

Anatomia vascolare retinica Angio-OCT, Slabs di decorrelazione & Intelligenza artificiale



Amedeo Lucente

Abstract: L'introduzione degli Angio-OCT nella diagnostica strumentale oftalmologica ha apportato indubbi vantaggi per la rapida e non invasiva modalità d'esecuzione, la migliore individuazione delle lesioni neuro-corio-retiniche, e la positiva ricaduta sull'appropriatezza delle scelte terapeutiche. La possibilità di evidenziare le reti vascolari retiniche, oggetto di un interessante e recente studio di Campbell et al., è stata largamente discussa. L'articolo continua offrendo utili considerazioni sull'imaging OCTA, discute la letteratura più recente sulle slabs di segmentazione, evidenzia lo scarso agreement degli OCTA, e prospetta i benefici che l'applicazione dell'intelligenza artificiale potrà avere sulla qualità finale dei plessi vasali.

Keywords and abbreviations: AI Artificial Intelligence, AO-cSLO Adaptive Optics confocal Scanning Laser Ophthalmoscop, BEE Barriera Emato-Encefalica, BER Barriera Emato-Retinica, DCP Deep Capillary Plexus, FA Fluorangiografia, FDA, Food and Drug Administration, FAZ Foveal Avascular Zone, GPU Graphics Processing Unit, GCL Ganglion Cell Layer, ICP Intermediate Capillary Plexus, INL Inner Nuclear Layer, OCTA Optical Coherence Tomography Angiography, NFL Nerve Fiber Layer, RPCP Radial Peripapillary Capillary Plexus, SVP Superficial Vascular Plexus, SS-OCT Swept-Source OCT.

Brevi cenni di anatomia vascolare retinica

L'introduzione degli Angio-OCT nella diagnostica strumentale oftalmologica ha apportato indubbi vantaggi per la rapida e non invasiva modalità d'esecuzione, la migliore individuazione delle lesioni neuro-corio-retiniche, e la positiva ricaduta sull'appropriatezza delle scelte terapeutiche.

Questi evidenti progressi sono il risultato di un'imaging dettagliato che permette una visualizzazione strutturale nella dimensione lineare e tridimensionale.

I molti evidenti benefici della tomografia assiale computerizzata, ora anche angiografica, hanno aperto

interessanti discussioni e favorito utili reinterpretazioni su molti aspetti anatomo-funzionali della corio-retina, in particolare per quanto riguarda la sua struttura vascolare.

La FDA Food and Drug Administration (o USFDA), agenzia governativa statunitense istituita nel 1906 da Theodore Roosevelt con sede Silver Spring nel Maryland, si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici negli USA. Nella sessione CDRH Center for Devices and Radiological Health, svolge il compito di visionare i nuovi device medicali che le industrie immettono sul mercato.

TABELLA 1
ALCUNE CARATTERISTICHE DEI DEVICE OCTA DISPONIBILI FDA APPROVED O PENDING

Commercial name	Company	Algorithm used	OCTA approach	OCT spectrum	FDA approval
AngioVue™	Optovue, Inc.	SSADA	Intensity decorrelation	Split-spectrum	Approved
AngioPlex™	Zeiss	OMAG-C	Combined intensity and phase variance	Full-spectrum	Approved
SS-OCT Angio™	Topcon Corp.	OCTARA	Intensity ratio analysis	Full-spectrum	Pending
AngioScan	NIDEK CO., L TD		Combined intensity and phase decorrelation		Pending
SPECTRALIS® OCT Angiography	Heidelberg Engineering		Intensity decorrelation	Full-spectrum	Pending

Abbreviazioni: FDA = Food and Drug Administration, OCTA = Optical coherence tomography angiography, OCTARA = Optical coherence tomography angiography ratio analysis, OMAG-C = OCT Microangiography Complex, SSADA = Split-spectrum amplitude-decorrelation angiography, SS-OCT Angio = Swept-Source Optical Coherence Tomography Angiography (by Ahmed M. Hagag et al. Taiwan J Ophthalmol 2017;7:115-129)

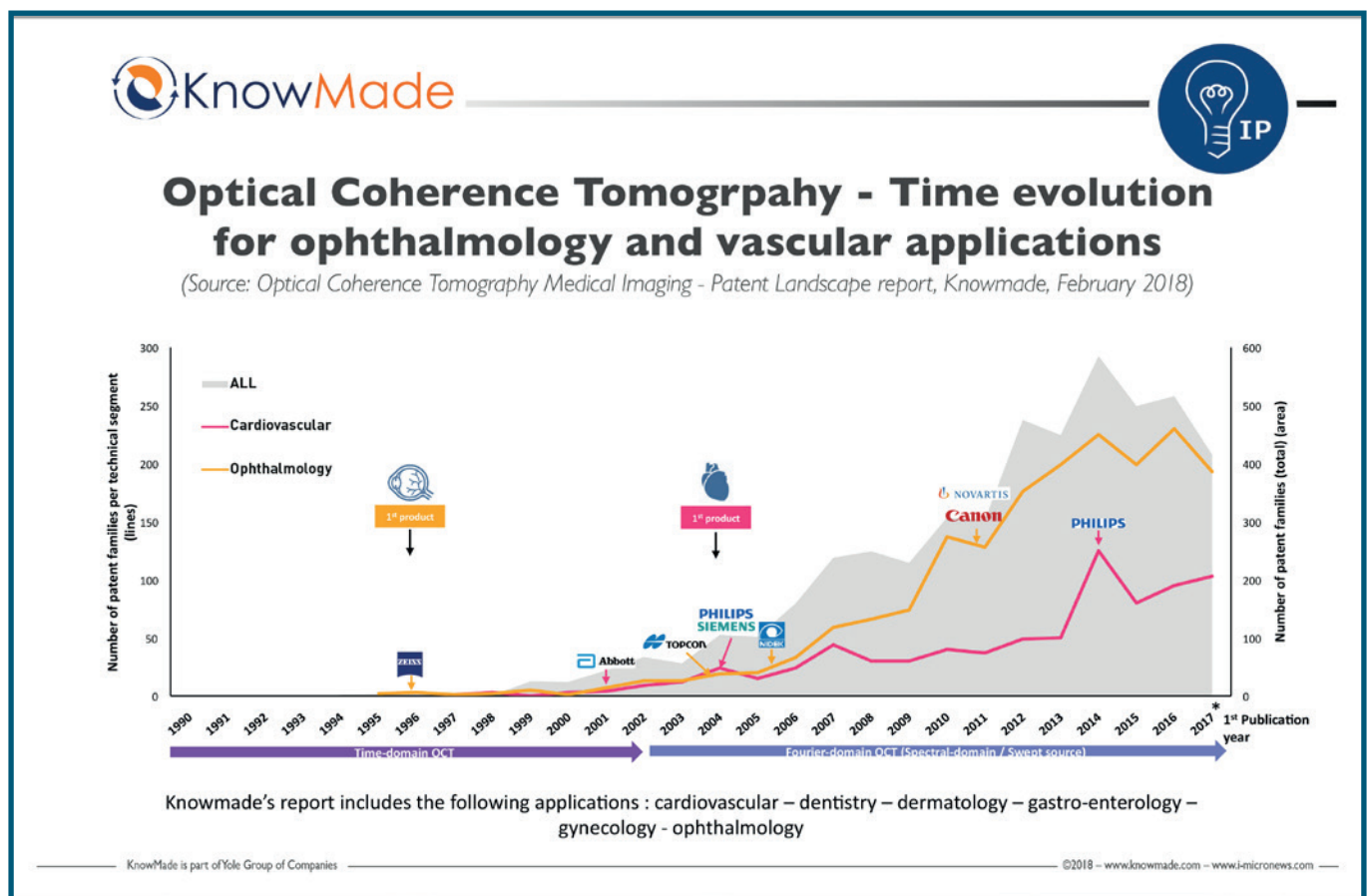


Fig. 1 - Evoluzione degli OCT e loro applicazioni vascolari
 (by <https://www.knowmade.com/medical-imaging-technologies-oct-dynamic-competitive-industry>)

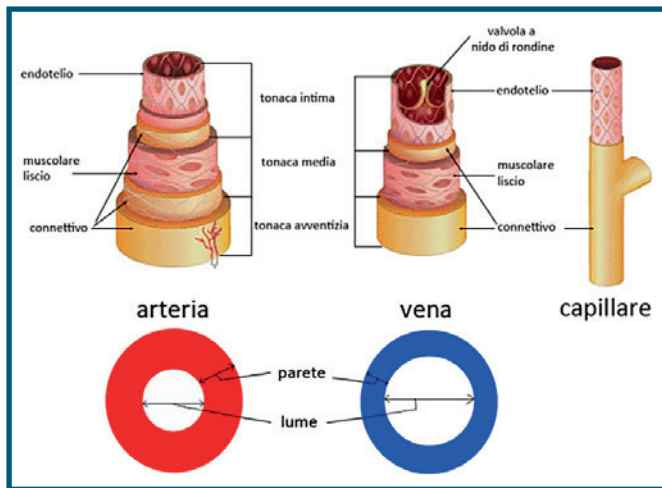


Fig. 2 - Struttura di un'arteria e di una vena rispetto al capillare
(by Medicina on line, <https://medicinaonline.co/2017/01/23/>)

Verso la fine del 2016 ha approvato definitivamente la tecnologia OCTA Optical Coherence Tomography Angiography; i device al 2017 FDA "approved o pending" sono elencati nella Tabella 1.

Lo sviluppo tecnologico degli OCT/OCTA è stato repentino; altrettanto straordinario è stato il loro successo commerciale, che ha registrato inaspettate affermazioni non solo in campo oftalmologico (Fig.1).

Le conoscenze dei networks vascolari della corio-retina hanno basi istologiche consolidate, come si può leggere nei numerosi studi pubblicati in letteratura. Provis et al. evidenziano, tra i tanti autori, che la retina umana ha una vascolarizzazione simile ai macachi (Macaco Rhesus); poche differenze ci sono con ratti e gatti.

Tali concordanze scaturiscono soprattutto dal confronto delle regioni temporali retiniche per la presenza della fovea, area specializzata nella visione distinta.

Molti dati istologici conosciuti derivano da studi comparati con queste specie animali [1].

Le arterie intorno al nervo ottico, prima di penetrare nella sclera, hanno un diametro di circa 100 µm (0,1 mm) e uno spessore di parete ~ a 18 µm (Fig. 2).

Queste dimensioni diminuiscono progressivamente verso la regione equatoriale; nella retina periferica si trovano diametri dieci volte inferiori ~ a 15 µm.

La parete delle arterie retiniche è composta di un unico strato di cellule endoteliali, uno strato sub-endoteliale elastico, uno medio di cellule muscolari lisce e, all'esterno, da una sottile lamina elastica, con un'avventizia ricca di fibre collagene [2].

Identica struttura troviamo nelle arterie dei muscoli scheletrici.

Lo strato muscolare delle arterie retiniche al polo posteriore è formato da cinque/sei lamine di cellule

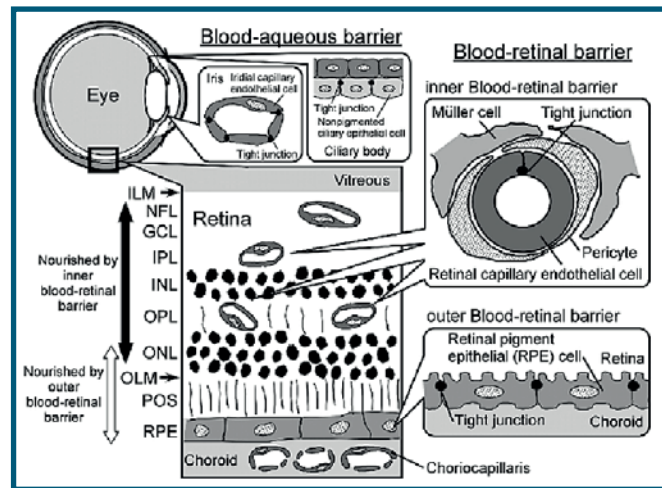


Fig. 3 - Schema della Blood-Ocular Barrier.
Abbreviazioni: RPE, retinal pigment epithelium; POS, photoreceptor outer segments; OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; NFL, nerve fiber layer; ILM, inner limiting membrane
(Modificato by <https://www.researchgate.net>)

muscolari lisce, che nella regione equatoriale si riducono a tre lamine e, nella periferia retinica, a due [2].

Questa complessa struttura muscolare serve a mantenere e garantire un flusso ematico regolare, capace di rispondere prontamente a stimoli chimici o pressori differenti. In condizioni fisiologiche l'ossigenazione tissutale è così sempre adeguata.

La parete interna dei capillari retinici è composta di cellule endoteliali, membrana basale e periciti intramurali. Il loro lume ha un diametro ~ 3,5 µm / 6 µm.

Il diametro medio dei globuli rossi è ~ 7,5 µm; per tale motivo le emazie nei capillari retinici scorrono "in fila indiana".

I periciti (cellule murali o cellule di Rouget), distribuiti tra lamina basale ed endotelio svolgono, non solo in ambito retinico, un importante ruolo nel regolare il flusso ematico [2,3].

Il loro profilo d'azione interviene infatti nella regolazione della BEE, barriera emato-encefalica (BEE o BBB, blood-brain barrier). La BEE ha funzioni complesse, dinamiche nel controllo del diametro dei capillari, del flusso ematico e, in modo non ancora ben compreso, nell'angiogenesi [3].

Simile funzione i periciti svolgono nella circolazione corio-retinica.

A differenza della coriocapillare, l'endotelio dei capillari retinici non è però fenestrato.

Le cellule endoteliali dei capillari retinici mostrano infatti zone occludens che impediscono il libero transito delle molecole in entrambe le direzioni. Queste

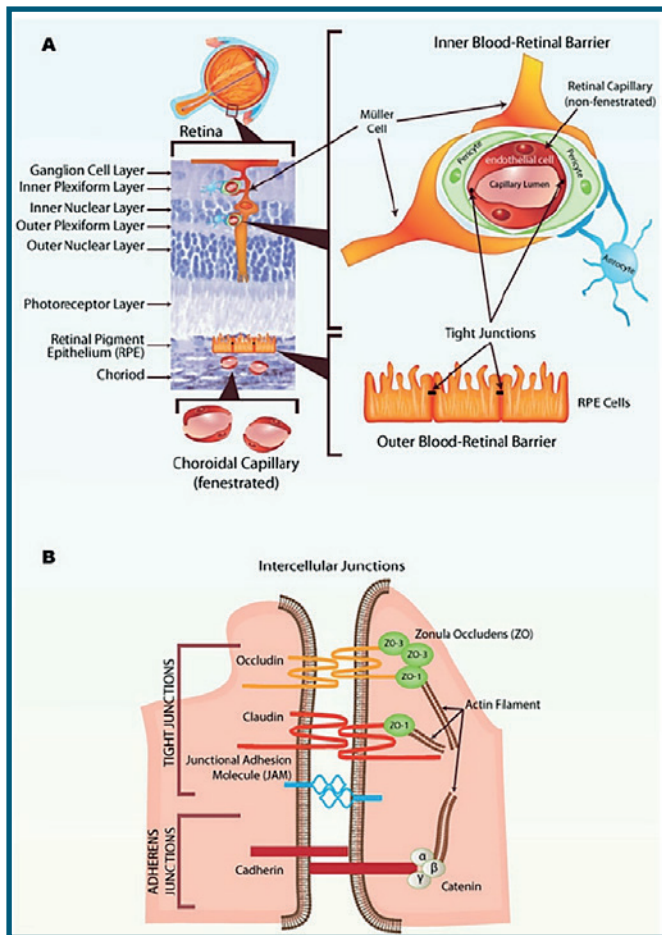


Fig. 4 - Blood-Retinal Barrier
(by <httpswww.researchgate.net>)

giunzioni strette sono l'elemento fondante della barriera emato-retinica interna.

La BER Barriera Emato-Retinica è formata infatti, in modo del tutto esclusivo, da un doppio sbarramento cellulare a perfetta tenuta, uno strettamente intraretinico, e l'altro retino-coroideale (Fig. 3) [4]. I capillari intraretinici, insieme alle cellule del Müller e agli astrociti, non meno importanti per garantire una perfetta tenuta, costituiscono la barriera emato-oculare interna (Inner Blood-Retinal Barrier); le cellule dell'epitelio pigmentato retinico, provviste anch'esse di giunzioni occludenti (tight junction), formano la barriera emato-oculare esterna (Outer Blood-Retinal Barrier) (Fig. 4) [5].

Le vene retiniche, in prossimità del disco ottico, hanno un diametro ~ a 200 μm (0,2 mm), circa doppio delle arterie.

La loro parete è composta di un unico strato di cellule endoteliali, una membrana basale, una tunica media di fibre elastiche, e 3/4 strati di fibre muscolari lisce, che in periferia sono rimpiazzate da periciti; all'esterno la loro parete termina con un'avventizia.

La minore presenza di cellule muscolari lisce rende le pareti delle vene retiniche relativamente più deboli e

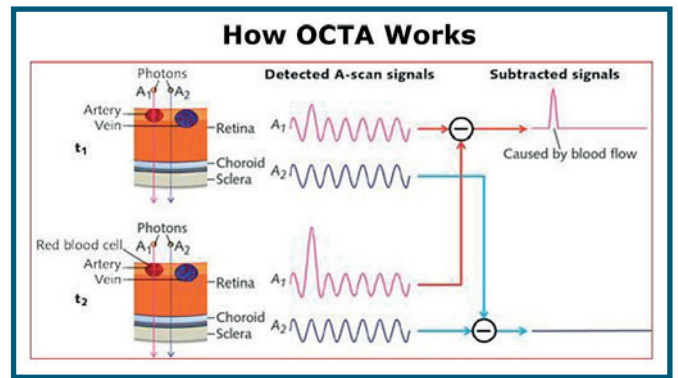


Fig. 5 - Schema di funzionamento degli OCTA
(by CHIEH-LI CHEN 11/13/2015 Bio Optics World)

maggiormente suscettibili agli insulti pressori e/o metabolici [2].

Vascularizzazione retinica & Angio-OCT

Gli OCTA, dopo l'approvazione della FDA, hanno avuto una rapida e favorevole diffusione (Fig.1).

L'imaging OCTA trova origine dal variabile backscattering della luce nel tessuto neuro-corio-retinico.

Il segnale tomografico ritorna senza interferenze dalle strutture istologiche che nel tempo non presentano variazioni morfologiche; se il segnale intercetta i vasi tissutali con flussi rilevabili si modifica, si decorrela [6].

La decorrelazione del segnale, dovuta essenzialmente al movimento delle emazie endovasali, presenta un'intensità variabile in fase e ampiezza proporzionale alla velocità degli elementi figurati endovasali e alla portata del lume intercettato (Fig. 5).

Gli algoritmi utilizzati per leggere il segnale decorrelato escludono ogni rilievo interferometrico di fondo e rilevano il segnale dinamico, il flusso vascolare corio-retinico [6].

L'imaging OCTA, generato dal tessuto in movimento, è possibile leggerlo sulle linee B-scan, cross-sectional images (B-frames), in falsi colori: in rosso per i flussi più evidenti, in verde per i flussi laminari come nella coriocapillare [6].

Le reti vascolari, con maggior impatto nell'imaging en face, sono ricostruite dal software con risultati iconografici non sempre perfettamente sovrapponibili tra i diversi device [23].

Un occhio attento ed esercitato tuttavia riconosce le caratteristiche dei network, e ricollega l'imaging ai device d'origine [6].

Queste differenze morfologiche nell'imaging sono dovute agli algoritmi di decorrelazione utilizzati, agli schemi di selezione correlati al segnale decorrelato, al software che ricostruisce il percorso dei singoli vasi, oltre che allo spessore delle slabs preimpostate.

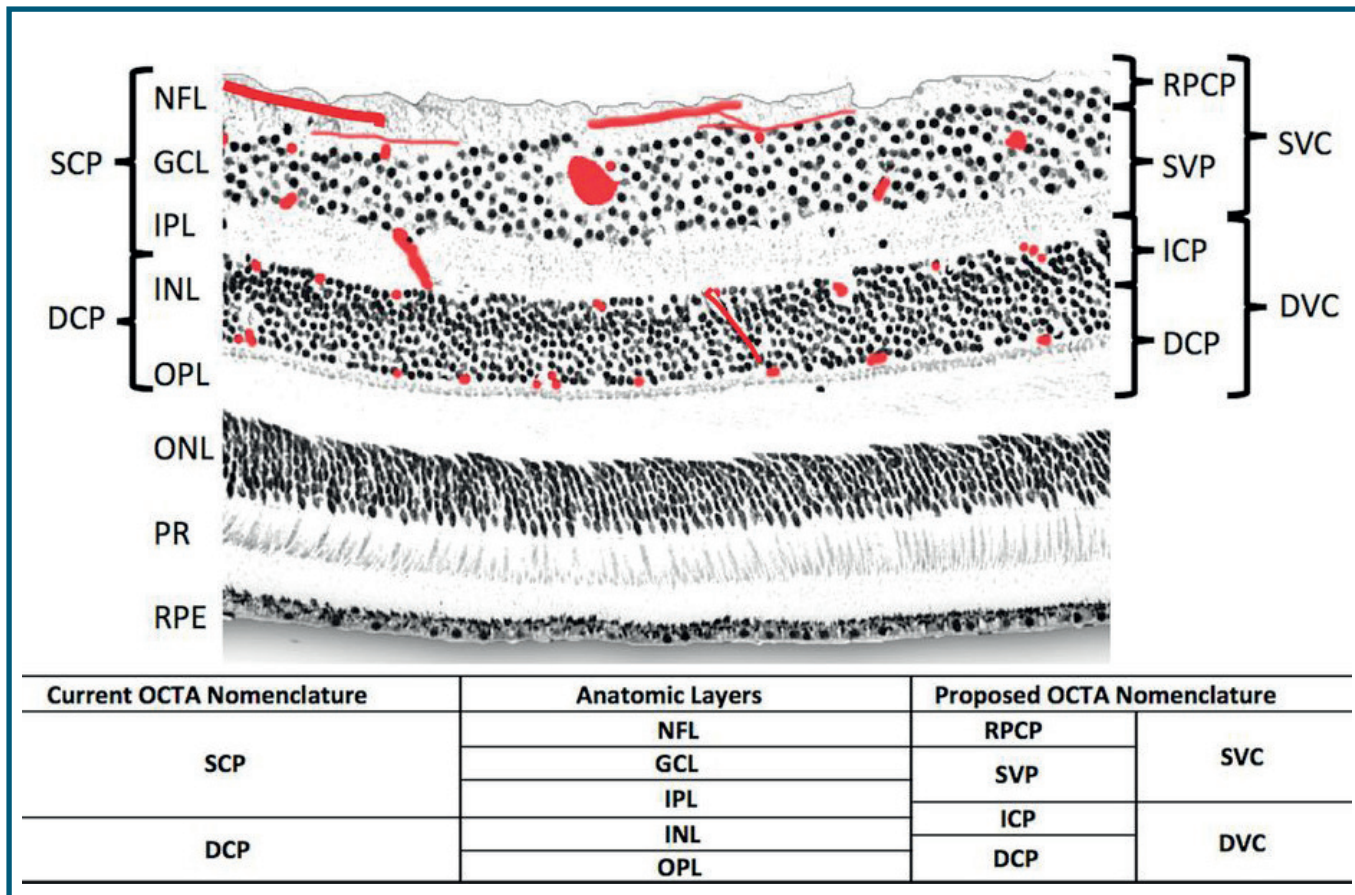


Fig. 6 - Localizzazione dei plessi vascolari retinici con segmentazione secondo Campbell et. al 2017. I plessi vascolari in rosso, disegnati a mano, sono denominati a destra; gli strati retinici sono denominati a sinistra. Confrontabili le due nomenclature vascolari, l'attuale e quella proposta da Campbell et al. (by Scientific Reports | 7:42201 | DOI: 10.1038/srep42201)

Tutte queste caratteristiche possono variare nei device in commercio, spesso frutto di brevetti depositati.

Campbell et al. recentemente propongono una nuova classificazione dei plessi vascolari con OCTA [22].

Gli autori distinguono nell'area papillo-maculare fino a quattro plessi vascolari. Nello strato delle cellule ganglionari GCL Ganglion Cell Layer descrivono il plesso vascolare superficiale SVP Superficial Vascular Plexus alimentato dall'arteria centrale della retina e composto di arterie, arteriole, vene, capillari (Fig. 6) [22].

Anastomosi verticali collegano il SVP a networks più profondi, al di sopra e al di sotto allo strato nucleare interno INL Inner Nuclear Layer [7,8] (Fig. 7).

Questi plessi vascolari capillari, denominati ICP Intermediate Capillary Plexus e DCP Deep Capillary Plexus rispettivamente, meno importanti per estensione, portata di flusso, si sviluppano orizzontalmente [22].

A questi tre plessi vascolari se ne aggiunge un quarto, il RPCP Radial Peripapillary Capillary Plexus.

Di aspetto lobulare, in parallelo agli assoni del NFL Nerve Fiber Layer, il RPCP svolge funzione di

supplenza, necessaria per le particolari esigenze metaboliche e di ossigenazione degli assoni nel tratto intraretinico, fortemente addensati e senza guaina mielinica (Fig. 6).

Questa complessa organizzazione vascolare, non chiaramente messa in evidenza in vivo con la fluorangiografia FA, è supportata da numerose ricerche e studi effettuati con la microscopia confocale ex vivo [9,10], in vivo con lo speckle variance OCT [11], e con l'utilizzo di ottiche adattive AO-cSLO adaptive optics confocal scanning laser ophthalmoscopy [12].

Dalla FA agli OCTA

Tra i molti studi presenti in letteratura, quelli svolti su retine di macaco del 1995 di Weinhaus et al. [13] e le ricerche del 2010 di Mendis et al. [14], più di altri, evidenziano il confronto tra i risultati dell'imaging FA con l'anatomia microvascolare retinica.

Nel primo studio si sottolinea come le dimensioni anatomiche della zona avascolare foveale retinica FAZ Foveal Avascular Zone siano sovrapponibili ai risultati ottenibili con FA. Nello stesso studio si fa rivelare

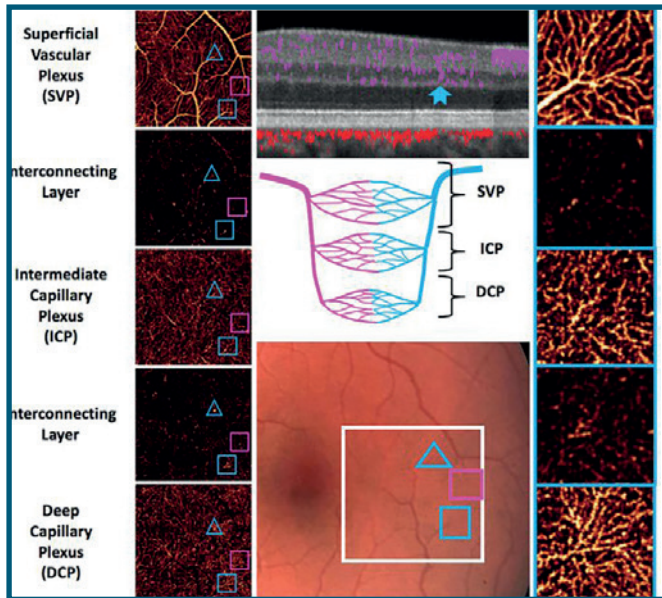


Fig. 7 - Fotografia del fondo oculare dell'area maculare in basso; imaging en face con algoritmo PR-OCT che mostra i vari plessi vascolari dal superficiale al profondo nei pannelli di sinistra; nel riquadro centrale si evidenziano le relazioni tra il sistema delle arterie e vene nei tre plessi SVP, ICP e DCP; nei riquadri a destra alcune venule che danno origine a network capillari nei tre plessi.
(by Scientific RepoRts | 7:42201 | DOI: 10.1038/srep42201).

tuttavia la difficoltà della FA a individuare i plessi vascolari retinici profondi per la predominanza del segnale proveniente dal SVP e dalla coroide [13]. Nel secondo studio, con maggior forza, gli autori rendono evidente i limiti della FA nell'indagare la vascularizzazione retinica profonda, e la sua incompleta capacità a fornire informazioni dettagliate sul network vascolare retinico superficiale [14]. Queste e altre considerazioni non diminuiscono tuttavia i meriti e vantaggi che la FA ha avuto nello studio delle patologie corio-retiniche, restando ancora indispensabile per la diagnosi in molte patologie vascolari complesse, oltre che come utile confronto. A fronte di questi indubbi vantaggi, la FA resta una tecnica invasiva, non raccomandata in gravidanza, nell'infanzia, e in soggetti con anamnesi di allergia; inoltre non è ripetibile a intervalli ravvicinati nel tempo [15]. L'angiografia OCTA ha il pregio di essere una tecnologia non invasiva, non a contatto, ripetibile, senza mezzo di contrasto e limiti per età o per stato di salute del paziente [15]. Un fondamentale limite della fotografia 2D e della FA, anche ad alta definizione e/o con imaging widefield, è, infatti, la mancanza di discriminazione dei tessuti in profondità. L'angiografia dyeless risolve questo limite, permettendo di sezionare la corioretina strato per strato e, nella papilla ottica, discriminare la lamina cribrosa con

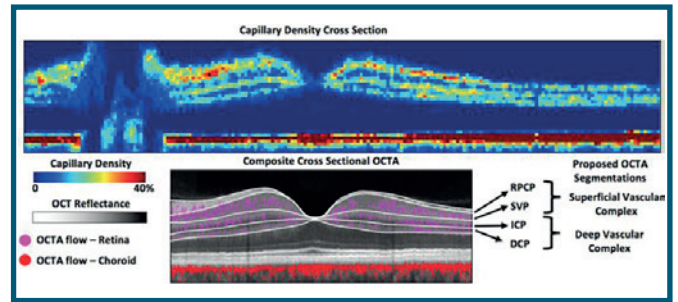


Fig. 8 - Cross-section dei capillari in soggetti normali nella regione retinica secondo Campbell et al.
Abbreviazioni: OCT = optical coherence tomography, RPCP = radial peripapillary capillary plexus, SVP = superficial vascular plexus, ICP = intermediate capillary plexus, DCP = deep capillary plexus, GCC = ganglion cell complex, OPL = outer plexiform layer, RPE = retinal pigment epithelium.
(by Scientific RepoRts | 7:42201 | DOI: 10.1038/srep42201)

dettagli prima impossibili in live, specie con l'utilizzo della tecnologia Swept Source OCT SS-OCT [15]. Il segnale complessivo OCTA è dovuto alla sovrapposizione della componente statica, dinamica e del noise di fondo: insieme determinano i voxel (pixel in 3D) catturati dai device.

Il segnale dinamico è 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, calcolarli, ed adeguatamente elaborarli con averaging finale, media statistica del segnale filtrato [15]. Questi limiti subiscono rapidi aggiornamenti nei software di ultima generazione.

La possibilità di poter segmentare la retina in sottili fette (slabs), ha permesso di evidenziare con OCTA la presenza di più aree di flusso nella compagine corio-retinica.

Inizialmente sono stati distinti due principali plessi, il superficiale SCP e il profondo DCP, descritti da *Lumbroso et al.* [16].

La nomenclatura OCTA è oggetto tuttavia di continue modifiche; gli studi di *Campbell et al.*, in parte riferiti, propongono una revisione complessiva delle reti vascolari con ampia eco di consensi. Per l'importanza che hanno questi studi, la loro portata nell'utilizzo degli OCTA, le novità offerte dell'algoritmo "projection-resolved" OCTA non presente in tutti i device, sembra utile fornire altri dati sull'argomento.

Nomenclatura Vascolare OCTA

Gli utilizzatori di OCTA hanno ben presente la suddivisione finora da tutti condivisa nei plessi superficiale e profondo, SCP e DCP.

J.P. Campbell et al. sostengono che i limiti della segmentazione in slabs, inizialmente utilizzata, non hanno permesso di intercettare efficacemente il plesso vascolare intermedio a causa della proiezione, nella retina profonda, del plesso superficiale, causando artefatto di coda (tailing artifact) [17,22].

Tale condizione ha reso impossibile ottenere un'immagine pulita dei plessi vascolari più profondi, visualizzare separatamente i plessi intermedi e profondo ICP e DCP, e dimostrare un segnale valido di flusso nella slab avascolare della retina esterna [18].

Gli autori, con l'utilizzo dell'algoritmo "projection-resolved" OCTA (PR-OCTA), descritto da Zhang et al., riescono a individuare quattro plessi vascolari, presenti non in tutte le aree retiniche [19], di cui abbiamo in parte già discusso (Fig. 6 > Fig. 8).

Gli autori riservano il termine di plesso a ogni segnale angiograficamente rilevabile con l'ausilio dell'algoritmo PR-OCTA. Con questa tecnologia individuano:

- RPCP Radial Peripapillary Capillary Plexus
- SVP Superficial Vascular Plexus
- ICP Intermediate Capillary Plexus
- DCP Deep Capillary Plexus

Con il termine "Complexes" delimitano due complessi vascolari principali, il superficiale e il profondo (SVC e DVC). Il Superficial Vascular Complex SVC include i due plessi capillari più interni, RPCP e SVP, mentre il Deep Vascular Complex DVC include i plessi capillari più esterni, intermedio e profondo ICP e DCP [22] (Fig. 6).

Il plesso RPCP si evidenzia solo nell'area del disco ottico tra gli assoni ganglionari retinici.

In area maculare si possono individuare tre soli plessi: SVP nelle cellule ganglionari, ICP tra lo strato plessiforme interno Inner Plexiform Layer (IPL) e lo strato nucleare interno Inner Nuclear Layer (INL), e infine il plesso DCP Deep Capillary Plexus, rinvenibile tra lo strato INL e OPL Outer Plexiform Layer [20,22].

Il SVP è una rete di vasi grandi e piccoli collegati direttamente alle arterie e alle vene della retina; fornisce tutti gli altri plessi vascolari. SVP diminuisce di spessore all'aumentare della distanza dal nervo ottico, come parimenti si assottiglia lo spessore delle cellule ganglionari lungo l'asse maculo-papillare.

Questi dati sono concordi a quelli istologici, come rilevato da P. Henkind et al. [21].

Il complesso vascolare profondo DVC presenta capillari a forma lobulare di uguale dimensione, con capillari di collegamento tra i plessi di maggiore sezione [22].

Considerazioni sulle performance degli OCTA & agreement

I device OCT/OCTA in commercio offrono prestazioni differenti. Dal punto di vista strutturale siamo testimoni dell'evoluzione che ha portato l'imaging neuro-corio-retinico a standard molto elevati, con differenze tomografiche tra i device difficilmente apprezzabili, rilevabili solo dopo un'attenta analisi delle scansioni messe a confronto.

Le immagini tomografiche, per quanto riguarda il flusso con tecnologia Spectral o Fourier domine sono ancor meno sovrapponibili; le prestazioni dei singoli device rimangono pertanto distanti, non paragonabili, specie nel follow-up delle patologie corio-retiniche.

Gli algoritmi che permettono a ogni dispositivo di rilevare il flusso, determinano specifici protocolli di acquisizione adattati alle caratteristiche di ciascuna macchina. In particolare, il numero di scansioni OCT ripetute in ciascuna sede retinica è solo una delle caratteristiche utili nel rilevare i flussi, specialmente quelli di minore entità nella deep retina [15,16].

Le possibilità di decorrelazione del segnale tomografico in segnale dinamico può perciò dare risultati molto differenti da uno strumento all'altro.

La velocità d'acquisizione e i limiti anatomici di segmentazione neuro-corio-retinici trovano sviluppo iconografico nelle slabs, al fine di esaltare il flusso vascolare e delinearne i relativi spazi d'appartenenza, specie con la modalità en face.

L'imaging finale è il risultato di specifiche modalità d'acquisizione ed elaborazione, spesso collegate a brevetti depositati, come si è avuto già modo di riferire.

Non vi è per tanto *agreement* tra i device. A tal proposito Xin-Xin Li et al., in una recente Review tra i sistemi angio-OCT in commercio, prendono in considerazione le loro performance diagnostiche, e propongono una tabella molto esaustiva di tutte le loro caratteristiche [23] [Tab. 2].

Nelle conclusioni del loro lavoro così affermano: "There is poor agreement of measurements among systems" [23].

La tecnologia OCTA inoltre, applicata al dominio delle frequenze, ha comunque dei limiti intrinseci a questa modalità d'acquisizione.

Gli artefatti proiettati dagli strati superficiali verso quelli più profondi sono ancora un ostacolo non risolto completamente [24].

Il rilievo dei cambiamenti nel segnale OCTA acquisito e valutato da più immagini strutturali tomografiche nella stessa posizione, trova un limite nel movimento di massa involontario e incontrollato del bulbo in esame, oltre che a causa delle saccadi oculari.

Il segnale tomografico statico e dinamico può variare

Quantitative comparison of OCTA devices

Tecnical characteristics of five different OCTA systems

System	AngioVue™	AngioPlex™	Spectralis® OCTA	AngioScan™	SS OCT Angio™
Manufactory	OptoVue, Fremont Inc., Calif., USA	Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, Calif., USA	Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany	Nidek, Aichi, Japan	Topcon Corporation, Tokyo, Japan
Algorithm	SSADA	OMAG	Full-spectrum probabilistic approach	Complex Difference	OCTARA
OCT device	RTVue XR AVANTI Widefield; SD-OCT	CIRRUS HD-OCT 5000; SD-OCT	Spectralis OCT2; SD-OCT	RS-3000 Advance; SD-OCT	DRI Triton; SS-OCT
Optical source (nm)	Centered on 840 with a bandwidth of 50	Centered on 840 with a bandwidth of 90	Centered on 870 with a bandwidth of 50	Centered on 880 (infrared, invisible)	Tunable laser centered on 1050 (invisible)
Scan speed (A-scan/s)	70000	68000	85000	53000	100000
Resolution (μm)	Axial: 5 Transverse: 15	Axial: 5 Transverse: 15	Axial: 5 Transverse: 6	Axial: 7 Transverse: 20	Axial: 8 Transverse: 20
Imaging depth (mm)	2.0-3.0	2	2	2.1	2.6
Scan area (H×V, mm ²)	Macula: 3×3, 6×6, 8×8; optic disc: 3×3, 4.5×4.5	3×3, 6×6	3×3	3×3 to 9×9 (in 0.3 mm increment)	3×3, 4.5×4.5, 6×6
Scan range (H×V)	45°×45°	67°×45°	30°×30°	40°×30°	45°×45°
A-scan count (H×V)	304×304, 400×400 (for 6×6 HD mode)	245×245 (for 3×3), 350×350 (for 6×6)	256×256, 512×512	256×256	256×256, 320×320
Repeated B-scan count	2	2 (6×6), 4 (3×3)	7	2, 4 or 8	4
Acquisition count (for each complete image)	1 in X and 1 in Y	1 in X	1 in X	1 in Y (AngioScan2 and 4), 2 in Y (AngioScan8)	1 in X
Theoretical acquisition time	2.7s×2, 4.6s×2 (HD mode)	3.6s	5.4s (256×256), 21.6s (512×512)	2.5s (AngioScan2), 5.0s (AngioScan4)	2.7s (256×256), 4.1s (320×320)
Default layer segmentation ^a (inner boundary to outer boundary)	Macula: SRL: ILM -3 μm to IPL -15 μm ^b ; DRL: IPL -15 μm to IPL -70 μm; ORL: IPL -70 μm to RPE ref -30 μm; CC: RPE ref -30 μm to RPE ref -60 μm; Optic disk: vitreous: above ILM -50 μm; ONH: ILM to ILM -150 μm; RPC: ILM to NFL; choroid: below RPE +75 μm ^c	VRI: ILM +300 μm to ILM; SRL: ILM to IPL (ILM -70% T _{ILM-OPL}); DRL: IPL to OPL (RPE fit +110 μm); avascular slab: OPL to RPE fit +70 μm; CC: RPE -29 μm to RPE -49 μm; choroid: RPE -64 μm to RPE -115 μm	SRL: ILM to IPL; DRL: IPL to OPL; Avascular layer: OPL to BM	Macula: SRL: ILM to IPL -8 μm; DRL: IPL -13 μm to IPL -88 μm; ORL: IPL -92 μm to RPE; choroid: RPE -4 μm to RPE -63 μm; optic disk: RPCP: ILM to ILM -105 μm; ORL: IPL -109 μm to RPE; choroid: RPE -4 μm to RPE -126 μm; lamina cribrosa: ILM -63 μm to ILM -378 μm	SRL: ILM -2.6 μm to IPL -15.6 μm; DRL: IPL -15.6 μm to IPL -70.2 μm; ORL: IPL -70.2 μm to BM; CC: BM to BM -10.4 μm
Eye-tracking technology	DualTrac™	FastTrac™	SMARTTrack™	Real-time SLO Eye HD Tracer	TruTrack™ Active Eye Tracking
Software version	AngioVue (2016.2)	AngioPlex v.9.0	HEYEX V6.4a	Navis-EX 1.5.5	FastMap10.11
Other highlighted features	MCT™; Angio Analytics; Blood flow signal overlay on structural OCT; follow-up settings; color composite layers	Blood flow signal overlay on structural OCT; superficial projection elimination technology; ganglion cell OU analysis; color composite slab	ART; multimodal imaging system; angiography overlay on multicolor or IR image; follow-up settings	Multimodal imaging system; automate mosaic panorama	Multimodal imaging system with fundus photography

^aIn layer segmentation, ILM, IPL, OPL, RPE and BM refer to the loci of their outer boundary respectively; ^bInferior to; ^cSuperior to. ART: Automated real-time mode; BM: Bruch's membrane; CC: Choriocapillaris; DRL: Deep retinal layer; H×V: Horizontal×vertical; HD: High definition; ILM: Inner limiting membrane; IPL: Inner plexiform layer; IR: Infrared; MCT: Motion correction technology; NFL: Nerve fiber layer; N/A: Not applicable; OCT: Optical coherence tomography; OCTA: OCT angiography; OCTARA: OCTA ratio analysis; OMAG: Optic micro-angiography; ONH: Optic nerve head; OPL: Outer plexiform layer; RPC: Radial peripapillary capillary; RPCP: RPC plexus; RPE: Retinal pigment epithelium; SD-OCT: Spectral domain OCT; ORL: Outer retinal layer; SRL: Superficial retinal layer; SSADA: Split-spectrum amplitude-decorrelation angiography; SS-OCT: Swept source OCT; T_{ILM-OPL}: Thickness between ILM and OPL; VRI: Vitreoretinal interface.

Tabella 2 - Comparazione riassuntiva delle caratteristiche degli OCTA più diffusi in commercio (modificato by Xin-Xin Li et al.)

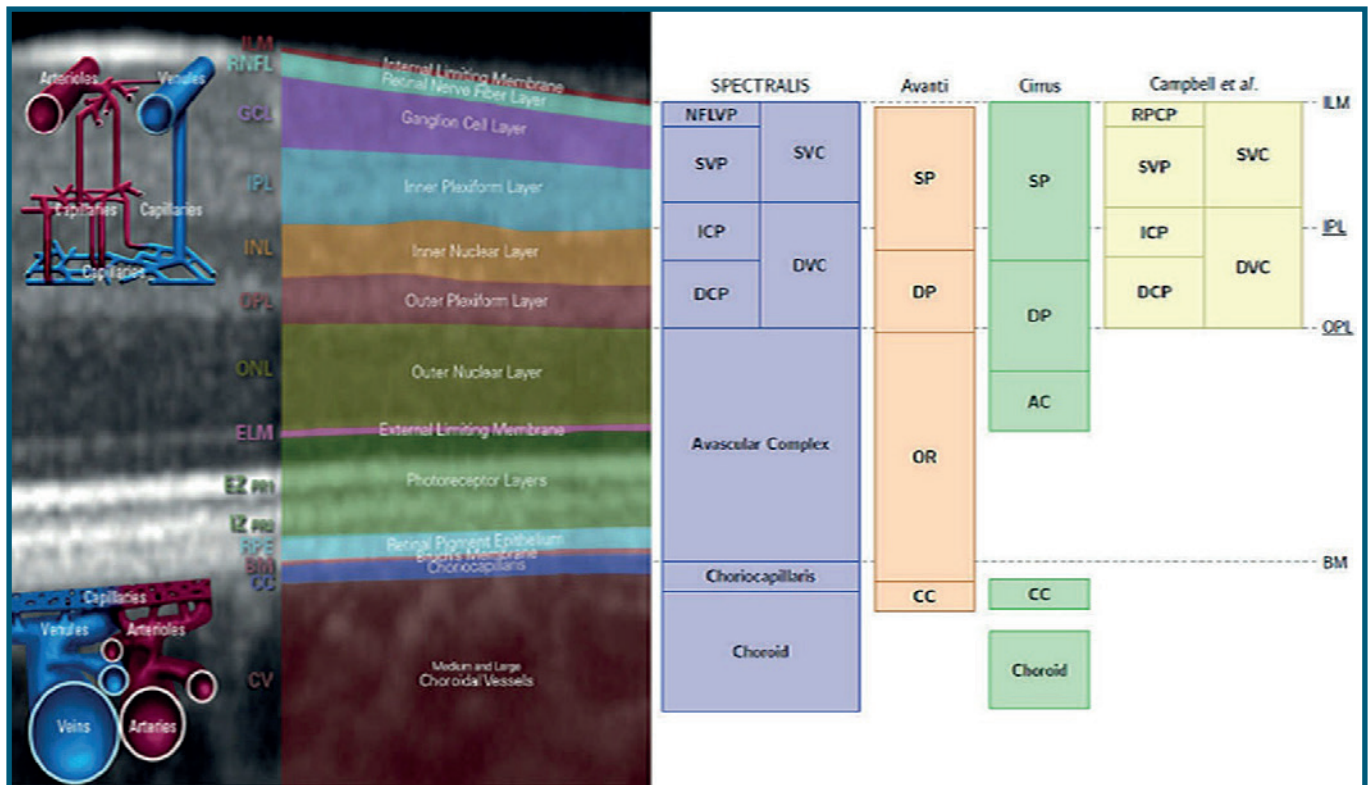


Fig. 9 - Definizione e limite delle slabs. A sinistra figura schematica della retina in falsi colori e della rete vasale. A destra schema delle slabs secondo Spectralis Heidelberg, Avanti Optovue, Cirrus Zeiss, e le slabs proposte da Campbell et al. Abbreviazioni: SVC: Superficial Vascular Complex; NFLVP: Nerve Fiber Layer Vascular Plexus (part of SVC); SVP: Superficial Vascular Plexus (part of SVC); DVC: Deep Vascular Complex; AC: Avascular Complex; ICP: Intermediate Capillary Plexus (part of DVC); DCP: Deep Capillary Plexus (part of DVC); CC: Choriocapillaris /Choroid Cap; RPCP: Radial Peripapillary Capillary Plexus; SP: Superficial Plexus; DP: Deep Plexus; OR: Outer Retina. Sources: SPECTRALIS: Heidelberg Engineering. OCT Angiography Module User Manual, Software Version 6.9, 2017. Avanti: Avanti Optovue. Optovue RTVue XR OCT Avanti System User Manual, Software Version 2016.1.0.26, 2016. Cirrus: Carl Zeiss Meditec Inc. CIRRUS HD-OCT User Manual Models 500, 5000, 2016. Campbell et al. (by www.he-academy.com/ Retinal-Layers-Interactive)

nel tempo lentamente (eye drift), o rapidamente a causa delle saccadi, introducendo falsi segnali strutturali e/o di flusso [24].

Nel caso di eye drift, il segnale OCTA risultante può essere corretto dall'elaborazione e dalla registrazione dell'immagine nel tempo.

Nel caso invece d'improvvisi movimenti oculari, le scansioni tomografiche di volume, su qualsiasi dispositivo OCTA, non possono essere compensate [24].

In presenza di movimenti oculari improvvisi il percorso di scansione effettivo del raggio laser OCT si discosta perciò da quello impostato, provocando distorsioni sull'area retinica indagata, sia nelle scansioni su superfici piane, espresse in mm², che per le aree 3D, espresse in mm³ (volume scans).

Da queste osservazioni e per superare i limiti descritti sono stati installati da qualche tempo sui device gli eye-tracking, utilissimi nel monitorare attivamente l'acquisizione e correggere le distorsioni da movimento, come Krause et al. hanno ben evidenziato tra gli altri

numerosi autori [25].

Molte sono le strategie informatiche che possono essere attuate per migliorare l'imaging finale OCTA.

Le tecniche di post-elaborazione delle immagini, utilizzate largamente da molti device, sono utili nel ridurre gli errori da movimento; è difficile tuttavia confermare se le immagini catturate rappresentino la vera anatomia delle strutture oculari riprese [17].

L'interpolazione è un'altra possibile risposta per risolvere questa problematica.

In matematica, in particolare in analisi numerica, per interpolazione s'intende un metodo per individuare nuovi punti del piano cartesiano da un insieme finito di punti dati.

L'interpolazione è necessaria per una corretta post-elaborazione delle immagini.

Anche questi complessi calcoli matematici potrebbero tuttavia non riuscire a catturare correttamente e compiutamente i piccoli flussi intraretinici in tempo reale (real time) [26].

L'elaborazione digitale delle immagini è una disciplina che comporta l'utilizzo di algoritmi, sfrutta l'elaborazione numerica dei segnali, e modifica un'immagine digitale in pixel dai valori originari, restituendo un'imaging finale di qualità superiore [27].

Considerando le velocità fisiologiche di perfusione del sistema vascolare corio-retinico, e gli intervalli in millisecondi tra due immagini OCTA consecutive, è improbabile che tutti i flussi presenti nel tessuto in esame siano sempre intercettati.

Gli attuali dispositivi OCTA utilizzano algoritmi diversi per rilevare queste variazioni di flusso in real time. La possibilità d'intercettare tutte le variazioni flussimetriche intraretiniche sono del resto legate agli intervalli d'azione intrinseci a ogni algoritmo [28].

Gli output in entrata, individuabili degli algoritmi, potrebbero non essere sempre rilevati come flusso, come contrasto tra tessuto statico e dinamico, in situazioni fisiologiche e, ancor maggiormente, in caso di iniziali neovasi patologici.

Ogni variazione tomografica proveniente dal tessuto statico è riconosciuta come flusso in un sistema binario 0-1, tutto o niente; la soglia sotto la quale il sistema non riconosce più un segnale come dinamico è il limite che si cerca sempre più di migliorare e superare [28].

Altri modi finalizzati a migliorare la risposta complessiva del sistema tomografico per esaltare il segnale di flusso dal rumore di fondo sono l'utilizzo di filtri e dell'analisi statistica.

L'intervento di questi complessi calcoli matematici solo parzialmente accennati e descritti, delineano da un lato il progresso informatico che è in atto ma, altresì, evidenziano i limiti che il dominio Fourier Domain presenta nell'acquisizione delle immagini dinamiche [29,30].

Segmentazione e flusso emoreologico

L'acquisizione OCTA scaturisce da scansioni B-scan lineari ripetute in pixel per creare un'imaging tridimensionale o di volume, un cubo di dati in voxel.

Le immagini strutturali acquisite ortogonalmente con quelle di flusso inizialmente fuse insieme sono indistinguibili.

La decorrelazione del segnale tomografico statico fa emergere il segnale di flusso che cambia nel tempo [6].

Le immagini en face sono le più idonee per visualizzare le reti o plessi vascolari retinici all'interno di specifici strati, le slabs.

Al fine di rilevare e gestire con precisione le reti vascolari corio-retiniche, è importante individuare con precisione i diversi plessi per ogni segmento.

È fondamentale pertanto che le slabs intercettino e

comprendano ciascun plesso vascolare compiutamente. Le differenze nelle definizioni delle slabs complicano ulteriormente il confronto delle immagini en face tra dispositivi diversi. Le slabs predefinite e la loro posizione all'interno della retina e della coroide sono mostrate nella figura numero nove (Fig. 9).

Per un confronto più diretto nell'immagine sono evidenziate le differenze tra alcuni device e i risultati dello studio di *Campbell et al.* del 2017 [22], oggetto di discussione di quest'articolo.

Attualmente vi sono ampi sforzi orientati a ridurre i tempi di acquisizione e di decorrelazione, la messa a fuoco e la fruibilità complessiva dei device.

Lo sviluppo continuo verso un'angiografia sempre più performante e ad ampio campo widefield, al fine di consentire una valutazione dei cambiamenti vascolari anche nella retina periferica, come nella retinopatia diabetica, porterà sicuri progressi e nuove opportunità diagnostiche.

Lo sviluppo della segmentazione tridimensionale dei vasi è un progresso chiave che mira a migliorare il rendering 3D, offrendo analisi più affidabili e avanzate [31].

Intelligenza Artificiale, Machine Learning & Deep Learning

L'applicazione dell'intelligenza artificiale ha avuto inizio nel 1956 con un seminario tenutosi presso il Dartmouth College (Hanover, contea di Grafton, New Hampshire, US) [32].

Al workshop gli intervenuti John McCarthy e Marvin Minsky del Massachusetts Institute of Technology (MIT), Allen Newell e Herbert Simon della Carnegie Mellon University (CMU), e Arthur Samuel dell'International Business Machines Corporation (IBM), hanno mostrato i risultati promettenti nelle strategie di apprendimento con intelligenza artificiale nei computer per il gioco a scacchi, per la risoluzione di problemi in algebra e nei teoremi logici.

Il termine Intelligenza Artificiale AI Artificial Intelligence, coniato per la prima volta negli anni Cinquanta, coinvolge tutte quelle macchine computazionali in grado di eseguire compiti caratteristici dell'intelligenza umana [32].

L'AI comprende: Machine Learning ML e Deep Learning DL.

Il termine "*Machine Learning*" è stato inizialmente adoperato da Arthur Samuel nel 1959; in merito scriveva: "*il computer dovrebbe avere la capacità di apprendere usando varie tecniche statistiche, senza essere programmato esplicitamente*" [32>36].

ML è in definitiva la capacità di una macchina ad

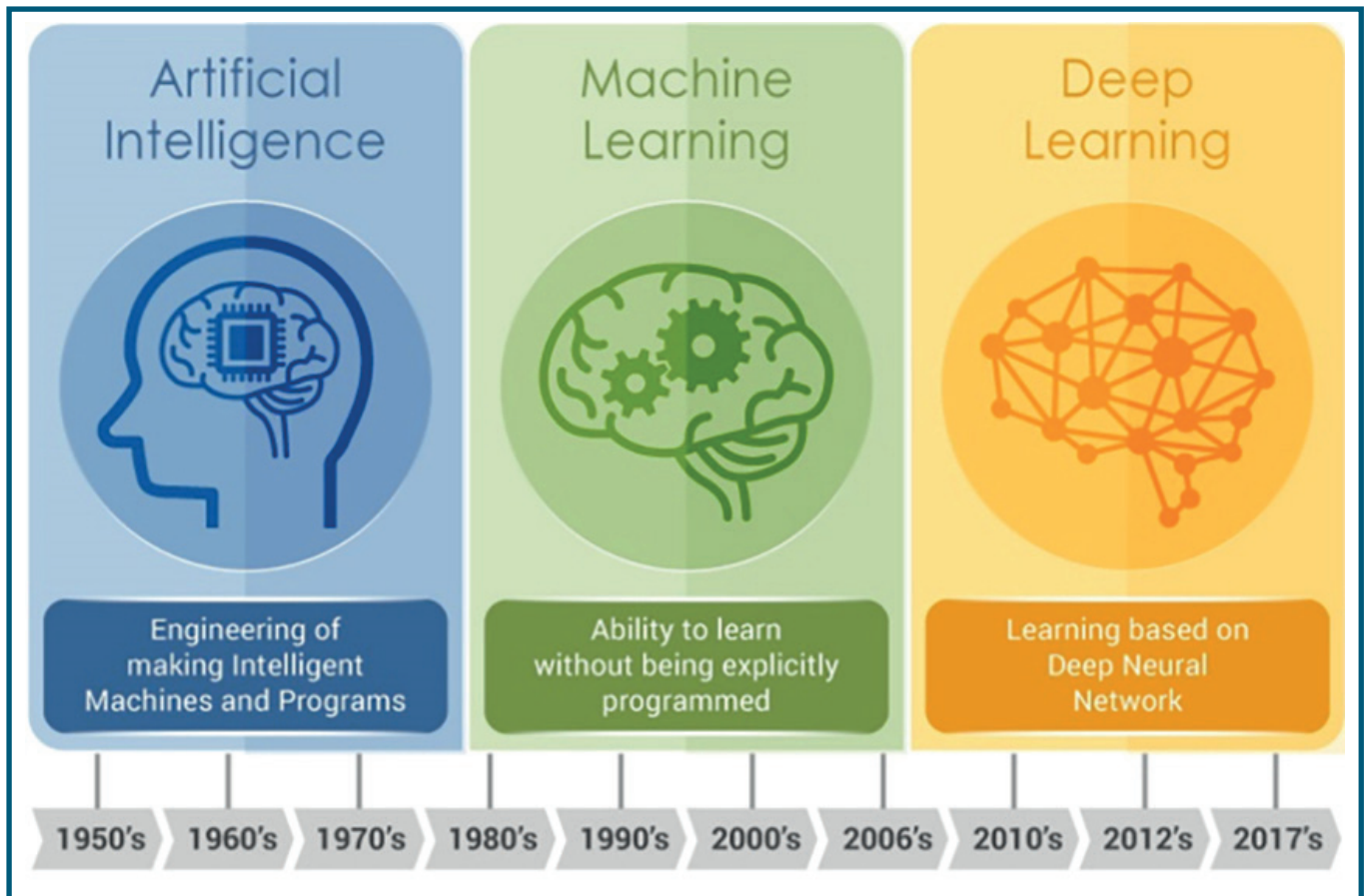


Fig. 10 - Evoluzione dell'Intelligenza Artificiale.
(by <https://medium.com>)

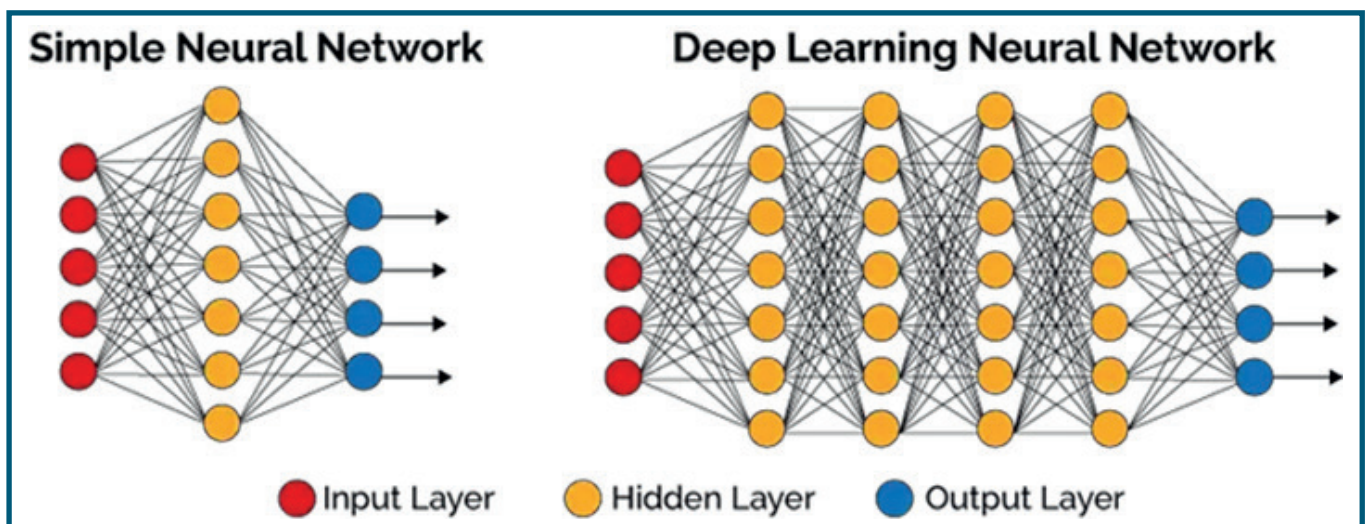


Fig. 11 - Schema della Deep Learnig.
(by <https://it.quora.com>)

apprendere sequenze e processi logico-informatici senza uno specifico programma. Esempi di ML sono i sistemi di visione artificiale o la capacità di un sistema computazionale nel riconoscere oggetti acquisiti digitalmente da sensori d'immagine [33].

L'apprendimento approfondito o Deep Learning DL è, invece, uno dei possibili approcci all'apprendimento automatico. La DL (apprendimento strutturato, profondo, gerarchico) è una sottocategoria della ML. Indica la branca della AI che fa riferimento agli algoritmi ispirati alla struttura e alla funzione del cervello

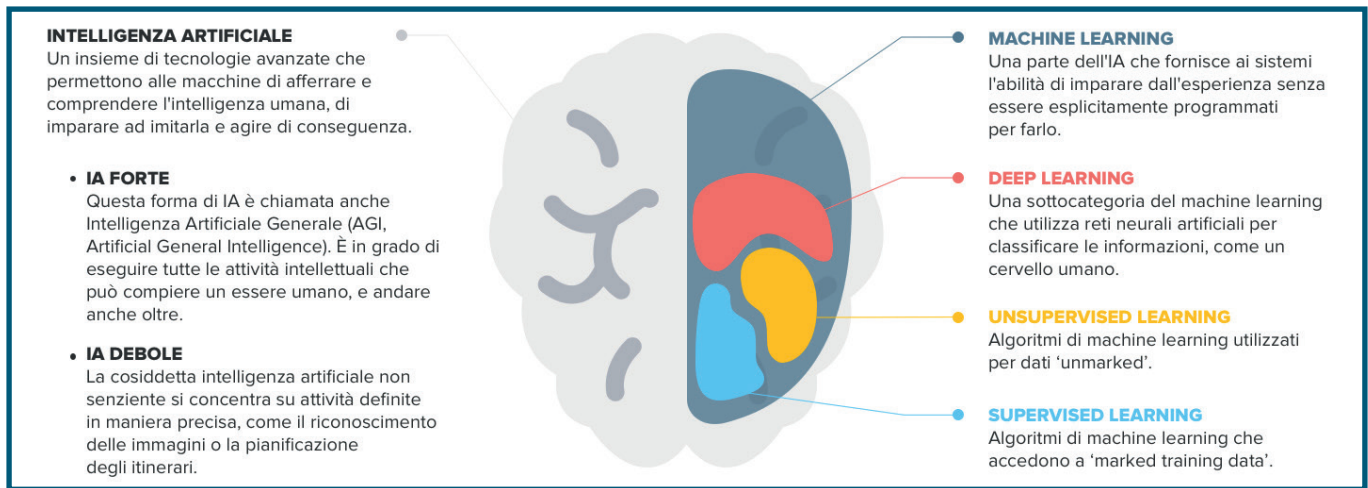


Fig. 12 - Quadro complessivo e descrittivo dell'evoluzione dell'Intelligenza artificiale.
(by <https://www.reply.com/it>)

umano, alle reti neurali artificiali (neural network) con due o più strati (hidden layers) al fine di elaborare informazioni in modo non lineare; in altre parole un secondo livello della AI [33] (Fig. 10, Fig. 11).

La rete neurale della DL è un insieme di neuroni artificiali connessi tra loro, che vengono "allenati" per risolvere un particolare problema. Si passa così di livello, da ML a DL.

L'insieme dei neuroni artificiali sono suddivisi a loro volta in gruppi, in layer (strato, livello), connessi tra loro a formare una rete complessa come nel cervello umano.

Quando il numero di layer è alto la rete neurale è definita profonda, da cui il termine Deep Learning [33].

L'AI, basata sull'apprendimento approfondito DL, ha suscitato un enorme interesse, un'attenzione globale negli ultimi anni.

La DL è stata ampiamente adottata nel riconoscimento d'immagini, in quello vocale, e nell'elaborazione del linguaggio.

Il connubio tra AI e mondo sanitario sta muovendo i primi passi, con un impatto crescente sull'assistenza medica.

In Oftalmologia la DL è stata applicata con successo alle fotografie del fundus, alla tomografia a coerenza ottica, ai campi visivi, ottenendo prestazioni di classificazione "robuste" nel rilevamento di molte patologie come nella retinopatia diabetica, del prematuro, nel riconoscere le papille glaucomatose, l'edema maculare, oltre che nella degenerazione maculare legata all'età [34].

La DL nell'imaging oculare può essere inoltre utilizzata con successo nella telemedicina con grande aiuto a monitorare le principali patologie e indirizzare le cure primarie.

Le potenziali opportunità che DL può offrire nel mondo sanitario, stanno tuttavia aprendo notevoli problematiche medico-legali, e non poche perplessità da parte di medici e pazienti. Le indicazioni offerte dalla DL, specialmente se per mezzo di algoritmi "black-box", largamente utilizzati, trova inevitabili ostacoli e, in parte, condivisibili perplessità.

Il modello black box è, infatti, una scatola nera, leggibile solo in uscita (output) dopo una determinata sollecitazione in ingresso (input); il suo funzionamento interno è invisibile, rimane ignoto.

Si contrappone al modello white box dove il sistema è, invece, una scatola trasparente dove sono note le componenti interne e il loro funzionamento.

Esiste un terzo modello, il grey box, in cui il sistema utilizza un approccio intermedio tra white box e black box [34].

Utilizzando l'apprendimento automatico, l'algoritmo può fare previsioni basate su i dati inseriti in fase di addestramento, in modo supervisionato o non supervisionato (Fig. 11).

Come descritto da *LeCun Y et al.*, con l'avvento delle unità di elaborazione grafica (GPU) e una maggiore potenza di elaborazione, la DL è la tecnica di ML maggiormente utilizzata, con più livelli di elaborazione, e migliore rappresentazione dei dati a diversi livelli di astrazione [32>37].

L'unità di elaborazione grafica GPU Graphics Processing Unit è una tipologia particolare di coprocessore che si contraddistingue per essere specializzata nel rendering d'immagini grafiche.

A sua volta, nella computer grafica, il rendering (restituzione grafica) identifica la "resa", la capacità di generare un'immagine a partire da una descrizione matematica tridimensionale; attraverso l'intervento di adeguati

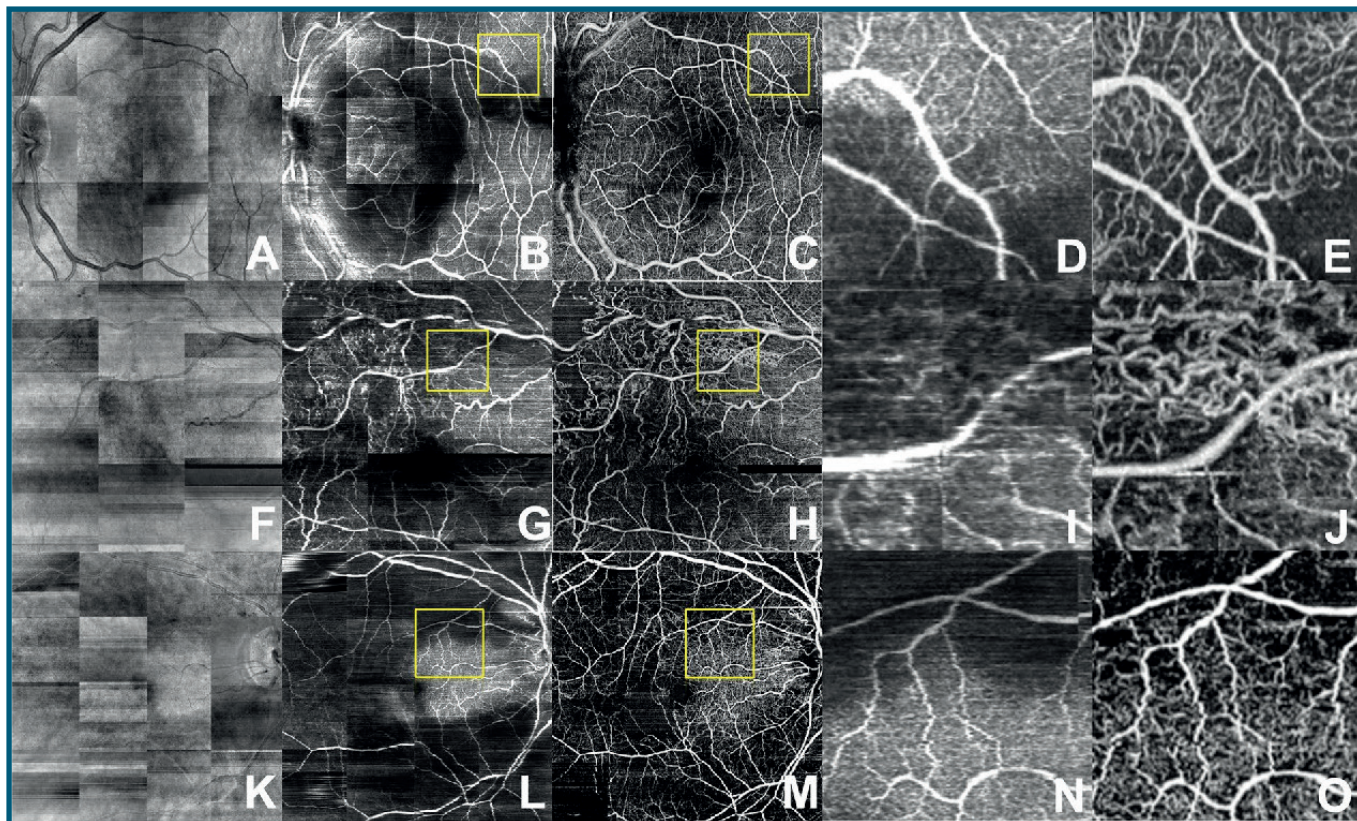


Fig. 13 Retinopatia diabetica. Mappe en-face del flusso ematico retinico che scaturiscono dai volumi OCT strutturale (A,F,K,P), dai volumi di flussi generati dalla AI (B,G,L,Q) e OCTA (C,H,M,R). Immagini magnificate generate da AI (D,I,N,S) e OCTA (E,J,O,T) con aree di decremento di flusso rispetto ai flussi in retine normali. Con Deep Learning si evidenziano immagini e dettagli per la vascolarizzazione dei plessi superficiali simili alle immagini OCTA. (by Cecilia S. Lee et al, Scientific RepoRts | (2019) 9:5694 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42042-y>).

algoritmi si possono definire anche il colore pixel per pixel [32>37, 39].

L'AI sta entrando nell'imaging in Oftalmologia e prepotentemente anche nei software degli OCTA (Fig. 12).

Un esempio è l'integrazione di AI nel controllo dei dati normativi per le misurazioni della densità capillare e del flusso.

Le analisi statistiche integrate con AI potranno mostrare cambiamenti morfologici in conformità a immagini ad alta risoluzione OCTA, misurabili e confrontabili con i database nella gestione di patologie largamente diffuse come maculopatie, glaucoma, e rendere più razionale il trattamento con intravitreali nelle membrane neovascolari [34,35].

Infatti i metodi di AI sono stati esplorati per facilitare il rilevamento precoce e automatico dei cambiamenti vascolari e la previsione della progressione di molte lesioni patologiche [35].

L'Institute for Business Value di IBM riferisce che 82% delle imprese sta prendendo in considerazione la possibilità di utilizzare l'AI nella loro gestione, mentre il 60% delle imprese ne frena l'adozione per i timori e le

problematiche legate alla responsabilità finale; tuttavia un 63% di tutte le imprese non ha competenze interne in grado di gestire in modo sicuro l'AI [38].

Certamente le black box sono un limite che si dovrà superare per aumentare la fiducia verso l'utilizzo della AI in modo più diffuso, specie in campo sanitario.

L'applicazione della DL potrebbe potenzialmente rivoluzionare il modo di fare diagnosi in medicina in un prossimo futuro.

Conclusioni

Uno degli argomenti più discussi oggi nel mondo degli affari è l'Intelligenza Artificiale AI, tecnologia alla guida della Quarta Rivoluzione Industriale.

Il termine Industria 4.0 (Industry 4.0) indica una tendenza dell'automazione industriale che integra alcune nuove tecnologie produttive per migliorare le condizioni di lavoro, creare nuovi modelli di business e aumentare la produttività. L'AI è il perno di questa nuova era digitale.

Nonostante i progressi in campo medico, l'applicazione della AI è stata ritardata e limitata nelle singole specialità dal confronto tra i risultati diagnostici degli

esperti e gli elaborati dopo l'utilizzo della AI [38]. L'apprendimento approfondito DL è stato in grado di identificare nel campo dell'angiografia retinica il flusso da singole immagini OCT strutturali, con fedeltà simile all'OCTA [39].

Il modello utilizzato con AI consente di generare mappe di flusso da grandi volumi di dati OCT raccolti in precedenza negli studi clinici e nella pratica clinica.

Lo studio di *Cecilia S. Lee et al.* dimostra che un modello di Deep Learning può essere addestrato a riconoscere le caratteristiche d'immagini OCT con una corretta identificazione della vascolarizzazione retinica sulle scansioni OCT trasversali, in modo completamente automatizzato (Fig. 13) [39].

Il modello proposto e descritto nello studio è capace di generare anche mappe di flusso en-face.

Il modello di DL ha identificato sia i vasi retinici che sono facilmente visibili sulle immagini strutturali B-scan OCT, sia la microvascolarizzazione della retina non evidente con OCT standard, mostrando un numero significativamente maggiore di vasi retinici rispetto alle proiezioni strutturali OCT, all'imaging a colori e con FA.

Inoltre l'applicazione della DL è stata in grado di generare mappe di flusso dettagliate dei vasi retinici in una varietà di condizioni cliniche differenti, utilizzando l'imaging strutturale standard [37, 39].

In un prossimo futuro l'implementazione di AI nei device sarà sempre più diffuso e utile ai fini diagnostici, oltre che nella telemedicina.

Questa nuova possibilità non deve trovarci impreparati; la gestione finale dei dati resta sempre del medico; più rapido sarà il nostro adattamento culturale, migliore saranno i benefici per i pazienti.

L'utilizzo più diffuso dei Big Data (o megadati), necessari per comprendere prima e meglio il follow-up di molte malattie croniche ed invalidanti, necessiterà di integrazioni digitali sempre più complesse.

Solo con l'aiuto sistematico di ML e DL si potranno affrontare queste sfide tecnologiche.

Limitare i danni permanenti alla vista e contenere i relativi costi sociali sono ulteriori motivi perché il mondo sanitario accetti culturalmente la partnership con l'AI, specialmente nella gestione delle patologie complesse. ■

REFERENCES

1. Provis, J. M. Development of the primate retinal vasculature. *Progress in Retinal and Eye Research* 20, 799–821 (2001).
2. Anand-Apte, B., Hollyfield, J. G. *Developmental Anatomy of the Retinal and Choroidal Vasculature*. Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA. ©2010 Elsevier Ltd.
3. www.brainmindlife.org/20130518-periciticervello.htm.
4. Vinoses, SA. Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histology and Histopathology*, vol. 10, n° 1, 1995, pp. 141-154.
5. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21 Suppl 6:S3-9. doi: 10.5301/EJO.2010.6049.
6. Lucente, A. Principi tecnologici e imaging degli Angio-OCT. *Oftalmologia Domani - N. 2 - Anno 2015*.
7. Snodderly, D. M., Weinhaus, R. S. & Ch[oi], J. C. Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Neurosci.* 12, 1169–1193 (1992).
8. Stone, J., van Driel, D., Valter, K., Rees, S. & Provis, J. The locations of mitochondria in mammalian photoreceptors: relation to retinal vasculature. *Brain Res.* 1189, 58–69 (2008).
9. Tan, P. E. Z. et al. Quantitative Confocal Imaging of the Retinal Microvasculature in the Human Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 5728–9 (2012).
10. Chan, G. et al. Quantitative Morphometry of Perifoveal Capillary Networks in the Human Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 5502–13 (2012).
11. Kurokawa, K., Sasaki, K., Makita, S., Hong, Y.-J. & Yasuno, Y. Three-dimensional retinal and choroidal capillary imaging by power Doppler optical coherence angiography with adaptive optics. *Opt Express* 20, 22796–22812 (2012).
12. Chan, G. et al. In vivo optical imaging of human retinal capillary networks using speckle variance optical coherence tomography with quantitative clinico-histological correlation. *Microvascular Research* 100, 32–39 (2015).
13. Weinhaus, R. S., Burke, J. M., Delori, F. C. & Snodderly, D. M. Comparison of fluorescein angiography with microvascular anatomy of macaque retinas. *Exp. Eye Res.* 61, 1–16 (1995).
14. Mendis, K. R. et al. Correlation of histologic and clinical images to determine the diagnostic value of fluorescein angiography for studying retinal capillary detail. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5864–5869 (2010).
15. Lucente, A. Angio-OCT in progress. *Oftalmologia Domani*. N. 3 - Anno 2016.

segue >

REFERENCES

16. Lumbroso, B., Huang, D., Romano, A., Rispoli, M. & Coscas, G. *Clinical En Face OCT Atlas* (Jaycee Brothers Medical, 2013).
17. Spaide, R. F., Fujimoto, J. G. & Waheed, N. K. *Image Artifacts in Optical Coherence Tomography Angiography*. *Retina* (Philadelphia, Pa.) 35, 2163–2180 (2015).
18. Hwang, T. S. et al. *Automated Quantification of Capillary Nonperfusion Using Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy*. *JAMA Ophthalmol* 1–7.
19. Zhang, M. et al. *Projection-resolved optical coherence tomographic angiography*. *Biomed Opt Express* 7, 816–13 (2016).
20. Thomas S. Hwang, Miao Zhang, Kavita Bhavsar, Xinbo Zhang, J. Peter Campbell, Phoebe Lin, Steven T. Bailey, Christina J. Flaxel, Andreas K. Lauer, David J. Wilson, David Huang, Yali Jia. *Visualization of 3 Distinct Retinal Plexuses by Projection Resolved Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy*. *JAMA Ophthalmol*. Published on line November 3, 2016.
21. Henkind, P. *Radial peripapillary capillaries of the retina. I. Anatomy: human and comparative*. *British Journal of Ophthalmology* 51, 115–123 (1967).
22. J. P. Campbell, M. Zhang, T. S. Hwang, S. T. Bailey, D. J. Wilson, Y. Jia & D. Huang. *Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection Resolved Optical Coherence Tomography Angiography*. *Scientific Repo Rts* | 7:42201 | DOI: 10.1038/srep42201.
23. Xin-Xin Li, Wei Wu, Hao Zhou, Jun-Jie Deng, Meng-Ya Zhao, Tian-Wei Qian, Chen Yan1, Xun Xu, Su-Qin Yu. *A quantitative comparison of five optical coherence tomography angiography systems in clinical performance*. *Int J Ophthalmol*, Vol. 11, No. 11, Nov.18, 2018.
24. Zhang, A., Zhang, Q., Chen, C. L. & Wang, R. K. *Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: a review and comparison*. *J Biomed Opt* 20, 100901, doi:10.1117/1.JBO.20.10.100901 (2015).
25. Kraus, M. et al. *Motion Artifact Correction in OCT Volume Scans Using Image Registration*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51, 4405–4405 (2010).
26. Mirco Mariucci, *Laboratorio di Modellistica Numerica: introduzione all'elaborazione digitale delle immagini*, 2017.
27. Wilhelm Burger and Mark J. Burge, *Digital Image Processing: An Algorithmic Approach Using Java*, Springer, 2007, ISBN 978-1-84628-379-6.
28. Kraus, M. F. et al. *Quantitative 3D-OCT motion correction with tilt and illumination correction, robust similarity measure and regularization*. *Biomed Opt Express* 5, 2591–2613, doi:10.1364/BOE.5.002591 (2014).
29. Gao, S. S., Liu, G., Huang, D. & Jia, Y. *Optimization of the split-spectrum amplitude-decorrelation angiography algorithm on a spectral optical coherence tomography system*. *Opt Lett* 40, 2305–2308, doi:10.1364/OL.40.002305 (2015).
30. F. Frangi, R., Niessen, W. J., Vincken, K. & A Viergever, M. *Multiscale Vessel Enhancement Filtering*. Vol. 1496 (2000).
31. Freund, K. B., Gattoussi, S. & Leong, B. C. *Dense B-scan Optical Coherence Tomography Angiography*. *Am J Ophthalmol*, doi:10.1016/j.ajo.2018.03.029 (2018).
32. Marcus Hutter, *Universal Artificial Intelligence*, Berlin, Springer, 2005, ISBN 978-3-540-22139-5.
33. Gardner A., *An Artificial Intelligence Approach to Legal Reasoning*, 0262071045, 9780262071048 MIT 1987.
34. D.Sciuto, *Introduzione ai sistemi informatici*, Milano, McGraw-Hill, 2002.
35. Hutchinson A, McIntosh A, Peters J, et al. *Effectiveness of screening and monitoring tests for diabetic retinopathy--a systematic review*. *Diabet Med*. 2000;17(7):495-506
36. LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. *Deep learning*. *Nature*. 2015;521(7553):436-444.
37. Glassner (1995). *Principles Of Digital Image Synthesis*. Morgan Kaufmann. ISBN 1-55860-276-3.
38. <https://www.ibm.com/it>.
39. Cecilia S. Lee, Ariel J. Tying, Yue Wu, sa Xiao, Ariel S. Rokem, Nicolaas P. DeRuyter, Qinqin Zhang, Adnan Tufail, Ruikang K. Wang, & Aaron Y. Lee. *Generating retinal flow maps from structural optical coherence tomography with artificial intelligence*. *Scientific RepoRts* | (2019) 9:5694 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42042-y>.