-informatica di geometria applicata all'immagine processing (Fig. 11) [49,50].

L'applicazione software *skeletonized vascular network mask*, proposta da Zeiss ancora non in commercio, è la realizzazione di questa tecnica, un'efficace elaborazione delle immagini per esaltare la visione dettagliata e schematica delle connessioni della rete vascolare capillare neuro-retinica.

L'innovazione algoritmica *Decorrelation Tail Removal* è un'applicazione particolarmente utile per aumentare il risultato qualitativo dell'imaging angio-OCT e diminuire gli artefatti di movimento. Rispetto ad altri algoritmi come Patented Motion Correction Technology (MCT) di Optovue utilizzati

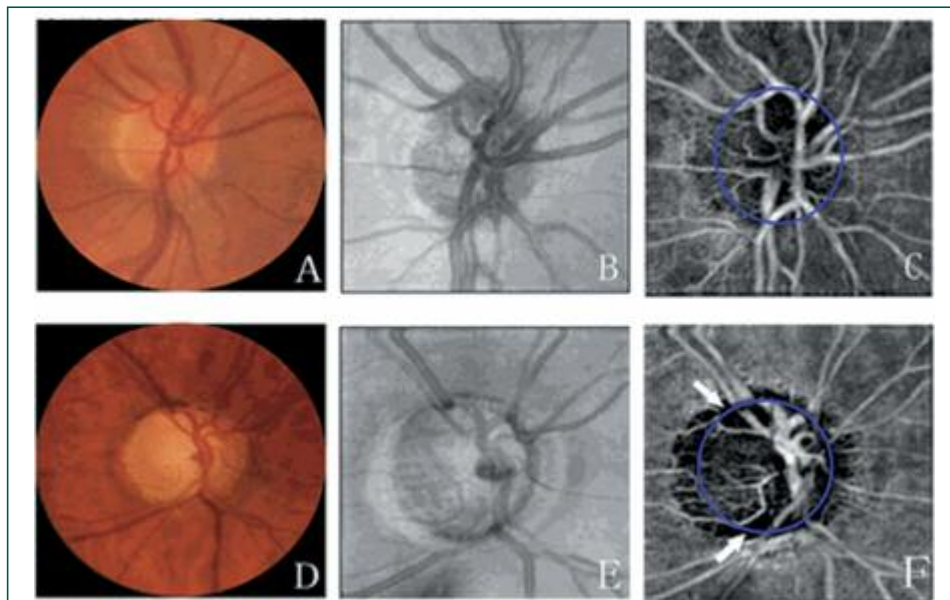


Fig. 9 - Fotografia del disco (A,D), immagini OCT en face (B,E) e angiogrammi(C,F) dell'ONH in soggetto normale(A→C) e con glaucoma(D→F). In (C) & (F) .La linea circolare blu delimita l'area del disco ottico. La freccia in (F) indica il difetto di perfusione per assenza del network microvascolare. (da Liang Liu et al.; rif. Bibl. [49]).

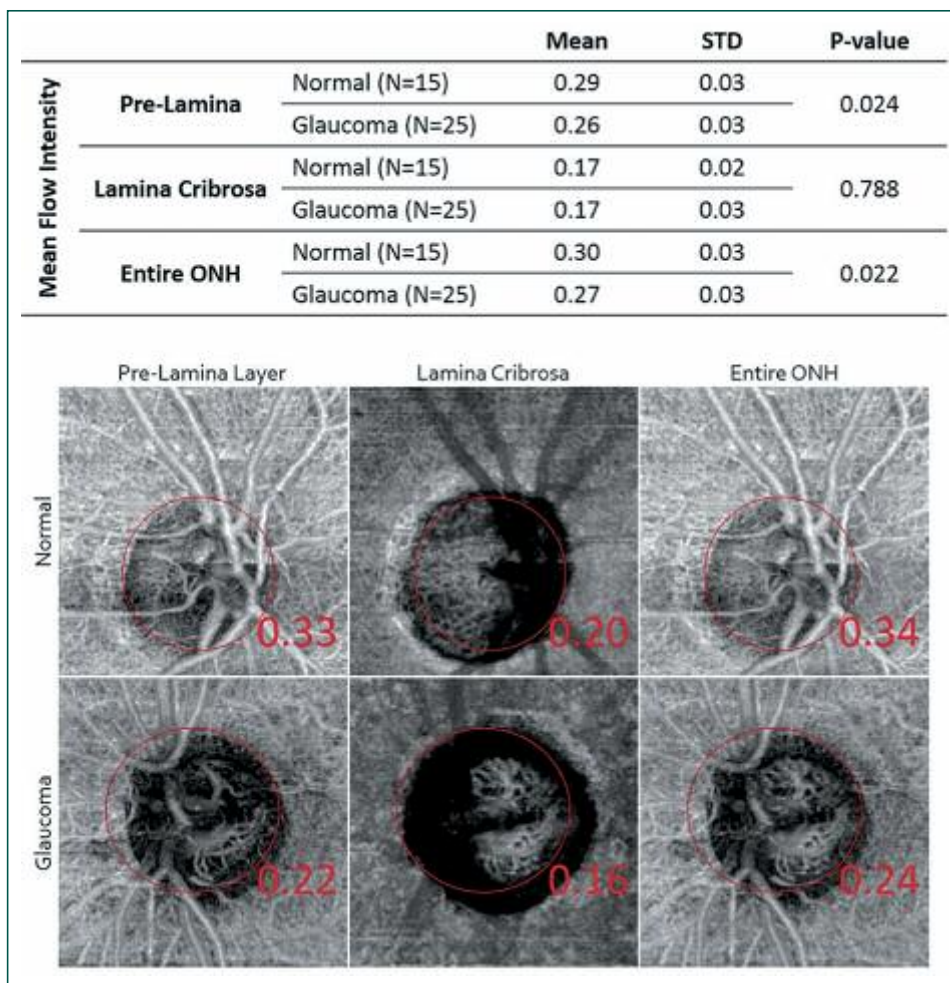


Fig. 10 - Intensità media del flusso in occhi normali e glaucomatosi. Dati di flusso medi (mean) in tabella e visualizzazione nella figura (angioPlex Zeiss e OMAG) (da Chieh-Li Chen et al. rif. Bibl. [46]).

per lo stesso fine, sembra svolgere meglio il compito di migliorare la risoluzione finale dell'imaging.

L'imaging composita a mosaico di singoli campi neuro-retinici, con la possibilità di estendere oltre le arcate vascolari la visione complessiva angio-vascolare dyeless, è una nuova modalità Wide Field angio-OCT.

L'ausilio di lenti opzionali (Staurerghi a 150°) utilizzate da qualche tempo in fluorangiografia ha definitivamente aperto la strada del Wide Field nell'imaging oftalmologico. Le implementazioni software utili al montaggio automatico di singole aree angio-tomografiche 3mm x 3mm e 6mm x 6mm, saranno presto a disposizione per una visione ad ampio campo anche nell'imaging vascolare dyeless.

La definizione finale delle immagini resta funzione dei pixel totali; dal loro aumento dipende la migliore definizione complessiva con la metodica Wide Field anche con gli angio-OCT.

Akihito Uji et al. dell'Università di Kyoto, all'ARVO 2015, hanno proposto una nuova tecnica per estendere il campo dell'imaging OCT (EFI, Extended Field Imaging) applicata inizialmente su Spectralis OCT Heidelberg e DRI OCT-1 Topcon e, in seguito, su altri modelli (RS3000 Nidek, Cirrus HD-OCT Carl Zeiss Meditec, RTVue-100 Optovue, 3D OCT-2000 Topcon).

In media le Scan orizzontali e verticali con Spectralis OCT-EFI erano rispettivamente aumentate da $9416 \pm 410 \mu\text{m}$ e $9437 \pm 374 \mu\text{m}$ a $13,610 \pm 843 \mu\text{m}$ e $14,082 \pm 701 \mu\text{m}$ (per entrambe le Scan $P < 0.0001$), senza rilevanti distorsioni delle immagini [51].

Altro passo futuro, transitorio o definitivo, sarà l'utilizzo a tutto campo della tecnologia *Swept Source* e l'applicazione delle *Ottiche Adattive*. Sugli SS-OCT si è già detto in altri articoli in questa Rivista.

La visione dettagliata che le Ottiche Adattive permettono, pur se per campi molto ristretti, offre la possibilità di vedere le singole entità cellulari e di studiarne la morfo-fisiologia anche in modo correlato.

Quest'opportunità straordinaria d'imaging aprirà, sicuramente, nuovi scenari e imprevedibili orizzonti scien-

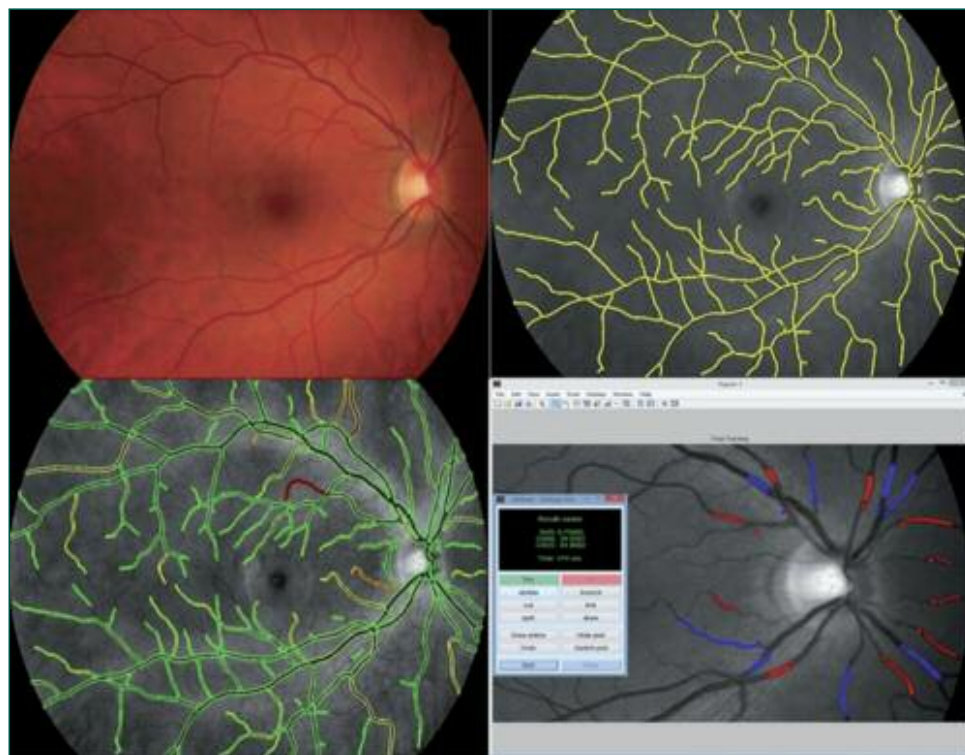


Fig. 11 - Esempio di sclerotizzazione dei vasi retinici. In alto a sinistra immagine fotografica originale. In alto a destra vasi sclerotizzati. In basso a sinistra metrica della tortuosità vasale Twist-based. In basso a destra metodo per classificazione i vasi (da J.C. Wigdahl et al.; ARVO 2015, University of Padova, Italy. rif. Bibl.[49]).

tifici, utilizzabili su larga scala, se i costi non saranno proibitivi.

Conclusioni e considerazioni finali

Con la comparsa sul mercato dopo RTVue-XR di altri angio-OCT come AngioPlex Zeiss, Triton DRI Topcon SS-OCT, RS 3000 Advance Nidek, Spectralis Heidelberg con modulo OCT2, il confronto e la discussione su questa nuova metodologia si è definitivamente e ulteriormente estesa, a tutto vantaggio delle conoscenze diagnostiche oftalmologiche in campo vascolare.

Grande e riconosciuto merito alla diffusione e conoscenza in Italia degli OCT prima e degli angio-OCT dopo è dovuto ai Corsi di Aggiornamento che da 40 anni Bruno Lumbroso organizza con assoluto alto profilo scientifico, grande rispondenza di pubblico e ampia risonanza internazionale. A lui va anche l'indiscusso merito di aver pensato e realizzato la modalità tomografica en face, senza la quale non sarebbe stata possibile l'indagine vascolare dyeless angio-OCT.

Le informazioni offerte sulla velocità emoreologica e la densità vascolare sono estremamente importanti per la fisiologia neuro-retinica in molte malattie oculari non solo del polo posteriore. Tale è la bellezza angiografica e tomografica offerta dagli angio-OCT che Philip J. Ro-

senfeld del Bascom Palmer Eye Institute dell'Università di Miami, in un recente articolo apparso su *Ophthalmology Times* nel novembre 2015, così conclude: "Consequently, it is a win-win situation for users" riferendosi alla doppia possibilità d'indagine, strutturale e vascolare, che i recenti angio-OCT oggi ci offrono.

Gli sviluppi futuri saranno sicuramente molto promettenti e fruttuosi, con ancora importanti sorprese, non

del tutto prevedibili. Le nuove possibilità diagnostiche vascolari non invasive, aperte ad una più grande platea d'utilizzatori, certamente saranno di vantaggio nella diagnosi precoce del glaucoma, con positive ricadute, oltre che sulla funzione visiva, anche sul risparmio previdenziale, così necessario per le finanze statali, ancor di più nel terzo Millennio per l'aumento della vita media della popolazione. ■

BIBLIOGRAFIA & SITIGRAFIA

- 1) Ruikang K Wang. Optical Microangiography: A Label Free 3D Imaging Technology to Visualize and Quantify Blood Circulations within Tissue Beds in vivo. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2010 May; 16(3): 545-554.
- 2) Arend O, Plange N, Sponsel WE, Remky A. Pathogenetic aspects of the glaucomatous optic neuropathy: fluorescein angiographic findings in patients with primary open angle glaucoma. *Brain Res Bull* 2004;62:517-24.
- 3) Schwartz B, Rieser JC, Fishbein SL. Fluorescein angiographic defects of the optic disc in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1977;95:1961-74.
- 4) Hitchings RA, Spaeth GL. Fluorescein angiography in chronic simple and low-tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1977;61:126-32.
- 5) Piltz-Seymour JR, Grunwald JE, Hariprasad SM, Dupont J. Optic nerve blood flow is diminished in eyes of primary openangle glaucoma suspects. *Am J Ophthalmol* 2001;132:63-9.
- 6) Hamard P, Hamard H, Dufaux J, Quesnot S. Optic nerve head blood flow using a laser Doppler velocimeter and haemorheology in primary open angle glaucoma and normal pressure glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1994;78:449-53.
- 7) Hafez AS, Bizzarro RL, Lesk MR. Evaluation of optic nerve head and peripapillary retinal blood flow in glaucoma patients, ocular hypertensives, and normal subjects. *Am J Ophthalmol* 2003;136:1022-31.
- 8) C. Prünte, J. Flammer, R. Markstein, and M. Rudin, "Quantification of optic nerve blood flow changes using magnetic resonance imaging" *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36(1), 247-251 (1995).
- 9) Sommer A, Tielsch JM, Katz J, et al; Baltimore Eye Survey Research Group. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1090-5.
- 10) Flammer J. The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994;38(Suppl):S3-6.
- 11) Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, et al. Vascular risk factors for primary open angle glaucoma: the Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 2000;107:1287-93.
- 12) Schuman JS, Hee MR, Arya AV, Pedut-Kloizman T, Puliafito CA, Fujimoto JG, Swanson EA. Optical coherence tomography: a new tool for glaucoma diagnosis. *Curr Opin Ophthalmol*. 1995 Apr;6(2):89-95.
- 13) Sihota R1, Sony P, Gupta V, Dada T, Singh R. Diagnostic capability of optical coherence tomography in evaluating the degree of glaucomatous retinal nerve fiber damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 May;47(5):2006-10.
- 14) Garway-Heath DF, Wollstein G, R A Hitchings RA. Aging changes of the optic nerve head in relation to open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1997 81: 840-845.
- 15) A. Lucente. Glaucoma tra struttura e funzione. *Oftalmologia domani* - N.1 - Anno 2014.
- 16) M. Cristina Leske. Ocular perfusion pressure and glaucoma: clinical trial and epidemiologic findings. *Curr Opin Ophthalmol*. 2009 March; 20(2): 73-78.
- 17) A. Lucente. Principi tecnologici e Imaging degli Angio-OCT. *Oftalmologia Domani*. N.2 - Anno 2015.
- 18) Harris A, Anderson DR, Pillunat L, Joos K, Knighton RW, Kagemann L, Martin BJ. Laser Doppler flowmetry measurement of changes in human optic nerve head blood flow in response to blood gas perturbations. *J Glaucoma*. 1996 Aug;5(4):258-65.
- 19) Larry Kagemann, Alon Harris, Hak Sung Chung, David Evans, Scott Buck, Bruce Martin. Heidelberg retinal flowmetry: factors affecting blood flow measurement. *British Journal of Ophthalmology* 1998;82:131-136.
- 20) Alon Harris, Thomas A. Ciulla, Hak Sung Chung, Bruce Martin. Regulation of Retinal and Optic Nerve Blood Flow. *JAMA Ophthalmology*. November 1, 1998, Vol 116, No. 11.
- 21) B. L. Petrig, C. E. Riva, and S. S. Hayreh, "Laser Doppler flowmetry and optic nerve head blood flow," *Am. J. Ophthalmol.* 127(4), 413-425 (1999).
- 22) Hana Leiba, Rony Rachmiel, Alon Harris, Larry Kagemann, Ayala Pollack, Miriam Zalish. Optic nerve head blood flow measurements in non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Eye* (2000) 14, 828-833; doi:10.1038/eye.2000.231.
- 23) M. Nagahara, Y. Tamaki, A. Tomidokoro, and M. Araie, "In vivo measurement of blood velocity in human major retinal vessels using the laser speckle method" *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 52, no. 1, pp. 87-92, 2011.

segue ●●●>

<••• segue

- 24) Wataru Kobayashi, Hiroshi Kunikata, Kazuko Omodaka, Kyousuke Togashi, Morin Ryu, Masahiro Akiba, Gaku Takeuchi, Tetsuya Yuasa, and Toru Nakazawa. Correlation of Optic Nerve Microcirculation with Papillomacular Bundle Structure in Treatment Naive Normal Tension Glaucoma. *Journal of Ophthalmology*. Volume 2014, Article ID 468908, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/468908>
- 25) S. Resnikoff, D. Pascolini, D. Etya'ale et al., "Global data on visual impairment in the year 2002," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 82, no. 11, pp. 844-851, 2004.
- 26) A. Iwase, Y. Suzuki, M. Araie et al. "The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study," *Ophthalmology*, vol. 111, no. 9, pp. 1641-1648, 2004.
- 27) Tetsuya Sugiyama. Basic Technology and Clinical Applications of the Updated Model of Laser Speckle Flowgraphy to Ocular Diseases. *Photonics* 2014, 1, 220-234; doi:10.3390/photonics103022.
- 28) H. Isono, S. Kishi, Y. Kimura, N. Hagiwara, N. Konishi, and H. Fujii. "Observation of choroidal circulation using index of erythrocytic velocity". *Arch. Ophthalmol. (Chicago)* 121, 225-231 2003.
- 29) N. Konishi, Y. Tokimoto, K. Kohra, and H. Fujii, "New laser speckle flowgraphy system using CCD camera" *Opt. Rev.* 9, 163-169 2002.
- 30) A. Lucente. La Lamina Cribrosa: Imaging e biomeccanica. *Oftalmologia domani - N. 2 - Anno 2014*.
- 31) Yali Jia, John C. Morrison, Jason Tokayer, Ou Tan, Lorinna Lombardi, Bernhard Baumann, Chen D. Lu, WooJhon Choi, James G. Fujimoto, David Huang. Quantitative OCT angiography of optic nerve head blood flow. 1 December 2012 / Vol. 3, No. 12 / *BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS* 3128.
- 32) Yali Jia, Eric Wei, Xiaogang Wang, Xinbo Zhang, John C. Morrison, Mansi Parikh, Lori H. Lombardi, Devin M. Gattey, Rebecca L. Armour, Beth Edmunds, Martin F. Kraus, James G. Fujimoto, David Huang. Optical Coherence Tomography Angiography of Optic Disc Perfusion in Glaucoma. *Ophthalmology* 2014;121:1322-1332 by the American Academy of Ophthalmology.
- 33) Ruikang K Wang. Optical Microangiography: A Label Free 3D Imaging Technology to Visualize and Quantify Blood Circulations within Tissue Beds in vivo. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2010 May.
- 34) R. K. Wang et al., "Depth-resolved imaging of capillary networks in retina and choroid using ultrahigh sensitive optical microangiography," *Opt. Lett.* 35(9), 1467-1469 (2010).
- 35) A. Mariampillai et al., "Speckle variance detection of microvasculature using swept-source optical coherence tomography," *Opt. Lett.* 33(13), 1530-1532 (2008).
- 36) D. Yu Kim et al., "In vivo volumetric imaging of human retinal circulation with phase-variance optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express* 2(6), 1504-1513 (2011).
- 37) Y. Jia et al. "Split-spectrum amplitude-decorrelation angiography with optical coherence tomography" *Opt. Express* 20(4), 4710-4725 (2012).
- 38) H. M. Subhash and M. J. Leahy, "Microcirculation imaging based on full-range high-speed spectral domain correlation mapping optical coherence tomography" *J. Biomed. Opt.* 19(2), 021103 (2014).
- 39) Anqi Zhang, Qinqin Zhang, Chieh-Li Chen, Ruikang K. Wang. Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: a review and comparison. *Journal of Biomedical Optics* 20(10), 100901 (October 2015).
- 40) Huang JC, Konduru R, Zhang X, Tan O, Francis BA, Varma R, Sehi M, Greenfield DS, Sadda SR, Huang D. Relationship among visual field, blood flow, and neural structure measurements in glaucoma. *IOVS* 2012.
- 41) Huang D, et.al. A new view for an old disease SSADA software, coupled with OCT angiography shows potential in diagnosing, monitoring glaucoma. *Ophthalmology Management*. Article Date: 11/1/2015.
- 42) Abadia B, Ferreras A, Calvo P, et al. Relationship between spectral-domain optical coherence tomography and standard automated perimetry in healthy and glaucoma patients. *Biomed Res Int.* 2014;2014:514948.
- 43) Brusini P. Clinical use of a new method for visual field damage classification in glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 6:402-407,1996.
- 44) Brusini P, Johnson CA. Staging functional damage in glaucoma: review of different classification methods. *Surv Ophthalmol* 52:156-179,2007.
- 45) Liu L, Jia Y, Takusagawa HL, Pechauer AD, Edmunds B, Lombardi L, Davis E, Morrison JC, Huang D. Optical Coherence Tomography Angiography of the Peripapillary Retina in Glaucoma. *JAMA Ophthalmol.* 2015 Sep;133(9):1045-52.
- 46) Chieh-Li Chen, Divakar Gupta, Joanne C. Wen, Raghu C. Mudumbai, Murray A. Johnstone, Philip P. Chen, Karine D. Bojikian, Qinqin Zhang, Yanping Huang, Ruikang K. Wang. Optic disc perfusion in glaucoma with optical microangiography (OMAG). *ARVO* 2015.
- 47) Liang Liu; Yali Jia; John C Morrison; Mansi Parikh; Beth Edmunds; David Huang. Angiography of Optic Disc Perfusion in Glaucoma with a 70 kHz Spectral OCT. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* April 2014, Vol.55, 221.
- 48) <http://cnpg.comparenetworks.com/167610-Angio-OCT-of-Optic-Disc-SSADA>.
- 49) [fantomake.altervista.org/tesi/Capitolo III](http://fantomake.altervista.org/tesi/Capitolo%20III).
- 50) Jeffrey C Wigdahl, Pedro Guimaraes, Enea Poletti, Alfredo Ruggeri. ReVMS (Retinal Vasculature Measurement System). *Investigative Ophthalmology & Visual Science* June 2015, Vol.56, 5260. doi:
- 51) Akihito Uji, Nagahisa Yoshimura. *Ophthalmology*, Kyoto Univ Graduate Sch of Med, Kyoto City, Japan. *ARVO 2015 The Application of Extended Field Imaging to Optical Coherence Tomography*.