

Capitolo 1

Principi tecnologici e imaging degli Angio-OCT

Amedeo Lucente

INTRODUZIONE

L'angiografia tomografica a coerenza ottica senza mezzo di contrasto da poco più di due anni è una solida realtà semeiologica strumentale in oftalmologia. Tale innovazione d'imaging, di straordinaria portata diagnostica, è sempre più diffusa e in continuo sviluppo, come attestano gli innumerevoli lavori scientifici e i brevetti depositati negli ultimi anni (Figura 1).

L'angiografia con fluoresceina (FA) per decenni ha permesso, in modo molto soddisfacente, l'imaging vascolare neuroretinica, e resta ancora gold standard per le patologie vascolari in oftalmologia. A fronte degli indubbi vantaggi che ha apportato nelle conoscenze di gran parte delle patologie retiniche, la FA resta una tecnica invasiva, non raccomandata in gravidanza, nell'infanzia, in soggetti con anamnesi di allergia, non ripetibile a intervalli ravvicinati nel tempo. L'angiografia OCT (OCTA) ha il vantaggio di essere una tecnologia non invasiva, non a contatto, ripetibile, senza mezzo di contrasto, senza limiti per età o stato di salute del paziente, e permette di visionare la trama vascolare neuroretinica per strati, evitando sovrapposizioni tissutali come in FA. Rispetto

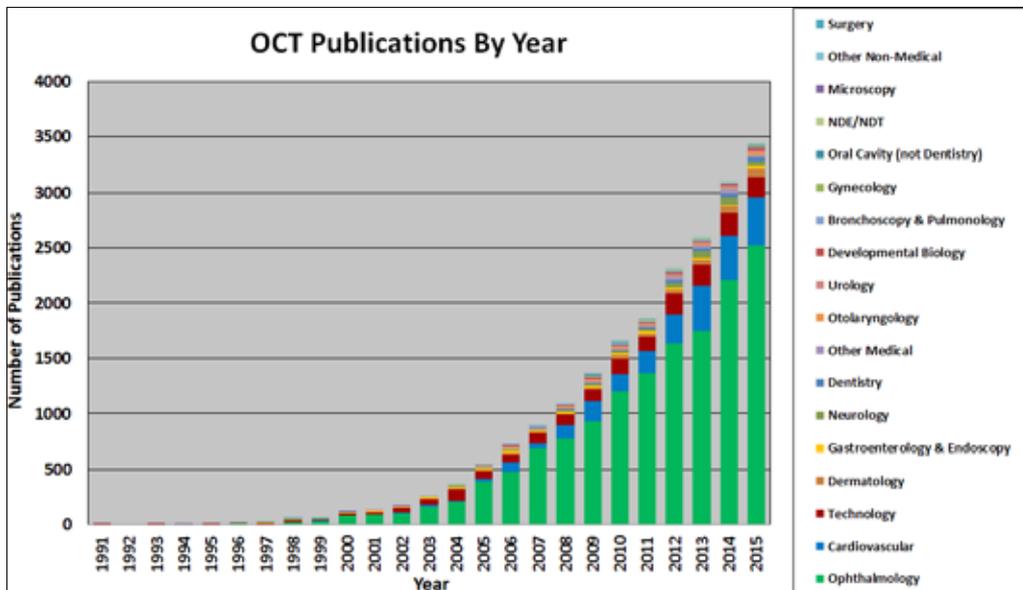


Figura 1. Pubblicazioni sugli OCT in PubMed per anno e per area di ricerca (by Eric A. Swanson and <http://www.sweptlaser.com>).

all'imaging Doppler-OCT non è influenzata dall'orientamento dei vasi, visibili anche se disposti perpendicolarmente al fascio di scansione. La possibilità di avere un'imaging vascolare con modalità dyeless è dovuta essenzialmente alla fluttuazione della luce retrodiffusa (backscattered), secondaria al movimento dei fluidi intravascolari, principalmente eritrociti, correlata alla loro velocità. Per una registrazione iconograficamente soddisfacente del flusso emoreologico sono necessari algoritmi applicativi, una sequenza di A-scan ripetute su B-scan, un tempo sufficiente al rilievo di segnali in movimento rispetto ai segnali statici.

Il tempo di ripetizione necessario alla cattura dello scattering di movimento è molto migliorato; negli attuali device è di soli pochi secondi, con comprensibile beneficio della qualità finale per i minori artefatti. La ricostruzione dei network vascolari è opera dei software matematici applicativi e delle specifiche caratteristiche degli algoritmi di decorrelazione, qualità tecnologiche tutelate da brevetti depositati. Applicazioni sempre più performanti sono disponibili negli OCTA con maggiori e più ampie possibilità diagnostiche, sia per il segmento anteriore che posteriore. I database di riferimento, ancora non disponibili, sono in elaborazione e presto saranno immessi nei Report di stampa, con validazione statistica.

Mappe finali in falsi colori rendono visibili i risultati degli esami effettuati in modo chiaro e immediato; questa possibilità è stata già realizzata per la Vessel Density e la Perfusion Density. Una moltitudine di metodi OCTA si sta infatti sviluppando, con vantaggi e limiti che dipendono essenzialmente dalle caratteristiche informatico-matematiche degli algoritmi, e dall'efficacia dei software applicativi. Nessuna metodologia è superiore alle altre; la strada da percorrere in angiografia dyeless, anche se tracciata, è ancora molto lunga e migliorabile. Spesso nuove applicazioni rendono più fruibile la metodologia utilizzata, e le case costruttrici implementano di continuo gli originali pannelli applicativi dei loro OCTA. Questa straordinaria e, per molti versi, rivoluzionaria modalità d'imaging è in continuo sviluppo anche negli altri campi della diagnostica per immagini oltre all'oftalmologia (Figura 2).

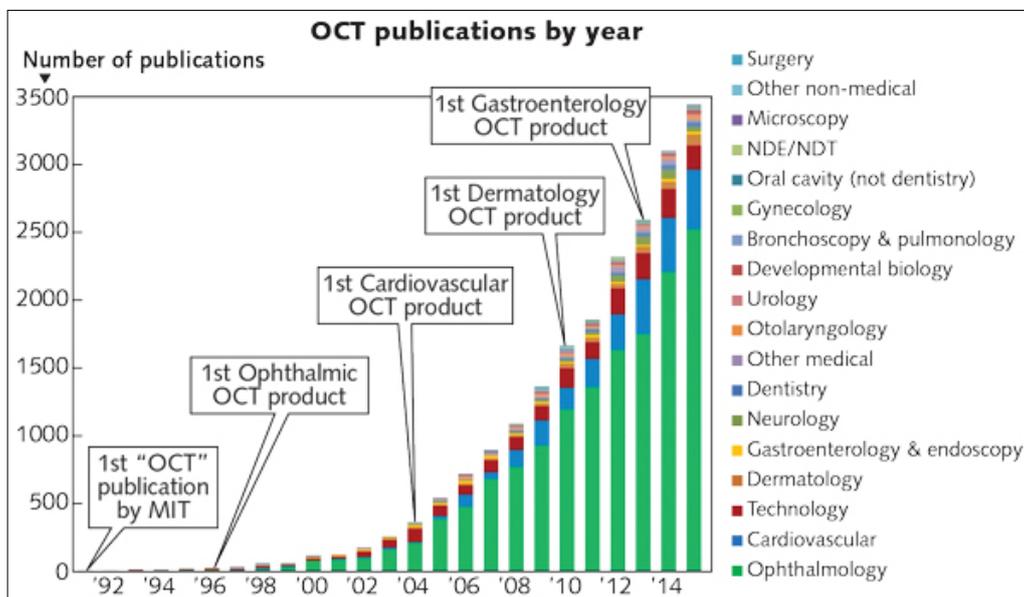


Figura 1. Pubblicazioni sugli OCT dal 1991 al 2015 nelle varie discipline mediche (by Eric A. Swanson and <http://www.sweptlaser.com>).

CARATTERISTICHE DEGLI OCTA

Il voxel (volumetric pixel, volumetric picture element) è l'equivalente in 3D del pixel bidimensionale (pixel, picture element, elemento d'immagine) e indica ciascuno degli elementi puntiformi che compongono la rappresentazione di un'immagine raster digitale su un dispositivo di visualizzazione¹. Gli OCTA permettono scansioni sia bi che tridimensionali. La rappresentazione finale delle immagini dipende dal numero totale dei pixel/voxel per campo, che ne determinano la qualità. La storia dell'imaging nella diagnostica biomedica non è recente.

Ha inizio con la scoperta dei raggi X (W. C. Röntgen 1845-1923) e, segnatamente, con l'avvento della tomografia assiale computerizzata (TAC in seguito TC) da parte di due scienziati indipendenti alla fine degli anni Settanta, Godfrey N. Hounsfield e Cormack McLeod, entrambi premi Nobel per la Medicina nel 1979². Il ruolo dell'informatica è stato essenziale per lo sviluppo della medicina; non esiste disciplina scientifica dove il digitale e i software non siano fondamentali per la qualità finale dell'imaging. I nuovi OCTA hanno beneficiato di questi recenti progressi, e permettono la visualizzazione dei plessi vascolari neuro-retinici non realizzabile fino a poco tempo fa senza mezzo di contrasto. Questi nuovi device, attraverso modifiche migliorative del software e l'utilizzo di algoritmi studiati specificatamente, riescono a selezionare per sottrazione dal back-scattering complessivo il segnale dinamico nella sezione di tessuto in scansione.

È possibile, infatti, rilevare mappe bi-tridimensionali del flusso emoreologico neuro-retinico dal contesto della riflettività tomografica globale. La ripetizione sequenziale delle scansioni è necessaria per distinguere la riflettività dinamica ed eliminare gli artefatti dovuti ai movimenti del tessuto, che inficerebbero la qualità finale dell'imaging³⁻⁵. Gli OCTA sono caratterizzati da una velocità di campionatura maggiore (A-scan) rispetto alla maggioranza degli SD-OCT in commercio, condizione necessaria per una proficua elaborazione del segnale (decorrelazione).

Affinché possa essere rilevato tomograficamente il movimento dovuto al flusso ematico, è necessario, infatti, che l'algoritmo rilevi e scarti i pixel (o voxel in 3D) statici e riesca a evidenziare, per

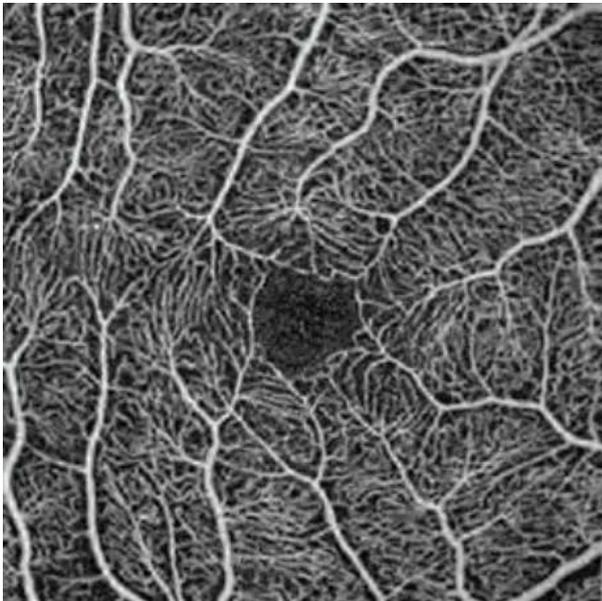


Figura 3a. Superficial Vascular Plexus SVP

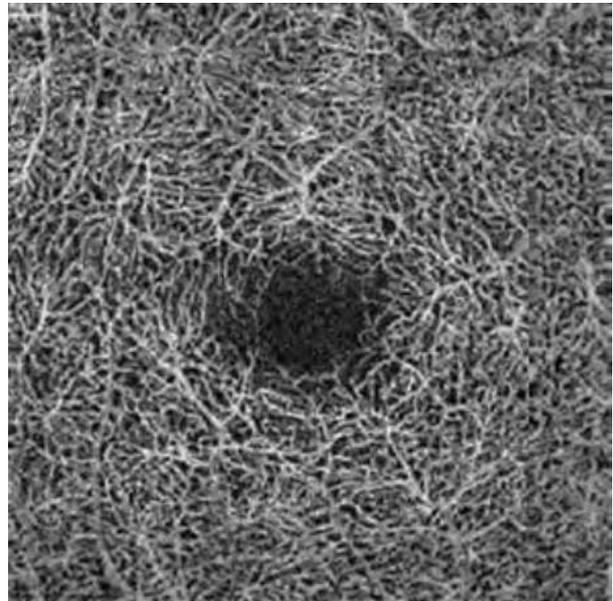


Figura 3b. Deep Vascular Plexus DVP

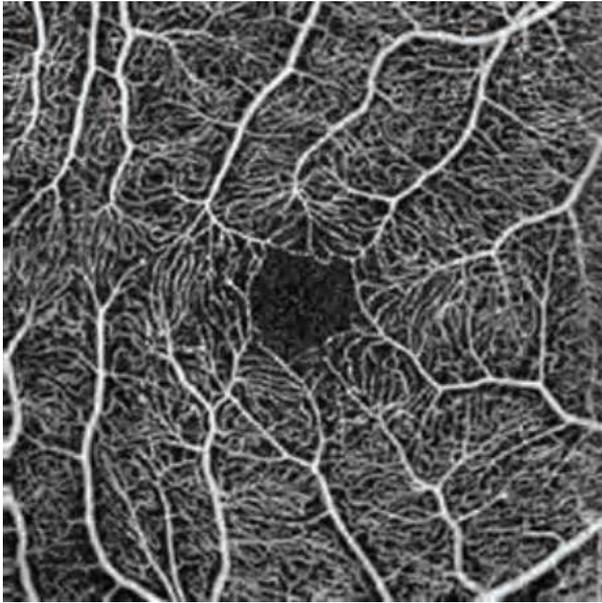


Figura 4a. Immagine della fovea 3 x 3 mm.



Figura 4b. 4b Immagine del disco ottico 3x3mm.

sottrazione, i pixel dinamici, variabili nel tempo, attraverso un processo informatico-matematico di decodificazione dei segnali denominato decorrelazione. La velocità minima di scansione richiesta è di 70.000 A-Scan al sec (70KHz, 1kHz = 1000Hz). L'algoritmo, in questa fase di sviluppo, suddivide le scansioni in più bande spettrali (split spectrum) per riuscire a decorrelare efficacemente il segnale; i risultati sono iconograficamente meno brillanti se si procede su un unico spettro (full spectrum). Lo split spectrum, infatti, migliora di oltre 100% il rapporto segnale/rumore (signal-to-noise ratio SNR) rispetto al full spectrum.

Tale caratteristica d'applicazione sarà ulteriormente implementata e modificata negli OCTA di seconda generazione in fase avanzata di progettazione, essenzialmente con l'aumento della velocità di scansione fino a 400KHerz. Il miglioramento del rapporto SNR è stato del resto affrontato non senza difficoltà in ultrasonografia sin dalla fine degli anni Ottanta⁶. Gli angiogrammi OCT, partendo dalla Membrana Limitante Interna MLI fino all'Epitelio Pigmentato Retinico EPR e alla corioide, individuano separatamente il plesso vascolare superficiale, Superficial Vascular Plexus SVP, e quello profondo Deep Vascular Plexus DVP (Figure 3a-3b).

Il SVP, costituito dai grossi vasi retinici più interni che si trovano tra le cellule ganglionari e le fibre ottiche, ha uno spessore di 120 micron. Il DVP è, invece, individuato nello strato plessiforme interno IPL con uno spessore di 60 micron. Attualmente il limite di risoluzione di flusso degli OCTA è di circa 25-30 micron. Lo studio dell'anatomia della retina ci ha insegnato che i vasi retinici sono divisi in tre plessi, il superficiale con vasi di grande/medio calibro, l'intermedio con vasi di piccole dimensioni a livello dello strato nucleare interno e il plesso profondo esternamente allo strato plessiforme esterno⁷. Gli attuali OCTA non riescono a distinguere questi ultimi due plessi che sono associati in un unico plesso. La risoluzione degli OCTA è ora possibile in retina per aree di 3mm x 3mm, 6mm x 6mm e 8mm x 8mm, mentre sul disco ottico le aree possibili d'indagine sono variabili e non standardizzate (3mm x 3mm e 4.5mm x 4.5mm Optovue) (Figure 4a-4b).

Anche se le aree sono di diverse dimensioni, i pixel totali rimangono gli stessi, per cui la risoluzio-

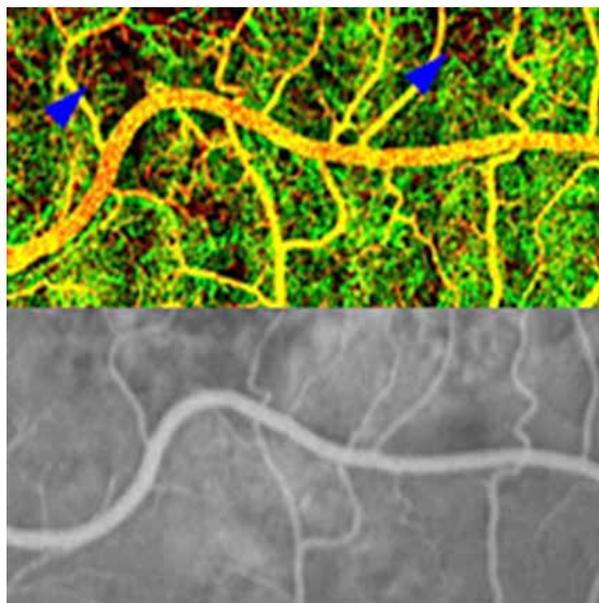


Figura 5. Phase-Variance OCT (sopra) rivela i vasi ematici nella retina in giallo e rosso e nella coriocalpillare in grigio. Le frecce blu rilevano aree prive di coriocalpillare. Nella fluoroangiografia (sotto) non sono visibili tutti i dettagli vascolari evidenti in OCTA. Paziente con AMD (da Republished from Kim et al., PNAS). Da: <https://nei.nih.gov/sites/default/files/news-images/tech2.jpg>

ne diminuisce in modo evidente all'aumentare dell'estensione del campo d'indagine e i dettagli di flusso possono sfuggire. In pratica si utilizza di routine solo il campo 3mm x 3mm per indagini più dettagliate sulla retina. Sono in arrivo nuovi device che potranno offrire indagini ad ampio campo (wide field) fino a 12mmx12mm e una completa visione della vascolarizzazione corio-retinica, conservando una risoluzione finale accettabile, cosa possibile con l'aumento dei pixel totali⁸. Per verificare la validità di questa nuova metodica il confronto con l'indagine invasiva si è resa necessariamente obbligatoria. In uno studio *Matsunaga et al.* hanno dimostrato la sovrapponibilità e confrontabilità tra l'indagine OCTA dyeless e la fluoroangiografia/indocianina FA/ICGA⁹.

- *Spaide et al.* hanno confrontato e attentamente osservato la vascolarizzazione peripapillare con OCTA in 12 occhi normali. La sovrapponibilità nelle immagini tra FA/ICGA e OCTA dell'architettura dei plessi vascolari era evidente, con punti a favore dell'angio-OCT per i capillari peripapillari e quelli profondi, vantaggi riscontrati anche per la retina in altre ricerche¹⁰ (Figura 5). Questi studi, se da un lato avvalorano l'attendibilità dell'angio-OCT o addirittura ne tracciano una certa supremazia, dall'altro giustificano ulteriormente la marginalità diagnostica delle metodiche invasive. Le immagini wide-field, che tanto successo hanno nell'imaging oftalmologica FA/ICGA, saranno presto possibili anche con gli OCTA (Figure 6a-6b).

La Zeiss ha sviluppato recentemente un software di montaggio automatico e indiretto delle singole immagini wide-field in modo veloce ed efficace, che potrebbe interessare anche agli OCTA [11]. A un simile risultato è arrivata anche la Heidelberg con un sistema ottico applicato agli SD-OCT Spectralis che permette di coprire un campo retinico di 105°, da equatore ad equatore^{12,13} (Figura 7). Il montaggio indiretto delle immagini 3mm x 3mm permetterebbe immagini wide-field ad alta definizione. La novità della tecnologia dyeless, come riferito, è dovuta essenzialmente all'applicazione di algoritmi capaci di modificare l'imaging tomografica. La ricerca biomedica da più tempo

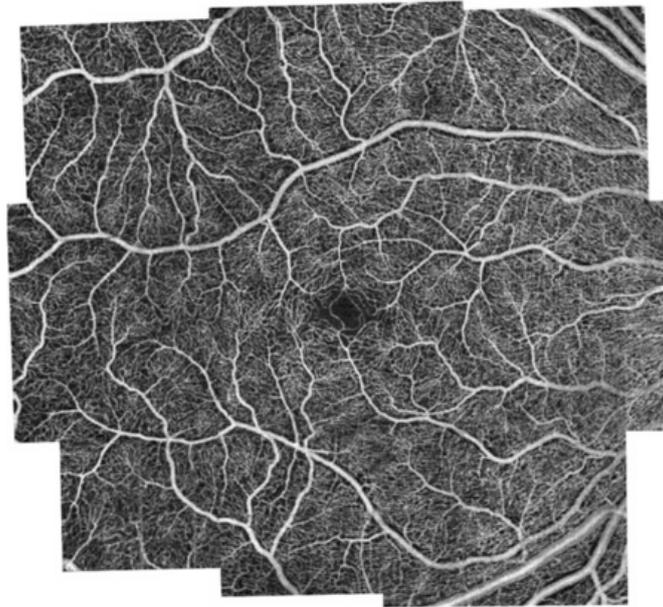


Figura 6a. OCTA Wide-field di retina normale con RTVue XR Avanti, montaggio con Adobe Photoshop (San Jose, CA). (de Carlo TE et al.). Da: A review of optical coherence tomography angiography (OCTA)

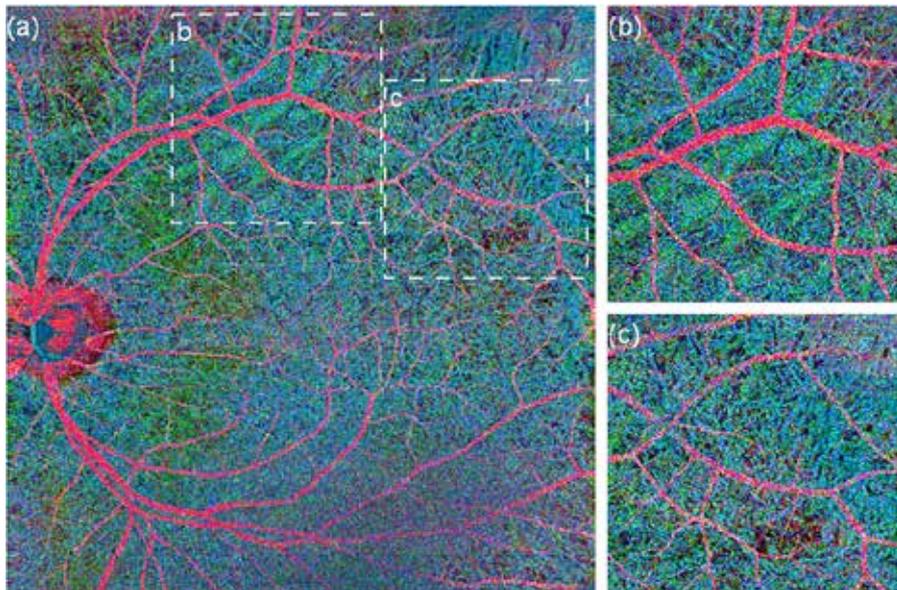


Figura 6b. En-face color-coded della vascolarizzazione corio-retinica per 48° circa d'apertura angolare in a; zoom in b e c. (da Cedric Blatter J. Biomed. Opt. 17(7). <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1351611>)

si è dedicata all'elaborazione e modifica dei segnali biomedicali per migliorare i dati in uscita. Gli algoritmi matematici sono lo strumento per arrivare a quest'obiettivo, mentre l'informatica e l'elaborazione dei segnali elettromagnetici sono il terreno su cui questi modelli matematici agiscono con grandi performance se adeguatamente e opportunamente applicati.

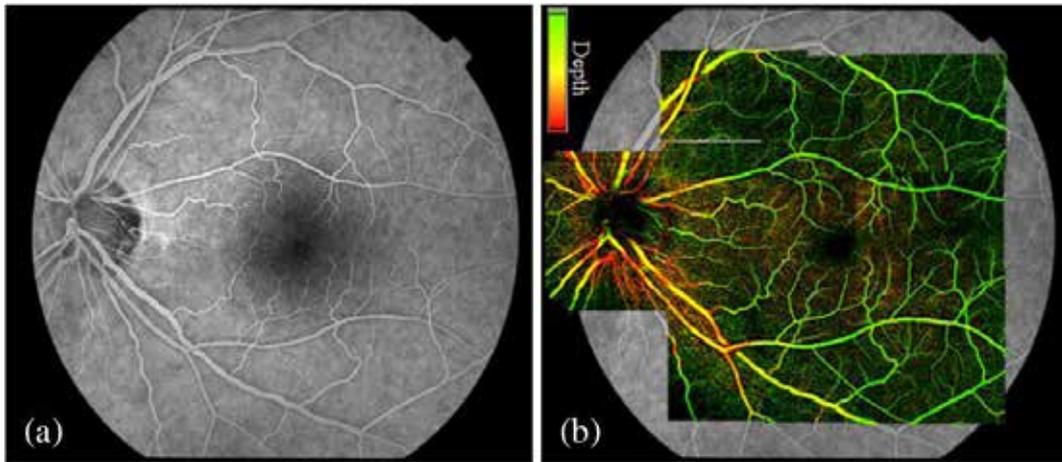


Figura 7. Immagine FA in (a) e PV-OCT di 10 riquadri sovrapposto a FA in (b). (Mohammad Sultan Mahmud). Da: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1681506> (a) FA image. (b) PV-OCT vascular map of the retina acquired from 10 volumes and overlaid on fundus FA. (Mohammad Sultan Mahmud)

SEGNALI ELETTROMAGNETICI E TRASFORMATA DI FOURIER

Per capire come un algoritmo possa favorire l'imaging del flusso ematico retinico dyeless, bisogna chiarire alcune nozioni sulla teoria dei segnali elettromagnetici. Caratteristica di un segnale elettrico è la possibilità di trasmettere un'informazione, definita come funzione matematica nel tempo. La teoria dei segnali studia le proprietà matematiche e statistiche dei segnali e delle loro variazioni. In statistica per correlazione s'intende una relazione tra due variabili tale che a ciascun valore nella prima variabile corrisponda, con una "certa regolarità", un valore nella seconda (Wikipedia). La correlazione dei segnali è alla base degli algoritmi negli OCTA.

Non si tratta di un semplice rapporto causa-effetto ma della relazione tra due variabili. La decorrelazione (decorrelation) è un processo matematico utilizzato nell'elaborazione dei segnali per modificare l'autocorrelazione (comparazione del segnale con se stesso) o le correlazioni incrociate (cross-correlazioni, comparazione delle immagini nel tempo), al fine di preservare alcune caratteristiche ed esaltarle, come avviene per esempio con un filtro (sbiancamento).

L'uso di algoritmi è indispensabile, tra l'altro, ai device biomedicali per la cosiddetta "registrazione d'immagini" (image registration). Questa tecnica è utilissima in radiologia (TAC e RMN) nelle ricostruzioni 3D, nel contrastare le modificazioni dovute alla respirazione e/o ai movimenti del corpo durante l'esecuzione dell'esame e per poter utilmente confrontare le immagini nel tempo attraverso la sovrapposizione automatica di nuove scansioni ad altre di riferimento, strategia informatico-algoritmica denominata co-registrazione multi-modale¹⁴. Decorrelazione e co-registrazione spesso si sovrappongono e si sommano per aumentare la qualità finale nell'imaging. Esistono fondamentalmente due modi per acquisire immagini biomedicali: uno finalizzato ad avere informazioni strutturali/anatomiche, possibili ad alta risoluzione (Tomografia Computerizzata CT o in Risonanza Magnetica MR), e un modo per ottenere informazioni funzionali, fruibili solo a più bassa risoluzione (PET Positron Emission Tomography, SPECT Single Photon Emission Computed Tomography o fMRI functional Magnetic Risonance Imaging).

L'angio-OCT è da considerarsi, con ogni diritto, una Neuroimaging Funzionale (Functional Neuroimaging), tecnologia in grado di misurare il metabolismo cerebrale al fine di analizzare e stu-

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \cdot e^{-j2\pi f t} dt$$

$$x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} X(f) \cdot e^{+j2\pi f t} df$$

Figura 8. Trasformata di Fourier $X(f)$ nel dominio della frequenza e antitrasformata $x(t)$ nel dominio del tempo.

diare la relazione tra l'attività di determinate aree dell'encefalo e le sue specifiche funzioni. Da questo punto di vista l'oftalmologia arriva con un certo ritardo tecnologico. Considerate però le dimensioni tissutali d'analisi, si comprende bene che il gap temporale è più che giustificato¹⁵. Per visualizzare il flusso vascolare retinico e del nervo ottico, com'è stato anticipato, si possono utilizzare algoritmi che implementano la fase Phase-based, o l'ampiezza del segnale digitale Amplitude-based. Gli algoritmi utilizzano a loro volta la trasformata di Fourier, che ha reso possibile, d'altra parte, il passaggio dalla tecnologia Time Domain (dominio del tempo) allo Spectral o Fourier Domain (dominio delle frequenze).

L'utilizzo delle formule matematiche trovate e descritte dallo scienziato francese Jean Baptiste Fourier (Auxerre 1768 – Parigi 1830) sono, infatti, alla base dell'imaging in biomedicina e uno degli strumenti matematici più utilizzati nell'ambito delle scienze applicate in generale. Senza entrare troppo nel merito questa coppia di formule reversibili, trasformata e anti-trasformata (trasformata inversa) di Fourier, consentono di scomporre un'onda sinusoidale complessa in onde più semplici e calcolarne le componenti, ampiezza, fase e frequenza. Applicando la trasformata di Fourier si passa dallo studiare il segnale (una funzione) dal dominio del tempo $x(t)$ al dominio della frequenza $X(f)$, misurabile in Hertz e denominata spettro delle frequenze (Figura 8). Si seziona così l'onda nelle sue componenti, in modo che siano più facilmente caratterizzabili e determinabili (Figure 9a-9b).

In sostanza anche la trasformata di Fourier, e la sua forma veloce FFT Fast Fourier Transform, sono processi matematici di semplificazione, indispensabili nell'elaborazione di segnali digitali¹⁶.

ALGORITMI E ANGIOGRAFIA DYELESS

Gli algoritmi che hanno permesso la visualizzazione dei plessi vascolari neuroretinici utilizzano basi fisico-matematiche e sono capaci di esaltare e distinguere il contrasto tra tessuto statico e dinamico. Gli algoritmi in uso per l'angiografia dyeless sono attualmente¹⁷:

- Optical Microangiography(OMAG)*¹⁸
- Speckle Variance*¹⁹
- Phase variance*²⁰
- Split Spectrum Amplitude Decorrelation Angiography (SSADA)*²¹
- Correlation mapping*²²

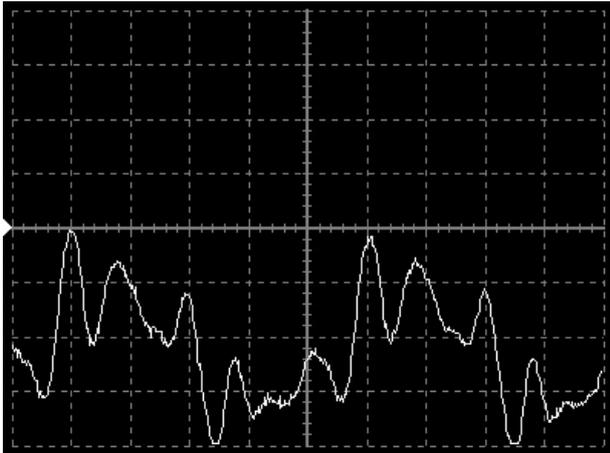


Figura 9a. Nota "La" del clarinetto che varia nel dominio del tempo registrata con oscilloscopio (da www.clarinet.it).

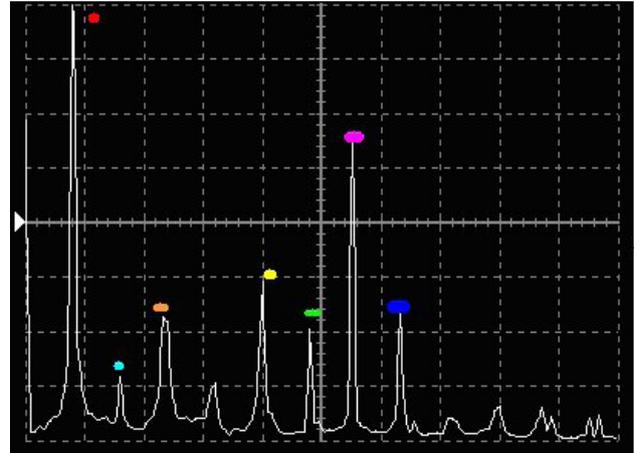


Figura 9b. Nota "La" del clarinetto scomposta in sotto-onde nel dominio delle frequenze (da www.clarinet.it).

Molto spesso le case costruttrici migliorano ed elaborano ulteriormente l'algoritmo originale, connotando nuovi acronimi di non facile memorizzazione e comprensione. Gli OCTA più venduti hanno differenti velocità di scansione; non è solo questa caratteristica tecnologica però ad influenzare la qualità finale di risoluzione tissutale. Gli algoritmi, in sostanza, elaborano, implementano e rendono fruibile la scansione in imaging; sono fulcro e volano indispensabile per l'interpretazione del segnale angiografico. Le successive modifiche apportate sugli algoritmi da bioingegneri e informatici rendono la visione angiografica neuroretinica finale dei diversi device quasi un unicum, con peculiarità proprie, non sempre comparabili. I più diffusi OCTA hanno A-Scan rate e algoritmi di decorrelazione del segnale tomografico differenti. Tutte le loro caratteristiche sono riassunte nella Table 1 di Burak Turgut (2016).²³⁻²⁷ Nuovi modelli OCTA stanno per uscire; alcuni affiancheranno inizialmente i modelli già esistenti, per superamento della tecnologia base Time-Domain/Fourier-Domain/Swept-Source, altri, invece, li sostituiranno, per miglioramenti e sviluppi del loro firmware/software.

- *Anqi Zhang et al.* hanno confrontato le performance dei più diffusi algoritmi in uso. In questo studio emerge che l'algoritmo OMAG, fino al momento della ricerca, offre le migliori performance applicative²⁸. Altri studi di confronto tra algoritmi, più di recente, hanno utilizzando lo stesso device per verificarne le capacità applicative.

- *Iwona Gorczynska et al.*, su *Biomedical Optics Express*, febbraio 2016, confrontano le performance di tre algoritmi differenti con lo stesso Swept-Source OCT system, (1040 nm wavelength e 100,000 A-Scans/Sec.): Speckle Variance, Amplitude Decorrelation e Phase Variance. Per quanto riguarda le differenze nell'imaging della retina e della coroide la qualità è stata confrontata con due metodi Averaging: lo Split Spectrum e il Volume Averaging. Per il confronto di qualità sulla visualizzazione dello strato coriocabillare è stato utilizzato il rapporto contrasto/rumore CNR Contrast-to-Noise Ratio, più sensibile del rapporto segnale/rumore SNR Signal-to-Noise Ratio nel definire la qualità dell'imaging; precisamente:

Table 1: The comparison of the specifications of main OCTA systems

AngioPlex*	AngioVue*	Spectralis OCTA [†]	SS OCT Angio [‡]	AngioScan [§]	Angio eXpert [¶]
<ul style="list-style-type: none"> Commercially available OMAG algorithm Used a light source of 840 nm and a bandwidth of 90 nm OCTA mean scan time: 3.8 seconds Real-time FastTrackeye tracking system Allowing visualisation of both the retinal flow and structure 3x3 mm and 6x6 mm OCT angiograms (in 2016 planning 8x8 mm and 12x12 mm) Segmentation algorithms including the maps of the superficial retina, the deep retina, avascular retina choriocapillaris and choroid 68,000 A-scans/sec OCTA requires 1 scan Motion correction software to remove artifacts En-face microvascular flow images en-face map of the retinal and choroidal blood flow 	<ul style="list-style-type: none"> Commercially available SSADA algorithm Used a light source of 840 nm and a bandwidth of 45 nm OCTA mean scan time: 3 seconds Allowing visualisation of both the retinal flow and structure 3x3 mm 4.5x4.5 mm, 6x6 mm and 8x8 mm OCT angiograms Segmentation algorithms including plexus of the superficial retinal capillary plexus, the deep retinal capillary plexus, the choriocapillaris 70,000 A-scans/sec OCTA requires 2 separate scans No eye tracking system Motion Correction Technology software to remove artifacts Angio quantification with AngioAnalytics quantification En-face map of the retinal and choroidal blood flow 	<ul style="list-style-type: none"> Not available in all countries Amplitude decorrelation algorithm Used a light source of 870 nm with bandwidth of 50 nm An automated, realtime mode and an Active Eye Tracking System Expect a long acquisition time (1-2 minutes per eye) 85,000 A-scans/sec with upgrading to new OCT2 module Expect a good image quality Basic software interface, not yet refined No detailed information on segmentation capability No detailed data on device specifications and software 	<ul style="list-style-type: none"> Not available in all countries Swept Source OCT OCTARA algorithm Used a light source of 1,050 nm 100,000 A scan/sec Scan size (mm) 3.0x3.0 mm, 4.5x4.5 mm, 6.0x6.0 mm SMARTTrack tracking software Multi-modal SS- OCT/fundus camera with OCT Angiography Expect a wide field, deep penetration Segmentation algorithms including superficial, deep, outer retina and choriocapillaris No active motion correction software 	<ul style="list-style-type: none"> Not available in all countries Modified OMAG algorithm (motion detection and decorrelation analysis) Used a light source of 880 nm 3x3 mm, 6x6 mm, 9x9 mm scans plus 12x9 mm montage (12 3x3 mm scans) widest field of view 53,000 A-scans/sec Long scan time (40 sec+) Real-time SLO based tracking system Multiple scan patterns Montage ability for panoramic image Segmentation algorithms including superficial, deep, outer retina and choriocapillaris The visualisation of the retinal and choroidal blood flow 	<ul style="list-style-type: none"> Not available in all countries No data in web about the used OCTA algorithm Used a light source of 855 nm \pm 5 nm Segmentation algorithms including superficial, deep, outer retina and choriocapillaris 3x3 to 8x8 mm OCT angiograms OCTA mean scan time: appr. 3.0 seconds Maximum 70,000 A-scans/sec The superficial and deeper blood vessels a designated layer SLO tracking follow-up Auto fundus tracking by SLO No information on the visualisation of the retinal and choroidal blood flow No detailed data on device specifications and softwares

Data on all OCTA devices and systems have been provided from the catalogues, manuals and web pages. * Zeiss, † Heidelberg, ‡ Topcon, ¶ Nidek, § Canon. OCT – optical coherence tomography; OCTA – optical coherence tomography angiography; OCTARA – OCT angiography Ratio Analysis; OMAG – optical microangiography; SLO – scanning laser ophthalmoscopy; SS – swept-source; SSADA – split-spectrum amplitude decorrelation angiography.

Tabella 1.

- *SNR rapporto segnale/rumore relaziona la potenza del segnale utile con il rumore di fondo; più il suo valore è alto migliore è la ricezione finale del segnale;*
- *CNR rapporto contrasto/rumore misura la capacità di riconoscere le strutture biologiche in base ai toni di grigio percepibili dalla retina.*

I risultati finali sono stati interpretati e visualizzati con un modello di scheletrizzazione 3D, tecnologia implementata in molti device. Nel confronto tra le tre tecnologie OCTA, Amplitude Decorrelation offre migliore qualità e minore granulosità nel definire il network vascolare retinico rispetto a Speckle Variance e Phase Variance. L'utilizzo di Split Spectrum migliora la resa delle tre metodiche applicative, mentre la più alta performance per la continuità del profilo dei vasi retinici è stata ottenuta con l'utilizzo del Volume Averaging (Figura 10)²⁹. Gli algoritmi restano la chiave di lettura del segnale tomografico di ritorno dal tessuto indagato, il vocabolario necessario per tradurre bene la riflettività in imaging.

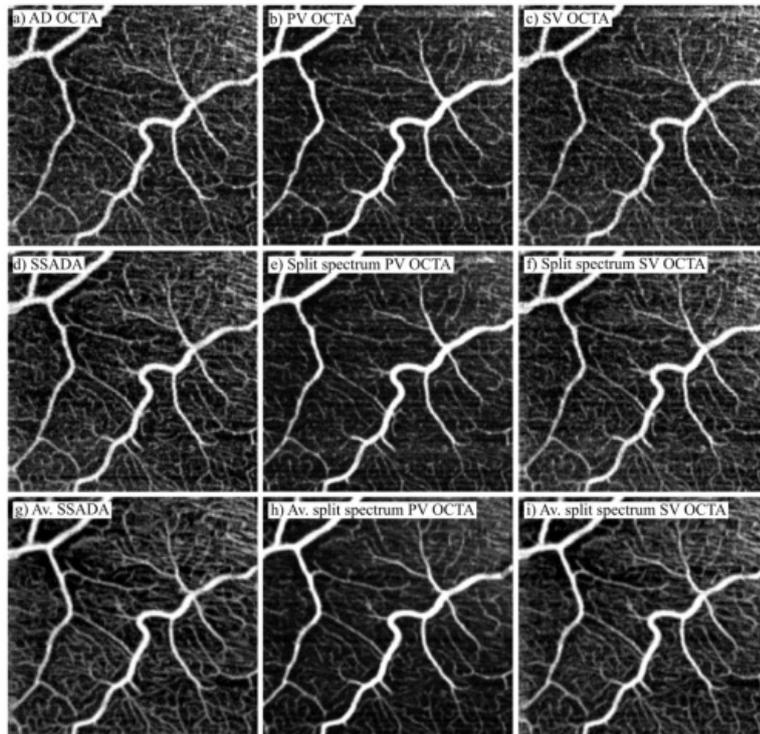


Figura 10. Confronto d'imaging di tre metodi OCTA. Prima colonna amplitudine-decorrelation method, seconda colonna phase-variance OCT, terza colonna speckle-variance OCT. Prima riga Full Spectrum, seconda riga Split Spectrum, terza riga Average con Split Spectrum data. Immagine a 6° nasali e 4° inferiori dalla fovea con campo 1,8 x 1,8 mm (by Iwona Gorczynska et al.).

Continuando il paragone lessicale, i software informatici aggiuntivi permettono, invece, una traduzione fluida, elegante, appropriata dei segnali rilevati, essenziali in angiografia dyeless per esaltare il movimento cellulare intravasale. La trasformata di Fourier permette di visualizzare il segnale interferometrico in termini di ampiezza A_0 . La seguente equazione mette in relazione Ampiezza A_0 , Phase $i\Phi$, Spazio (x, y, z) e Tempo t :

$$A(x, y, z; t) = A_0(x, y, z; t) \exp [i\Phi(x, y, z; t)]$$

Ampiezza $A_0(x, y, z; t)$

Phase $i\Phi(x, y, z; t)$

Spazio (x, y, z)

Applicando questa equazione in differenti intervalli Δt , l'algoritmo permette di rilevare il flusso per sottrazione dal segnale di ritorno (Figura 11). La formula matematica evidenzia una logica di correlazione abbastanza evidente tra i singoli parametri del segnale interferometrico²⁹.

NUOVI SOFTWARE APPLICATIVI

Una fondamentale limitazione della fotografia 2D anche ad alta definizione Wide Field, o della FA, è la mancanza di discriminazione dei tessuti in profondità. L'angiografia dyeless risolve questo limite permettendo di sezionare la retina strato per strato e, nella papilla ottica, arrivare fino alla lamina cribrosa, con dettagli prima non possibili in live. Solo alcuni dei più importanti software applicativi descritti in letteratura sono attualmente presenti nei nostri device; molti altri, in studio o in via di perfezionamento, con modifiche e peculiarità apportate dalle singole case costruttrici, non

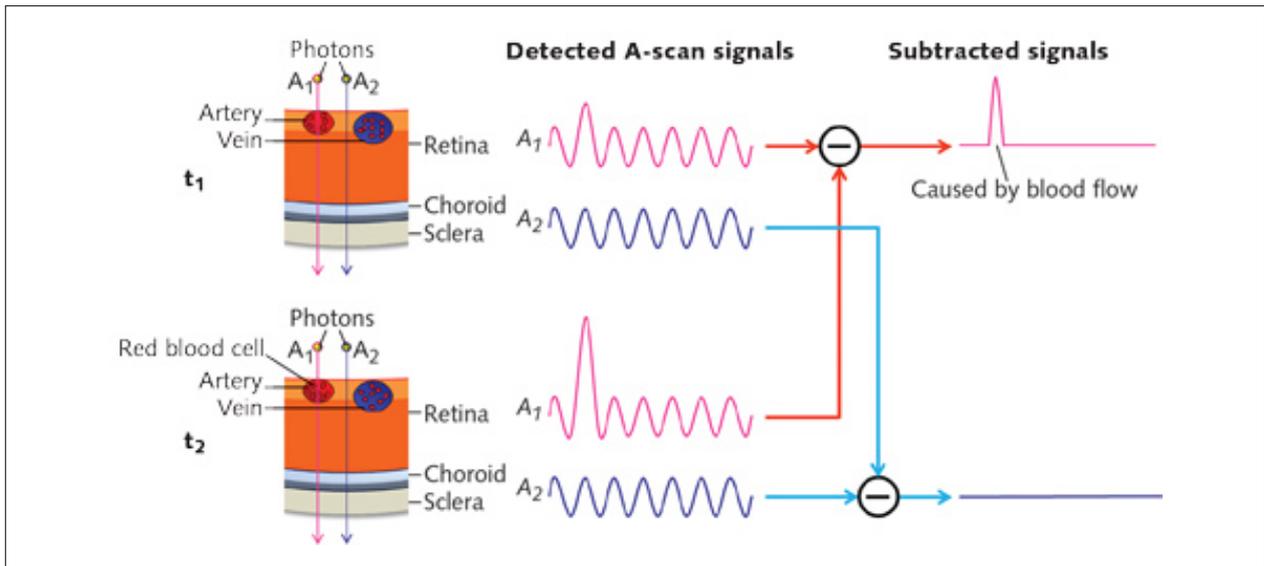


Figura 11. Schema di funzionamento degli angio OCT (by CHIEH-LI CHEN 11/13/2015 Bio Optics World).

sono, ad oggi, ancora disponibili nei Printout di stampa.

Database non confrontabili, iconografie non simili, imaging finali peculiari per ogni singolo OCTA rendono difficile la lettura dei risultati, anche per gli “addetti ai lavori”. Lo scopo degli angiogrammi OCTA è di migliorare il contrasto tra il flusso, segnale dinamico, e il tessuto circostante, segnale statico, non vascolare. Il segnale complessivo OCTA è dovuto alla sovrapposizione della componente statica, dinamica e del noise di fondo: insieme determinano i voxel catturati dai device. Il segnale dinamico è calcolato e rilevato per mezzo di un high-pass filtering filtro passa-alto, che scarta il segnale statico nelle sequenze dei frames, con inter frame di 11 millisecondi, intertempo sufficiente per acquisire i segnali dinamici, elaborati con averaging finale, media statistica del segnale filtrato.

- *Conor Leahy et al.* in uno studio sperimentale su ratti, hanno utilizzato diversi procedimenti matematici per definire la vascolarizzazione della retina interna.

Un procedimento molto efficace per questo scopo è la scheletrizzazione. La scheletrizzazione (skeletonization) è un processo sistematico di sottrazione di voxel (pixel in 3D) da maschere binarie (1,0) tomografiche, fino a lasciare una traccia finale di voxel, la più spessa, rilevata e definita con l'applicazione dell'algoritmo di Lee et al.^{30,31}. È una semplificazione informatica molto utile per determinare calcoli su aree e visualizzare in 3 D i plessi vascolari, ancor con più enfasi iconografica con l'utilizzo di falsi colori (Figura 12). Questo processo di calcolo algoritmico richiede un adeguato linguaggio di programmazione che s'interfaccia con MATLAB. MATLAB (Matrix Laboratory, MathWorks, Natick, MA, USA), creato alla fine degli anni Settanta da Cleve Moler, è un ambiente per il calcolo numerico e l'analisi statistica scritto in C (C = linguaggio di programmazione ad alto livello), che consente di manipolare matrici, visualizzare funzioni e dati, implementare algoritmi, creare interfacce utente, comunicare con altri programmi.

È in sostanza un linguaggio statistico-informatico, utilizzato da milioni di persone nell'industria e nelle università per la versatilità dei suoi numerosi strumenti a supporto dei più disparati campi

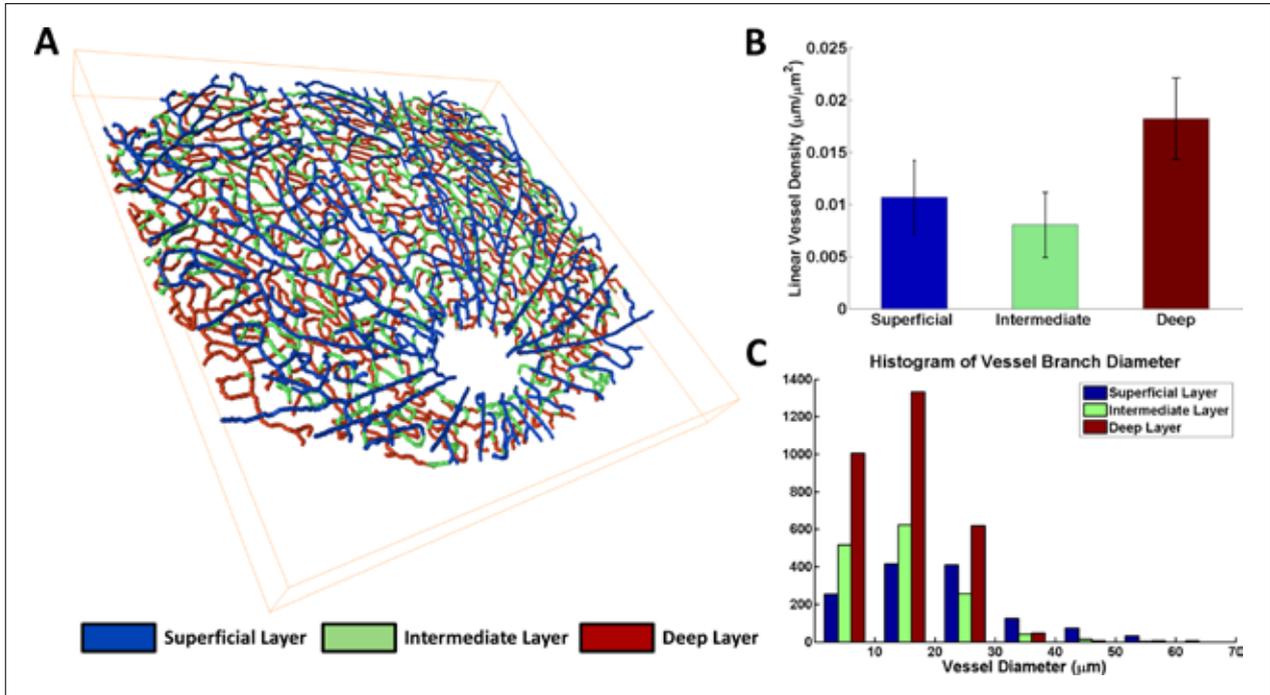


Figura 12. (A) Metodo di scheletrizzazione dell'intera vascolarizzazione retinica di ratto. I falsi colori indicano diversi strati di profondità. (B) Vessel density lineare dei tre plessi vascolari: superficiale, intermedio e profondo. (C) Istogramma di stima del diametro delle branche vascolari (by Conor Leahy et al.).

di studio applicati, e funziona su diversi sistemi operativi, come Windows, Mac OS, GNU/Linux e Unix (da Wikipedia modificato).

COLOR-CODING & ULTRA WIDE-FIELD

La Wide-Field e la Ultra Wide-Field imaging sono metodiche d'imaging ad ampio campo. Possono essere realizzate con la tradizionale Fundus Camera e visione della periferia retinica, con la lente di Staurenghi 230 SLO Retina Lens (Ocular Instruments, Bellevue, Wash.) e Scanning Laser Ophthalmoscope camera Heidelberg HRA (Heidelberg Engineering)³², con la Retcam (in commercio dal 1997) e ampiezza di circa 130° (Clarity Medical Systems, Pleasanton, Calif.)³³, oppure con Optos (Optos, Dunfermline, UK), introdotto nel 2000, prima camera con una visione fino a 200° gradi, 82.5% dell'area totale della retina³⁴⁻³⁶.

Sette campi retinici in un collage standard coprono circa 75° gradi di retina al polo posteriore non esplorando la periferia, importante in tutte le neuro-retinopatie non strettamente centrali. L'esigenza di un Wide-Field si sta avvertendo anche in angiografia dyeless, insieme alla possibilità in live di un confronto con le più familiari immagini fluoro/ICG. Il color code è un sistema per la visualizzazione d'informazioni tramite una scala di colori. Il Color-Coded in angio-OCT è un'imaging composta dall'insieme di più campi angiografici en-face dyeless, utilizza ampiamente Adobe Photoshop™, permette un confronto più agevole con le immagini fluoro/ICG, e offre la possibilità ad ampio campo Wide Field, oltre le arcate vascolari. Per un miglior impatto iconografico si utilizzano in OCTA solitamente i seguenti falsi colori³⁷:

- Red → superficial vascular plexus
- White → outer retina
- Blue → deep retina
- Green → choriocapillaris

VESSEL DENSITY E I SISTEMI FRATTALI

- Santosh G. K. Gadde et al. hanno misurato la densità vasale del plesso superficiale e profondo retinico di 52 soggetti sani indio-asiatici tra 20 e 67 anni (Group A 20/30 anni, Group B 31/45 anni, Group C 46/67 anni), applicando l'analisi frattale locale con campi d'indagine A-Scan di 3mm x 3mm e un'analisi statistica tra i differenti gruppi per età. È stato utilizzato RTVue XR Avanti OCTA (Optovue, Inc., Fremont, CA, USA), un singolo operatore, algoritmo SSADA.

L'area avascolare foveale FAZ Foveal Avascular Zone e la Vessel density sono state divise in zone circolari e settoriali intorno alla fovea: C1 (diametro 1.5 mm), C2 (diametro 2 mm) e C3 (diametro 2.5 mm). La vessel density è stata calcolata, escludendo l'area FAZ, nei rispettivi settori temporale T, superiore S, nasale N, inferiore I, per un'area circolare di diametro di 2,5 mm. È stata considerata un'unica contour map per le densità vasali e le zone di dropout vascolare al fine di migliorare il confronto settoriale. Infine tutti i metodi sono stati implementati utilizzando MATLAB v7.10 (Mathworks, Inc.) (Figura. 13)³⁸.

Gli autori hanno rilevato un'area FAZ superficiale di $0.35 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ e un'area profonda di $0.49 \pm 0,012 \text{ mm}^2$, con un agreement tra la misura manuale e la misurazione frattale di 0.97, senza apparenti differenze per i tre gruppi di età. La vessel density era maggiore nel plesso profondo rispetto al superficiale ($P < 0.0001$), e il settore inferiore della FAZ aveva una maggiore vessel density rispetto agli altri settori, temporale, superiore e nasale, in entrambi i plessi ($P < 0.05$), similmente ai riscontri sperimentali su animali. Per comprendere come i dati dei nostri OCTA sono elaborati e fruibili clinicamente, è opportuno dare un cenno sul sistema frattale, utilizzato non solo in questo studio per il calcolo della vessel density.

Un frattale è un oggetto geometrico dotato di omotetia interna (omos = simile, tithemi = metto,

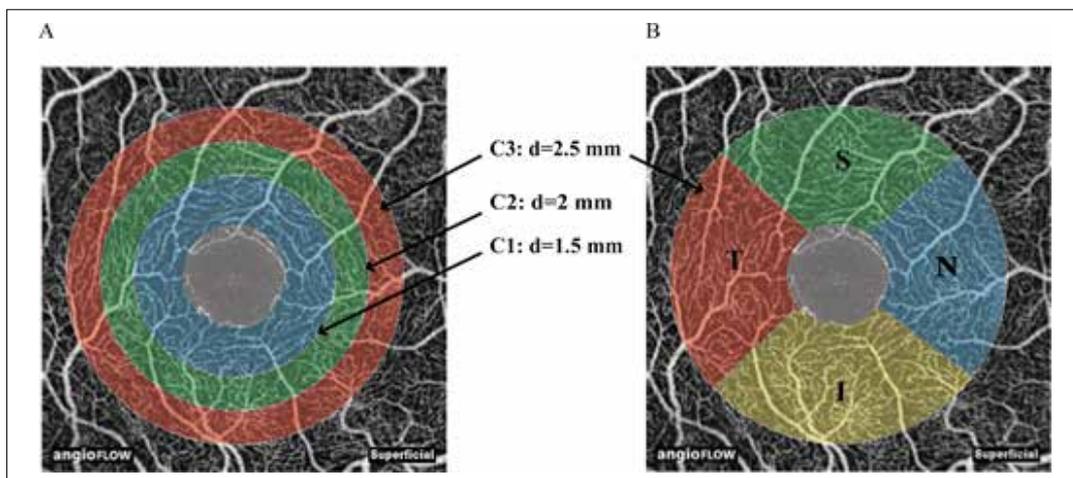


Figura 13. (A) Analisi con OCTA del plesso vascolare superficiale retinico in tre zone circolari C1,C2,C3; d=diametro. (B) Analisi con OCTA del plesso vascolare superficiale retinico in 4 settori: temporale T, superiore S, nasale N e inferiore I (by Santosh G. K. Gadde et al.).

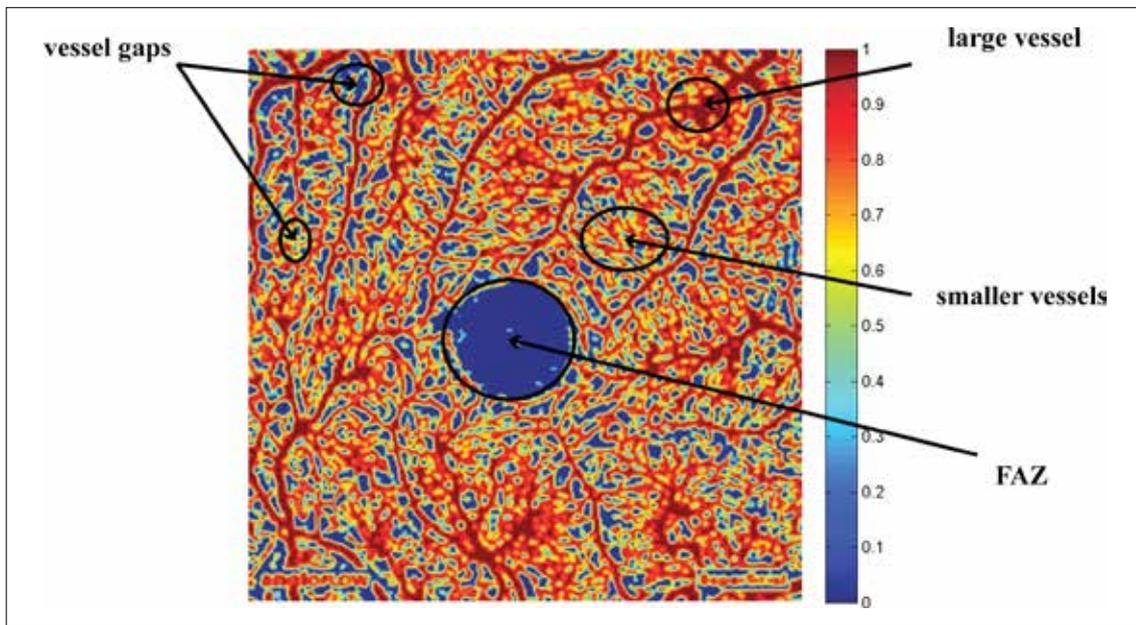


Figura 14. Contour Map con analisi frattale del plesso retinico superficiale dove si evidenziano la FAZ, vasi grandi, piccoli e zone di gaps vascolare (by Santosh G. K. Gadde et al.).

Michel Chasles 1827): si ripete cioè nella sua forma allo stesso modo su scale diverse di grandezza; una sua qualunque parte è simile all'originale. Questa caratteristica è spesso chiamata anche auto similarità o autosomiglianza. Il termine, coniato nel 1975 da Benoît Mandelbrot, descrive l'elaborazione di alcuni comportamenti matematici che sembrano essere "caotici", dal latino fractus (rotto, spezzato), come il termine frazione. Le immagini frattali sono oggetti di dimensione anche non intera, immagini spezzate, (modificato da Wikipedia), analizzate nell'aspetto informatico-matematico attraverso due proprietà: la Self-similarity e la Hausdorff Besicovich dimension³⁹.

Inoltre necessitano, per una loro proficua utilizzazione, dell'intervento di numerosi algoritmi in sequenza: HYBRID algorithm, EXACT algorithm, Box-counting algorithm e Differential Box-counting algorithm. Il sistema d'elaborazione, scomposizione e dimensione frattale è, in definitiva, senza addentrarsi ulteriormente in campi di difficile comprensione, un modo per stimare la complessità dell'imaging biomedicale e renderla leggibile in dati statistici ed iconografici. Si avvale indispensabilmente della texture analysis (Fractal Texture Analysis), branca della scienza dell'imaging utile per la descrizione strutturale delle immagini dei tessuti biologici. La definizione usata e accettata di texture è, infatti, inerente alla variazione spaziale dell'intensità dei pixel, al fine di rilevare ogni minima eventuale differenza di segnale nell'area biologica in studio⁴⁰ (Figura 14).

Numerose ricerche hanno introdotto nuovi parametri per determinare l'assetto vascolare OCTA: vessel area density (VAD), vessel skeleton density (VSD) e nonperfusion area. Questi parametri sono importanti specie nella retinopatia diabetica e le maculopatie in genere⁴¹⁻⁴³, ma hanno evidenziato limiti applicativi, risultando insufficienti se presi singolarmente.

- *Zhongdi Chu et al.*, dopo aver puntualizzato questi limiti per VAD, VSD, e la nonperfusion area, in un loro studio del marzo 2016 hanno confrontato 5 indici quantitativi: la vessel area density, la vessel skeleton density, la vessel diameter index, la vessel perimeter index, e la vessel complexity index su retine sane e stabilmente patologiche, riscontrando un'ottima ripetibilità tra gli esami⁴⁴

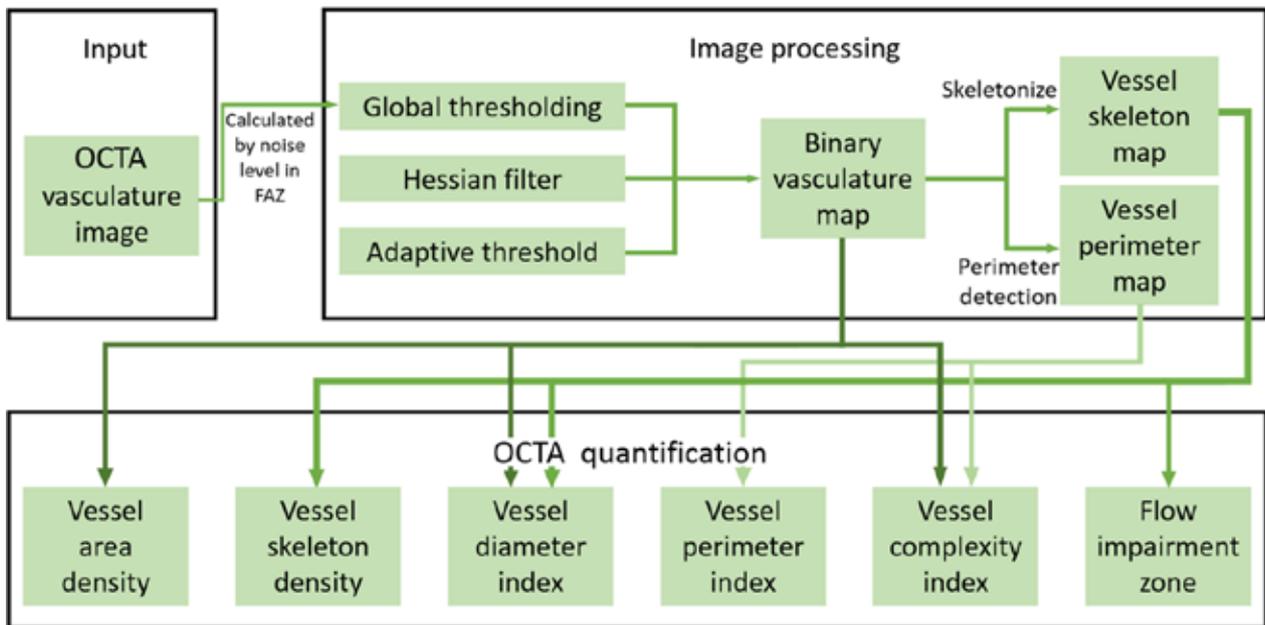


Figura 15. Modalità d'analisi quantitative(diagramma di flusso) applicando l'algoritmo OMAG. (by Zhong-di Chu et al.).

(Figura 15). Sono stati utilizzati due OCTA, un Cirrus HD 5000 a 840-nm central wavelength, 45-nm $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda$ = risoluzione spettrale), 68-KHz A-scan rate, risoluzione assiale $\sim 7 \mu\text{m}$, laterale $\sim 15 \mu\text{m}$, campo d'indagine di $2.4 \text{ mm} \times 2.4 \text{ mm}$, 245 linee per ciascuna B-scan, 245 punti in assiale, con FastTrac per il tracking retinico, device già in commercio, e un SS-OCT a 1050-nm central wavelength, 100-nm $\Delta\lambda$, 100-kHz A-scan rate, risoluzione assiale $\sim 5 \mu\text{m}$, laterale $\sim 14 \mu\text{m}$, campo d'indagine di $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, 300 A-lines per ciascuna B-scan e 300 B-scans centrati nella fovea, di prossima commercializzazione, entrambi Carl Zeiss Meditec Inc.

Le scansioni HD-OCT sono state eseguite alla University di Washington Eye Institute, le scansioni SS-OCT al Bascom Palmer Eye Institute, University di Miami Miller School of Medicine.

Gli angiogrammi sono stati processati come immagini binarie utilizzando MATLAB (R2015b, MathWorks, Inc.) insieme ad algoritmi e filtri associativi, global threshold, hessian filter, e adaptive threshold, necessari per ottenere immagini in mappe binarie 1, 0, dove 1 rappresenta i pixel bianchi e l'esistenza di flusso white pixel (i.e., existence of blood vessel), e 0 i pixel neri black pixel e l'assenza di flusso (i.e., absence of blood vessel).

Questa elaborazione raffinata del segnale permette un'analisi del "tutto o nulla"; inoltre, la determinazione dei livelli di grigi noise level, serve per esaltare il movimento rispetto al tessuto stabile e non mobile^{45,46}. L'imaging è stata elaborata con l'algoritmo di decorrelazione OMAG Optical microangiography, utilizzato nei device Zeiss, che prende in considerazione l'ampiezza e la fase del segnale OCT. Queste caratteristiche migliorano la connettività vascolare, permettono un più alto rendimento segnale/rumore signal-to-noise ratio, e una più elevata sensibilità nel rilevare il flusso ematico capillare. I risultati dimostrano che tutte le analisi quantitative utilizzate possono essere complementari, ripetibili, e che l'unione di tutti questi parametri permette una migliore resa in termini di quantità dell'imaging angio vascolare.

Nel lavoro non è stato affrontato il confronto, pur interessante, tra i due device utilizzati, elaborazione probabilmente in corso per una successiva pubblicazione.

PROBLEMATICHE IN ANGIO-OCT

- *Huang D. et al.* lavorano da tempo per migliorare gli artefatti in angiografia dyeless. Hanno individuato che gli artefatti di proiezione inficiano in modo determinante la quantificazione della vessel density dei plessi vascolari profondi. Nel loro studio, presentato al meeting dell'American Ophthalmological Society nel maggio 2016, hanno elaborato un ulteriore algoritmo nella definizione del segnale di ritorno "projection resolution and reflectance compensation", che migliora e risolve gli artefatti di proiezione.

La loro ricerca è stata eseguita su 30 occhi di 30 pazienti con glaucoma perimetrico, 10 con lesioni lievi (mild disease), 15 con lesioni moderate (moderate disease) e 5 con lesioni avanzate (advanced disease), oltre 30 soggetti di controllo. Il plesso superficiale era statisticamente diminuito del 22% nella vessel density rispetto al gruppo di controllo ($P < .001$); i plessi intermedio e profondo mostravano una diminuzione rispettivamente di 8% e 13%. La vessel density del plesso superficiale dimostra nel glaucoma un'alta rispondenza diagnostica con i deficit al campo visivo e lo spessore delle cellule ganglionari maculari GCC ganglion cell complex, riaprendo nuovamente la strada vascolare del glaucoma, del resto mai abbandonata, con promettenti, realistiche nuove performance⁴⁷.

- *Adeleh Yarmohammadi et al.*, confermando quanto dimostrato da Huang D., con uno studio originale senza riscontri in letteratura, confrontano la sensibilità e l'accuratezza diagnostica della vessel density con OCTA AngioVue e lo spessore RNFL con SD-OCT Avanti in 164 pazienti normali e con glaucoma ad angolo aperto. La vessel density è stata calcolata nella zona peripapillare RNFL circolare centrata sulla papilla ottica con diametro 4,5 mm x 4,5mm, misurata tra la mem-

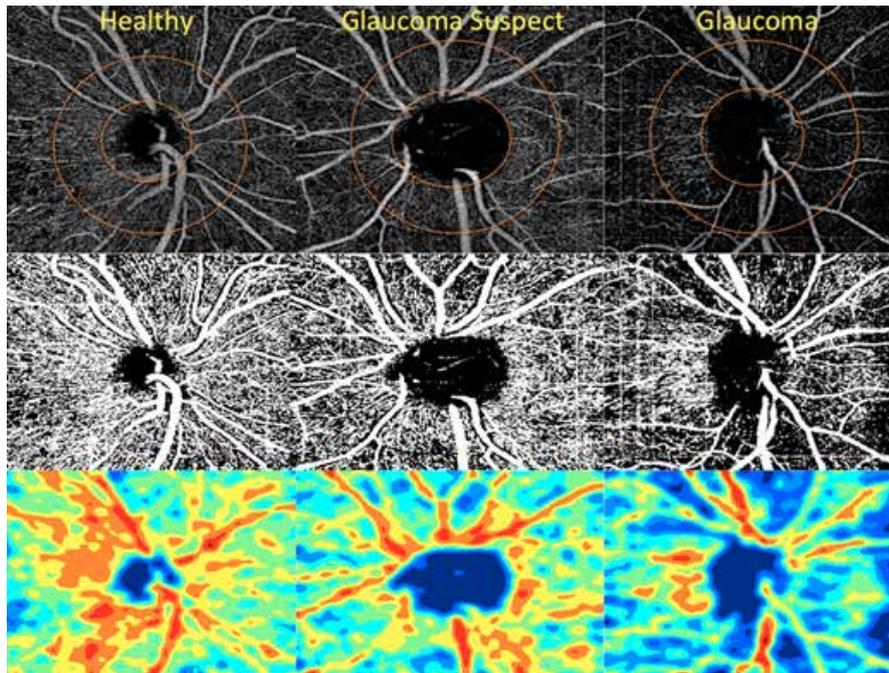


Figura 16. Vessel density map per le fibre ganglionari retiniche intorno al disco ottico(RNFL) in occhio sano, con sospetto glaucoma e glaucoma ad angolo aperto. Riga superiore: circumpapillary vessel density map 4,5 x 4,5mm. Riga intermedia: vessel density map estratta nella zona di maggior densità vasale. Riga inferiore: vessel density area in color-coded (by Adeleh Yarmohammadi et al.).

brana limitante interna MLI e il bordo posteriore RNFL, con software standard Optovue (version 2015.1.0.90). Le misurazioni della vessel density sono state effettuate per un intero campo enface di 4.5mm x 4.5mm (whole enface image vessel density, wiVD) e nella zona circumpapillare (circumpapillary vessel density, cpVD) delineata da un'ellissi di 750µm dal bordo papillare.

La AUROC (Areas under the receiver operating characteristic curves) è stata utilizzata dal punto di vista statistico per validare l'accuratezza diagnostica dei risultati finali acquisiti. Gli autori confermano l'affidabilità di OCTA nel misurare la vessel density sovrapponibile, per sensibilità diagnostica, allo spessore RNFL nel management dei pazienti glaucomatosi.

Le curve AUROCs hanno fatto rilevare massima efficacia per wiVD (0.70), seguito da cpVD (0.65) e RNFL thickness (0.65) nel distinguere occhi sani e glaucomatosi. Concludono il loro lavoro con la necessità di nuovi studi longitudinali per verificare se la bassa vessel density trovata nei glaucomatosi preceda o segua il danno al nervo ottico, prevedendo vantaggi nella diagnosi precoce dai risultati di questa ricerca⁴⁸ (Figura 16).

ULTIMATE GOAL E CONSIDERAZIONI FINALI

L'angiografia dyeless è il risultato dell'integrazione di più algoritmi, di processi d'elaborazione informatica di alto livello e di calcoli matematici molto complessi. Lo sviluppo tecnologico in fase di rilievo tomografico e scansione dei tessuti biologici è stato il presupposto necessario e indispensabile per l'elaborazione angiografica dyeless. Gli OCTA sono appena all'inizio del loro sviluppo.

- *Matthias Salas, Wolfgang Drexler et al.* hanno presentato un nuovo prototipo compatto, multi-modal imaging, che mette insieme Ottiche Adattive, Fundus Camera e OCT a 200 KHz A-scan. Questo prototipo ha una risoluzione trasversale ~ 4 µm, assiale ~5 µm, acquisisce un campo di 4°x4°, ha un frame rate di 10 fps (10 al secondo) e un tempo di esposizione di 10 millisecondi (ms).

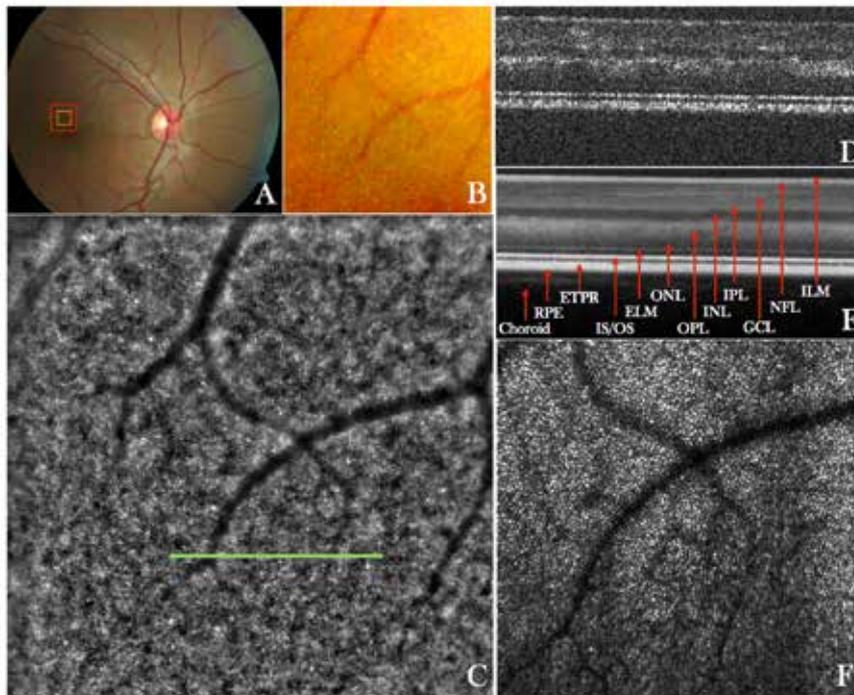


Figura 17. Multi-imaging Hi-tech con fotografia, OCT ed ottiche adattive (by Matthias Salas et al.).

Queste caratteristiche permettono di azzerare o quasi ogni artefatto da movimento, consentendo un'elevata risoluzione finale⁴⁹ (Figura 17).

Il futuro andrà verso device sempre più integrati e complessi. L'impegno e l'interesse delle industrie è rendere questi nuovi device fruibili ad una platea di utilizzatori sempre più ampia, permettere migliori performance e più rapide diagnosi. Essere protagonisti e non semplici spettatori di questi repentini sviluppi tecnologici è, per tutti noi, un augurale auspicio e, allo stesso tempo, una sfida molto difficile, a mio parere necessariamente da affrontare, sicuramente da vincere, senza alcuna incertezza o infruttuosa esitazione.

BIBLIOGRAFIA

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Voxel>
2. Luigi Cei. Tecniche di Tomografia Computerizzata e di Risonanza Magnetica, II edizione, SEU, 2011.
3. Kim DY, Fingler J, Zawadzki RJ, Park SS, Morse LS, Schwartz DM, et al. Optical Imaging of the chorioretinal vasculature in the living human eye. *Proc Natl Acad Sci.*2013;110:14354–9.
4. Choi W, Mohler KJ, Potsaid B, Lu CD, Liu JJ, Jayaraman V, et al. Choriocapillaris and Choroidal Microvasculature Imaging with Ultrahigh Speed OCT Angiography. *Plos One.* 2013;8:e81499.
5. Schwartz DM, Fingler J, Kim DY, Zawadzki RJ, Morse LS, Park SS, et al. Phase-variance optical coherence tomography: a technique for noninvasive angiography. *Ophthalmology.* 2014;121:180–7.
6. P. Karpur, P.M. Shankar, J.L. Rose, V.L. Newhouse. Spilt spectrum processing: optimizing the processing parameters using minimization. *Ultrasonic*, vol. 26 Juli, pp 204-209,1987.
7. Bruno Lumbroso, David Huang, Yali Jia, James G Fujimoto, Marco Rispoli. Guida Pratica all'Angio-OCT.FGE Editore 2014. Choi W, Mohler KJ, Potsaid B, Lu CD, Liu JJ, Jayaraman V, et al.
8. Choi W, Mohler KJ, Potsaid B, Lu CD, Liu JJ, Jayaraman V, et al. Choriocapillaris and Choroidal Microvasculature Imaging with Ultrahigh Speed OCT Angiography. *Plos One.* 2013;8:e81499.
9. Matsunaga D, Puliafito CA, Kashani AH. OCT Angiography in Healthy Human Subjects. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 2014;45(6):510-5.
10. Spaide RF, Klancnik JM, Cooney MJ. Retinal Vascular Layers Imaged by Fluorescein Angiography and Optical Coherence Tomography Angiography.*JAMA Ophthalmol.* 2014.
11. Talisa E de Carlo, Andre Romano, Nadia K Waheed, Jay S Duker. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). *International Journal of Retina and Vitreous.* 2015.
12. Mark Espina, Giulio Barteselli, Feiyan Ma, Cheryl A. Arcinue, Natalia Camacho, William R. Freeman, Dirk-Uwe G. Bartsch. Noncontact Ultra-wide field Lens system by Heidelberg Spectralis. Jacobs Retina Center, UCSD, La jolla, CA. ARVO 2014 Annual Meeting Abstracts.
13. Francesca Gilardoni, Francesco Pichi, Francesco Bonsignore, Paolo Nucci. WIDE-FIELD SPECTRAL-DOMAIN OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY. San Giuseppe hospital, Milano, Italy. ARVO 2014.
14. Richard Szeliski. Image Alignment and Stitching: A Tutorial. *Foundations and Trends in Computer Graphics and Computer Vision*, 2:1-104, 2006.
15. Mario Esposito. Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Computazionali ed Informatiche, Ciclo XXII, Università di Salerno, Sede Amministrativa Università degli Studi di Napoli Federico II. Il problema della co-registrazione di immagini biomedicali e sue applicazioni nell'ambito radiologico e diagnostico. 2009.
16. Maria Laura Manca, Luigi Murri. Fourier ed il ruolo della sua trasformata nella ricerca neurologica. Dipartimento di Neuroscienze, Università di Pisa.
17. Anqi Zhang, Qinqin Zhang, Chieh-Li Chen, and Ruikang K. Wang. Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: a review and comparison. *Journal of Biome-*

- dical Optics 20(10), 100901 (October 2015).
18. 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).
 19. A. Mariampillai et al., "Speckle variance detection of microvasculature using swept-source optical coherence tomography," *Opt. Lett.* 33(13), 1530-1532 (2008).
 20. 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).
 21. Y. Jia et al. "Split-spectrum amplitude-decorrelation angiography with optical coherence tomography" *Opt. Express* 20(4), 4710-4725 (2012).
 22. 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).
 23. www.optovue.com/products/angiovue/
 24. www.zeiss.com/.../en.../oct/oct-optical.../cirrus-hd-oct.html.
 25. www.topcon-medical.eu/.../382-dri-oct-triton-swept-source-oct.
 26. Stanga PE, Tsamis E, Papayannis A, Stringa F, Cole T, Jalil A. Swept-Source Optical Coherence Tomography Angio™ (Topcon Corp, Japan): Technology Review. *Dev Ophthalmol.* 2016;56:13-7. doi: 10.1159/000442771. Epub 2016 Mar 15
 27. <https://www.heidelbergengineering.com/.../heidelberg-engineeri>.
 28. 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).
 29. Iwona Gorczynska, Justin V. Migacz, Robert J. Zawadzki, Arlie G. Capps, and John S. Werner. Comparison of amplitude-decorrelation, speckle variance and phase-variance OCT angiography methods for imaging the human retina and choroid. 1 Mar 2016, Vol. 7, No. 3. DOI:10.1364/BOE.7.000911. *BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS* 911.
 30. Lee TC, Kashyap RL, Chu CN. Building skeleton models via 3-D medial surface axis thinning algorithms. *Cvgrp-Graph Model Im.* 1994;56:462-478.
 31. Staurenghi G, Viola F, Mainster MA, et al. Scanning laser ophthalmoscopy and angiography with a wide-field contact lens system. *Arch Ophthalmol* 2005;123:244-52.
 32. Staurenghi G, Viola F, Mainster MA, et al. Scanning laser ophthalmoscopy and angiography with a wide-field contact lens system. *Arch Ophthalmol* 2005;123:244-52
 33. Dai S, Chow K, Vincent A. Efficacy of wide-field digital retinal imaging for retinopathy of prematurity screening. *Clin Experiment Ophthalmol* 2011;39(1):23-9.
 34. Atkinson A, Mazo C. Imaged area of the retina. Data on file, Optos.
 35. Matthew T. Witmer, MD and Szilárd Kiss, MD, New York City, The Clinical Utility of Ultra-Wide-Field Imaging. *Review of Ophthalmology*. Published 8 March 2012.
 36. Qinqin Zhang, Cecilia S. Lee, Jennifer Chao, Chieh-Li Chen, Thomas Zhang, Utkarsh Sharma, Anqi Zhang, Jin Liu, Kasra Rezaei, Kathryn L. Pepple, Richard Munsen, James Kinyoun, Mur-

- ray Johnstone, Russell N. Van Gelder & Ruikang K. Wang. Wide-field optical coherence tomography based microangiography for retinal imaging. *Scientific Reports* | 6:22017 | DOI: 10.1038/srep22017.
37. Maged Alnawaiseh, Friederike Schubert, Pieter Nelis, Gabriele Wirths, André Rosentreter and Nicole Eter. Optical coherence tomography (OCT) angiography findings in retinal arterial macroaneurysms. Alnawaiseh et al. *BMC Ophthalmology* (2016) 16:120.
 38. Santosh G. K. Gadde, Neha Anegondi, Devanshi Bhanushali, Lavanya Chidambara, Naresh Kumar Yadav, Aruj Khurana, and Abhijit Sinha Roy. Quantification of Vessel Density in Retinal Optical Coherence Tomography Angiography Images Using Local Fractal Dimension. <http://iovs.arvojournals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/Journals/IOVS/934840/on 08/13/2016>.
 39. Antonio Napolitano, Sara Ungania and Vittorio Cannata. Fractal Dimension Estimation Methods for Biomedical Images. <http://dx.doi.org/10.5772/48760>.
 40. William Henry Nailon. Texture Analysis Methods for Medical Image Characterisation. www.intechopen.com.
 41. R. Reif et al., "Quantifying optical microangiography images obtained from a spectral domain optical coherence tomography system," *J. Biomed. Imaging* 2012, 9 (2012).
 42. Y. Jia et al., "Quantitative optical coherence tomography angiography of vascular abnormalities in the living human eye," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(18), E2395–E2402 (2015).
 43. S. A. Agemy et al., "Retinal vascular perfusion density mapping using optical coherence tomography angiography in normals and diabetic retinopathy patients," *Retina* 35(11), 2353–2363 (2015).
 44. Zhongdi Chu, Jason Lin, Chen Gao, Chen Xin, Qinqin Zhang, Chieh-Li Chen, Luis Roisman, Giovanni Gregori, Philip J. Rosenfeld, Ruikang K. Wang. Quantitative assessment of the retinal microvasculature using optical coherence tomography angiography. *Journal of Biomedical Optics* 21(6), 066008 (June 2016).
 45. R. Reif et al., "Quantifying optical microangiography images obtained from a spectral domain optical coherence tomography system," *J. Biomed. Imaging* 2012, 9 (2012).
 46. A. F. Frangi et al., "Multiscale vessel enhancement filtering," in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention—MICCAI'98*, pp. 130–137, Springer Verlag, Berlin, Germany (1998).
 47. Huang D. Angiography of macular circulation in glaucoma. Presented at: American Ophthalmological Society; May 19-22, 2016; Colorado Springs, Colo.
 48. Adeleh Yarmohammadi, Linda M. Zangwill, Alberto Diniz-Filho, Min Hee Suh, Patricia Isabel Manalastas, Naeem Fatehee, Siamak Yousefi, Akram Belghith, Luke J. Saunders, Felipe A. Medeiros, David Huang, and Robert N. Weinreb. Optical Coherence Tomography Angiography Vessel Density in Healthy, Glaucoma Suspect, and Glaucoma Eyes. *iovs.arvojournals.org* j ISSN: 1552-5783.
 49. Matthias Salas, Wolfgang Drexler, Xavier Levecq, Barbara Lamory, Markus Ritter, Sonja Prager, Julia Hafner, Ursula Schmidt-Erfurth, and Michael Pircher. Multi-modal adaptive optics system including fundus photography and optical coherence tomography for the clinical setting. 1 May 2016|Vol.7,No.5|DOI:10.1364/BOE.7.001783 | BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS