



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

DOTTORATO DI RICERCA XXI CICLO

**“ LA PATOLOGIA VASCOLARE DEL DISTRETTO
TESTA - COLLO ”**

Coordinatore: Prof. Lucio Rucci

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE
OTO-NEURO-OFTALMICHE**

TESI DI DOTTORATO

“Analisi computerizzata della tortuosità vasale in pazienti affetti da occlusione della vena centrale retinica, confronto rispetto ad un gruppo di controllo”

S.S.D.: MED-30

Relatore
Prof. Ugo Menchini

Dottorando
Dott. Alessandro Bini

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

INDICE

INTRODUZIONE	2
ANATOMIA DELLA RETINA.....	3
TROMBOSI DELLA VENA CENTRALE RETINICA	5
EPIDEMIOLOGIA E PATOGENESI	5
CLASSIFICAZIONE	8
DIAGNOSI E TESTS STRUMENTALI.....	12
TERAPIA.....	15
SCOPO DEL LAVORO	18
CASISTICA.....	19
PROTOCOLLO DI INDAGINE	20
DESCRIZIONE DEL NUOVO SOFTWARE PER LO STUDIO COMPUTERIZZATO DELLA TORTUOSITA' DEI VASI RETINICI.....	21
ANALISI DELLA TORTUOSITA'	24
<i>Lunghezza relativa</i>	25
<i>SOAM</i> (Metrica della Somma degli Angoli)	27
<i>PAD</i> (Prodotto Angoli Metrica Distanza).....	28
<i>I2EVAR</i> (Indice Triangolo).....	28
PROCEDURA DI UTILIZZO DEL SOFTWARE.....	31
ANALISI STATISTICA.....	33
RISULTATI.....	34
TABELLE DEI RISULTATI.....	36
DISCUSSIONE.....	38
CONCLUSIONI.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42

INTRODUZIONE

La patologia venosa occlusiva della retina, e in particolare quella a carico della vena centrale (OVCR), è di frequente osservazione nella pratica clinica oculistica e rappresenta la più comune patologia vascolare della retina dopo la retinopatia diabetica. Si manifesta tipicamente in pazienti di età superiore ai 50 anni, ipertesi, con malattie cardiovascolari e diabete mellito. Altri fattori spesso associati ad un aumentato rischio di trombosi venosa retinica sono il fumo di sigaretta, l'assunzione di contraccettivi orali e anomalie congenite o acquisite della coagulazione quali il deficit di Antitrombina III, il deficit delle proteine C ed S, la resistenza alla proteina C attivata, alcuni polimorfismi della protrombina, la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi, l'iperomocisteinemia. Dal punto di vista oculare sono considerati importanti fattori predisponenti: l'aumento di pressione intraoculare, l'ipermetropia, alcune malattie infiammatorie sistemiche con vasculite retiniche, come la sarcoidosi e la sindrome di Behçet, e rare anomalie congenite a carico della vena centrale della retina.

Il quadro oftalmoscopico all'esordio è caratterizzato da emorragie nella porzione di retina coinvolta, dilatazione e tortuosità delle vene affette, edema retinico e vario grado di ischemia con essudati cotonosi.

Le procedure diagnostiche più utilizzate nell'OVCR sono la retinografia, la fluorangiografia e la tomografia a coerenza ottica, che secondo la nostra esperienza, confermano un significativo aumento della tortuosità vasale nei pazienti affetti da tale patologia.

Nel presente lavoro si descrive la realizzazione e l'applicazione di una nuova metodica computerizzata per la valutazione oggettiva, mediante software dedicato, della tortuosità dei vasi retinici. Obiettivo primario del lavoro è la validazione di tale metodica come rilevatore di tortuosità in pazienti affetti da OVCR rispetto ad un gruppo di controllo, omogeneo per sesso ed età. Obiettivo secondario è la ricerca, fra i vari indici analizzati dal software, di possibili fattori di predisposizione analizzando gli occhi non affetti da OVCR dei pazienti rispetto alla popolazione normale. Questo potrebbe corroborare le informazioni cliniche al fine di impostare la migliori terapie preventive possibili.

ANATOMIA DELLA RETINA

L'occhio è avvolto da tre tuniche che hanno strutture e funzioni assai diverse.

- La tunica più esterna, detta fibrosa, è costituita dalla sclerotica o sclera e dalla cornea, quella media è detta vascolare ed è fortemente pigmentata per impedire la riflessione e la rifrazione dei raggi luminosi. Quest'ultima è divisa in più porzioni, di cui una posteriore, sottilissima e aderente alla superficie della sclera, detta coroide, principalmente vascolare, una intermedia (corpo ciliare) e una anteriore, l'iride, con al centro la pupilla.

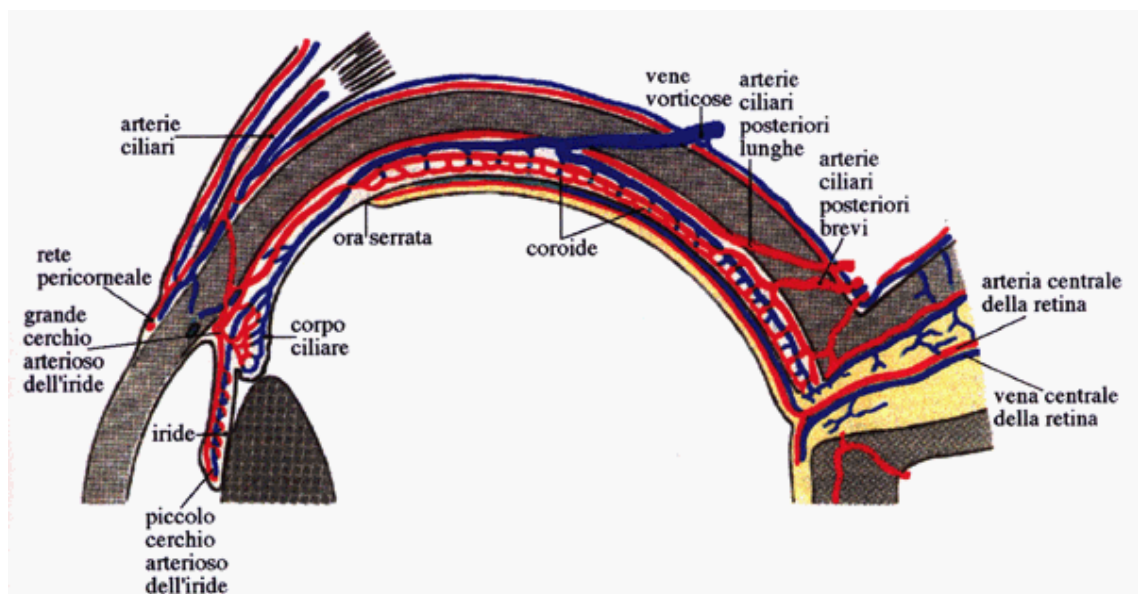
- La tunica più interna è di natura nervosa, aderente a quella media; può esser distinta in una porzione ottica (corrispondente alla coroide) e in una porzione cieca, formata da due parti, una ciliare, l'altra iridea.

- Il limite tra le due porzioni è segnato da una linea festonata, detta ora serrata. Questa terza tunica, nella sua porzione ottica, è costituita da due foglietti, uno esterno epitelio pigmentato e uno interno retina neurosensoriale. **La retina**, considerata un'espansione del nervo ottico, che, come una membrana, si applica sulla coroide, fino all'ora serrata. La retina è una sottile membrana formata da cellule nervose, il cui ruolo è di trasformare gli impulsi luminosi che riceve in impulsi elettrici, che attraverso il nervo ottico sono trasmessi al cervello. La porzione centrale della retina prende il nome di macula ed è caratterizzata da una densità cellulare decisamente più elevata, e dalla presenza di coni. La macula consente la visione distinta, la lettura e la percezione netta dei colori ma per funzionare correttamente richiede una discreta quantità di luce. La restante porzione

periferica, dove prevalgono i bastoncelli, permette di orientarsi e di muoversi discretamente nello spazio, garantendogli la percezione periferica del campo visivo e la visione in scarse condizioni di luminosità.

La vascolarizzazione delle retina origina da un ramo dell'arteria oftalmica, l'arteria centrale della retina, che penetra nel nervo ottico, ne percorre l'asse ed entra nel bulbo al centro della papilla ottica. Da qui, l'arteria centrale della retina si divide in più rami che si distribuiscono sulla superficie retinica ed in profondità con una fitta rete che vascolarizza i 2/3 interni della retina stessa. Il terzo esterno è nutrito dalla corio capillare della coroide. La macula non ha rami dell'arteria centrale, ma è nutrita esclusivamente dalla coriocapillare per diffusione. Dalla rete capillare originano i vasi venosi: questi confluiscono nella vena centrale retinica che fuoriesce dal bulbo oculare attraverso la papilla, di qui alle vene orbitarie ed al seno cavernoso

Fig. 1: Vascolarizzazione dell'occhio.



Note : Da “anatomia umana: sistema nervoso e organi di senso”, Ambrosiana

TROMBOSI DELLA VENA CENTRALE RETINICA

EPIDEMIOLOGIA E PATOGENESI

La “patologia occlusiva venosa della retina” è una patologia di frequente riscontro nella pratica clinica, seconda solo al diabete per incidenza. In una recente pubblicazione, il “Beaver Dam Eye Study Group” riporta negli Stati Uniti una incidenza cumulativa in 15 anni pari al 0.5%ⁱ. Altri studi di popolazione condotti in Australia e Israele riportano una incidenza che varia dall’0,2 allo 0,7% sotto i 60 anni e dal 4,6 al 5,3% oltre i 60 anniⁱⁱ. Oltre il 90% dei soggetti affetti la OVCR infatti è ultracinquantenne, anche se la patologia è stata descritta in ogni fascia di età. L’incidenza sembra essere leggermente più elevata negli uomini che nelle donne, mentre non è stata descritta una prevalenza di razzaⁱⁱⁱ. La OVCR non sembra associata ad un aumentata mortalità o morbilità.

La patogenesi della OVCR non è ancora del tutto chiara, per quanto sia generalmente condiviso che, sul piano istopatologico, la lesione scatenante sia un trombo nella vena centrale della retina a livello della lamina cribrosa^{iv}. Il perché di questo evento non è ancora conosciuto, anche se diversi fattori locali e sistemici sembrano giocare un ruolo nell'occlusione della vena centrale retinica^{vivii}.

L'arteria e la vena centrali della retina decorrono all'interno del nervo ottico in una guaina avventiziale comune e passano attraverso uno stretto canale nella lamina cribrosa. Questa posizione anatomica così "fissa" predispone di per sé alla formazione di trombi e amplifica i classici meccanismi descritti da Virchow: rallentamento del flusso ematico, modificazioni della parete vasale e modificazione della composizione ematica stessa.

Tra le ipotesi più accreditate vi è quella che prende in considerazione l'aterosclerosi dell'arteria centrale della retina. Poiché l'arteria e la vena centrali della retina decorrono all'interno del nervo ottico in una guaina comune, è possibile che l'ispessimento e l'ipertrofia dell'arteria riducano il diametro della vena ostruendola direttamente o provocandone un flusso turbolento e quindi un danno endoteliale che favorisce la formazione di trombi. Poiché molti pazienti manifestano i sintomi al risveglio, dichiarando di aver avuto un visus normale la sera precedente, è stato ipotizzato che la ridotta perfusione oculare dovuta alla riduzione della pressione sistemica e della frequenza cardiaca, associata all'aumento della pressione intraoculare presente in clinostatismo, possano favorire questi episodi.

Secondo altri autori la OVCR rappresenterebbe lo stadio finale di un fenomeno indotto da una varietà di lesioni primitive. Tali lesioni potrebbero includere problemi compressivi o infiammatori a livello del nervo ottico e dell'orbita (pressione meccanica dovuta a modificazioni strutturali della lamina cribrosa in corso di glaucoma, rigonfiamento infiammatorio del nervo ottico, patologie dell'orbita), alterazioni emodinamiche, danno vasale (vasculiti) o infine modificazioni del sangue (deficit di fattori della trombolisi o aumento di fattori protrombotici). Poiché la circolazione venosa retinica rappresenta un sistema relativamente ad alta resistenza e a basso flusso, è particolarmente sensibile ai fattori emorragici. Altri studi indicano che insieme ad un'elevata velocità di

eritrosedimentazione e livello di antitrombina III, un elevato livello di ematocrito, di fibrinogeno, l'aumentata viscosità ematica, la presenza di lupus anticoagulante o un altro anticorpo antifosfolipide e mancanza della proteina C attivata possono essere associati con la malattia venosa^{viiiix}. Se questi parametri ematologici possano da soli dare inizio all'occlusione della vena centrale della retina o il loro ruolo sia quello di funzionare come cofattori.

Il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa sistemica e la malattia cardiovascolare ischemica sono le patologie sottostanti più frequentemente associate alle trombosi venose retiniche, anche se la loro relazione con il meccanismo patogenetico rimane ancora solo un'ipotesi. Dal The Eye Disease Case-Control Study Group^x, effettuato su 298 pazienti con OVCR, è emersa l'utilità del trattamento dell'ipertensione arteriosa sistemica per prevenire l'insorgenza di OVCR. Inoltre dallo stesso studio è emersa anche un'associazione significativa inversa, in altre parole un rischio diminuito di presentare OVCR, con il consumo d'alcool, l'educazione, l'attività fisica e l'utilizzo di estrogeni nelle donne. Tuttavia la maggior parte degli autori ha concluso che il trattamento efficace delle condizioni sistemiche, non è utile nella gestione terapeutica delle complicanze oculari, ma piuttosto può ridurre l'incidenza di OVCR nell'occhio adelfo.

L'OVCR è stata osservata inoltre in pazienti con otticopatia ischemica bilaterale, come manifestazione iniziale di pseudotumor cerebri, associata a carcinomatosi meningea o ad anomalie congenite del disco ottico come le drusen della testa del nervo ottico. Sono stati riportati in letteratura anche casi insorti in gravidanza ed in seguito a vaccinazioni per l'epatite B ed in associazione ad anemia sideropenica.

Tra i fattori predisponenti oculari sono invece importanti l'ipermetropia, alcune malattie infiammatorie causa di vasculiti retiniche, come la sarcoidosi e la sindrome di Behçet, e il glaucoma ad angolo aperto. Il glaucoma ad angolo aperto è un reperto relativamente comune nei pazienti che hanno occlusione della vena centrale della retina. I pazienti con anamnesi positiva per glaucoma hanno una probabilità di sviluppare una OVCR cinque volte maggiore rispetto a quelli con anamnesi negativa, probabilmente a causa di alterazioni strutturali della lamina cribrosa indotte dall'elevata pressione

intraoculare. Il glaucoma ad angolo chiuso può invece precipitare l'occlusione della vena centrale della retina.

La OVCR giovanile, molto più rara, nella maggior parte dei casi non si riscontrano fattori predisponenti sottostanti sistemici od oculari, per cui è stata ipotizzata la presenza di un'inflammatione della vena centrale della retina o di un'anomalia congenita a carico della vena stessa.

La causa più comune di riduzione dell'acuità visiva nei pazienti con OVCR è lo sviluppo di edema maculare (che può essere di tipo diffuso o cistoide). Altre possibili cause includono l'emorragia e, nelle forme più gravi, l'ischemia maculare e il glaucoma neovascolare determinato dal rilascio di fattori angiogenetici da parte del tessuto sofferente. Dal punto di vista fisiopatologico in un sistema ad arterie terminali, come quello retinico, l'occlusione venosa causa un aumento della pressione venosa e capillare con ristagno ematico. Questo determina un'ipossia nella zona di retina normalmente drenata dalla vena occlusa. L'ipossia danneggia le cellule endoteliali dei capillari con diffusione nello spazio extravascolare. L'aumento della pressione extravascolare causa un ulteriore ristagno circolatorio e ipossia, creando così un circolo vizioso.

Le complicanze quindi che possono accompagnare il decorso delle OVCR sono: l'edema maculare, la neovascolarizzazione retinica ed il glaucoma neovascolare. Dal punto di vista fisiopatologico si ipotizza che lo sviluppo di edema maculare (EM), in seguito a patologia occlusiva venosa retinica, sia causato dalla fuoriuscita di fluido dai vasi in accordo con la legge di Starling, per rottura della barriera ematoretinica (BRB) come risultato del danno alle tight junctions delle cellule endoteliali dei capillari, adesione vitreoretinica e secrezione nel vitreo di fattori di vasopermeabilità prodotti dalla retina stessa^{xixixixixiv}. Osservazioni di Noma e coll. suggeriscono che l'occlusione vascolare induca l'espressione del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e della Interleukina-6 (IL-6), che portano ad una rottura della BRB e ad un aumento della permeabilità vascolare^{xv}. Inoltre, il VEGF e la IL-6 potrebbero contribuire allo sviluppo e progressione dell'edema maculare vasogenico. L'edema maculare è strettamente associato all'ipossia retinica ed il grado di ipossia nel centro della macula correla certamente con un peggioramento dell'acuità visiva (VA). Se persiste un'ipossia marcata, intervengono cambiamenti strutturali irreversibili a livello maculare tale da compromettere irrimediabilmente l'acuità visiva, a meno che non si sviluppino circoli collaterali.

La prognosi della OVCR infatti dipende dal grado di ricanalizzazione vasale, dalla dissoluzione del trombo e dalla formazione di circoli collaterali e shunts optociliari.

CLASSIFICAZIONE

La "patologia occlusiva venosa della retina" comprende sia le occlusioni della vena centrale della retina (OVCR) sia le

occlusioni venose di branca (OVBR) a seconda che l'ostruzione sia a livello della vena centrale della retina o in uno dei suoi rami.

È necessario distinguere tali forme poiché esse differiscono per patofisiologia, associazioni sistemiche sottostanti, età media d'insorgenza, decorso clinico e terapia.

L'OVCR è caratterizzata dall'occlusione della vena retinica nella sua porzione terminale, a livello del nervo ottico, ove raccoglie tutto il sangue proveniente dai capillari retinici.

Le occlusioni venose variano considerevolmente per gravità ed il disturbo visivo dipende dalla regione di retina coinvolta, dal grado di occlusione e dall'entità dell'ischemia retinica.

Le OVCR sono comunemente classificate in forme ischemiche e in forme non ischemiche. Esistono inoltre delle forme molto rare, prevalentemente giovanili (occlusione venosa centrale del giovane adulto). Dal punto di vista clinico differenziare le due forme riveste una notevole importanza in quanto predice un diverso rischio di neovascolarizzazione oculare (complicanza a medio termine), identifica quei pazienti che avranno una prognosi visiva peggiore rispetto a quelli con maggior probabilità di un recupero visivo spontaneo, pesando nella decisione e programmazione degli interventi terapeutici e di follow-up. All'esordio o anche nelle fasi successive di malattia, talvolta può essere difficile classificare la patologia in queste due categorie fisse, per la presenza di caratteristiche cliniche a comune. Tutte le forme infatti hanno all'esordio reperti oftalmoscopici simili, caratterizzati da vene retiniche dilatate e tortuose ed emorragie in tutti i quadranti. La distinzione fra di esse può essere in qualche modo arbitraria.

Parte degli studiosi ritengono infatti che le due forme non ischemica e ischemica rappresentino diversi livelli di gravità di uno stesso continuum patologico sottostante. Alcuni invece suggeriscono che queste siano due entità distinte con differente patogenesi: la varietà ischemica sarebbe associata con una patologia arteriosa retinica coesistente e grave, mentre la forma, non ischemica, più lieve, sarebbe causata da una trombosi più distale dietro la lamina cribrosa.

In realtà vi sono molteplici caratteristiche che vengono prese in esame per classificare le OVCR che includono il deficit visivo all'esordio, la presenza o assenza del riflesso afferente pupillare, l'estensione delle emorragie retiniche e degli essudati cotonosi all'esame del fondo, l'estensione della perfusione retinica alla fluorangiografia e modificazione all'elettoretinografia.

Occlusione della vena centrale della retina non ischemica

Questa forma è la più comune di occlusione della vena centrale retinica e fortunatamente con prognosi migliore. Essa coinvolge circa il 75-80% dei pazienti. I pazienti di solito si presentano con una riduzione dell'acuità visiva da lieve a moderata. All'esordio il paziente potrà riferire annebbiamenti intermittenti o un oscuramento visivo transitorio, nella quasi totalità dei casi in assenza di dolore. I tests pupillari raramente rivelano un difetto afferente, che se presente è lieve. All'esame del fundus si potranno evidenziare un numero variabile di emorragie puntiformi e a fiamma presenti in tutti i quadranti e le caratteristiche vene dilatate e tortuose. È comune il rigonfiamento della testa del nervo ottico, mentre gli essudati cotonosi, se presenti, sono in numero limitato e localizzati posteriormente. Quando si ha diminuzione dell'acuità visiva, questa è solitamente da imputare all'emorragia maculare o all'edema maculare, che può essere di tipo cistoide, con ispessimento maculare diffuso o entrambi.

La neovascolarizzazione sia del segmento anteriore che di quello posteriore è rara in una OVCR non ischemica vera (incidenza inferior al 2%), sebbene non sia una eventualità atipica la trasformazione da un'occlusione venosa inizialmente non ischemica nella forma ischemica. Il Gruppo di Studio dell'Occlusione della Vena Centrale ha rilevato che dei 547 occhi inizialmente diagnosticati come occlusioni venose retiniche centrali non ischemiche, 185 (34%) sono progrediti a occlusioni venose retiniche centrali ischemiche entro tre anni e di queste progressioni poco meno della metà (15%) è avvenuta nei primi quattro mesi (The Central Vein Occlusion Study Group, 1997)^{xvi}.

Molti o tutti i reperti retinici patologici possono risolversi nei 6-12 mesi successivi alla diagnosi. Le emorragie retiniche si risolvono spesso completamente. Il nervo ottico può apparire normale, ma possono svilupparsi vasi collaterali optociliari. Vi può essere anche una risoluzione dell'edema maculare con recupero del normale aspetto. Comunque, alterazioni pigmentarie, formazione di membrane epiretiniche, o edema maculare cistoide persistente possono rimanere e dar luogo ad una perdita permanente dell'acuità visiva.

Occlusione venosa centrale retinica ischemica

Questa forma è fortunatamente meno comune della precedente, rappresentando circa il 20-25% di tutte le OVCR. Il quadro clinico esordisce solitamente con una riduzione improvvisa e marcata dell'acuità visiva, con visus ridotto nella maggior parte dei casi al di sotto di 1/10 e più spesso "a conta dita". È tipico un difetto afferente pupillare. Vi può essere dolore all'esordio se si è già sviluppato un glaucoma neovascolare. L'aspetto oftalmoscopico della OVCR ischemica è caratterizzato da emorragie retiniche estese in tutti i quadranti, concentrate per lo più al polo posteriore.

Le emorragie possono essere così estese da mascherare i dettagli retinici e coroideali ed il sanguinamento può farsi strada attraverso la membrana limitante interna dando luogo ad emovitreo. Le vene retiniche sono marcatamente ingorgate e tortuose e il disco ottico è di solito edematoso. Gli essudati cotonosi sono spesso presenti e possono essere numerosi. L'edema maculare frequentemente è grave, ma all'esame oftalmoscopico può essere mascherato dall'emorragia. Si può anche sviluppare un distacco di retina essudativo e in questo caso la prognosi visiva è decisamente infausta. Nella forma ischemica della OVCR si ha anche un'alta incidenza di neovascolarizzazione del segmento anteriore (60%) ed è stata documentata a partire dalla nona settimana dopo l'insorgenza^{xvii}. Quindi, vi è il rischio di un glaucoma ad angolo chiuso neovascolare, secondario. La neovascolarizzazione dell'angolo ed il glaucoma neovascolare possono verificarsi entro 3 mesi dall'insorgenza della malattia (così detto "glaucoma dei 90 giorni") e può produrre una pressione intraoculare elevata e intrattabile. Anche la vascolarizzazione del disco ottico e retinica possono essere presenti, ma meno comunemente.

Come nel caso della OVCR non ischemica, i reperti possono diminuire o risolversi 6-12 mesi dopo la diagnosi, ma nella OVCR ischemica il nervo ottico mostra pallore e vasi collaterali optociliari sono più spesso presenti rispetto alla forma non ischemica. Cambiamenti maculari permanenti includono le alterazioni pigmentarie, la formazione di membrane epiretينية e la fibrosi sottoretinica che assomiglia alla cicatrice disciforme. Anche l'ischemia maculare può essere presente.

Occlusione venosa centrale del giovane adulto

Una forma rara di occlusione venosa centrale è quella del giovane adulto, caratterizzata da una modesta riduzione della capacità visiva, tipicamente più evidente nelle prime ore del mattino. Colpisce prevalentemente individui al di sotto dei 40 anni e la causa è probabilmente da ricercarsi in un'anomalia congenita che favorisce alterazioni del flusso vascolare a livello della vena centrale della retina, o in uno stato infiammatorio della stessa. Questi pazienti tendono ad avere un edema del disco ottico sproporzionato rispetto ai reperti clinici, con essudati cotonosi che circondano ad anello la papilla ottica e, occasionalmente, occlusioni dell'arteria cilioretinica o persino parziali occlusioni dell'arteria centrale della retina. La prognosi è in genere favorevole anche se il 30% di questi pazienti può sviluppare il tipo ischemico dell'occlusione.

DIAGNOSI E TESTS STRUMENTALI

La diagnosi di OVCR si basa principalmente sui caratteristici reperti del fundus oculi: emorragie retiniche diffuse, ingorgo e tortuosità venosa retinica, edema maculare e edema della papilla. Possono essere presenti anche segni di vari gradi di ischemia retinica, essudati cotonosi e neovascolarizzazione.

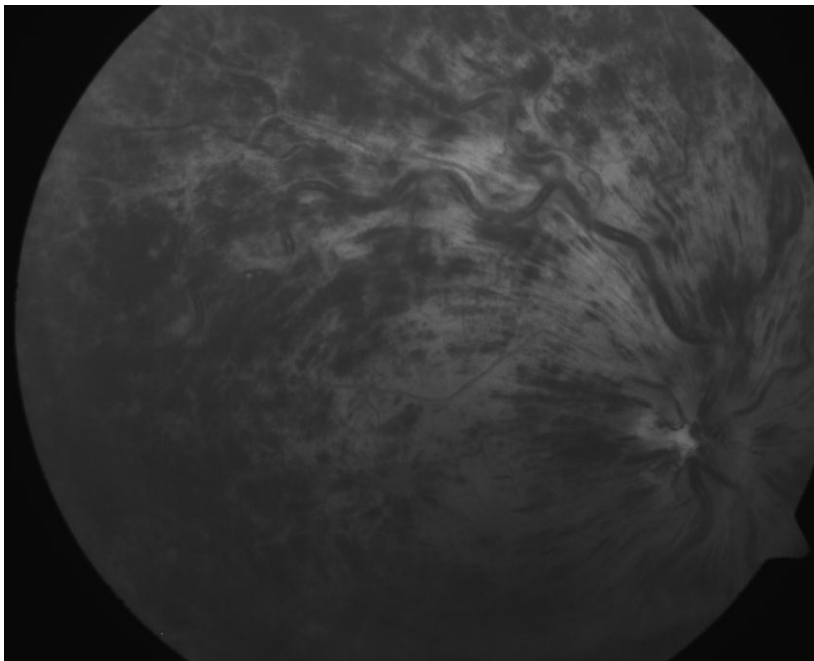
Non vi sono esami di laboratorio diagnostici per OVCR. Tuttavia nei soggetti anziani gli esami ematici di routine potrebbero indicare una patologia vascolare sistemica sottostante (glicemia, velocità di eritrosedimentazione, emocromo, assetto lipidico), mentre nei pazienti più giovani potrebbero corroborare le informazioni cliniche alla ricerca di una causa rara di stato pro-trombotico.

I tests strumentali da effettuare nella diagnosi di patologia occlusiva venosa retinica sono principalmente: la fluorangiografia (FAG) associata alla retinografia e la tomografia a coerenza ottica (OCT).

Retinografia

La retinografia è una semplice foto del fundus che può essere eseguita a colori o con filtro verde e può risultare di estrema utilità nel follow-up dei pazienti. E' difatti una metodica non invasiva che richiede esclusivamente la dilatazione della papilla con un collirio midriatico alla quale segue lo scatto fotografico che oggi si effettua con angiografi digitali (figura 2).

Fig. 2. Retinografia del fundus in un paziente affetto da OVCR.



Fluorangiografia (FAG)

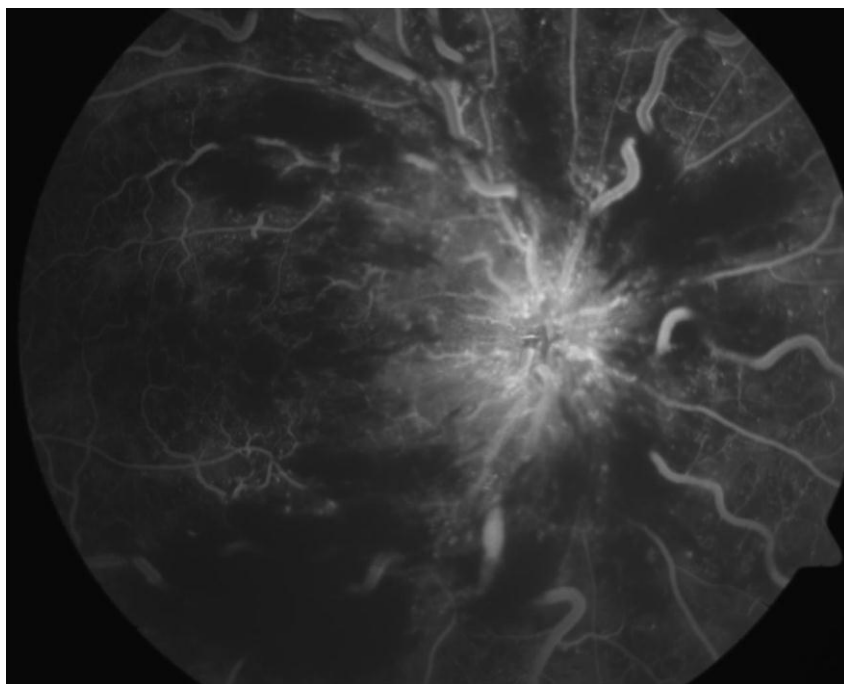
La fluorangiografia (angiografia oculare con fluoresceina) rappresenta il test sicuramente più utile per evidenziare e valutare le aree ischemiche in cui è assente la perfusione capillare e l'eventuale insorgenza di neovascolarizzazione. Alcuni studi suggeriscono che gli occhi con una superficie di non perfusione pari o superiore a 10 diametri papillari, evidenziata all'esame angiografico, sono ad aumentato rischio di sviluppo di neovascolarizzazione del segmento anteriore e, perciò, dovrebbero essere classificati come ischemici^{xviii}. La fluorangiografia nella OVCR ischemica può mettere in evidenza una marcata ipofluorescenza che può essere secondaria al blocco da emorragia estesa o alla non perfusione capillare retinica. Quando sono presenti estese emorragie, dall'angiogramma si ottengono poche informazioni. In ogni modo, non appena si riassorbono le emorragie (solitamente in alcuni mesi) il grado di non

perfusione capillare può risultare evidente. La maggior parte degli occhi (80%) con quest'entità di emorragia è classificata come ischemica. L'edema maculare è quasi universalmente presente nei casi ischemici e spesso è grave. Si può presentare come grandi spazi cistoidi o diffusa perdita all'esame angiografico. Può essere oscurato dall'emorragia, ma non appena questa e l'edema si risolvono, può divenire evidente l'ischemia maculare. La FAG mostra anche diffusione di colorante dalla papilla e, negli stadi tardivi di malattia, ipoperfusione estesa generalizzata, circoli collaterali artero-venosi e microaneurismi. La regione maculare mostra edema persistente o degenerazione pigmentaria.

Nella OVCR non ischemica è minima o assente l'ipoperfusione capillare, ma la FAG evidenzia colorazione lungo le vene retiniche, microaneurismi e capillari della testa del nervo ottico dilatati. Come la OVCR non ischemica si risolve, l'angiogramma può ritornare normale. Se l'edema maculare persiste o si manifestano alterazioni pigmentarie, queste divengono evidenti.

Anche nel caso di una OVBR è necessario eseguire un esame fluoroangiografico, che mostrerà le alterazioni tipiche: emorragie retiniche nell'area di distribuzione del ramo occluso; ramo venoso interessato dilatato e tortuoso; possibile edema maculare settoriale, diffuso o cistoide; possibile neovascolarizzazione retinica (figura 3).

Fig. 3. Fluorangiografiaretinica in un paziente affetto da OVCR.



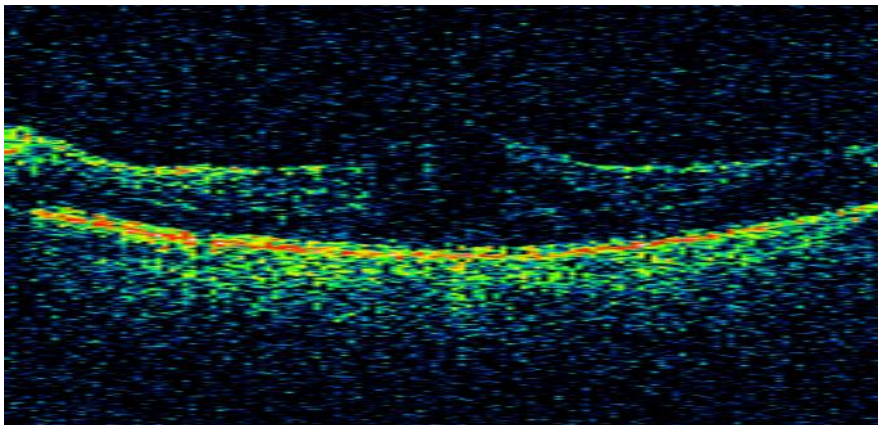
Tomografia a coerenza ottica (OCT)

La tomografia a coerenza ottica è una tecnica di diagnosi per immagini che permette in vivo l'analisi delle strutture retiniche mediante sezioni tomografiche ad alta risoluzione (7-10 micron) della retina, senza alcun atto invasivo. L'OCT è così denominato perché è essenzialmente una metodica tomografica, cioè fornisce in vivo immagini dei tessuti in esame, analogamente alla TAC o alla RMN. L'OCT esamina la diversa riflettività ottica delle singole strutture componenti il tessuto esaminato. Questa tecnica si basa sulla misurazione del ritardo (rispetto ad un raggio di riferimento) della luce retrodispersa dai diversi strati del tessuto retinico. Più semplicemente l'OCT funziona come un ecografo che utilizza la luce al posto degli ultrasuoni: viene infatti proiettato un fascio di luce

della lunghezza d'onda di 820 nm, che viene riflesso e retrodiffuso dalle microstrutture dei tessuti. La comparazione degli echi di luce riflessa, con l'eco ottenuto da uno specchio posto ad una distanza nota, dà origine al fenomeno dell'interferenza. L'elaborazione dei dati permette poi la ricostruzione di tomogrammi, rappresentati con scale di grigi e con scale di falsi colori, con una risoluzione assiale di 10 micron ed una trasversa di 20 micron. Questa tecnica permette di effettuare uno studio sia qualitativo che quantitativo della patologia retinica ed è un presidio di eccellenza per lo studio della regione maculare anche in considerazione della scarsa invasività e dell'alta riproducibilità. L'OCT permette di evidenziare e misurare: l'alterata morfologia retinica, la presenza di iperreflettività o iporeflettività, aree otticamente vuote, lo spessore retinico, lo spessore degli strati retinici e delle fibre nervose. Le immagini ottenute possono essere analizzate, quantificate, memorizzate e confrontate fra esami successivi.

I limiti di questa tecnica sono dati dal fatto che le scansioni si possono ottenere soltanto al polo posteriore, è utile una buona midriasi (anche se talvolta si possono ottenere buone immagini anche a pupilla reagente, mentre le immagini a pupilla miotica sono molto difficili da ottenere), è necessaria una buona trasparenza dei mezzi diottrici e una buona idratazione corneale, con un film lacrimale normale o lacrime artificiali. L'esame può risultare difficile o impossibile da eseguire in caso di nubes o edema corneale, opacità importanti del cristallino, torbidità del vitreo ed emorragie vitreali. L'edema maculare è evidenziabile molto meglio all'OCT come aumento diffuso dello spessore retinico e dalla presenza di aree intraretiniche a riflettività ridotta. Di solito questo accumulo di liquido ha un aspetto cistico. Non è inoltre infrequente osservare accumulo di liquido sottoretinico e distacco della retina neurosensoriale (figura 4).

Fig. 4. Tomografia a coerenza ottica in un paziente affetto da OVCR.



TERAPIA

Fino ad oggi, non esistono studi conclusivi sulla validità di terapie sistemiche nel favorire un recupero funzionale in pazienti colpiti da malattia occlusiva venosa della retina. Sicuramente, la complessa patogenesi di questa affezione richiede che siano ricercati ed eventualmente trattati i fattori di rischio prima di eseguire una terapia per le sequele.

Numerosi sono i trattamenti proposti per la cura della trombosi venosa retinica o per favorirne il recupero visivo; esse includono l'acido acetilsalicilico, farmaci antiinfiammatori, l'emodiluizione, la plasmaferesi, anticoagulanti orali o sistemici, fibrinolisi sistemica o intravitreale con alteplase, cortisonici.

Le opzioni di trattamento attuali infatti, si concentrano principalmente sulle sequele dell'occlusione venosa retinica: l'edema maculare (ME), la neovascolarizzazione retinica, l'emorragia endovitrea ed il distacco di retina.

Esistono numerosi studi che indagano la sicurezza e l'efficacia delle diverse terapie sistemiche o locali; essi trovano tuttavia limitazioni nel numero ristretto del campione, nel periodo di follow-up eccessivamente corto, nell'assenza od inadeguatezza di un gruppo di controllo. Proprio per questo i dati forniti da alcuni di questi studi clinici sono tra loro discordanti.

Negli ultimi anni molti ricercatori hanno dimostrato un crescente interesse verso l'utilizzo intravitreale "off-label" di farmaci corticosteroidi ed anti fattore di crescita dell'endotelio vascolare (anti-VEGF) nella terapia dell'edema maculare, come il triamcinolone^{xixxxxixxiixxi}. Nonostante non esistano ancora trials clinici randomizzati e controllati che confermino la loro efficacia e sicurezza, si sono raccolti molti risultati incoraggianti (lo studio americano SCORE *Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion* è attualmente in corso).

Gli antiangiogenetici, come il bevacizumab, sono ad oggi, i farmaci più utilizzati per via intravitreale. La somministrazione per via intravitreale consente l'impiego efficace di concentrazioni minime di antiangiogenetici con significativa riduzione di effetti collaterali sistemici tipici della via parenterale. Questi farmaci sembrano essere utile sia nella significativa riduzione dell'edema maculare che nella gestione delle neovascolarizzazioni^{xxivxxxvixxvii}.

Per quanto riguarda la OVCR Lo studio randomizzato "Central Vein Occlusion Study (CVOS)" ha dimostrato che la fotocoagulazione a griglia maculare non migliora l'acuità visiva nei pazienti colpiti da malattia non ischemica^{xxviii}. Inoltre, in questo studio, è stato osservato che in occhi con almeno 10 aree papillari di non perfusione retinica, un trattamento fotocoagulativo diffuso non preveniva lo sviluppo di neovascolarizzazione del segmento anteriore. Per tale motivo il CVOS conclude consigliando un atteggiamento più attendista e conservativo, aspettando l'eventuale insorgenza di una vascolarizzazione dell'iride o dell'angolo irido corneale, prima di iniziare un trattamento panfotocoagulativo. Una ulteriore motivazione ad adottare questo tipo di atteggiamento è stata l'evidenza, sempre in questo studio, di una regressione della vascolarizzazione nel 56% degli occhi non trattati in precedenza contro il 22% degli occhi trattati con panfotocoagulazione preventiva^{xxix}.

L'approccio chirurgico mediante la guainotomia dell'incrocio artero-venoso che dermina la separazione dell'arteria retinica dalla vena mediante la creazione di un'incisione nella guaina avventiziale adiacente ad un incrocio artero-venoso e la scissione delle adesioni ha dato risultati non così soddisfacenti come pure la neurtomia radiale del nervo ottico (RON). La neurtomia radiale del nervo ottico rappresenta un tentativo di trattare il restringimento della vena centrale della retina a livello della lamina cribrosa da riservare alle OVCR non ischemiche^{xxx}.

SCOPO DEL LAVORO

La valutazione qualitative e quantitative della tortuosità dei vasi retinici nella occlusione della vena centrale retinica (OVCR) non è stata oggetto di pubblicazioni scientifiche fino ad oggi, anche se la tortuosità dei vasi retinici è un segno oculare riscontrabile in molti pazienti affetti da questa malattia e la sua presenza, in associazione agli altri segni oftalmologici rilevabili all'esame del fundus, costituisce un importante elemento diagnostico. Peraltro la valutazione puramente clinica della tortuosità dei vasi retinici è assai difficoltosa e si limita a giudizi clinici approssimativi. Si tratta infatti di una valutazione molto soggettiva (sia in rapporto alla tortuosità di ogni singolo vaso che sul numero dei vasi ritenuti tortuosi), con possibilità di differenze anche molto significative sia fra un operatore e l'altro e anche per osservazioni ripetute dello stesso. Infine un'analisi puramente clinico-osservativa della tortuosità dei vasi retinici non fornisce parametri quantitativi, del tutto indispensabili per una valutazione oggettiva e per considerazioni di tipo statistico.

Pertanto lo scopo principale del presente lavoro è anzitutto quello di mettere a punto una metodica per la quantificazione oggettiva della tortuosità dei vasi retinici mediante analisi computerizzata di immagini digitalizzate del fondo oculare (retinografia) di pazienti affetti da OVCR rispetto a pazienti sani. Successivamente valuteremo se i parametri di tortuosità calcolati hanno un valore predittivo per lo sviluppo di OVCR, comparando il gruppo di occhi adelfi dei pazienti con OVCR rispetto ai controlli sani .

CASISTICA

Nel nostro lavoro abbiamo studiato in modo retrospettivo, una serie di pazienti con diagnosi clinica di OVCR e un gruppo di pazienti sani, in due ospedali della Toscana, nel periodo compreso fra il Gennaio e il Novembre 2008.

Il gruppo di studio era costituito da 28 pazienti affetti da OVCR e 28 controlli, reclutati presso la Clinica Oculistica dell'Università degli Studi di Firenze e l'ospedale Civile di Pistoia. La diagnosi clinica è stata posta sulla base della visita effettuata da due esperti retinologi dopo attento esame del fundus. Tutti pazienti arruolati nello studio presentavano i sintomi d'insorgenza della patologia da meno di 90 giorni. Erano esclusi pazienti con diabete mellito e ipertensione arteriosa di grado medio o severo. Tutta la popolazione in studio non presentava altre alterazioni oculari (ad eccezione di quelle caratteristiche della OVCR nell'occhio affetto). Il segmento anteriore dell'occhio risultava in tutti i casi considerati in quiete, la tensione endoculare misurata con tonometro ad applanazione di Goldmann doveva essere sempre inferiore a 20 mmHg.

.

PROTOCOLLO DI INDAGINE

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a visita oculistica standard con valutazione dell'acuità visiva, misurazione della pressione endoculare, esame biomicroscopico del segmento anteriore, esame biomicroscopico del segmento posteriore dopo midriasi farmacologica (Tropicamide 1% collirio).

Successivamente tutti i soggetti venivano sottoposti a retinografia a colori con retinografo *Zeiss*. L'immagine veniva ottenuta facendo fissare al paziente l'obiettivo del retinografo; in tal modo veniva sempre ottenuta una fotografia centrata sul polo posteriore, che conteneva la regione maculare e il disco ottico, le arcate vascolari temporali e parte delle arcate vascolari nasali.

Successivamente le immagini sono state elaborate attraverso uno specifico software appositamente predisposto per l'analisi computerizzata della tortuosità dei vasi retinici. Il software (descritto in dettaglio nel capitolo seguente) fornisce per ogni occhio esaminato quattro indici matematici che descrivono la tortuosità di un percorso.

NUOVO SOFTWARE PER LO STUDIO COMPUTERIZZATO DELLA TORTUOSITA' DEI VASI RETINICI

Presso il *Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Siena*, in collaborazione con la *Clinica Oculistica dell'Università di Firenze*, è stato elaborato uno specifico software per lo studio computerizzato della tortuosità dei vasi retinici. E' stato anzitutto costruito uno strumento in grado di estrarre i vasi sanguigni da un'immagine digitale; una volta acquisito il percorso che rappresenta il vaso è possibile studiarne la tortuosità ottenendo informazioni importanti sullo stato della patologia del paziente.

Il lavoro consiste nell' implementazione di un metodo di estrazione dei vasi sanguigni che sfrutta la teoria dei grafi, ed il risultato è uno strumento in grado di estrarre un vaso sanguigno da un'immagine biomedica semplicemente indicando sull'immagine stessa con il mouse, il punto di inizio e di fine del vaso che si vuol studiare.

L'algorithmo usato si chiama A^* , esplora i punti dell'immagine analizzando vari percorsi che potrebbero rappresentare il vaso e troverà quello richiesto tramite un metodo di ottimizzazione che dà come risultato il cammino ottimo, tale risultato è ottenuto basandosi su due semplici considerazioni:

Su immagini a livelli di grigio, i vasi sanguigni hanno un valore del livello di grigio minore rispetto allo sfondo (sono più scuri)

Dati il punto di inizio e di fine del vaso da estrarre, il percorso che li unisce deve essere il più breve possibile, inoltre il percorso trovato dovrà essere sempre compreso all' interno del vaso

In pratica l'algorithmo parte dal punto iniziale del vaso a ricercare tra i punti più scuri (che vengono considerati appartenenti al vaso), quelli che lo porteranno al punto finale. Queste considerazioni danno origine alla funzione di costo alla base del funzionamento dell'algorithmo di estrazione, determinando il percorso interno al vaso sanguigno che unisce il punto di inizio e di fine selezionati inizialmente.

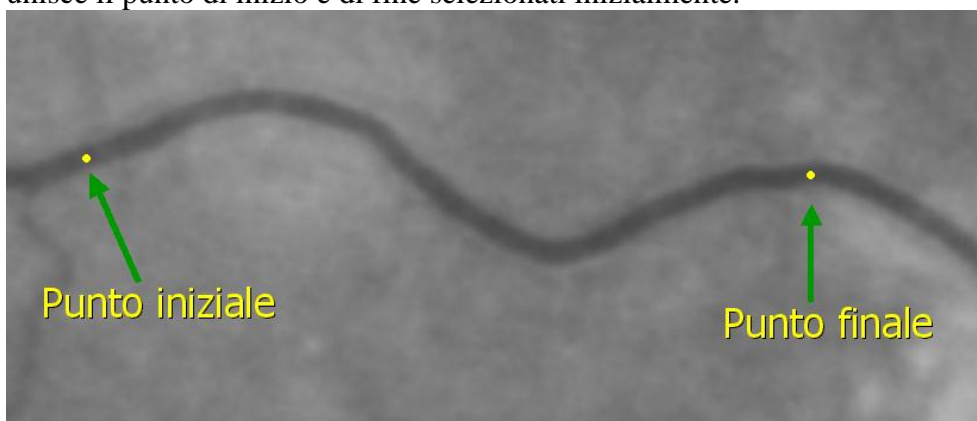


Fig. 5 a: Vengono immessi i punti iniziali e finali sull'immagine

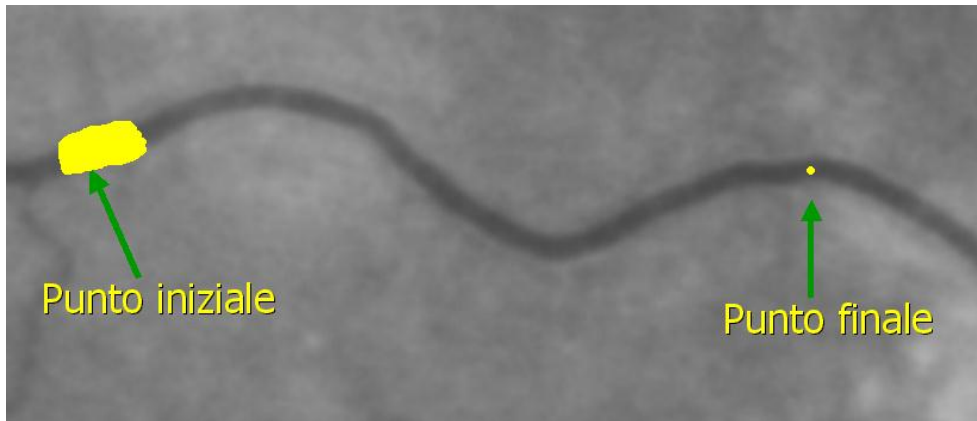


Fig. 5 b: L'algoritmo inizia l'esplorazione partendo dal primo punto

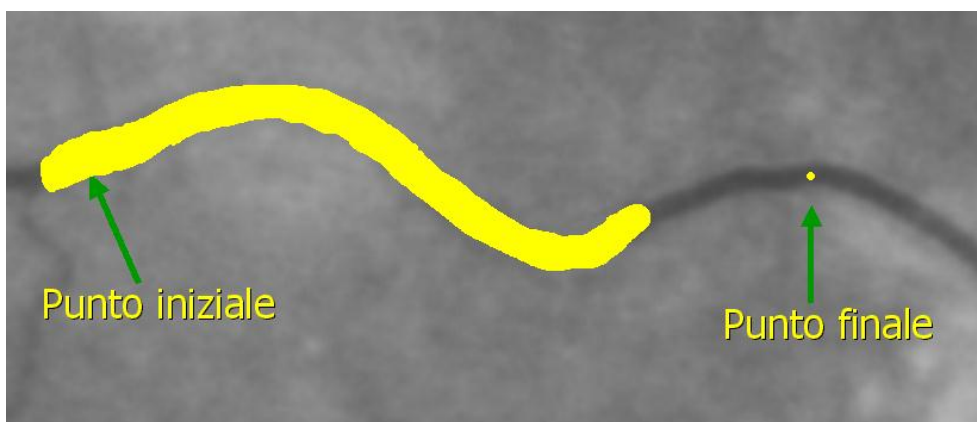


Fig. 5 c: L'esplorazione continua in direzione del secondo punto immesso

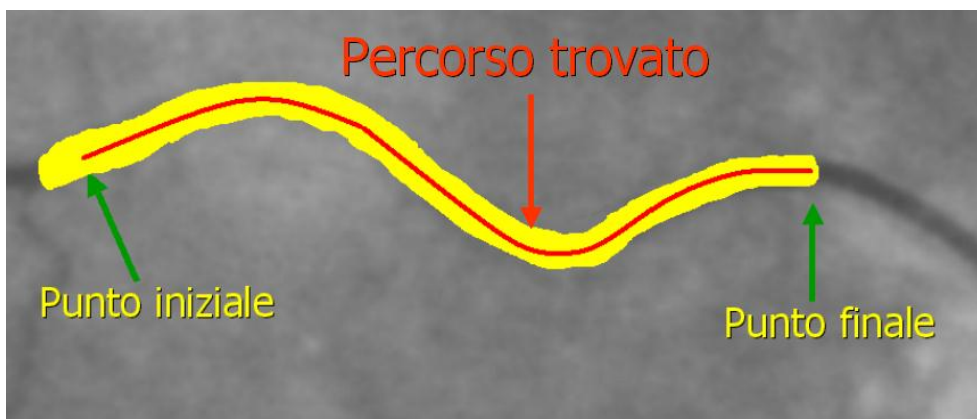


Fig. 5 d: Appena si incontra il punto finale l'algoritmo restituisce il percorso che rappresenta il vaso

Le figure 5 a, b, c, d, Illustrano le varie fasi di ricerca del percorso rappresentante il vaso sanguigno

Una volta trovato il percorso, il programma effettua delle operazioni di post-processing per rendere più lineare il percorso trovato ed eliminare eventuali artefatti dovuti ad imperfezioni all'interno dell'immagine della retina. Questo processo, si basa sulla

teoria delle curve polinomiali, che approssimano l'andamento del vaso tramite curve parametriche chiamate Spline^{xxx}.

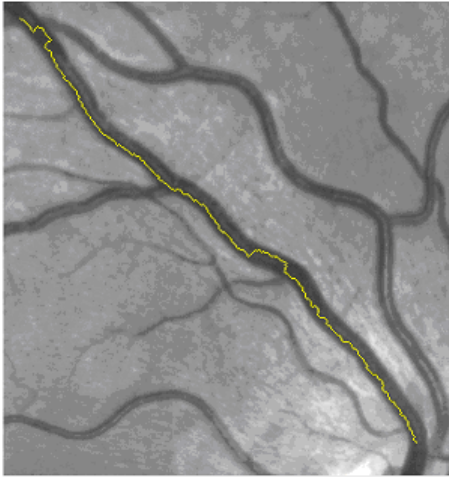
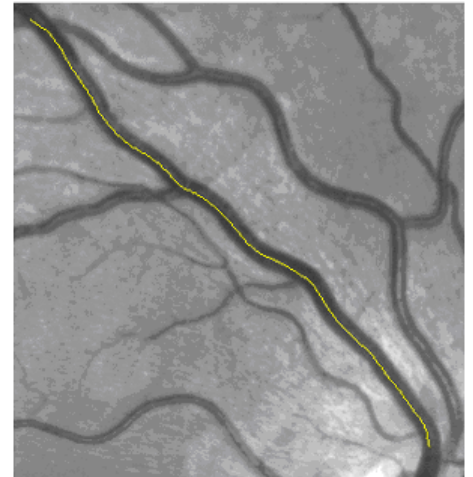


Fig 6 a) Percorso ottenuto con l'algoritmo A*



b) Percorso linearizzato nella fase di postproc.

ANALISI DELLA TORTUOSITA'

Per ottenere una misura clinicamente espressiva di tortuosità, cioè una misura che può comprendere la valutazione degli oftalmologi, è necessario rendere esplicite alcune proprietà della tortuosità, usando una formulazione matematica adeguata.

Le due caratteristiche principali da considerare per raggiungere una definizione di tortuosità, si possono esprimere così:

Numero di torsioni

Più grande è il numero di cambiamenti nel segno della curvatura (torsione), più tortuoso il vaso può essere considerato

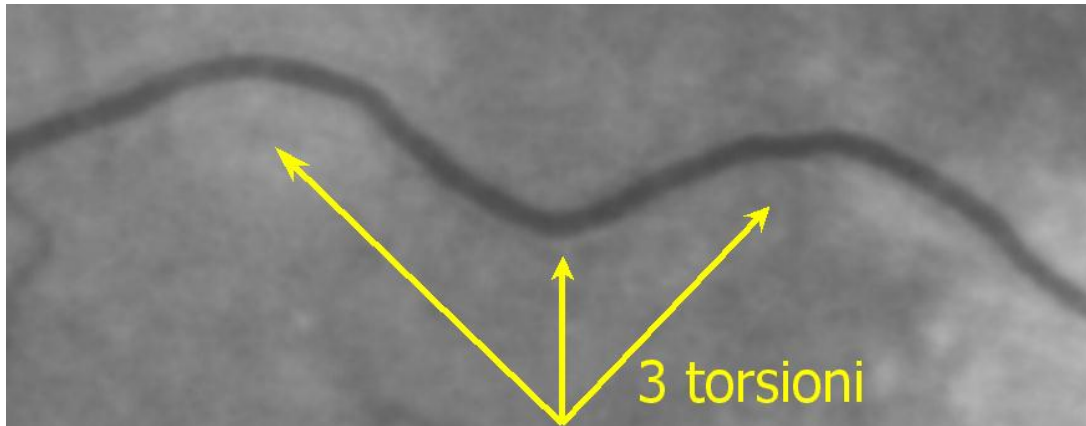


Fig. 7. Numero di torsioni

Ampiezza della torsione

Più grande è l'ampiezza di una torsione (distanza massima della curva dalla corda che unisce i punti finali), più grande è la tortuosità

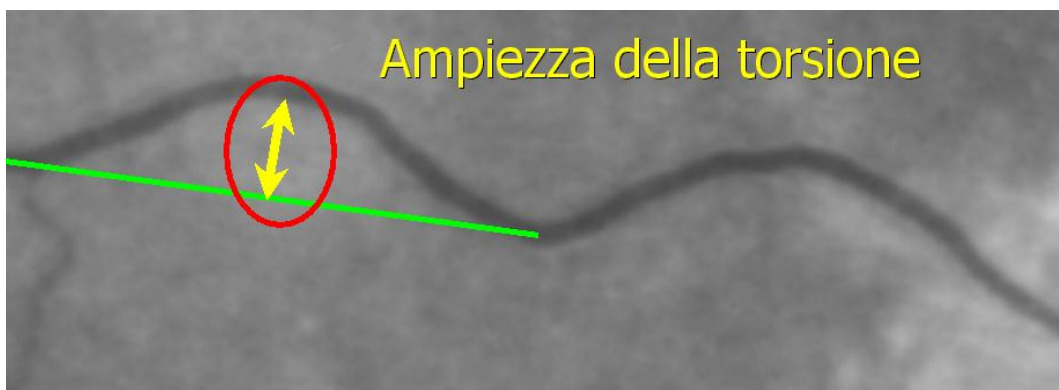


Fig. 8: ampiezza della torsione

Per due vasi che hanno torsioni con la stessa ampiezza, la differenza nella tortuosità varia con il numero di torsioni e di conseguenza, per due vasi con lo stesso numero di torsioni (con la stessa frequenza), la differenza nella tortuosità dipende dalla differenza in ampiezza delle torsioni.

Alla luce di queste proprietà che aiutano a definire il concetto di tortuosità, verranno esaminati alcuni indici implementati nell' algoritmo, fornendo per ognuno un approfondimento teorico e alcune considerazioni su pregi e difetti.

Lunghezza relativa

Il primo indice derivante dalle proprietà sopra elencate, per misurare la tortuosità del vaso, è la lunghezza relativa detto anche metrica distanza, definita come:

$$LR = \frac{L - l}{l}$$

Dove L è la lunghezza totale del vaso sanguigno (arco) e l è la lunghezza della linea che unisce i punti finali del vaso (corda) (Figura 9).

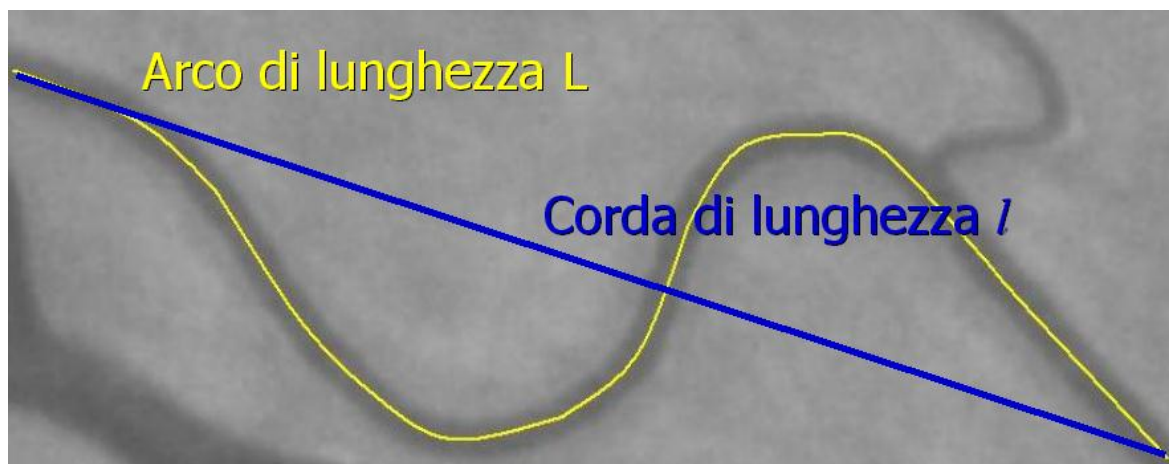


Fig 9. Rappresentazione del vaso sanguigno e della linea che unisce i punti finali, come arco e corda

Questo è l'indice più semplice da realizzare e maggiormente usato per la misura di tortuosità del vaso. L'idea usando questo rapporto è la seguente: più grande è la differenza tra L e l , più distante è il vaso da una linea retta cioè, tortuoso. La lunghezza relativa si basa esclusivamente sulla seconda caratteristica della tortuosità, ovvero considera solo l'ampiezza e non il numero delle torsioni. Ciò induce un primo difetto dell'indice. Consideriamo un vaso avente forma simile ad un arco del cerchio, visto che

la superficie della retina ha una forma semi-sferica, dovrebbe essere classificato come non tortuoso. Infatti, ogni vaso che ha una curvatura costante e piccola, indipendentemente dall'ampiezza dell' arco che descrive (per quanto riguarda i vasi retinici principali), verrà considerato dall'oftalmologia a tortuosità trascurabile. Al contrario la lunghezza relativa classifica tali vasi come tortuosi visto che la differenza tra l'arco e la corda in tali casi è elevata. Una seconda situazione in cui l'indice non fornisce buoni risultati, si presenta quando due vasi con tortuosità apparente molto differente (un'esempio è illustrato nella figura 10), avranno lo stesso rapporto inducendo un errore anche nella successiva classificazione.

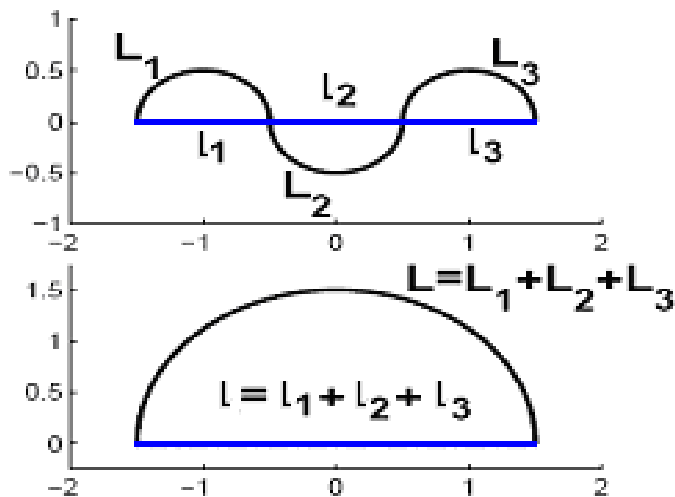


Fig 10. Esempio di curve di forma differente con uguale lunghezza relativa

SOAM (Metrica della Somma degli Angoli)

E' una misura di tortuosità che somma per ogni punto appartenente alla curva

rappresentante il vaso sanguigno, l'angolo compreso tra una terna di punti del percorso

(a distanza prefissata) lungo la curva. La misura viene poi normalizzata con la

lunghezza del percorso:

$$SOAM = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^n (\pi - \alpha_i)$$

Per $i = 1, \dots, N$ con N numero dei punti del percorso in cui viene misurato l'angolo, α_i è l'angolo formato dai tre punti (Figura 11 a, b) che può assumere un valore massimo (nel caso in cui i tre punti siano sulla stessa linea, ovvero vaso diritto) di 180 gradi.

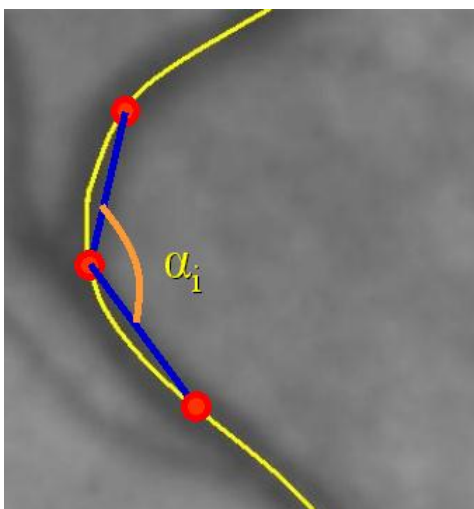
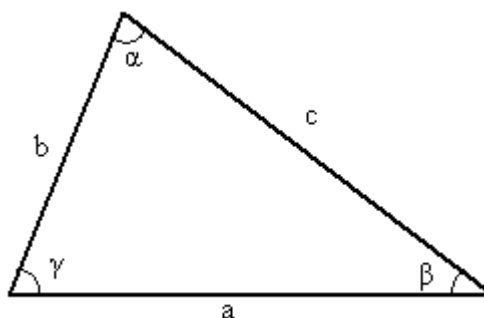


Fig 11.a) Angolo α_1 dell'angolo α



b) Triangolo usato per la misura

Ogni punto del percorso rappresenta il vertice alto di un triangolo che ha i restanti due vertici in punti sempre appartenenti al percorso ad una distanza fissa dal vertice alto. Ad esempio se stiamo considerando il cinquantesimo punto del percorso e la distanza fissata è di dieci punti, la terna è completata dal quarantesimo e dal sessantesimo punto, i tre punti insieme formano un triangolo di cui vogliamo misurare l'angolo α_i nel vertice superiore (Figura 11 b).

L'angolo α_i è calcolato grazie alle formule trigonometriche relative ai triangoli, in particolare viene usato il teorema del coseno, una generalizzazione del teorema di pitagora nel caso di triangoli non rettangoli^{xxxii}.

In pratica il funzionamento del SOAM si basa sull'idea che un vaso tortuoso avrà angoli α con basso valore che portano ad avere un valore dell'indice alto.

Malgrado alcuni difetti di sensibilità al rumore, il SOAM è particolarmente efficace in molte situazioni, ad esempio nella classificazione di vasi che hanno torsioni ad alta frequenza e ampiezza non elevata.

PAD (Prodotto Angoli Metrica Distanza)

E' calcolato come prodotto tra gli indici SOAM e lunghezza relativa:

$$PAD = SOAM * LR$$

Il maggior difetto del SOAM è l'alta sensibilità al rumore, al contrario la lunghezza relativa è molto robusta per quanto riguarda tale tipo di disturbo. L' idea è che facendo il prodotto dei due termini l'indice risultante sarà più robusto al rumore mantenendo le buone caratteristiche del SOAM.

I2EVAR (Indice Triangolo)

Per ogni punto i del percorso si costruisce un triangolo con un vertice nel punto

considerato e gli altri due, nei punti $i - \varepsilon$ (*ε punti prima di i*) e $i + \varepsilon$ (*ε dopo i*), dove ε è

un valore costante fissato a priori oppure variabile da 1 fino ad un massimo prefissato

(Figura 12). Una volta costruiti i triangoli viene calcolato il rapporto tra la somma dei

lati minori ed il lato maggiore, per ogni punto il rapporto viene sommato e

normalizzato con il numero dei punti considerati:

$$I1 = \frac{\left[\sum_i (b_i + c_i) / a_i \right]}{N} - 1$$

per $i = 1, \dots, N$ con N numero totale dei punti in cui viene costruito il triangolo (tutti i punti del percorso tranne i primi ε e gli ultimi ε); ai è la lunghezza del lato maggiore del triangolo (vale a dire la distanza euclidea tra i punti $i - \varepsilon$ e $i + \varepsilon$), bi e ci quella dei lati minori (rispettivamente le distanze euclidee tra i punti $i - \varepsilon$; i e i ; $i + \varepsilon$). Nell'indice $I1$, ε è fisso. Viene sottratto 1 in modo che un segmento completamente diritto abbia indice pari a zero, dato che il valore minimo che può assumere la sommatoria è N . Nel secondo indice, ε varia da un minimo m fino ad un massimo M . L'indice $I2$ è determinato dalla somma degli $I1$ calcolati per ogni valore di ε compreso nell'intervallo $[m, M]$.

$$I2 = \frac{\sum_n I1_n}{(M - m)}$$

con $n = 1, \dots, (M - m)$, dove $(M - m)$ è il numero di volte che viene calcolato $I1_n$.

E' stata implementata anche una differente versione del precedente indice, costruendo il triangolo non per ogni punto i del percorso, ma uno ogni ε punti. L'indice è chiamato $I2\varepsilon$. Gli indici risultanti sono meno efficaci dei precedenti in alcuni casi, guadagnando però nella complessità computazionale.

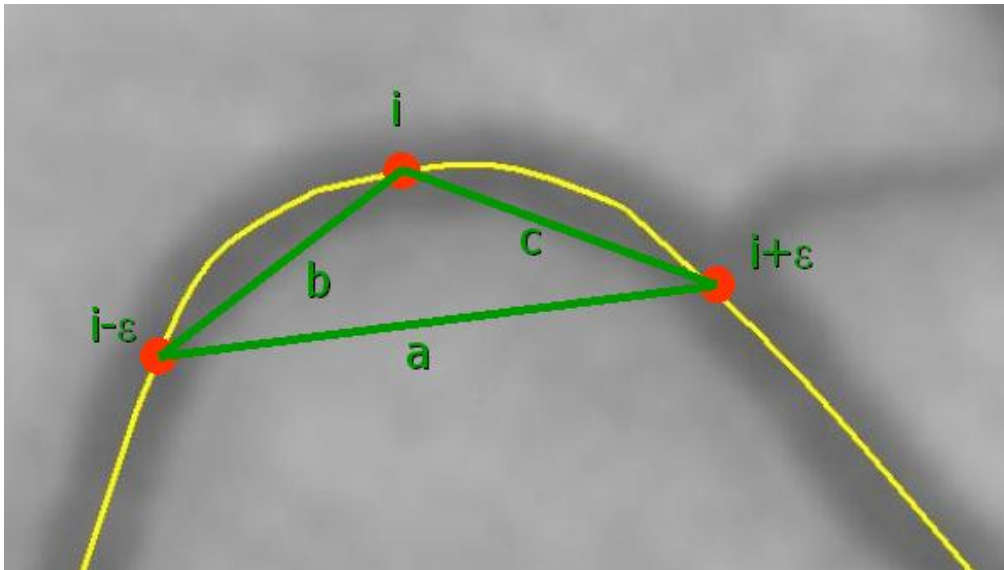


Fig 12. Esempio di triangolo costruito per l' indice I1.

Questo tipo di indice nasce dall' osservazione che la somma dei due lati maggiori del triangolo sarà sempre maggiore o uguale rispetto al lato maggiore (proprietà nota come disuguaglianza triangolare), si ha uguaglianza nel caso in cui il segmento considerato sia completamente diritto, in questo caso l' indice avrà valore zero. All' aumentare della tortuosità la somma delle lunghezze dei lati b e c aumenta rispetto alla lunghezza del lato a con conseguente aumento dell' indice di tortuosità. L' indice $I_{2\varepsilon}$ non è semplicemente una replica dell' indice precedente “*velocizzato*”, perché è vero che considerando meno punti si può perdere informazione importante, però analizzando la linea che rappresenta il vaso, si scopre che la presenza di variazioni del percorso che hanno inizio e fine in un piccolo intervallo, spesso sono da attribuire a errori dovuti alla quantizzazione o alla tecnica di inseguimento del vaso. Se questi “*salti*” repentini saranno minori dell' intervallo ε , l' ultimo indice può risultare più robusto al rumore del precedente (figura 12).

In letteratura viene descritto un altro software dedicato allo studio computerizzato della tortuosità dei vasi retinici. Il suddetto software è denominato **RISA** (*Retinal Image*

multiScale Analysis) ed è stato applicato finora allo studio della tortuosità vasale nei pazienti affetti da retinopatia del pretermine^{xxxiiixxxivxxxv} e da ipertensione arteriosa^{xxxvixxxvii}.

Le informazioni tecniche riportate nelle pubblicazioni non ci consentono una precisa valutazione comparativa delle analogie e delle differenze fra il nostro software e il programma RISA. Va peraltro sottolineato che in entrambi i casi si tratta di metodiche semiautomatiche, che cioè utilizzano una procedura di analisi informatizzata e forniscono dati quantitativi a partire dall'analisi di segmenti vascolari che vengono comunque selezionati da un operatore. Rispetto al software RISA il nostra programma fornisce peraltro un pool di parametri matematici espressione delle tortuosità consentendoci di valutare quali di essi siano più idonei a caratterizzare la tortuosità vasale nelle singole patologie.

PROCEDURA DI UTILIZZO DEL SOFTWARE

La procedura di utilizzo del software descritto viene effettuata con le seguenti modalità:
Acquisizione dell'immagine digitale del fondo oculare con retinografo Zeiss, secondo le modalità di ripresa precedentemente descritte

Trasferimento delle immagini in formato bitmap

In ogni occhio esaminato selezione dei cinque vasi più tortuosi a giudizio dei due operatori

Vengono selezionati vasi di diametro intermedio, escludendo le strutture vascolari di maggior diametro e le piccole reti capillari

La selezione dei vasi avviene senza cercare di distinguere arterie e vene; tale distinzione infatti non è sempre agevole sulla base delle immagini retinografiche.

Vengono selezionati dei segmenti vascolari che presentino sempre approssimativamente la stessa lunghezza. In particolare si usa come riferimento una lunghezza standard pari a **quattro diametri papillari**; successivamente, una volta selezionato il segmento vascolare d'interesse, lo stesso software ne fornisce la lunghezza in pixels e l'operatore verifica che il segmento prescelto sia sempre compreso fra **280 e 300 pixels**.

La selezione avviene inserendo nell'immagine in esame con un apposito cursore un punto di inizio, un punto intermedio ed un punto di fine del distretto vascolare prescelto; il segmento vascolare selezionato viene quindi evidenziato nell'immagine. La modalità pratica di selezione del segmento vascolare sono mostrate in Fig. A1 ed A2

Una volta selezionato il percorso vascolare prescelto il software calcola in tempo reale di 1-2 secondi i parametri di tortuosità relativi appunto al segmento vascolare prescelto

Per ogni occhio può essere effettuata una media dei valori ottenuti nei cinque vasi prescelti (i cinque più tortuosi a giudizio dei due operatori) e dunque alla fine si ottengono per ogni occhio i valori di quattro parametri matematici di tortuosità relativi a quell'occhio.

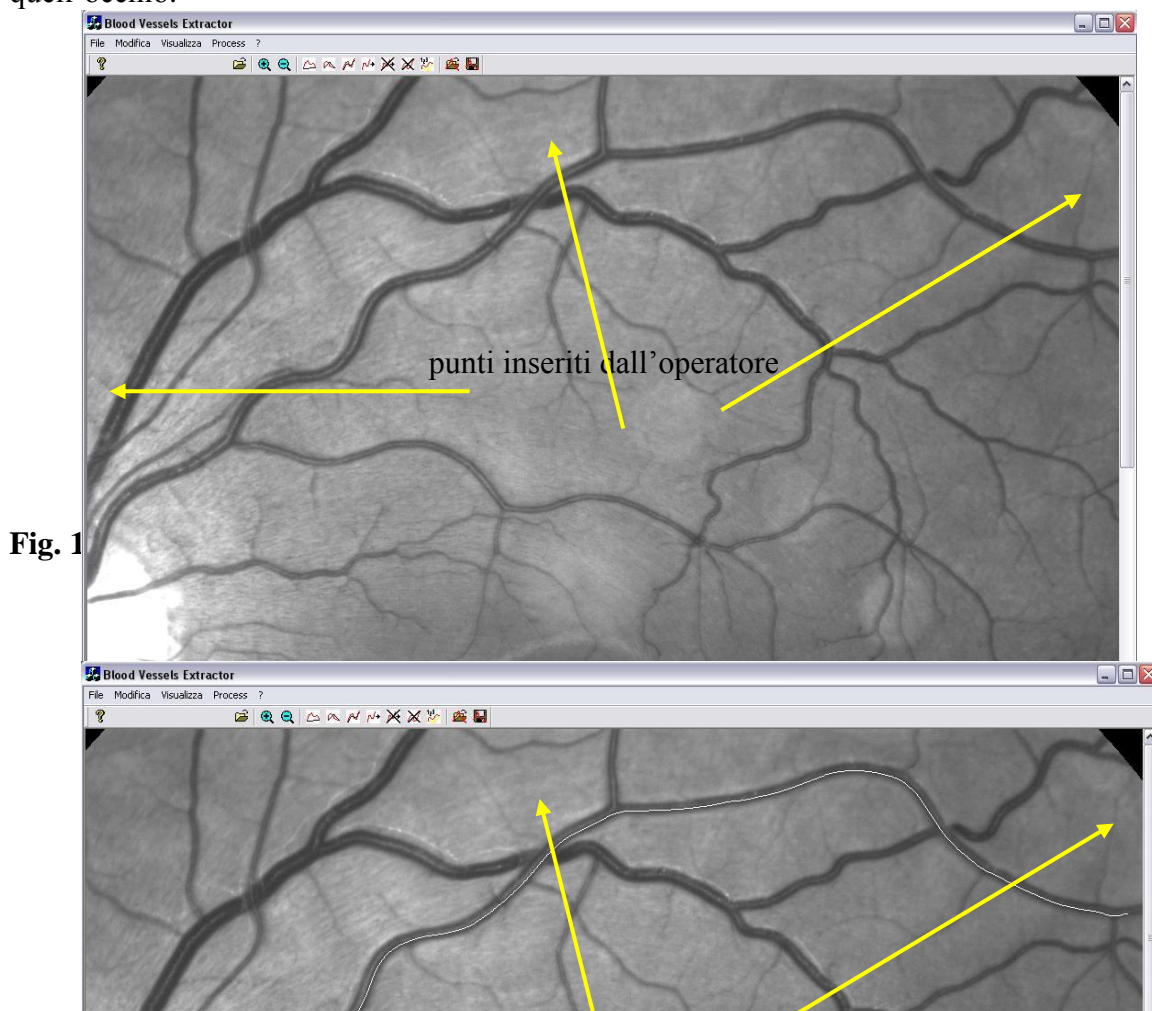



Fig. 1



percorso del segmento vascolare selezionato

Fig. A2. Procedura di selezione semiautomatica del percorso vascolare da analizzare

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata con l'impiego del programma *SPSS 15.0*. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS) per i dati parametrici e come mediana e range per i non parametrici.

Abbiamo utilizzato il *test Mann-Whitney* per i dati non parametrici per confrontare i singoli gruppi. Il *test di Wilcoxon* è stato utilizzato per confrontare i dati appaiati non parametrici. I valori $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

L'analisi statistica è stata compiuta eseguendo le seguenti valutazioni, utilizzando i tests indicati:

Confronto della tortuosità vasale fra l'occhio affetto dei pazienti con OVCR e l'occhio adelfo.

Confronto dei parametri di tortuosità fra i soggetti normali e l'occhio affetto da OVCR dei pazienti.

Confronto dei parametri di tortuosità fra i soggetti normali e l'occhio adelfo dei pazienti con OVCR.

RISULTATI

La nostra casistica comprende 28 pazienti con OVCR, di cui 15 (56.4%) erano maschi, 13 (43.6 %) erano femmine. L'età media era pari a $67,3 \pm 10,9$ anni (Mediana=70). Tutti i pazienti, nel corso della visita oculistica, presentavano nell'occhio affetto tortuosità dei vasi retinici e emorragie retiniche (100%); l'edema maculare era presente in 20/28, gli essudati cotonosi in 14/28 occhi, aree di ischemiche alla periferia retinica in 9/28 soggetti.

Il gruppo di controllo era costituito da 28 soggetti sani. Di questi 14 (50%) erano maschi. L'età media era pari a $70,2 \pm 7,2$ anni (Mediana= 72).

Il confronto fra i valori medi di età, livello di pressione intraoculare fra il gruppo dei pazienti con OVCR ed il gruppo dei soggetti di controllo non ha mostrato differenze statisticamente significative. Anche la valutazione della composizione per sesso è risultata sostanzialmente analoga nei due gruppi.

Nell'occhio affetto da OVCR gli indici di tortuosità **Lunghezza relativa, SOAM, PAD, I2EVAR** erano più elevati rispetto all'occhio adelfo dei pazienti; tale differenza raggiungeva una elevata significatività statistica. Gli specifici risultati sono mostrati in dettaglio nelle Tabelle **I**.

Al contrario il confronto dei parametri di tortuosità (**Lunghezza relativa, SOAM, PAD, I2EVAR**) fra occhio destro e sinistro, per i soggetti normali non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Elevata significatività statistica è stata riscontrata anche tra gli indici di tortuosità **Lunghezza relativa, SOAM, PAD, I2EVAR** dell'occhio affetto da OVCR rispetto alla popolazione di controllo. I valori suddetti sono risultati più elevati negli'occhi affetti da OVCR. Gli specifici risultati sono mostrati in dettaglio nelle Tabelle **II**.

Infine il confronto dei parametri di tortuosità fra i soggetti normali e quelli dell'occhio adelfo dei pazienti affetti da OVCR ha messo in evidenza che alcuni parametri di tortuosità (**Lunghezza relative p = 0,338, I2EVAR p = 0,154**) non presentano differenze statisticamente significative nei due gruppi. Mentre una debole significatività statistica è stata riscontrata per il **PAD p = 0,087** e una buona sensibilità per il **SOAM p = 0,015** (valori più elevati nei pazienti affetti da OVCR rispetto al gruppo di controllo). Gli specifici risultati sono mostrati in dettaglio nelle Tabelle **III**.

TABELLE RISULTATI

Le successive tabelle mostrano in dettaglio i risultati dello studio ed il valore di significatività statistica delle differenze riscontrate.

Tabella I CONFRONTO DEI PARAMETRI DI TORTUOSITA' VASALE TRA OCCHI AFFETTI E OCCHI ADELFI DEI PAZIENTI CON OVCR.

	Lun. Rel Occhio affetto	Lun. Rel Occhio adelfo	p	SOAM Occhio affetto	SOAM Occhio adelfo	p
N. occhi	28	28	0,00 3	28	28	0,00 0
Media± DS (su 5 vasi)	3,59±0,5 3	3,00±0,7 0		3,12±0,5 3	2,52±0, 57	

	PAD Occhio affetto	PAD Occhio adelfo	p	I2EVAR Occhio affetto	I2EVAR Occhio adelfo	P
N. occhi	28	28	0,00 0	28	28	0,00 0
Media± DS (su 5 vasi)	3,18±0,6 8	2,45±0,7 6		3,07±0,6 4	2,37±0, 56	

NOTE: lun.rel= lunghezza relativa; SOAM=metrica della somma degli angoli; PAD=prodotto angoli metrica distanza; I2EVAR=indice triangolo; DS= deviazione standard

Tabella II CONFRONTO DEI PARAMETRI DI TORTUOSITA' TRA OCCHII AFFETTO DA OVCR DEI PAZIENTI E OCCHII DEI CONTROLLI SANI.

	Lun. Rel Occhio affetto	Lun. Rel Occhio controllo	p	SOAM Occhio affetto	SOAM Occhio controllo	p
N. occhi	28	28	0,027	28	28	0,000
Media± DS (su 5 vasi)	3,59±0,53	3,19±0,70		3,12±0,53	2,17±0,32	

	PAD Occhio affetto	PAD Occhio controllo	p	I2EVAR Occhio affetto	I2EVAR Occhio controllo	P
N. occhi	28	28	0,000	28	28	0,000
Media± DS (su 5 vasi)	3,18±0,68	2,07±0,44		3,07±0,64	2,09±0,27	

NOTE: lun.rel= lunghezza relativa; SOAM=metrica della somma degli angoli; PAD=prodotto angoli metrica distanza; I2EVAR=indice triangolo; DS= deviazione standard

Tabella III CONFRONTO DEI PARAMETRI DI TORTUOSITA' TRA OCCHIO ADELFO DEI PAZIENTI AFFETTI E OCCHII DEL GRUPPO DI CONTRLLO.

	Lun. Rel Occhio controllo	Lun. Rel Occhio adelfo	p	SOAM Occhio controllo	SOAM Occhio adelfo	p
N. occhi	28	28	0,338	28	28	0,015
Media± DS (su 5 vasi)	3,26±0,57	3,00±0,70		2,16±0,39	2,52±0,57	

	PAD Occhio controllo	PAD Occhio adelfo	p	I2EVAR Occhio controllo	I2EVAR Occhio adelfo	P
N. occhi	28	28	0,087	28	28	0,154
Media± DS (su 5 vasi)	2,09±0,52	2,45±0,76		2,14±0,33	2,37±0,56	

NOTE: lun.rel= lunghezza relativa; SOAM=metrica della somma degli angoli; PAD=prodotto angoli metrica distanza; I2EVAR=indice triangolo; DS= deviazione standard

DISCUSSIONE

Nel nostro lavoro abbiamo valutato la tortuosità dei vasi retinici in un gruppo di pazienti affetti da occlusione della vena centrale retinica ed in un gruppo di controllo sani. Tutti i parametri di tortuosità valutati nel nostro lavoro sono risultati significativamente diversi negli occhi affetti rispetto ai controlli sani ($p < 0,000$).

L'OVCR è una malattia che colpisce prevalentemente individui oltre i 50 anni di età che si caratterizza per una ostruzione vascolare a carico del ditretto venoso. L'esame del fundus evidenzia presenza di emorragie retiniche puntiformi ed a fiamma in tutti e quattro i quadranti, ingorgo venoso con aumento della tortuosità delle vene retiniche, essudati cotonosi, aree ipoperfuse alla periferia retinica e la presenza di edema maculare più o meno esteso.

In letteratura non esistono studi dedicati che quantificano la tortuosità vasale in tale patologia una valutazione precisa potrebbe rappresentare un elemento diagnostico e prognostico prezioso. Ad oggi la tortuosità vasale può in genere essere valutata solo soggettivamente senza la possibilità di quantizzarla con precisione. Una metodica computerizzata capace di consentire una valutazione oggettiva e quantitativa della tortuosità sarebbe quindi di grande interesse clinico.

Nel nostro lavoro, frutto della collaborazione fra il *Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Siena* e la *Clinica Oculistica dell'Università di Firenze*, abbiamo progettato uno specifico software per un'analisi computerizzata della tortuosità dei vasi retinici. Tale software è stato applicato ad un gruppo di pazienti affetti da OVCR per valutarne la possibilità di apprezzare la tortuosità vascolare retinica in rapporto a quella di un gruppo di controllo.

Come era possibile prevedere il confronto dei parametri di tortuosità fra l'occhio affetto da OVCR e l'occhio adelfo ha evidenziato che alcuni parametri di tortuosità (Lunghezza Relativa, SOAM, PAD ed I2EVAR) presentano valori significativamente più elevati nei pazienti affetti da OVCR rispetto all'occhio sano. Al contrario il confronto dei parametri di tortuosità (Lunghezza relativa, SOAM, PAD, I2EVAR) fra occhio destro e sinistro, per i soggetti normali non hanno mostrato differenze statisticamente significative. Elevata significatività statistica è stata quindi riscontrata tra tutti gli indici di tortuosità esaminati, Lunghezza relativa, SOAM, PAD, I2EVAR dell'occhio affetto da OVCR rispetto alla popolazione di controllo. I valori suddetti sono risultati più elevati negli occhi affetti da OVCR.

Successivamente abbiamo identificato alcuni parametri di tortuosità nell'occhio adelfo dei pazienti con OVCR che si discostano da quella della popolazione normale. In particolare il parametro di tortuosità SOAM ($p = 0,015$) era più elevato nei casi mentre il parametro PAD mostrava solo una tendenza non significativa a discostarsi fra le due popolazioni in esame ($p = 0,087$). Questa maggior tortuosità dei vasi retinici potrebbe essere solo un epifenomeno dei fattori di rischio vascolari associate alla OVCR quali l'ipertensione e la aterosclerosi, oppure riflettere una peculiare caratteristica anatomica oculare collegata ad un più difficoltoso scorrimento del sangue all'interno dei vasi retinici e dunque ad un maggior rischio di occlusione venosa retinica. In ogni caso il riscontro di una maggiore tortuosità vasale negli occhi adelfi dei pazienti affetti rispetto agli occhi dei pazienti sani suggerisce che la valutazione della tortuosità vasale possa avere un valore predittivo sul rischio individuale di occlusione venosa retinica.

Peraltro solo uno studio longitudinale potrebbe confermare l'aumentato rischio di sviluppo di eventi trombotici in soggetti con accentuazione della tortuosità vasale retinica. Tuttavia la scarsa numerosità della popolazione in studio e la mancanza di

adeguate indagini per descrivere il profilo di rischio vascolare limitano ogni ulteriore considerazione clinica ma propongono interessanti spunti per ulteriori studi. Questi dati sono sicuramente significativi in quanto confermano, mediante una specifica tecnica di studio, che i pazienti con occlusione della vena centrale presentano un rilevante incremento della tortuosità vascolare retinica. I nostri risultati mostrano anche che il software specificamente progettato costituisce una metodica efficace per una valutazione relativamente oggettiva e comunque misurabile della tortuosità dei vasi retinici offrendo in proposito degli specifici parametri quantitativi utili per valutazioni cliniche e statistiche. In particolare nella nostra casistica alcuni parametri sono risultati nettamente diversi fra gli occhi affetti da OVCR e gli occhi adelfi e fra gli occhi con OVCR e il gruppo di controllo mostrando la capacità della tecnologia da noi predisposta di effettuare una distinzione fra il gruppo di controllo e quello dei pazienti affetti. E' stata inoltre rilevata una debole significatività statistica è stata riscontrata per il PAD e una buona sensibilità per il SOAM nel confronto tra l'occhio adelfo e il gruppo di controllo sano. Questa differenza non è evidentemente la stessa per tutti i parametri di tortuosità considerati. Questo dato conferma l'importanza di valutare più parametri di tortuosità perchè a priori è difficile prevedere quale di essi sia il più specifico nella caratterizzazione delle alterazioni del decorso vascolare nelle diverse patologie. La scelta dei parametri più idonei o eventualmente di un "punteggio" che ne rappresenti una combinazione, costituirà sicuramente uno dei punti chiave per il perfezionamento della procedura informatica che abbiamo predisposto. Infatti la sperimentazione effettuata ha messo in luce alcune criticità del software e della procedura di indagine che potranno essere superate nei futuri sviluppi della metodica. Anzitutto la tecnica utilizzata, pur consentendo una valutazione in buona parte oggettiva e quantizzabile della tortuosità vasale, non esclude del tutto una componente soggettiva legata alla scelta dei vasi da analizzare da parte dell'operatore. Questo limite potrà essere in parte superato da una standardizzazione molto rigorosa dei criteri di scelta e soprattutto da possibili sviluppi tecnologici (ricerca ed individuazione automatica del percorso vasale, superamento dell'analisi dei singoli vasi per arrivare allo studio della trama vascolare di un determinato settore del fondo oculare). Rimane poi appunto da precisare il significato clinico dei vari parametri di tortuosità, che come abbiamo visto non sono ugualmente efficaci nel descrivere delle differenze cliniche. E' possibile che successive esperienze suggeriscano la definizione di "indici" frutto della combinazione di più parametri oppure la selezione di specifici parametri (o combinazioni di essi) a seconda della patologia da indagare.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro abbiamo descritto una nuova procedura informatizzata per la valutazione semiautomatizzata della tortuosità vasale retinica. Il software predisposto è stato utilizzato per lo studio delle immagini del fondo oculare di un significativo gruppo di pazienti affetti da occlusioni della vena centrale retinica. In questa malattia la tortuosità dei vasi retinici è un reperto sempre presente e che potrebbe - se quantificato correttamente - fornire informazioni prognostiche importanti.

Inoltre la presenza di indici di tortuosità elevati potrebbe rappresentare un possibile marker di un aumentato rischio di sviluppo di trombosi venose retiniche visto e considerato che negli occhi adelfi sono stati riscontrati alcuni parametri più elevati rispetto alla gruppo di controllo.

L'analisi compiuta sulle foto del fondo oculare di un gruppo di pazienti affetti da OVCR confrontate con quelle di un gruppo di controllo ha consentito di rilevare una significativa differenza dei valori di tutti i parametri di tortuosità, da noi studiati.

La metodica utilizzata si è quindi confermata utile per una valutazione quantitativa della tortuosità vasale nei pazienti con OVCR e con gli opportuni adattamenti tecnici, potrà essere utilizzata anche per lo studio di altre malattie caratterizzate anch'esse dall'accentuazione della tortuosità dei vasi retinici, come la retinopatia del pretermine e la retinopatia ipertensiva.

BIBLIOGRAFIA

-
- ⁱ Klein R, Moss SE, Meuer SM, et al. The 15-year cumulative incidence of retinal vein occlusion: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*. Apr 2008;126(4):513-8.
- ⁱⁱ Mitchell P, Smith W, Chang A. Prevalence and associations of retinal vein occlusion in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol*. Oct 1996;114(10):1243-7.
- ⁱⁱⁱ Hayreh S.S., Zimmerman M.B., Podhajsky P. "Incidence of various types of retinal vein occlusion and their recurrence and demographic characteristics." *Am J Ophthalmol* 1994; 117(4): 429-441.
- ^{iv} Williamson T.H. "A "throttle" mechanism in the central retinal vein in the region of the lamina cribrosa." *Br J Ophthalmol* 2007; 91(9): 1190-1193.
- ^v Hayreh SS. Retinal vein occlusion. *Indian J Ophthalmol*. Sep 1994;42(3):109-32.
- ^{vi} David R, Zangwill L, Badarna M, et al. Epidemiology of retinal vein occlusion and its association with glaucoma and increased intraocular pressure. *Ophthalmologica*. 1988;197(2):69-74.
- ^{vii} Ota M, Tsujikawa A, Kita M, et al. Integrity of foveal photoreceptor layer in central retinal vein occlusion. *Retina*. Nov-Dec 2008;28(10):1502-8.
- ^{viii} Glacet-Bernard A., Chabanel, Lelong A.F., Samama M.M., Coscas G. "Elevated erythrocyte aggregation in patients with central retinal vein occlusion and without conventional risk factors." *Ophthalmology* 1994; 101(9): 1483-1487.
- ^{ix} Dhote R., Bachmeyer C., Horellou M.H., Toulon P., Christoforov B. "Central retinal vein thrombosis associated with resistance to activated protein C." *Am J Ophthalmol* 1995; 120(3): 388-389.
- ^x The Eye Disease Case-Control Study Group. "Risk Factors for branch retinal vein occlusion." *Am J Ophthalmol*. 1993; 116: 286-296.
- ^{xi} Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel H.D., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E. "Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders." *N Engl J Med* 1994; 31(22): 1480-1487.
- ^{xii} Silva R. M., Faria de Abreu J.R., Cunha-Vaz J.G. "Blood-retina barrier in acute retinal branch vein occlusion. ." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233:721-726.
- ^{xiii} Arnarsson A., Stefansson E. "Laser treatment and the mechanism of edema reduction in branch retinal vein occlusion." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(3): 877-879.
- ^{xiv} Stefansson E. "The therapeutic effects of retinal laser treatment and vitrectomy. A theory based on oxygen and vascular physiology." *Acta Ophthalmol Scand* 2001; 79(5): 435-440.

-
- ^{xv} Noma H., Minamoto A., Funatsu H., Tsukamoto H., Nakano K., Yamashita H., Mishima H.K. "Intravitreal levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 are correlated with macular edema in branch retinal vein occlusion." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 44(3): 309-315.
- ^{xvi} The Central Vein Occlusion Study Group. "Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion." *Arch Ophthalmol* 1997; 115(4): 486-491.
- ^{xvii} Zegarra H., Gutman F.A., Conforto J. "The natural course of central retinal vein occlusion." *Ophthalmology* 1979; 86(11): 1931-1942.
- ^{xviii} Magargal L.E., Brown G.C., Augsburger J.J., Parrish R.K. 2nd "Neovascular glaucoma following central retinal vein obstruction." *Ophthalmology* 1981; 88(11): 1095-1101.
- ^{xix} Bashshur ZF, Ma'luf RN, Allam S, et al. Intravitreal triamcinolone for the management of macular edema due to nonischemic central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol*. Aug 2004;122(8):1137-40.
- ^{xx} Cekic O, Chang S, Tseng JJ, et al. Intravitreal triamcinolone treatment for macular edema associated with central retinal vein occlusion and hemiretinal vein occlusion. *Retina*. Oct-Nov 2005;25(7):846-50.
- ^{xxi} Ip MS, Gottlieb JL, Kahana A, et al. Intravitreal triamcinolone for the treatment of macular edema associated with central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol*. Aug 2004;122(8):1131-6.
- ^{xxii} Patel PJ, Zaheer I, Karia N. Intravitreal triamcinolone acetonide for macular oedema owing to retinal vein occlusion. *Eye*. Jan 2008;22(1):60-4.
- ^{xxiii} Ramchandran RS, Fekrat S, Stinnett SS, et al. Fluocinolone acetonide sustained drug delivery device for chronic central retinal vein occlusion: 12-month results. *Am J Ophthalmol*. Aug 2008;146(2):285-291.
- ^{xxiv} Batioglu F, Astam N, Ozmert E. Rapid improvement of retinal and iris neovascularization after a single intravitreal bevacizumab injection in a patient with central retinal vein occlusion and neovascular glaucoma. *Int Ophthalmol*. Feb 2008;28(1):59-61.
- ^{xxv} Ferrara DC, Koizumi H, Spaide RF. Early bevacizumab treatment of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. Dec 2007;144(6):864-71.
- ^{xxvi} Kriechbaum K, Michels S, Prager F, et al. Intravitreal Avastin for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a prospective study. *Br J Ophthalmol*. Apr 2008;92(4):518-22.
- ^{xxvii} Spaide RF, Chang LK, Klanchnik JM, et al. Prospective Study of Intravitreal Ranibizumab as a Treatment for Decreased Visual Acuity Secondary to Central Retinal Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol*. Oct 17 2008.

-
- ^{xxviii} The Central Vein Occlusion Study Group. "Evaluation of grid pattern photocoagulation for macular edema in central vein occlusion. The Central Vein Occlusion Study Group M report." *Ophthalmology* 1995; 102(10): 1425-1433.
- ^{xxix} The Central Vein Occlusion Study Group. "A randomized clinical trial of early panretinal photocoagulation for ischemic central vein occlusion. The Central Vein Occlusion Study Group N report." *Ophthalmology* 1995; 102(10): 1434-1444.
- ^{xxx} Beck AP, Ryan EA, Lou PL, et al. Controversies regarding radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol Clin*. Fall 2005;45(4):153-61.
- ^{xxxi} Saika S. , Tanaka T., Miyamoto T., Ohnishi Y. "Surgical posterior vitreous detachment combined with gas/air tamponade for treating macular edema associated with branch retinal vein occlusion: retinal tomography and visual outcome." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239(10): 729-732.
- ^{xxxii} Amadori E. Introduzione alla geometria differenziale; *Miscellanea, NDM 2° Edizione*
- ^{xxxiii} Bartels RH, Beatty JC, Barsky BA. *An Introduction to the Use of Splines in Computer Graphics, SIGGRAPH'85, San Francisco; 1985*
- ^{xxxiv} Gelman R, Matinez-Perez ME, Vanderceen DK, Moskowitz A, Fulton AB. Diagnosis of Plus Disease in Retinopathy of Prematurity Using Retinal Image multi Scale Analysis. *IOVS* December 2005, Vol. 46, No. 12
- ^{xxxv} Gelman R, Matinez-Perez ME, Vanderceen DK, Moskowitz A, Fulton AB. Diagnosis of Plus Disease in Retinopathy of Prematurity Using Retinal Image multi Scale Analysis. *IOVS* December 2005, Vol. 46, No. 12
- ^{xxxvi} Swanson C, Cocker KD, Parker KH, Moseley MJ, Fielder AR. Semiautomated computer analysis of vessel growth in preterm infants without and with ROP. *Br J Ophthalmol*; 87: 1474-1477
- ^{xxxvii} Hughes AD, Martinez-Perez E, Jabbar AS, Hassan A, Witt NW, Mistry PD, Chapman N, Stanton AV, Beevers G, Pedrinelli R, Parker KH, McG Thom SA. *Quantification of topological changes in retinal vascular architecture in essential and malignant hypertension. Journal of Hypertension* 2006, Vol. 24, No. 5