

**Università degli Studi di Napoli  
“Federico II”**



**Scuola di Medicina e Chirurgia  
Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed  
Odontostomatologiche**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA  
IMAGING MOLECOLARE  
Coordinatore Prof. Andrea Renda**

**Relazione tra i parametri morfologici e funzionali in  
pazienti con differente grado di severità  
glaucomatosa**

**Relatore**

**Ch.mo Prof. G. Cennamo**

**Candidato**

**Dott. C. Minervino**

# Indice

## Introduzione

- Il Glaucoma pag. 2
- Cellule ganglionari retiniche : anatomia e fisiologia pag. 5
- Tomografia a Coerenza Ottica (OCT): valutazione delle cellule ganglionari pag 12
- Cellule ganglionari e glaucoma pag. 20

## Scopo dello studio

- Materiali e metodi pag. 34
- Risultati pag. 37
- Discussione pag. 41
- Casi clinici pag. 49
- Bibliografia pag. 59

# **INTRODUZIONE**

## **IL GLAUCOMA**

Il glaucoma è una delle più frequenti cause di cecità nel mondo.

Poiché la fisiopatologia, la presentazione clinica e il trattamento dei diversi tipi di glaucoma sono vari, non esiste un'unica definizione che descriva in maniera corretta tutte le forme.

In sostanza, il glaucoma è una malattia degenerativa del nervo ottico, la cui evoluzione è caratterizzata da una accelerazione della morte delle cellule ganglionari, con successiva perdita assonale e danno al nervo ottico, che conducono alla perdita progressiva del campo visivo.

La definizione classica di tale affezione fa riferimento alla concomitante presenza della cosiddetta triade di von Graefe, costituita da ipertono oculare (> 21 mmHg), otticopatia e alterazioni del campo visivo.

### **CLASSIFICAZIONE**

Nell' adulto il glaucoma si suddivide in :

- glaucoma ad angolo aperto (primario o secondario)

- glaucoma ad angolo stretto (primario o secondario)

Queste due forme differiscono per patogenesi e presentazione, ma entrambe portano a una progressiva perdita dell' acuità visiva.

## PRESSIONE INTRAOCULARE

Il più importante fattore di rischio è una pressione intraoculare (IOP) elevata, secondaria alla riduzione del deflusso di umore acqueo attraverso l'angolo di filtrazione. Non bisogna però trascurare l'esistenza dei cosiddetti glaucomi "a bassa pressione" o meglio "a pressione normale".

## PATOGENESI

Nel tentativo di chiarire il meccanismo che porta all'atrofia ottica glaucomatosa sono state formulate due distinte ipotesi:

- secondo una teoria meccanica il danno della pressione intraoculare si eserciterebbe soprattutto a livello della lamina cribrosa con compressione delle fibre e deformazione della lamina;
- secondo una teoria vascolare avrebbero un ruolo determinante alcune modificazioni microcircolatorie di tipo ischemico, primitive e/o secondarie all'ipertono oculare. Sempre maggiore attenzione viene data in tal senso all'esistenza di fenomeni di autoregolazione della circolazione nella testa del

nervo ottico e a sue eventuali anomalie.

Un punto comune alle due teorie è comunque l'esistenza di un blocco del flusso assoplasmico a cui farebbe seguito l'innescò di meccanismi degenerativi irreversibili, forse scatenati dal mancato arrivo al corpo cellulare di segnali (mediatori, proteine, fattori di crescita) provenienti dalle terminazioni sinaitiche, e che conducono alla morte cellulare. Un modello patogenetico integrato sembra poter conciliare le due visioni finora contrapposte: fattori vari, genetici o acquisiti, provocano alterazioni trabecolari e quindi un rialzo della IOP; l'ipertono provoca un blocco del flusso assoplasmico a livello della testa del nervo ottico, sia per compressione diretta sia attraverso un'ischemia per compressione dei vasi e per riduzione della pressione di perfusione. Tutto questo conduce infine alla morte delle cellule ganglionari.

# **CELLULE GANGLIONARI RETINICHE:**

## **ANATOMIA E FISIOLOGIA**

Le cellule ganglionari (o gangliari) rappresentano il neurone di uscita della retina e sono le prime cellule del sistema visivo nelle quali si generano potenziali d'azione. Su di esse convergono tutti gli stimoli provenienti dai fotorecettori (120.000.000 di bastoncelli e 6.000.000 di coni) dopo essere passati attraverso le cellule bipolari (35.000.000).

Le cellule ganglionari sono circa 1.200.000; hanno il corpo cellulare situato nello strato omonimo ed il loro assone forma il nervo ottico e termina, dopo aver attraversato il chiasma ed i tratti ottici, nel corpo genicolato laterale. Su di una cellula ganglionare affluiranno impulsi provenienti da più cellule bipolari e da più fotorecettori.[1]

Dal punto di vista anatomico, si distinguono tre differenti fenotipi:

- Cellule gangliari nane: divise a loro volta in due tipi:

a) Tipo 1: che contraggono sinapsi con le cellule bipolari nane piatte;

b) Tipo2: che contraggono sinapsi con le cellule bipolari nane penetranti (invaginanting).

Le cellule ganglionari nane hanno piccole dimensioni e sembrano avere il compito di trasmettere al cervello il segnale generato da ogni singolo cono. Le dimensioni del campo recettivo a livello foveolare sono uguali alle dimensioni di un singolo cono, quindi ad altissima risoluzione. La loro sensibilità spettrale è quella dei coni sensibili al rosso ed al verde. La loro sensibilità al contrasto è massima a luminanze elevate.

- Cellule ganglionari “centro-on blu sensibili”: contraggono sinapsi con le cellule bipolari omonime, hanno corpo cellulare più grande delle nane.

- Cellule ganglionari M: sembrano preposte al rilevamento del movimento degli oggetti.

Un'ulteriore classificazione morfofunzionale distingue tre tipi di cellule gangliari:

- Cellule gangliari W: a bassa velocità di conduzione, hanno un campo recettivo che può essere più grande o più piccolo delle cellule X o Y ma mai uguale. Il campo recettivo ha organizzazione concentrica. Queste cellule rispondono all'inizio ed alla fine della stimolazione. Una piccola quota di esse è sensibile al movimento dello stimolo in una determinata direzione dello spazio, hanno piccolo corpo cellulare e costituiscono circa il 50% delle ganglionari.

- Cellule ganglionari X: a media velocità di conduzione, sono di media grandezza, hanno campi recettivi piccoli e concentrici. Rispondono dall'inizio alla fine dell'applicazione dello stimolo. Sono molto sensibili a stimoli di alta frequenza spaziale, sono in grado di risolvere i dettagli più fini di uno stimolo strutturato e consentono l'esatta localizzazione di un oggetto in un contesto e quindi in un ambiente.

- Cellule ganglionari Y: ad alta velocità di conduzione, sono molto grandi e rappresentano circa il 10% delle ganglionari, hanno campi recettivi concentrici molto grandi, probabilmente suddivisi in subunità, ognuna delle quali riceve stimoli da pochi fotorecettori. Gli stimoli provenienti da queste subunità vengono verosimilmente sommati in modo generico a livello delle cellule Y. Si attivano solo all'inizio ed alla fine dell'applicazione di uno stimolo luminoso prolungato. Rispondono meglio a disegni grossolani ed ai rapidi cambiamenti di illuminazione nel contesto del proprio campo recettivo.

Dal punto di vista funzionale e in base alle caratteristiche del campo recettivo, le cellule gangliari si dividono in due tipi: cellule gangliari centro-on e cellule gangliari centro-off (Fig. 1).

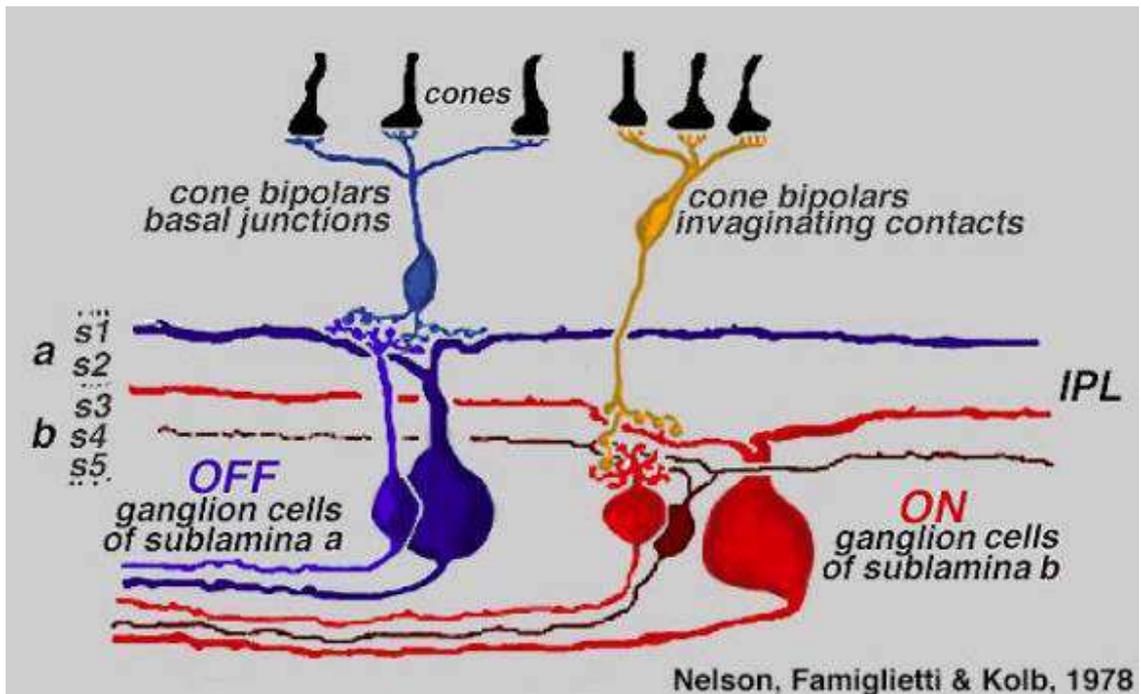


Fig.1 – Cellule ganglionari (centro-off e centro-on)

Al fine di comprendere la distinzione, occorre definire il concetto di campo recettivo. Per una cellula gangliare retinica, il campo recettivo è quella porzione di retina che se stimolata produce la massima risposta della stessa cellula gangliare.[1]

Le cellule gangliari centro-on (centro acceso), sono quelle nelle quali la stimolazione della parte centrale del campo recettivo ha effetto eccitatorio sulla cellula e fa aumentare la frequenza di scarica della cellula gangliare stessa. Nelle cellule gangliari centro-on, la stimolazione della porzione periferica del campo recettivo ha un effetto inibitorio e quindi rallenta la

frequenza di scarica della cellula stessa.

Le cellule gangliari centro-off, sono quelle nelle quali la stimolazione della parte centrale del campo recettivo ha su di esse un effetto inibitorio, facendone diminuire la frequenza di scarica, mentre la stimolazione periferica del campo recettivo ha effetto eccitatorio facendo aumentare la frequenza di scarica.

Anche nella retina, così come in altri distretti sensoriali, l'organismo mette in opera un espediente neurofunzionale detto inibizione laterale per migliorare la discriminazione spaziale dello stimolo. Questo meccanismo consiste nell'inibizione, mediante interneuroni associativi, delle zone adiacenti a quelle stimulate.

Così un campo recettivo centro-on, quando il centro sarà stimolato, la periferia del campo sarà inibita; mentre in un campo recettivo centro-off quando la periferia del campo sarà stimolata, il suo centro sarà inibito. L'organizzazione dei campi recettivi delle cellule gangliari, consente di comprendere il concetto della frequenza spaziale e delle sensibilità al contrasto visivo, utilizzata proprio per lo studio dei campi recettivi. Una ripercussione importante di tale organizzazione funzionale è rappresentata dal fatto che questo sistema ci consente di discriminare in maniera più o meno

nitida differenze di contrasto in funzione di una determinata frequenza spaziale. Si ricorda che per contrasto si intende “lo spicco più piccolo o meno marcato fra le parti scure e le parti chiare dell'immagine” cioè l'effetto chiaro-scuro. Mentre per la frequenza spaziale dello stimolo si intende la distanza fra le linee scure che costituiscono lo stimolo stesso, cioè il numero di linee in un'unità di spazio.

Nello studio della sensibilità al contrasto i due parametri fondamentali che variano sono:

- a) la tonalità di grigio delle linee presentate;
- b) la distanza fra le linee, nonché la dimensione del loro tratto.

Se consideriamo una linea scura tracciata su un foglio bianco, la differenza di contrasto tra linea e foglio deriverà dalla diversa stimolazione dei campi recettivi delle cellule gangliari.[1]

Poiché le cellule gangliari hanno attività fasica, cioè la risposta allo stimolo cessa dopo breve tempo, fondamentali appaiono i movimenti microsaccadici nel realizzare un meccanismo di stimolazione alternata ad alta frequenza in grado di rieccitare continuamente aree differenti dello stesso campo recettivo e di campi recettivi diversi e adiacenti.

Le cellule gangliari hanno quindi la capacità di presentare al cervello e di comunicare ad esso secondo un codice, la cui chiave di lettura è la frequenza di scarica del potenziale di azione. Si passa quindi da un linguaggio di tipo analogico presente nelle prime stazioni neuronali intraretiniche, dove variazioni di intensità dello stimolo sono modulate sotto la forma di variazioni di ampiezza del potenziale locale, ad un linguaggio di tipo digitale, dove variazioni di intensità dello stimolo sono modulate sotto forma di variazioni di frequenza di scarica di potenziale d'azione. Le cellule ganglionari, inoltre, non trasmettono dati assoluti, ma relativi. Tali dati, riguardano il grado di illuminazione delle singole cellule recettrici ( siamo infatti in grado di cogliere correttamente differenti livelli di illuminazione di un ambiente), e la relazione fra due regioni, centrale e periferica, dei campi recettivi. Quindi la sensibilità al contrasto è una stima relativa fra le due zone comparate del campo recettivo stesso.[1]

Lo studio delle cellule ganglionari, oggi possibile grazie all'utilizzo di OCT di nuova generazione, in diverse patologie retiniche, quali il glaucoma, la maculopatia ischemica del diabetico e le malattie demielinizzanti, ha migliorato non solo l'inquadramento diagnostico, ma anche quello prognostico di queste patologie.

## **Uso della Tomografia a Coerenza Ottica (OCT) per la valutazione delle cellule ganglionari**

Le cellule ganglionari retiniche sono localizzate in 3 strati retinici:

- 1) lo strato delle fibre nervose retiniche (RNFL), che contiene gli assoni delle cellule ganglionari;
- 2) lo strato delle cellule ganglionari (GCL), in cui si trovano i corpi delle cellule ganglionari;
- 3) lo strato plessiforme interno (IPL), che contiene i dendriti delle cellule ganglionari.

Tutti e tre questi strati sono identificati collettivamente con il nome di ***Complesso delle cellule ganglionari (GCC)*** (Fig. 2).

Diversi OCT permettono di effettuare una misura diretta dello spessore di questi 3 strati e fornire in un'unica analisi la perdita percentuale degli stessi comparata con un esteso database normativo.

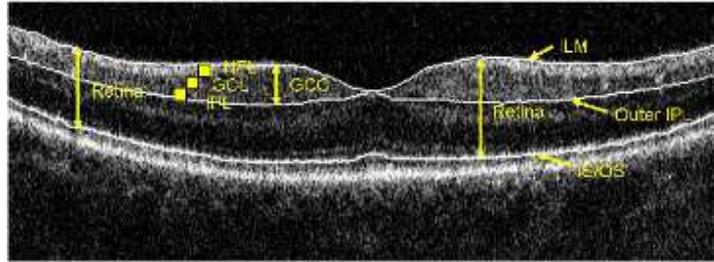


Fig. 2 – L'immagine mostra la segmentazione del complesso delle cellule ganglionari (GCC) comprendente RNFL, GCL e IPL, comparata alla segmentazione dell'intera retina. La più alta risoluzione in profondità, pari a 5 micron rende possibile la segmentazione degli strati retinici più interni che non è possibile effettuare con gli OCT di vecchia generazione (Time-Domain OCT).

(Tan O. et Al. Ophthalmology. 2009 Dec)

L'analisi delle cellule ganglionari per la valutazione del glaucoma viene effettuato con delle scansioni della regione maculare.

**Perché indagare proprio la macula?** La regione maculare contiene più del 50% delle cellule ganglionari retiniche. Inoltre qui le cellule ganglionari hanno un volume maggiore rispetto a quello delle cellule ganglionari localizzate in altre zone retiniche (è stato dimostrato che la perdita di queste

dipende anche dalla loro grandezza)[1], ed a livello della retina centrale la densità cellulare ha una minore variabilità rispetto alla retina periferica.

Ecco perché, proprio per l'alta densità cellulare, la macula appare come la regione ideale da indagare per individuare precocemente la perdita di cellule ganglionari retiniche e i successivi cambiamenti nel tempo.

L'analisi viene effettuata utilizzando come pattern di scansione 15 linee di scansione verticali (intervallo tra le linee: 0.5 mm) ed 1 linea di scansione orizzontale (Fig. 3). Vengono acquisite 26000 A-scan/sec su di un'area di scansione di 7 mm<sup>2</sup>, con una risoluzione di 5 μm.

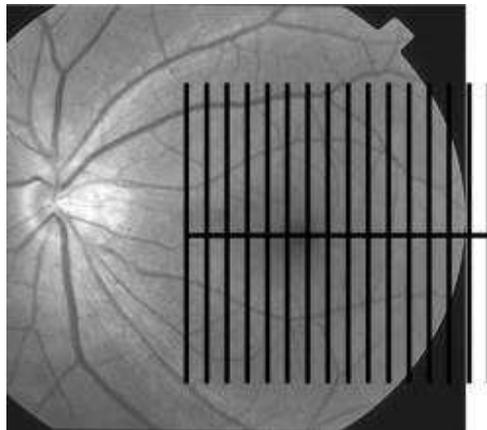


Fig. 3 – Pattern di scansione

(Tan O. et Al. Ophthalmology. 2009 Dec)

Tramite l'interpolazione delle 16 linee (Fig. 4) si ottengono i valori dello spessore del Complesso delle Cellule Ganglionari (GCC).

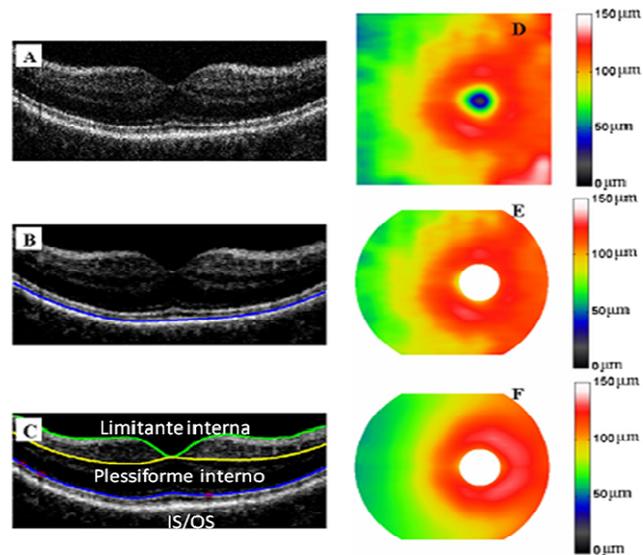


Fig. 4 – (Tan O. et Al. Ophthalmology. 2009 Dec) Fasi di elaborazione dell'immagine nella misurazione automatizzata del complesso delle cellule ganglionari (GCC) e dello spessore della retina.

A. Scansione OCT del GCC.

B. Viene identificato il complesso epitelio pigmentato – fotorecettori (PPC, linea blu).

C. La giunzione tra segmento interno/esterno (linea blu) è stato rilevato all'interno del PPC. Sono anche stati rilevati la membrana limitante interna (ILM; linea verde) e il limite esterno dello strato plessiforme esterno (Linea gialla). Il vaso sanguigno è indicato da un cerchio rosso.

D. La mappa dello spessore del GCC in regione maculare è stata ottenuta mediante interpolazione delle 16 scansioni OCT del pattern GCC.

E. La mappa GCC è stata centrata sulla depressione foveale. Le porzioni inaffidabili della mappa vengono rimossi; queste includono l'area della fovea (1.5 mm di diametro), l'area superiore e inferiore 0.5 mm, e le regioni d'angolo con distanza dal centro della mappa di 3.5 mm.

F. La mappa di riferimento del GCC è ottenuta dalla valutazione di tutti gli occhi del gruppo normale.

I dati ottenuti mediante le scansioni vengono visualizzati sottoforma di una mappa rappresentata mediante una scala di falsi colori che indica lo spessore del Complesso delle Cellule Ganglionari (GCC) punto per punto (*Thickness Map*).

Le zone con spessore maggiore sono indicate dai colori caldi (giallo e arancione) mentre le aree con spessore inferiore sono visualizzate con i colori freddi (blu e grigio).

La mappa di un occhio sano (Fig. 5) mostra una banda luminosa circolare tutto intorno la macula che rappresenta un GCC più spesso dovuto alla normale anatomia retinica. Il centro della macula è più sottile in quanto in questa zona non sono presenti cellule ganglionari.

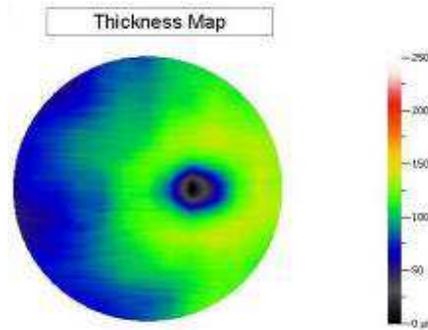


Fig. 5 – Occhio sano

I valori dello spessore del GCC sono analizzati e comparati con un vasto database normativo. Questo database di riferimento è costituito nell'OCT RTVue-Optovue da oltre 300 occhi sani provenienti da vari soggetti di etnia differente con un range di età compreso tra i 18 e gli 80 anni. Questo consente di separare i casi patologici dai sani, molto più sensibilmente e precocemente, facendo emergere i segni iniziali del viraggio dai parametri fisiologici.

Se i valori ottenuti mediante l'analisi sono al di fuori dal range di normalità, la misurazione viene decodificata mediante un colore.

I dati possono essere analizzati mediante diversi tipi di mappe (Fig. 6).

La ***Deviation Map*** mostra la perdita percentuale di cellule ganglionari rispetto ai valori normali, così come determinato dal database normativo. Questa mappa è costruita mediante il seguente calcolo:

$$\text{perdita \%} = (\text{valore del paziente in esame} - \text{valore normale di riferimento}) / \text{valore normale di riferimento}.$$

Il risultato è la perdita percentuale del GCC in ogni punto della mappa.

La mappa è rappresentata da una scala di falsi colori in cui il blu rappresenta una riduzione del 20-30% dello spessore del GCC e il nero una riduzione del 50% o maggiore.

La ***Significance Map*** mostra le regioni dove la variazione dai valori normali risulta essere statisticamente significativa.

Anche qui ritroviamo una scala di falsi colori in cui il verde rappresenta i valori compresi all'interno del range di normalità (p-value 5%-95%), il giallo indica i valori borderline (p-value <5%), e il rosso rappresenta i risultati al di fuori dai limiti normali (p-value <1%).

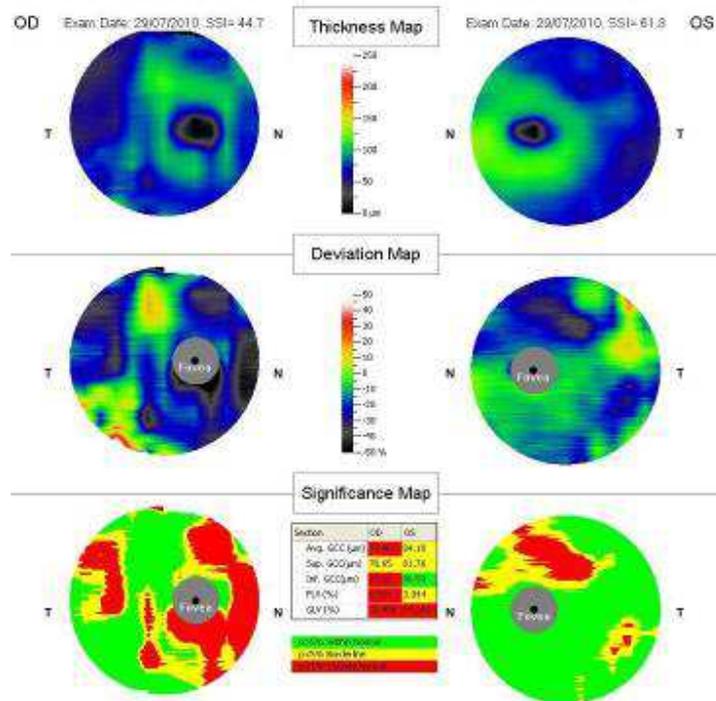


Fig. 6 – Sono qui mostrate la mappa dello spessore punto per punto (Thickness Map), la Deviation Map e la Significance Map di entrambi gli occhi di un paziente glaucomatoso.

La Deviation Map e la Significance Map hanno entrambe una zona circolare al centro della macula dove l'analisi non è possibile, a causa dell'assenza delle cellule ganglionari in questa regione.

Inoltre i parametri analizzati sono mostrati in una tabella (GCC parameter table – Fig. 7).

Section	OD	OS
Avg. GCC (...)	77.90	93.77
Sup. GCC( $\mu$ ...)	78.65	92.92
Inf. GCC( $\mu$ m)	77.15	94.62
<u>p &gt; 5% Within normal</u>		
p < 5% Borderline		
p < 1% Outside Normal		

Fig. 7 – GCC parameter table (colore verde = range di normalità; colore giallo/rosso = valori alterati)

In questa tabella vengono mostrati i valori dello spessore del Complesso delle Cellule Ganglionari a livello dei settori superiore e inferiore, nonché il valore medio dello spessore del GCC, indicati anche con un colore che indica la posizione dei risultati ottenuti rispetto ai valori presenti nel database normativo.

## CELLULE GANGLIONARI E GLAUCOMA

Il glaucoma non dà sintomi precoci (ad esclusione delle forme acute). Nel momento in cui il paziente si rende conto dei difetti del campo visivo, la

malattia è già in fase avanzata. La visione centrale viene in genere colpita per ultima, mentre la visione periferica è persa per prima ed è asintomatica.

Dunque il pericolo maggiore é rappresentato dalla mancanza di segnali che possono destare sospetti, esclusa la forma acuta che provoca fortissimi dolori.

Questo rende quindi difficile effettuare una diagnosi precoce della patologia, che invece potrebbe essere contrastata sin dai primi stadi, non sintomatologicamente rilevabili, ma che ad un attento esame strumentale posso essere individuati.

Oggi sono disponibili test di screening molto sensibili che permettono di valutare con accuratezza il paziente a rischio di sviluppare glaucoma, di monitorare al meglio il paziente con diagnosi iniziale di malattia e di contrastarne lo sviluppo.

Il paziente a rischio di malattia deve essere sottoposto a esami strumentali specifici, quali:

- Tonometria (Goldmann, Perkins, Pascal,..);
- Curve tonometriche (diurne e sulle 24 ore con misurazioni supine);
- Pachimetria;
- Gonioscopia;
- Perimetria Humphrey con Analisi della Progressione GPA;
- HRT 3;

- GDx;
- OCT.

L'esame fondamentale per la diagnosi e il follow-up del glaucoma resta a tutt'oggi comunque lo studio del campo visivo, che utilizza soprattutto la perimetria statica computerizzata, corredata di programmi statistici per la valutazione della significatività del danno rilevato e soprattutto della sua evoluzione nel tempo. Dal punto di vista funzionale le alterazioni rilevabili con l'esame perimetrico coinvolgono inizialmente i settori paracentrali (scotoma arciforme dell'area di Bjerrum – Fig. 8) e i settori periferici corrispondenti al cosiddetto salto nasale di Rönne. Tali alterazioni evolvono progressivamente coinvolgendo tutti i settori con esclusione dell'area centrale, che in genere viene persa solo negli stadi più avanzati della malattia.

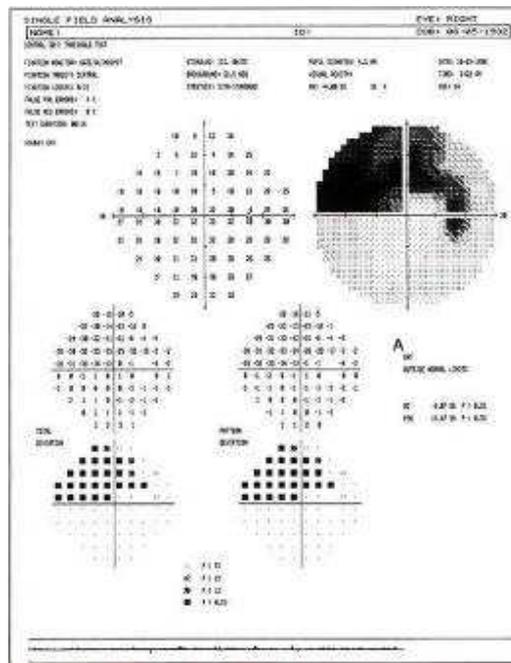


Fig. 8 – Tipico scotoma arciforme con risposta anormale al Glaucoma

### Hemifield Test

Non esiste una terapia definitiva per il glaucoma: la perdita visiva non può essere recuperata, ma con una terapia farmacologica o chirurgica, agendo sulla riduzione della IOP (che ricordiamo essere il fattore di rischio principale) si può prevenire l'ulteriore perdita visiva. Inoltre il glaucoma è una condizione cronica e deve essere monitorata frequentemente per tutta la vita, in quanto il quadro clinico può modificarsi negli anni.

### Cellule Ganglionari e glaucoma

L'esito finale di un danno glaucomatoso è la morte delle cellule ganglionari retiniche dell'occhio.

Una valutazione del meccanismo di morte delle cellule ganglionari in caso di glaucoma sperimentale ha mostrato molte caratteristiche del processo apoptotico (Fig. 9). [1] Per di più, la morte per apoptosi delle cellule ganglionari è indotta da una serie di stimoli sperimentali, incluse la sezione del nervo ottico, l'ischemia retinica e l'esposizione a livelli elevati d'aminoacidi eccitatori. [1]

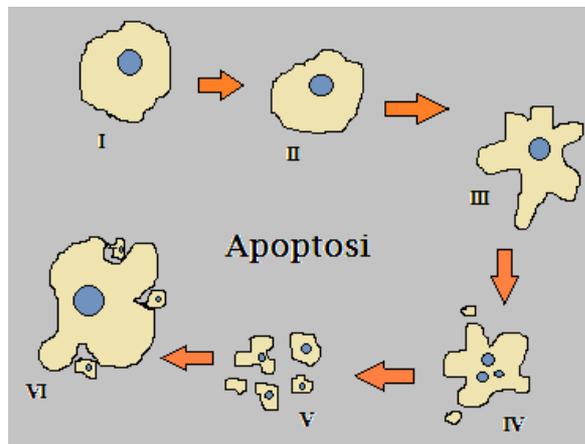


Fig. 9 – Schema degli eventi morfologici dell'apoptosi.

**I.** L'apoptosi può essere innescata nelle cellule da una varietà di stimoli diversi.

**II.** L'attivazione dell'apoptosi è associata con un addensamento della cromatina, che di solito comincia con accumuli densi sulla superficie interna della membrana nucleare.

**III.** L'addensamento della cromatina talora circonda l'intera struttura nucleare, dandole un aspetto picnotico all'osservazione mediante microscopia ottica. Le cellule morenti cominciano anche a mostrare una superficie irregolare, associata con la comparsa precoce di vescicole in formazione.

**IV.** Il nucleo picnotico comincia a frammentarsi, mentre alcune vescicole sono espulse attraverso la superficie cellulare. La cellula morente è ora più raggrinzita rispetto alla sua dimensione originale.

**V.** La cellula si è completamente frammentata in corpi apoptotici. Queste strutture contengono organuli cellulari dall'aspetto abbastanza normale, così come frammenti del nucleo condensato.

**VI.** Il processo di apoptosi è completato quando i corpi apoptotici sono fagocitati dalle cellule adiacenti, che sono stimolate a svolgere un ruolo di supplenza dei macrofagi.

La morte delle cellule ganglionari determina alterazioni nello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL), costituito dagli assoni delle cellule ganglionari. [1]

La perdita delle fibre nervose conferisce un aspetto glaucomatoso tipico alla papilla ottica.

Ma un difetto dell'RNFL può essere uno dei segni più precoci di glaucoma, e può precedere le alterazioni della configurazione della papilla ottica e del

campo visivo. E' stato infatti dimostrato che la variazione dello spessore delle fibre nervose retiniche peripapillari avviene precocemente in corso di glaucoma. [1-2] Quindi un aspetto normale della papilla e un campo visivo normale non devono necessariamente far escludere un glaucoma. Anormalità dello strato delle fibre nervose retiniche in pazienti affetti da glaucoma sono state riferite per la prima volta da Hoyt et al. nel 1973. [1] Le alterazioni riscontrate da questo autore erano difetti sottili, simili ad una fessura, o solchi nell'area arcuata dell'RNFL. In casi più avanzati si sono sviluppati difetti localizzati cuneiformi. L'RNFL sano appare sottoforma di striature orientate regolarmente, che sono formate da fasci di assoni, compartimentalizzati a tunnel dai processi delle cellule di Müller. Lo spessore di questo strato è maggiore nell'area peripapillare, in particolare nel segmento temporale superiore o inferiore, dove può raggiungere anche valori di 300 µm. [1] In un esame clinico di routine è possibile osservare l'RNFL con luce verde alla lampada a fessura con una lente di Volk o una lente a contatto di Goldmann. I fasci di fibre nervose possono essere seguiti fino a livello della macula. Tuttavia, uno degli inconvenienti della valutazione oftalmoscopica dell'RNFL è che si tratta di una metodica soggettiva e qualitativa. Ecco perché sono state messe a punto tecniche specifiche, mediante una tecnologia di alto livello, per

quantificare le anomalie dell'RNFL misurandone lo spessore o il contorno, quali l'HRT, il GDx, e l'OCT.

Queste tecniche di imaging forniscono misure quantitative altamente riproducibili,<sup>1</sup> permettendo al clinico di valutare oggettivamente lo stato delle fibre nervose retiniche peripapillari che, a differenza del disco ottico, non possono essere visualizzate e misurate facilmente.

Inoltre le tecniche di imaging forniscono un utile mezzo per quantificare le dimensioni del disco ottico.

Gli occhi affetti da ipertensione oculare che presentano anomalie all'HRT e uno spessore ridotto del RNFL misurato con l'OCT e al GDx presentano un rischio aumentato di sviluppare un glaucoma ad angolo aperto. [2-3]

### **OCT e valutazione delle Cellule Ganglionari nel glaucoma**

La tomografia a coerenza ottica (OCT) introdotta da Huang et al. nel 1991, è una tecnica di imaging non invasiva molto utilizzata negli ultimi anni.

Questa tecnologia sfrutta il principio dell'interferometria ad alta frequenza, per valutare lo spessore del tessuto.

L'OCT può essere utilizzato nel glaucoma per lo studio della testa del nervo ottico, dello stato delle fibre nervose retiniche peripapillari e delle cellule ganglionari della regione maculare. [2]

Nel paziente glaucomatoso una significativa perdita di cellule ganglionari può verificarsi prima che i deficit al campo visivo siano rilevabili, e quindi la perdita strutturale può precedere la perdita funzionale anche di 5 anni. [2]

La valutazione dello spessore delle cellule ganglionari sta acquistando sempre più interesse nello studio della patologia glaucomatosa come indice sensibile di danno precoce allo stress pressorio endoculare. [2]

Così l'utilizzo di metodi per quantificare i cambiamenti nella popolazione delle cellule ganglionari nel paziente a rischio di glaucoma potrebbe portare alla diagnosi della patologia in una fase pre-clinica, ed essere inoltre d'aiuto in un più accurato monitoraggio della progressione della patologia.

L'indagine anatomica tomografica mediante OCT dà la possibilità di arrivare a determinare, in modo dettagliato, l'intima struttura degli strati retinici interessati dalla patologia in analisi: nessuna altra tecnologia ad oggi può offrire queste prerogative, permettendo, di fatto, di ottenere una scansione paragonabile ad una immagine isto-citologica delle strutture corio retiniche.

[2-3]

La suddivisione tra retina esterna ed interna, tracciata idealmente dallo strato plessiforme interno, non è solo un'esigenza schematica, ma risponde ad una più accorta visione fisiopatologica degli strati retinici.

La retina esterna, maggiormente coinvolta nella patologia dell'Epitelio Pigmentato Retinico (EPR) e quindi nelle maculopatie viene più dettagliatamente visionata e scomposta nei suoi distinti strati, mentre la retina interna, principalmente interessata nella patologia a carico delle fibre ottiche ed in prima istanza nel glaucoma, viene misurata nei suoi spessori, con la possibilità di individuare prima un loro eventuale danno.

L'analisi delle cellule ganglionari per la valutazione del glaucoma viene effettuato con delle scansioni della regione maculare. [1]

Con studi istologici approfonditi, Quigley e collaboratori hanno dimostrato che le cellule ganglionari grandi ed i loro grossi assoni (fibre nervose) sono più suscettibili agli effetti lesivi del glaucoma, rispetto alle cellule ganglionari più piccole e con fibre nervose più sottili. [2] Pertanto, i difetti più precoci in corso di glaucoma potrebbero essere evidenziati verificando la funzione delle cellule ganglionari di maggiori dimensioni. [2-3] Queste sono appunto localizzate nella regione maculare.

Negli occhi glaucomatosi il Complesso delle Cellule Ganglionari diventa più sottile a causa della perdita delle cellule ganglionari (Fig. 10 e Fig. 11).

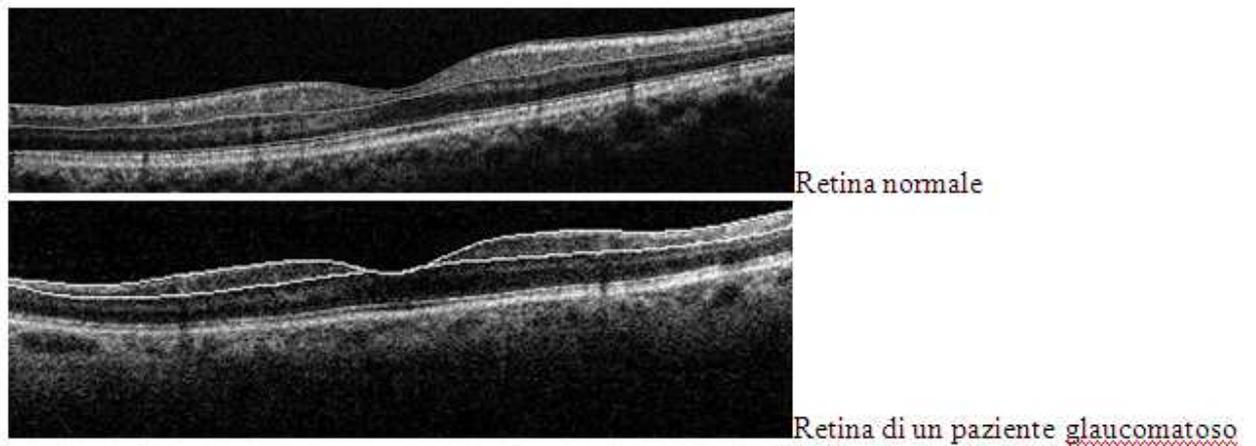


Fig. 10

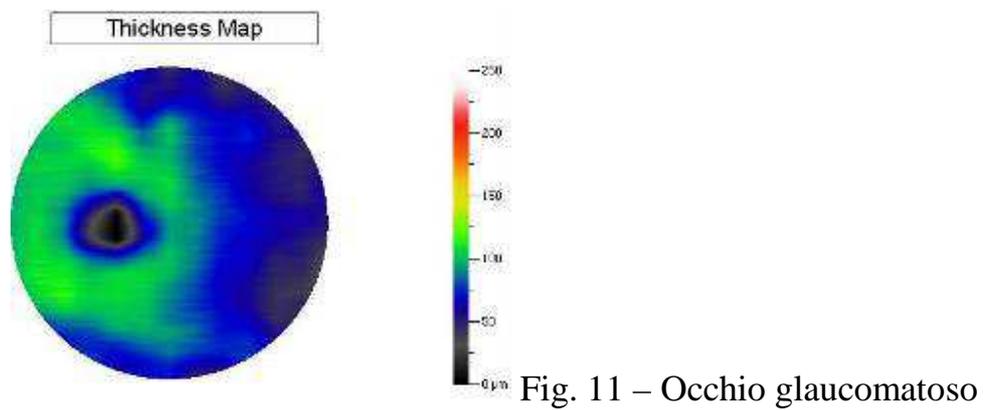


Fig. 11 – Occhio glaucomatoso

### **Confronto tra l'analisi del GCC con quella dell'RNFL**

L'analisi del Complesso delle Cellule Ganglionari offre un'altra importante informazione per una più completa definizione di un caso clinico. Ma l'uso dell'imaging della macula per lo studio del glaucoma non è nuovo.

In passato, diversi studi hanno testato l'accuratezza diagnostica della valutazione maculare mediante OCT con l'analisi peripapillare dello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL).

Nel 2005, Meideros e collaboratori [4] trovarono che l'analisi dell'RNFL peripapillare risultava statisticamente più accurata per la diagnosi del glaucoma se comparata alla misura dell'intero spessore retinico in regione maculare. In un altro studio simile, Wollstein e colleghi [5] trovarono gli stessi risultati: la valutazione delle fibre nervose peripapillari era significativamente più accurata se comparata all'analisi maculare.

In entrambi questi studi comunque, l'OCT utilizzato era un OCT Time-domain, l'OCT Stratus.

Lo Stratus ha una velocità di scansione più lenta se comparata a quella dell'RTVue-Optovue OCT, un sistema OCT Fourier-Domain (400 A scans/sec per lo Stratus; 26000 A scans/sec per l'RTVue).

Inoltre lo Stratus ha una minore risoluzione se paragonato a quella dell'RTVue (10 micron per lo Stratus contro 5 micron per l'RTVue).

L'aumentata velocità d'acquisizione degli A-scan con gli Spectral Domain sta alla base della migliore definizione delle immagini topografiche di questa nuova generazione di OCT insieme al fatto che, con la rapidità d'esecuzione raggiunta, si possono azzerare del tutto o quasi gli artefatti dovuti ai

movimenti del paziente presenti nei Time Domain (si calcola una riduzione di circa trenta volte), ulteriore motivo per un sostanziale miglioramento della qualità finale dell'immagine tomografica.

La limitata risoluzione per il TD-OCT permette soltanto la misurazione dell'intero spessore retinico in regione maculare, mentre il FD-OCT, con la sua più alta risoluzione rende possibile una più specifica segmentazione consentendo, nello specifico, la valutazione del Complesso delle Cellule Ganglionari (GCC). [2]

Uno studio pubblicato da Tan Ou, David Huang e collaboratori ha evidenziato che l'analisi del GCC mediante RTVue sono significativamente più accurate della valutazione dell'intero spessore maculare ottenute mediante Stratus per la diagnosi di glaucoma nello stesso paziente. [6] Questo studio suggerisce che l'analisi del GCC potrebbe provvedere ad una più accurata valutazione del glaucoma.

Non bisogna però trascurare che l'analisi del GCC maculare ha la stessa significatività dell'analisi dell'RNFL circumpapillare. Tuttavia, l'analisi del GCC maculare potrebbe essere in grado di individuare meglio i casi di glaucoma in cui la perdita maculare si verifica più precocemente. Così, l'analisi del GCC e quella dell'RNFL possono essere complementari (Fig.12).

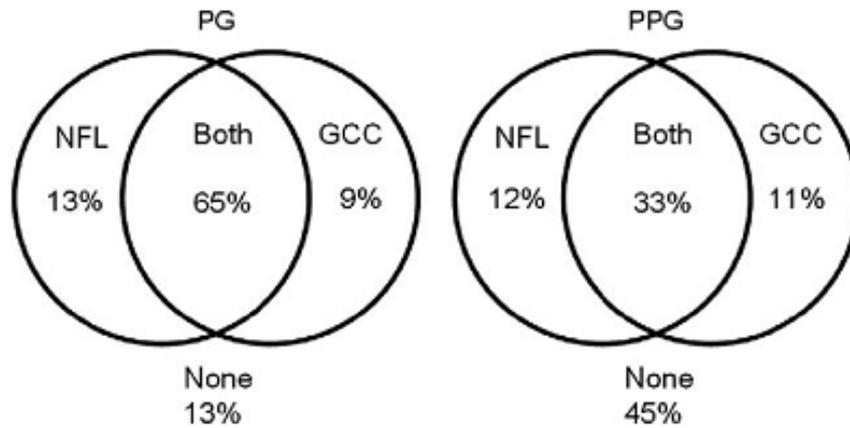


Fig. 12 - DIAGRAMMA DI VENN (Tan O. et Al. Ophthalmology. 2009

Dec)

Mostra la sovrapposizione tra le alterazioni dell'NFL e del GCC, in entrambi i gruppi (pazienti glaucomatosi con alterazioni perimetriche – PG – e pazienti glaucomatosi senza alterazioni perimetriche – PPG).

- Glaucoma: NFL+GCC = *detection rate* dal 78% al 87%
- Glaucoma pre-perimetrico: NFL+GCC = *detection rate* dal 45% al 56%

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo del nostro studio è dimostrare come l'utilizzo della Tomografia a Coerenza Ottica (OCT) per la valutazione dello spessore del Complesso delle Cellule Ganglionari retiniche (GCC) possa essere un valido aiuto nella diagnosi precoce del glaucoma. Tale condizione patologica, molto spesso, è di difficile diagnosi per la variabilità dei quadri oftalmoscopici e per le numerose patologie che rientrano nella diagnosi differenziale.

## **Materiali e metodi**

Sono stati selezionati, nel periodo di tempo compreso tra Settembre 2011 e Novembre 2014, 131 pazienti (182 occhi), giunti presso l'ambulatorio "Glaucoma, perimetria e visione dei colori" del Dipartimento di Scienze Oftalmologiche della Federico II.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con anamnesi remota di patologie retiniche, procedure laser retiniche, interventi chirurgici nell'area retinica, disturbi neurologici, cataratta o opacità dei mezzi diottrici che potevano interferire significativamente con le immagini OCT e con altre procedure diagnostiche eseguite.

I pazienti selezionati, aventi diagnosi di glaucoma ad angolo aperto, sono stati divisi in tre gruppi in accordo con il parametro Mean Deviation (MD) del campo visivo (Hodapp-Anderson-Parrish grading scale):

Lieve glaucoma: 41 occhi con  $MD \geq -6$  dB; Glaucoma Moderato: 35 occhi con MD tra -6 and -12dB; Glaucoma Severo: 40 occhi con MD maggiore di -12.

Inoltre sono stati selezionati 66 occhi di pazienti preperimetrici che presentano le caratteristiche morfologiche del danno glaucomatoso ma non alterazioni al campo visivo.

I pazienti sani (40 occhi di 20 pazienti) presentavano valori di pressione intraoculare meno di 21mmHg, fondo oculare con assenza di danni glaucomatosi e valori di MD e PSD nella norma.

I pazienti sono stati sottoposti a visita oculistica complessiva che comprendeva:

- Acutezza visiva centrale, biomicroscopia del segmento anteriore, esame del fondo oculare.
- Tonometria oculare con Tonometro di Goldmann
- Pachimetria
- Gonioscopia

- Perimetria automatica computerizzata (Humphrey Field Analyzer with Swedish Interactive Thresholding Algorithm - SITA STANDARD con strategia di soglia 30-2). Il campo visivo era considerato affidabile quando la perdita di fissazione era meno del 20% e gli errori falsi positivi e falsi negativi erano meno del 15%. La sensibilità del campo visivo era espressa con i parametri: Mean Deviation (MD) e Pattern Standard Deviation (PSD).

- Tomografia a coerenza ottica (SD-OCT) per la valutazione dei parametri del complesso delle cellule ganglionari (GCC) e dello strato delle fibre nervose retiniche circumpapillari (RNFL). È stato utilizzato l'OCT RTVue 5.0 dell'Optovue, un sistema OCT Fourier-Domain dotato di:

1) maggior velocità di acquisizione degli A-scan (26000 A scans/sec) con l'azzeramento del tutto o quasi degli artefatti dovuti ai movimenti del paziente. 2) una maggiore risoluzione (5  $\mu$ m), consentendo una migliore definizione delle immagini topografiche e rendendo possibile una più specifica segmentazione e quindi, nello specifico, la valutazione del Complesso delle Cellule Ganglionari (GCC) e dello Strato delle fibre nervose retiniche circumpapillari (RNFL). Quest'ultimo è stato calcolato con il Pattern OHN mode ( Pattern testa del nervo ottico) che consiste in 3 sequenze di scansioni circolari di 3.45 mm di diametro effettuate intorno alla testa del nervo ottico. Mentre nell'analisi dello spessore del GCC è stato usato come

pattern di scansione una griglia quadrata (7x7) nella porzione centrale della macula, centrata ad 1 mm temporalmente dalla fovea.

La relazione tra i parametri morfologici misurati al SD-OCT e quelli funzionali misurati al campo è stata valutata mediante l'analisi di regressione lineare e quadratica.

Inoltre lo studio è stato completato con l'Analisi della Varianza (ANOVA).

Il T-test independent è stato utilizzato per poter confrontare i parametri in studio nella progressione della patologia glaucomatosa e per confrontare ciascun gruppo con i pazienti sani.

Le Curve ROC sono state utilizzate per analizzare l'abilità diagnostica dei vari parametri in studio nel discriminare i pazienti glaucomatosi di ciascun gruppo dal gruppo dei sani. In tutte le analisi statistiche una significatività inferiore ad 0.05 è stata considerata statisticamente significativa. Le analisi statistiche sono state eseguite con il software SPSS, ver. 19.0 per Windows XP Professional (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **Risultati**

In questo studio sono stati valutati 222 occhi di 151 pazienti (20 controlli [40 occhi] e 131 pazienti con glaucoma [182 occhi]). I pazienti glaucomatosi erano suddivisi in 4 gruppi: gruppo pre-perimetrico (occhi n=66); gruppo

lieve glaucoma (occhi n=41); gruppo moderato glaucoma (occhi n=35); gruppo severo glaucoma (occhi n=40).

La tabella 1 riassume le caratteristiche dei soggetti arruolati per lo studio ed i valori dei parametri presi in considerazione nel presente studio.

Come mostrato nella tabella 2, alla valutazione dell'OCT lo spessore medio dell'RNFL e del GCC decresceva progressivamente con l'aumentare della gravità della patologia (mean GCC thickness: controlli  $96.16 \pm 2.77\mu\text{m}$ ; pre-perimetro glaucoma  $92.58 \pm 4.99$ ; lieve glaucoma  $90.27 \pm 11.74$ ; moderato glaucoma  $72.31 \pm 5.21$ ; severo glaucoma  $62.33 \pm 4.35$ ; mean RNFL thickness: controlli  $105.77 \pm 21.24 \mu\text{m}$ ; pre-perimetrico glaucoma  $102.21 \pm 17.58$ ; lieve glaucoma  $97.33 \pm 14.63$ ; moderato glaucoma  $75.34 \pm 6.03$ ; severo glaucoma  $66.13 \pm 3.5$ ).

E' stato riscontrata differenza significatività statistica, mediante T-test independent, tra il gruppo dei controlli ed i diversi gruppi dei pazienti glaucomatosi.

In particolare confrontando i controlli con il gruppo dei preperimetrici risultava interessante riscontrare come per i parametri del GCC erano presenti differenze statisticamente significative ( $p < 0,001$ ) a differenza degli altri parametri in studio.

La tabella 2 riassume i valori di significatività nel confronto tra il gruppo dei sani ed i diversi gruppi glaucomatosi in studio con il T-test independent.

La tabella 3 mostra i valori di significatività nel confronto tra i diversi gruppi dei pazienti per ogni parametro in studio con il T-test independent.

La relazione tra le variabili di tipo quantitativo (misurati con lo SD-OCT) e le variabili di tipo qualitativo (misurati al campo visivo) in tutti gli occhi glaucomatosi e nei diversi gruppi in studio è stata valutata mediante l'analisi di regressione lineare e quadratica.

La relazione struttura-funzione nella patologia glaucomatosa è stata maggiormente espressa in tutto il gruppo glaucomatoso ( $p < 0.001$ ).

Tra i GCC parametri, GLV mostrava la più alta correlazione con MD ( $r = 0.905$ ,  $P < 0,001$ ) e con PSD ( $r = 0,869$ ,  $P < 0.001$ ).

Era presente anche una significativa correlazione tra MD, PSD e tutti i parametri del RNFL. Superior RNFL thickness mostrava la più alta correlazione con MD ( $r = 0.743$ ,  $P < 0.001$ ) e con PSD ( $r = 0.707$ ,  $P < 0,001$ ) (tabella 4).

Nessuna significativa correlazione era stata riscontrata nel gruppo dei preperimetrici, ad eccezione del superior RNFL thickness con MD (tabella 5).

Nel gruppo lieve glaucoma la maggior parte dei GCC parametri erano significativamente correlati con il PSD, il coefficiente di correlazione era più alto per GLV e PSD ( $r=0.444$ ,  $P= 0.015$ ) (tabella6).

Nel gruppo moderato glaucoma il coefficiente di correlazione era più alto per superior RNFL thickness e PSD ( $r= 0.752$ ,  $P< 0.001$ ), inferior GCC thickness e PSD ( $r=0.737$ ,  $P<0.001$ ) (tabella 7).

Le più alte correlazioni del gruppo severo glaucoma erano mostrati per superior RNFL thickness e PSD ( $r=0.564$ ,  $P= 0.001$ ), mean GCC thickness e PSD ( $r=0.516$ ,  $P=0.003$ ) (tabella 8).

Le curve ROC erano state utilizzate per valutare la performance diagnostica dei parametri dell' OCT e del campo visivo nei vari gruppi glaucomatosi (tabella 9).

Fra i parametri dell'OCT, inferior GCC (AUC 0.792) e mean GCC thickness (AUC 0.741) avevano la migliore capacità discriminante i cambiamenti glaucomatosi tra i pazienti controlli e quelli preperimetrici.

Anche nel gruppo lieve glaucoma le più alte curve ROC erano per i parametri: MD (1.000), inferior GCC (0.742), mean GCC thickness (0.718) seguito da superior GCC (0.679) ed mean RNFL thickness (0.640).

I parametri dell'OCT (eccetto GLV e FLV) e del campo visivo erano simili nella capacità diagnostica nel gruppo moderato e severo glaucoma (tabella 9).

## **Discussione**

L'esame delle fibre nervose retiniche (RNFL), del complesso delle cellule ganglionari (GCC) rappresenta la nuova avanguardia nel campo della diagnostica glaucomatosa.

Porre l'attenzione sui cambiamenti anatomico-morfologici retinici consente di poter effettuare una diagnosi precoce ed un valido follow up.

Infatti è proprio nel danno strutturale retinico che si riscontra la patogenesi della malattia ed il suo conseguente danno funzionale.

La morte delle cellule ganglionari determina le alterazioni nello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL), costituito dagli assoni delle cellule ganglionari [7].

La perdita delle fibre nervose conferisce un aspetto glaucomatoso tipico della papilla ottica.

Un difetto dell'RNFL può essere uno dei segni più precoci di glaucoma, e può precedere le alterazioni della configurazione della papilla ottica e del campo visivo.

Cho JW e Sung KR dimostrarono così che la variazione dello spessore delle fibre nervose retiniche peripapillari avviene precocemente in corso di glaucoma[8-9].

Quindi un aspetto normale della papilla ed un campo visivo normale non devono necessariamente far escludere un glaucoma.

Hoyt W.F e Frisen L riferirono anomalie dello strato delle fibre nervose retiniche in pazienti affetti da glaucoma [10].

Le alterazioni riscontrate da questi autori erano difetti sottili, simili ad una fessura, o solchi nell'area arcuata dell'RNFL.

In casi più avanzati si erano sviluppati difetti localizzati cuneiformi.

L'RNFL sano appare sottoforma di striature, orientate regolarmente, che sono formate da fasci di assoni, compartimentalizzati a tunnel dai processi delle cellule di Müller.

Lo spessore di questo strato è maggiore nell'area peripapillare, in particolare nel segmento temporale superiore o inferiore, dove può raggiungere anche valori di 300  $\mu\text{m}$  [11].

In un esame clinico di routine è possibile osservare l'RNFL con luce verde alla lampada a fessura con una lente di Volk o una lente a contatto di Goldmann.

I fasci di fibre nervose possono essere seguiti fino a livello della macula.

Tuttavia, uno degli inconvenienti della valutazione oftalmoscopica dell'RNFL è che si tratta di una metodica soggettiva e qualitativa.

Ecco perché sono state messe a punto tecniche specifiche, mediante una tecnologia di alto livello, per quantificare le anomalie dell'RNFL misurandone lo spessore o il contorno, quali l'HRT, il GDx, e l'OCT.

Queste tecniche di imaging forniscono misure quantitative altamente riproducibili [12], permettendo al clinico di valutare oggettivamente lo stato delle fibre nervose retiniche peripapillari che, a differenza del disco ottico, non possono essere visualizzate e misurate facilmente.

Inoltre le tecniche di imaging forniscono un utile mezzo per quantificare le dimensioni del disco ottico.

Gli occhi affetti da ipertensione oculare e che evidenziano anomalie all'HRT ed uno spessore ridotto del RNFL, misurato con l'OCT ed al GDx, presentano un rischio aumentato di sviluppare un glaucoma ad angolo aperto[13-14]

La tomografia a coerenza ottica (OCT) introdotta da Huang et al. nel 1991, è una tecnica di imaging non invasiva molto utilizzata negli ultimi anni.

L'OCT può essere utilizzato nel glaucoma per lo studio della testa del nervo ottico, dello stato delle fibre nervose retiniche peripapillari e delle cellule ganglionari della regione maculare [15].

Nel paziente glaucomatoso una significativa perdita di cellule ganglionari può verificarsi prima che i deficit al campo visivo siano rilevabili, e quindi la perdita strutturale può precedere la perdita funzionale anche di 5 anni, in

accordo con i risultati dei lavori di Harwerth RS e Carter-Dawson L nel 1999 [16].

Precedenti studi condotti da Leventhal et al. nel 1981, da Quigley et al. nel 1983 e da Rohrschneider et al. nel 1999, comparando il numero delle rimanenti fibre del nervo ottico con i risultati del campo visivo negli occhi glaucomatosi, avevano già stimato che il 35-50% delle cellule ganglionari andavano incontro a degenerazione prima della perdita riproducibile dal campo visivo [17].

La valutazione dello spessore delle cellule ganglionari sta acquistando sempre più interesse nello studio della patologia glaucomatosa come indice sensibile di danno precoce allo stress pressorio endoculare [18-19]

Così l'utilizzo di metodi per quantificare i cambiamenti nella popolazione delle cellule ganglionari nel paziente a rischio di glaucoma potrebbe portare alla diagnosi della patologia in una fase pre-clinica, ed essere inoltre d'aiuto in un più accurato monitoraggio della progressione della patologia.

L'indagine anatomica tomografica mediante OCT dà la possibilità di arrivare a determinare, in modo dettagliato, l'intima struttura degli strati retinici interessati dalla patologia in analisi: nessuna altra tecnologia ad oggi può offrire queste prerogative, permettendo, di fatto, di ottenere una scansione

paragonabile ad una immagine isto-citologica delle strutture corioretiniche [20-21].

L'analisi delle cellule ganglionari per la valutazione del glaucoma viene effettuato con delle scansioni della regione maculare [22].

Con studi istologici approfonditi, Quigley e collaboratori hanno dimostrato che le cellule ganglionari grandi ed i loro grossi assoni (fibre nervose) sono più suscettibili agli effetti lesivi del glaucoma, rispetto alle cellule ganglionari più piccole e con fibre nervose più sottili [23].

Pertanto, i difetti più precoci in corso di glaucoma potrebbero essere evidenziati verificando la funzione delle cellule ganglionari di maggiori dimensioni [24]. Queste sono appunto localizzate nella regione maculare.

Negli occhi glaucomatosi il complesso delle cellule ganglionari diventa più sottile a causa della perdita delle cellule ganglionari.

Diversi studi, tra cui quello condotto da Tan e Huang, hanno evidenziato che l'analisi del GCC mediante TRVue è significativamente più accurata della valutazione dell'intero spessore maculare ottenuto mediante Stratus per la diagnosi di glaucoma nello stesso paziente [25]. Questo studio suggerisce che l'analisi del GCC potrebbe contribuire ad una più accurata valutazione del glaucoma.

Non bisogna però trascurare che l'analisi del GCC maculare ha la stessa significatività dell'analisi dell'RNFL [25].

Tuttavia, l'analisi del GCC maculare potrebbe essere in grado di individuare i casi di glaucoma in cui la perdita maculare si verifica più precocemente. In tal modo, l'analisi del GCC e quella dell'RNFL potrebbero essere complementari.

Il nostro studio a differenza dei precedenti menzionati ha apportato un'analisi peculiare dei soggetti arruolati.

E' stata effettuata una precisa suddivisione dei pazienti in Preperimetrici e Perimetrici e quest'ultimo gruppo è stato ulteriormente stratificato in base allo stadio di severità patologica (Lieve, Moderato, Severo) potendo così effettuare uno studio completo e attento sui cambiamenti morfologico-funzionali della malattia.

Inoltre sono stati effettuati peculiari confronti tra il gruppo dei controlli e tutte le categorie dei malati in studio.

In quest'ultima analisi è stato riscontrato un interessante risultato: per i parametri del GCC il gruppo dei Preperimetrici, confrontato con il gruppo dei controlli, presentava una evidente differenza statisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) rispetto al risultato offerto confrontando i due gruppi per i parametri del RNFL.

Nella fase precoce della patologia glaucomatosa quando ancora non sono evidenti alterazioni patologiche del campo visivo l'indicatore dunque dei primi cambiamenti morfologici retinici è rappresentato dal complesso delle cellule ganglionari.

Seguire in un paziente l'andamento di questo parametro all'OCT consente di poter effettuare una diagnosi precoce ed un valido follow up

Risulta dunque necessario l'utilizzo di una metodica diagnostica quanto più oggettiva e qualitativa che consenta una rappresentazione topografica meticolosa delle alterazione retiniche nei pazienti con diagnosi di glaucoma senza alterazioni perimetriche (pre-perimetrici) e nei pazienti glaucomatosi che presentano già alterazioni campimetriche (perimetrici).

In conclusione, la relazione anatomica e funzionale nei pazienti glaucomatosi ci ha fornito utili ed interessanti risultati: i cambiamenti strutturali precedono quelli funzionali negli stadi iniziali della patologia.

Inoltre questo studio ha mostrato un importante risultato anatomico : i parametri del complesso delle cellule ganglionari presentano differenze statisticamente significative nel discriminare il gruppo dei preperimetrici da quello dei sani.

Questi parametri, dunque, rappresentano i primi cambiamenti strutturali nello stadio della patologia quando non sono presenti alterazioni al campo visivo e

possono aiutare nella diagnosi precoce ed in un valido follow up durante la pratica clinica.

## CASI CLINICI

Fig. 13 – Paziente maschio, 54 anni. Glaucoma in fase iniziale, senza alterazioni al campo visivo.

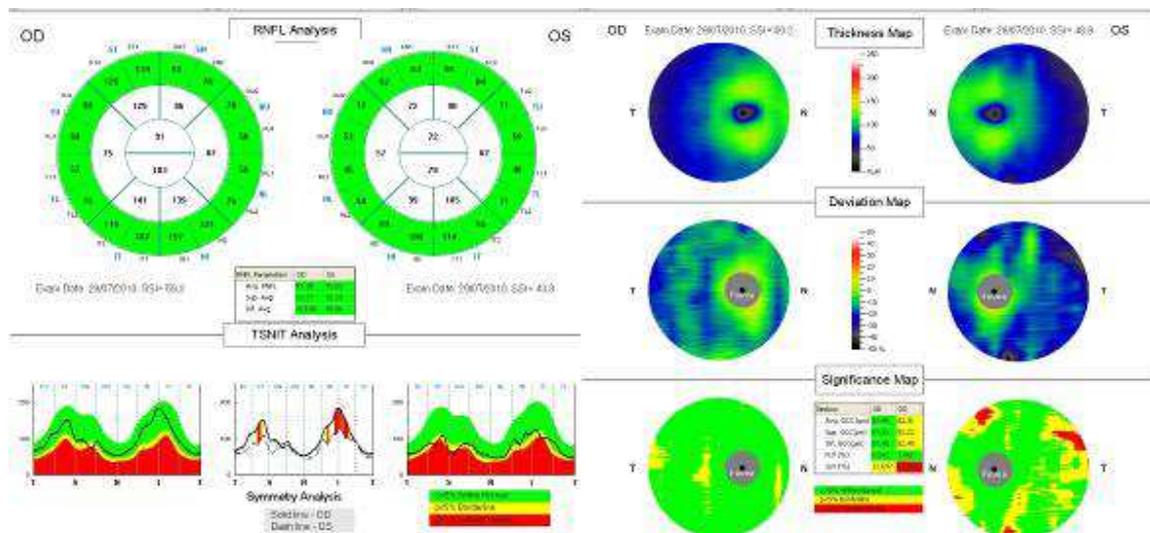


Fig. 14 – Paziente maschio, 50 anni. Glaucoma in fase avanzata

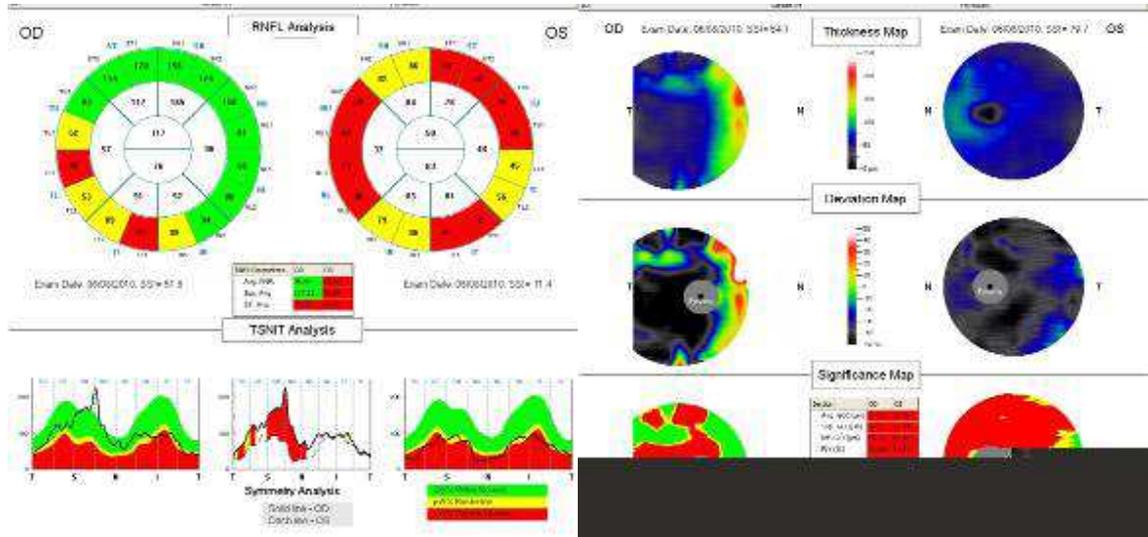


Tabella 1. Caratteristiche dei soggetti

	<b>CONTROLLI (n=40)</b>	<b>PREPERIMETRIC (n=66)</b>	<b>P value*</b>	<b>LIEVE GLAUCOMA (n=41)</b>	<b>P value*</b>	<b>MODERATO GLAUCOMA (n=35)</b>	<b>P value*</b>	<b>SEVERO GLAUCOMA (n=40)</b>	<b>P value*</b>
<i>Age (years)</i>	65,8 ± 6,43	64,86 ± 7,12	0,487	63,78 ± 11,70	0,338	67,40 ± 4,46	0,210	63,63 ± 7,93	0,182
<i>Female sex (%)</i>	24 (60%)	30 (45%)	0,414	25 (61%)	0,405	16 (46%)	0,382	12 (30%)	0,363
<i>IOP (mmHg)</i>	16,16 ± 2,66	15,85 ± 2,25	0,546	16,76 ± 2,29	0,280	16,52 ± 1,80	0,490	16,63 ± 1,70	0,355
<i>CCT (µm)</i>	543,27 ± 2,58	542,54 ± 2,74	0,174	543,48 ± 3,13	0,743	542,42 ± 3,29	0,224	541,14 ± 7,67	0,103

I dati sono espresso come media ± deviazione standard (ad eccezione del sesso).

IOP= intraocular pressure; CCT= central corneal thickness.

\* Differenza tra i controlli e I diversi gruppi glaucomatosi.

Tabella 2. Confronti tra i parametri strutturali ed anatomici tra i controlli ed i gruppi glaucomatosi.

	<b>CONTROLLI (n=40)</b>	<b>PREPERIMETRICI (n=66)</b>	<b>P value*</b>	<b>LIEVE GLAUCOMA (n=41)</b>	<b>P value*</b>	<b>MODERATO GLAUCOMA (n=35)</b>	<b>P value*</b>	<b>SEVERO GLAUCOMA (n=40)</b>	<b>P value*</b>
<b>RNFL parametri</b>									
<i>Average, μm</i>	105,77 ± 21,24	104,21 ± 17,58	0,698	97,33 ± 14,63	0,041	71,34 ± 6,03	< 0,001	66,13 ± 3,5	<0,001
<i>Superior, μm</i>	107,36 ± 26,12	102,70 ± 12,93	0,298	99,08 ± 17,11	0,097	77,39 ± 7,90	< 0,001	66,13 ± 4,37	<0,001
<i>Inferior, μm</i>	104,15 ± 19,08	101,69 ± 14,25	0,483	95,57 ± 14,84	0,027	71,28 ± 10,61	< 0,001	66,01 ± 4,96	<0,001
<b>GCC parametri</b>									
<i>Average, μm</i>	96,16 ± 2,77	92,58 ± 4,99	<0,001	90,27 ± 11,74	0,003	72,31 ± 5,21	< 0,001	62,33 ± 4,35	<0,001
<i>Superior, μm</i>	96,5 ± 2,93	93,55 ± 5,42	<0,001	90,64 ± 9,69	<0,001	73,25 ± 6,30	< 0,001	62,62 ± 4,87	<0,001
<i>Inferior, μm</i>	95,73 ± 3,34	91,79 ± 5,04	<0,001	89,67 ± 15,48	0,018	71,27 ± 5,79	< 0,001	62,54 ± 5,85	<0,001
<i>GLV, %</i>	3,83 ± 1,91	6,21 ± 3,75	<0,001	7,24 ± 6,41	0,002	22,75 ± 5,08	< 0,001	34,22 ± 3,38	<0,001
<i>FLV, %</i>	0,83 ± 1,16	1,42 ± 1,60	0,031	4,44 ± 3,64	<0,001	7,44 ± 5,15	< 0,001	10,80 ± 5,01	<0,001
<b>Campo visivo Parametri</b>									
<i>MD, dB</i>	-0,4 ± 1,3	-0,25 ± 1,18	0,557	-3,20 ± 0,98	<0,0001	-9,58 ± 1,29	<0,0001	-20,56 ± 4,59	<0,0001
<i>PSD, dB</i>	2,18 ± 0,43	2,25 ± 1,04	0,628	3,16 ± 1,42	<0,0001	7,36 ± 1,80	< 0,0001	11,83 ± 2,59	<0,0001

I dati sono espresso come media ± deviazione standard .

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD=mean deviation;

PSD= pattern standard deviation.

Unpaired t test. Significatività statistica P <0.05

\* Differenze tra I controlli ed I vari gruppi glaucomatosi.

Tabella 3. Confronto tra parametri strutturali ed anatomici tra I gruppi glaucomatosi.

	<b>PREPERIMETRICI VS LIEVE</b>	<b>PREPERIMETRICI VS MODERATO</b>	<b>PREPERIMETRICI VS SEVERO</b>	<b>LIEVE VS MODERATO</b>	<b>LIEVE VS SEVERO</b>	<b>MODERATO VS SEVERO</b>
<b>RNFL parameteri</b>						
<i>Average, <math>\mu m</math></i>	0,031	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Superior, <math>\mu m</math></i>	0,249	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Inferior, <math>\mu m</math></i>	0,038	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,010
<b>GCC parameteri</b>						
<i>Average, <math>\mu m</math></i>	0,238	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Superior, <math>\mu m</math></i>	0,081	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Inferior, <math>\mu m</math></i>	0,399	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>GLV, %</i>	0,352	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>FLV, %</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
<b>Campo visivo parametri</b>						
<i>MD, dB</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>PSD, dB</i>	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD=mean deviation; PSD= pattern standard deviation.

Unpaired t test. Significatività statistica P <0.05

Tabella 4. Coefficienti di correlazione tra i parametri anatomici e funzionali in tutto il gruppo glaucomatoso

		<b>Linear</b>			<b>Second Order Quadratic</b>		
		<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>P value</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>P value</b>
<b>GCC parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,811	0,658	< 0,001	0,849	0,721	< 0,001
	<i>Superior</i>	0,830	0,689	< 0,001	0,866	0,750	< 0,001
	<i>Inferior</i>	0,747	0,558	< 0,001	0,789	0,623	< 0,001
	<i>GLV</i>	0,882	0,778	< 0,001	0,905	0,818	< 0,001
	<i>FLV</i>	0,648	0,419	< 0,001	0,685	0,470	< 0,001
<b>RNFL parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,705	0,497	< 0,0001	0,762	0,581	< 0,0001
	<i>Superior</i>	0,743	0,552	< 0,0001	0,738	0,613	< 0,0001
	<i>Inferior</i>	0,705	0,497	< 0,0001	0,757	0,574	< 0,0001
<b>GCC parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,821	0,674	< 0,0001	0,831	0,691	< 0,0001
	<i>Superior</i>	0,833	0,694	< 0,0001	0,845	0,713	< 0,0001
	<i>Inferior</i>	0,762	0,581	< 0,0001	0,773	0,598	< 0,0001
	<i>GLV</i>	0,864	0,747	< 0,0001	0,869	0,755	< 0,0001
	<i>FLV</i>	0,593	0,352	< 0,0001	0,613	0,376	< 0,0001
<b>RNFL parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,683	0,466	< 0,0001	0,703	0,495	< 0,0001
	<i>Superior</i>	0,707	0,500	< 0,0001	0,716	0,513	< 0,0001
	<i>Inferior</i>	0,692	0,479	< 0,0001	0,715	0,511	< 0,0001

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD=mean deviation; PSD=pattern standard deviation.

r= Pearson's correlation coefficient. Statistical significance P <0.05

Tabella 5. Coefficienti di correlazione tra I parametri anatomici e funzionali in gruppo dei preperimetrici.

		Linear			Second Order Quadratic		
		r	r <sup>2</sup>	P value	r	r <sup>2</sup>	P value
<b>GCC parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,126	0,016	0,313	0,136	0,018	0,558
	<i>Superior</i>	0,169	0,029	0,175	0,173	0,03	0,386
	<i>Inferior</i>	0,053	0,003	0,674	0,077	0,006	0,828
	<i>GLV</i>	0,183	0,033	0,142	0,217	0,047	0,218
	<i>FLV</i>	0,087	0,008	0,486	0,092	0,008	0,767
<b>RNFL parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,062	0,004	0,619	0,081	0,007	0,811
	<i>Superior</i>	0,371	0,137	0,002	0,432	0,186	0,002
	<i>Inferior</i>	0,016	<0,001	0,898	0,025	0,001	0,981
<b>GCC parametri</b>							
<b>PS D</b>	<i>Average</i>	0,109	0,012	0,386	0,161	0,026	0,437
	<i>Superior</i>	0,220	0,048	0,076	0,220	0,049	0,208
	<i>Inferior</i>	0,030	0,001	0,813	0,188	0,035	0,324
	<i>GLV</i>	0,094	0,009	0,452	0,120	0,014	0,632
	<i>FLV</i>	0,002	<0,001	0,988	0,113	0,013	0,665
<b>RNFL parametri</b>							
<b>PS D</b>	<i>Average</i>	0,043	0,002	0,732	0,125	0,016	0,611
	<i>Superior</i>	0,077	0,006	0,537	0,140	0,020	0,536
	<i>Inferior</i>	0,066	0,004	0,597	0,135	0,018	0,559

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD=mean deviation; PSD= pattern standard deviation.

r= Pearson's correlation coefficient. Statistical significance, P <0.05

Tabella 6. Coefficienti di correlazione tra I parametri anatomici e funzionali nel gruppo lieve glaucoma.

		Linear		Second Order Quadratic			
		r	r <sup>2</sup>	P value	r	r <sup>2</sup>	P value
<b>GCC parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,152	0,023	0,342	0,194	0,038	0,481
	<i>Superior</i>	0,129	0,017	0,420	0,139	0,019	0,690
	<i>Inferior</i>	0,162	0,026	0,311	0,231	0,053	0,354
	<i>GLV</i>	0,258	0,067	0,103	0,342	0,117	0,095
	<i>FLV</i>	0,108	0,012	0,500	0,229	0,052	0,360
<b>RNFL parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,182	0,033	0,254	0,211	0,045	0,420
	<i>Superior</i>	0,164	0,027	0,306	0,165	0,027	0,591
	<i>Inferior</i>	0,168	0,028	0,293	0,243	0,059	0,315
<b>GCC parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,401	0,161	0,009	0,411	0,169	0,030
	<i>Superior</i>	0,379	0,143	0,015	0,400	0,160	0,037
	<i>Inferior</i>	0,369	0,136	0,017	0,375	0,141	0,056
	<i>GLV</i>	0,395	0,156	0,011	0,444	0,197	0,015
	<i>FLV</i>	0,119	0,014	0,460	0,179	0,032	0,538
<b>RNFL parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,201	0,040	0,208	0,255	0,065	0,280
	<i>Superior</i>	0,144	0,021	0,369	0,165	0,027	0,591
	<i>Inferior</i>	0,230	0,053	0,148	0,312	0,097	0,143

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD= mean deviation; PSD= pattern standard deviation.

r= Pearson's correlation coefficient. Statistical significance, P <0.05

Tabella 7. Coefficienti di correlazione tra I parametri anatomici e funzionali nel gruppo moderato glaucoma

		Linear			Second Order Quadratic		
		r	r2	P value	r	r2	P value
<b>GCC parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,278	0,077	0,106	0,278	0,077	0,276
	<i>Superior</i>	0,093	0,009	0,595	0,100	0,010	0,851
	<i>Inferior</i>	0,436	0,190	0,009	0,439	0,193	0,033
	<i>GLV</i>	0,011	<0,001	0,950	0,066	0,004	0,933
	<i>FLV</i>	0,001	<0,001	0,994	0,058	0,003	0,947
<b>RNFL parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,622	0,387	<0,001	0,637	0,406	<0,001
	<i>Superior</i>	0,691	0,477	<0,001	0,692	0,478	<0,001
	<i>Inferior</i>	0,205	0,042	0,238	0,254	0,065	0,344
<b>GCC parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,554	0,307	0,001	0,699	0,488	<0,001
	<i>Superior</i>	0,333	0,111	0,051	0,525	0,276	0,006
	<i>Inferior</i>	0,676	0,457	<0,001	0,737	0,543	<0,001
	<i>GLV</i>	0,278	0,077	0,106	0,532	0,283	0,005
	<i>FLV</i>	0,187	0,035	0,283	0,318	0,101	0,182
<b>RNFL parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,733	0,537	<0,001	0,733	0,537	<0,001
	<i>Superior</i>	0,749	0,562	<0,001	0,752	0,566	<0,001
	<i>Inferior</i>	0,172	0,030	0,323	0,211	0,045	0,481

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD= mean deviation; PSD= pattern standard deviation.

r= Pearson's correlation coefficient. Statistical significance, P <0.05

Tabella 8. Coefficienti di correlazione tra I parametri anatomici e funzionali nel gruppo severo glaucoma

		Linear			Second Order Quadratic		
		r	r2	P value	r	r2	P value
<b>GCC parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,250	0,062	0,12	0,273	0,074	0,239
	<i>Superior</i>	0,190	0,036	0,240	0,275	0,075	0,234
	<i>Inferior</i>	0,258	0,066	0,108	0,262	0,069	0,269
	<i>GLV</i>	0,013	<0,001	0,937	0,015	<0,001	0,996
	<i>FLV</i>	0,035	0,001	0,832	0,119	0,014	0,767
<b>RNFL parametri</b>							
<b>MD</b>	<i>Average</i>	0,061	0,004	0,707	0,164	0,027	0,604
	<i>Superior</i>	0,044	0,002	0,788	0,142	0,020	0,687
	<i>Inferior</i>	0,017	<0,001	0,918	0,039	0,002	0,937
<b>GCC parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,399	0,159	0,011	0,516	0,266	0,003
	<i>Superior</i>	0,257	0,066	0,109	0,328	0,108	0,121
	<i>Inferior</i>	0,339	0,115	0,032	0,414	0,171	0,031
	<i>GLV</i>	0,272	0,074	0,090	0,476	0,227	0,009
	<i>FLV</i>	0,121	0,015	0,459	0,139	0,019	0,699
<b>RNFL parametri</b>							
<b>PSD</b>	<i>Average</i>	0,118	0,014	0,470	0,501	0,251	0,005
	<i>Superior</i>	0,137	0,019	0,400	0,564	0,318	0,001
	<i>Inferior</i>	0,016	<0,001	0,924	0,186	0,035	0,522

RNFL= retinal nerve fiber layer; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; MD= mean deviation; PSD= pattern standard deviation.

r= Pearson's correlation coefficient. Statistical significance, P <0.05

Tabella 9. Valutazione dei parametrici dell'OCT e del campo visivo come tests diagnostici con le curve ROC.

	Area under the ROC curve							
	Normali vs PPG	P value	Normali vs Lieve	P value	Normal Vs Moderato	P value	Normali vs Severo	P value
<b>GCC Parametri (95% CI)</b>								
<i>GCC Average</i>	0,741 (0,649-	<0,001	0,718 (0,606-	0,001	1,000 (1,000-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,001
<i>GCC Superior</i>	0,654 (0,550-	0,008	0,679 (0,561-	0,005	1,000 (1,000-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,001
<i>GCC Inferior</i>	0,792 (0,708-	<0,001	0,742 (0,630-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,001
<i>GLV</i>	0,302 (0,204-	0,001	0,370 (0,243-	0,043	0,000 (0,000-	<0,001	0,000 (0,000-	<0,001
<i>FLV</i>	0,391 (0,282- 0,499)	0,06	0,157 (0,075- 0,240)	<0,001	0,017 (0,000- 0,041)	<0,001	0,000 (0,000- 0,000)	<0,001
<b>RNFL Parametri (95% CI)</b>								
<i>RNFL Average</i>	0,514 (0,400-	0,809	0,640 (0,520-	0,03	1,000 (1,000-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,001
<i>RNFL Superior</i>	0,520 (0,406-	0,725	0,361 (0,509-	0,042	0,980 (0,956-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,001
<i>RNFL Inferior</i>	0,527 (0,410- 0,644)	0,644	0,617 (0,492- 0,742)	0,07	0,969 (0,938- 1,000)	<0,001	1,000 (1,000- 1,000)	<0,001
<b>Visual field Parametri</b>								
<i>MD</i>	0,449 (0,333-	0,382	1,000 (1,000-	<0,001	1,000 (1,000-	<0,0001	1,000 (1,000-	<0,000
<i>PSD</i>	0,582 (0,475- 0,690)	0,157	0,269 (0,157- 0,381)	<0,001	0,000 (0,000- 0,000)	<0,001	0,000 (0,000- 0,000)	<0,000

CI= confidence interval; GCC= ganglion cell complex; GLV= global loss volume; FLV= focal loss volume; RNFL= retinal nerve fiber layer; MD= mean deviation; PSD= pattern standard deviation.  
 Statistical significance, P <0.05

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Kandel ER., Schwarts JH., Jessel TM. Principi di neuroscienze. Editore Ambrosiana 2003
2. Azzolini C., Carta F., Menchini U., Clinica apparato visivo. Editore Elviser 2010.
3. Motolese E., Addabbo G.. Semiotica oculare. Editore Utet 1998.
4. Medeiros FA, Zangwill LM, Bowd C, Vessani RM, Susanna R Jr, Weinreb RN. Evaluation of retinal nerve fiber layer, optic nerve head, and macular thickness measurements for glaucoma detection using optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 2005 Jan;139(1):44-55.
5. Wollstein G, Ishikawa H, Wang J, Beaton SA, Schuman JS. Comparison of three optical coherence tomography scanning areas for detection of glaucomatous damage. *Am J Ophthalmol.* 2005 Jan;139(1):39-43.
6. Tan O, Chopra V, Lu AT, Schuman JS, Ishikawa H, Wollstein G, Varma R, Huang D. Detection of macular ganglion cell loss in glaucoma by Fourier-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2009 Dec;116(12):2305-14.e1-2.
7. Airaksinen P.J., Nieminen H.: Retinal nerve fiber layer photography in glaucoma. *Ophthalmology* 1985; 92 (7):877-9.
8. Sommer A, Katz J, Quigley HA, Miller NR, Robin AL, Richter RC, Witt KA. Clinically detectable nerve fiber atrophy precedes the onset of glaucomatous field loss. *Arch Ophthalmol* 1991;109(1):77-83.
9. Cho JW, Sung KR, Lee S, Yun SC, Kang SY, Choi J, Na JH, Lee Y, Kook MS. Relationship between visual field sensitivity and macular ganglion cell complex thickness as measured by spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(12): 6401-7.

- 
10. Hoyt W.F., Frisen L., Newman N.M.: Funduscopy of nerve fiber layer defects in glaucoma. *Invest Ophthalmol* 1973; 12(11):814-29.
  11. Quigley H.A., Addicks E.M.: Quantitative studies of retinal nerve fiber layer defects. *Arch ofthalmol* 1982;100(5):807-14
  12. Garas A, Vargha P, Hollò G. Reproducibility of retinal nerve fiber layer and macular thickness measurement with the RTVue-100 optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2010; 117(4):738-46.
  13. Kim NR, Lee ES, Seong GJ, Kim JH, An HG, Kim CY. Structure-function relationship and diagnostic value of macular ganglion cell complex measurement using Fourier-domain OCT in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(9):4646-51.
  14. Quigley HA, Katz J, Derick RJ, Gilbert D, Sommer A. An evaluation of optic disc and nerve fiber layer examinations in monitoring progression of early glaucoma damage. *Ophthalmology* 1992; 99(1):19–28.
  15. Medeiros FA, Zangwill LM, Bowd C, Vessani RM, Susanna R Jr, Weinreb RN. Evaluation of retinal nerve fiber layer, optic nerve head, and macular thickness measurements for glaucoma detection using optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(1):44-55.

- 
16. Harwerth RS, Carter-Dawson L, Shen F, Smith EL, Crawford ML. Ganglion cell losses underlying visual field defects from experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;40(10):2242–50.
  17. Leventhal AG, Rodieck RW, Dreher B. Retinal ganglion cell classes in Old World monkey: morphology and central projections. *Science* 1981;213(4512): 1139-1142.
  18. Wollstein G, Ishikawa H, Wang J, Beaton SA, Schuman JS. Comparison of three optical coherence tomography scanning areas for detection of glaucomatous damage. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(1):39-43.
  19. Wollstein G, Schuman JS, Price LL, Aydin A, Beaton SA, Stark PC, Fujimoto JG, Ishikawa H. Optical coherence tomography (OCT) macular and peripapillary retinal nerve fibre layer measurements and automates visual fields. *Am J Ophthalmol* 2004;138(2): 218-225.
  20. Ishikawa H, Stein DM, Wollstein G, Beaton S, Fujimoto JG, Schuman JS. Macular segmentation with optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(6):2012–7.
  21. Tan O, Li G, Lu AT, et al. Mapping of macular substructures with optical coherence tomography for glaucoma diagnosis. *Ophthalmology* 2008;115:949–56.
  22. Kandel ER., Schwarts JH., Jessel TM. *Principi di neuroscienze*. Editore Ambrosiana; 2003.

- 
23. Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* 1988; 95: 357 - 363.
24. S.T. Takagi, A. Nose, Y. Kita, G. Tomita. Inner Retinal Layer Measurements in Macular Region With Fourier Domain Optical Coherence Tomography in Glaucomatous Eyes With Hemifield Defects. Toho University Ohashi Medical Center, Tokyo, Japan, IOVS Suppl. 2008; 4648.
25. Tan O, Chopra V, Lu AT, Schuman JS, Ishikawa H, Wollstein G, Varma R, Huang D. Detection of macular ganglion cell loss in glaucoma by Fourier-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2009;116(12):2305-14.e1-2.