



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2023



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katarzyna Zabel

**Użyteczność kliniczna mikroperymetrii w diagnostyce jaskry
pierwotnie otwartego kąta**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

prof. dr hab. *Jakub J. Kałużny*

Bydgoszcz 2023

Serdeczne podziękowania kieruję do mojego promotora
Pana prof. dr. hab. Jakuba Kałużnego,
którego pomoc i wsparcie było kluczowym
elementem podczas powstawania mojej pracy.

Spis treści

Wykaz skrótów	5
Nota informacyjna i wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	6
Wstęp	8
Cele pracy doktorskiej	16
Publikacje oryginalne	17
Omówienie prac wchodzących w skład pracy doktorskiej	47
Wnioski.....	53
Oświadczenia autorów publikacji.....	54
Streszczenie.....	71
Summary	74

Wykaz skrótów

AT (average threshold) – czułość progowa siatkówki

AUROC (area under the receiver operating characteristic curve) – pole powierzchni pod wykresem krzywej

BCEA (bivariate contour ellipse area) – dwuwymiarowa powierzchnia elipsy konturowej

BCVA (best corrected visual acuity) – najlepsza skorygowana ostrość wzroku

DVP (deep vascular plexus) – splot naczyniowy głęboki

GCC (ganglion cell complex) – kompleks komórek zwojowych siatkówki

MD (mean deviation) – średnie odchylenie

MP (microperimetry) – mikroperymetria

OCT (optical coherence tomography) – optyczna koherentna tomografia

OCTA (optical coherence tomography angiography) – angiografia optycznej koherentnej tomografii

ONH (optic nerve head) – tarcza nerwu wzrokowego

POAG (primary open-angle glaucoma) – jaskra pierwotnie otwartego kąta

pRNFL (peripapillary retinal nerve fiber layer) – okołotarczowa warstwa włókien nerwowych siatkówki

RGCs (retinal ganglion cells) – komórki zwojowe siatkówki

pRPC (peripapillary radial peripapillary capillaries) – okołotarczowe kapilary radialne

RPC (radial peripapillary capillaries) – warstwa radialna okołotarczowych kapilar

SAP (standard automated perimetry) – standardowa automatyczna perymetria

SVP (superficial vascular plexus) – splot naczyniowy powierzchniowy

VD (vessel density) – gęstość naczyń

VF (visual field) – pole widzenia

Nota informacyjna i wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Zgodnie z warunkami ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk medycznych, wyszczególnionymi w uchwale nr 89 Senatu Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 25 czerwca 2019 roku „w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu”, niniejsza rozprawa doktorska: *Użyteczność kliniczna mikroperymetrii w diagnostyce jaskry pierwotnie otwartego kąta*, ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów. Dwa z nich są pracami oryginalnymi, opublikowanymi w czasopismach naukowych wymienionych w aktualnym *Wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych*, ogłoszonym przez ministra nauki i szkolnictwa wyższego, natomiast jeden jest pracą pogładową opublikowaną w polskim kwartalniku medycznym. Doktorantka jest pierwszą autorką każdej z trzech publikacji włączonych do cyklu. Łączna wartość współczynnika Impact Factor dla cyklu wynosi 8,204, a łączna wartość punktów ministerialnych według wykazu czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 245 punktów.

Lista prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. *Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma*

„Plos One”, 2020 Jul 6; 15(7)

Katarzyna Zabel, Przemysław Zabel, Martyna Kałużna, Aleksander Lamkowski, Damian Jaworski, Magdalena Wietlicka-Piszcz, Jakub J. Kałużny

MNiSW = 100 pkt; IF = 3,240

2. *Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry*

„Journal of Clinical Medicine”, 2022, 11(9), 2368

Katarzyna Zabel, Przemysław Zabel, Karolina Suwała, Aleksandra Gorczyca, Damian Jaworski, Martyna Kałużna, Martyna Gębska-Tołoczko, Kacper Wnuk, Katarzyna Buszko, Jakub J. Kałużny

MNiSW = 140 pkt; IF= 4,964

3. Mikroperymetria w diagnostyce jaskry

„Okulistyka. Kwartalnik medyczny”, 2/2022

Katarzyna Zabel, Przemysław Zabel, Jakub J. Kałużny

MNiSW = 5 pkt

Wstęp

Jaskra pierwotnie otwartego kąta (primary open-angle glaucoma – POAG) jest neuropatią nerwu wzrokowego, zaliczaną do grupy chorób neurodegeneracyjnych, charakteryzującą się postępującą apoptozą komórek zwojowych siatkówki (retinal ganglion cells – RGCs). Cechami POAG są typowe zmiany morfologii tarczy nerwu wzrokowego, zaburzenia grubości okołotarczowej warstwy włókien nerwowych siatkówki (peripapillary retinal nerve fiber layer – pRNFL), którym towarzyszą korespondujące ubytki w badaniu pola widzenia (visual field – VF). Standardowa automatyczna perymetria (SAP) jest uważana za złoty standard w diagnozowaniu i monitorowaniu jaskry, jednak najczęściej stosowane protokoły w celu wykrycia jaskrowych uszkodzeń funkcji siatkówki oceniają obszar 24° lub 30° od centrum, a punkty testowe są oddalone od siebie o 6°. W plamce, która leży w centralnych 5–10°, znajduje się większość RGCs. W aktualnych badaniach sugeruje się, że w konwencjonalnych testach SAP w niewystarczającym stopniu badany jest obszar plamki, w którym RGCs są najbardziej skoncentrowane. Ponadto wynik SAP może pozostać prawidłowy przy utracie ponad 25% RGCs. Dodatkowymi ograniczeniami badania perymetrycznego są rozbieżności w wynikach z powodu zmęczenia pacjenta, słabej fiksacji i ruchu gałek ocznych podczas trwania testu.

Mikroperymetria (MP) jest nowoczesną metodą badania funkcji siatkówki, która łączy badanie pola widzenia z obrazowaniem dna oka za pomocą fundus camery bądź wykorzystaniu technologii skaningowego lasera oftalmoskopowego na podczerwień. Dzięki zastosowaniu systemu eye-tracking, czyli obrazowania dna oka wraz ze śledzeniem punktów orientacyjnych siatkówki, badanie MP umożliwi precyzyjną korelację anatomii plamki z czułością siatkówki. MP dostarcza informacje o stanie funkcjonalnym plamki w postaci czułości progowej siatkówki (average threshold – AT). AT jest określane jako średni próg czułości ze wszystkich punktów pomiarowych na obszarze $\pm 5^\circ$ wokół plamki, a uzyskany wynik jest przedstawiony na wydruku w postaci wykresu. Kolory zielony, żółty i czerwony oznaczają odpowiednio prawidłową, podejrzaną bądź nieprawidłową czułość siatkówki.

Fiksacja w MP jest oceniana na dwa sposoby. W pierwszej metodzie oblicza się procent punktów fiksacji w okręgach o promieniu 1° i 2° (zdefiniowanych odpowiednio jako P1 i P2), wyśrodkowanych w barycentrum chmury punktów fiksacji. Główną zaletą tej metody jest kliniczna klasyfikacja stabilności fiksacji, którą zaproponowali Fuji i wsp., według której

oczy z P1 powyżej 75% klasyfikuje się jako posiadające stabilną fiksację. Jeśli P1 jest mniejsze niż 75%, a P2 – większe niż 75%, fiksację klasyfikuje się jako stosunkowo niestabilną. Jeśli zarówno P1, jak i P2 są mniejsze niż 75%, wynik jest opisywany jako niestabilna fiksacja. Drugą metodą, zaproponowaną przez Crosslanda, jest analiza oparta na wyznaczeniu dwuwymiarowej powierzchni elipsy konturowej (Bivariate Contour Ellipse Area – BCEA), która jest obszarem otaczającym wszystkie ruchy fiksacyjne w zakresie jednego lub dwóch odchyień standardowych, w konsekwencji obejmującym 95% (BCEA95) i 63% (BCEA63) punktów fiksacji. System eye-tracking zapewnia możliwość kontroli fiksacji pacjenta niezależnie od ruchu gałek ocznych. Ocena wzorca fiksacji jest wartościowym parametrem z uwagi na doniesienia o zaburzeniach stabilności fiksacji w przebiegu POAG oraz innych chorób neurodegeneracyjnych.

W badaniach naukowych wykazano nieprawidłowości strukturalne i czynnościowe w centralnej części plamki w przebiegu POAG. Nieodzownym elementem diagnozy i kontroli progresji POAG jest badanie optycznej koherentnej tomografii (optical coherence tomography – OCT), pozwalające na wykonanie pomiarów grubości pRNFL oraz kompleksu komórek zwojowych siatkówki (ganglion cell complex – GCC). Angiografia optycznej koherentnej tomografii (optical coherence tomography angiography – OCTA) jest obiektywną i nieinwazyjną metodą obrazowania naczyń siatkówki i naczyniówki. OCTA pozwala na powtarzalną i ilościową ocenę mikrokrążenia siatkówki. U pacjentów z POAG wielokrotnie potwierdzono zmniejszenie gęstości naczyń (vessel density – VD) w obrębie plamki i okolicy okołotarczowej (radial peripapillary capillaries – RPC). Yarmohammadi i wsp. wykorzystali OCTA do oceny zaburzeń mikrokrążenia w przebiegu jaskry. Wykazali jako pierwsi istotne zmniejszenie VD w warstwie RPC w oczach z POAG w porównaniu z oczami zdrowymi i z podejrzeniem jaskry. Takasagawa i wsp. również odnotowali obszary zaniku naczyń włosowatych w OCTA w powierzchniowym splocie naczyniowym plamki (superficial vascular plexus – SVP) u pacjentów z POAG.

Przez wiele lat uważano, że uszkodzenia jaskrowe dotyczą obwodowej części siatkówki, a obszar plamki nie jest zajęty aż do zaawansowanego stadium choroby, jednakże ostatnie badania potwierdziły obecność zmian patologicznych w plamce już we wczesnych etapach rozwoju jaskry. Mianowicie dowiedziono zależności między uszkodzeniem pęczków nerwowych w obszarze plamki ocenionych za pomocą OCT a utratą czułości siatkówki w centralnej części VF w badaniu SAP [Leung CK, Guo PY, Lam AK. Retinal Nerve Fiber Layer

Optical Texture Analysis (ROTA): Involvement of the Papillomacular Bundle and Papillofoveal Bundle in Early Glaucoma. *Ophthalmology*. 2022]. Zatem warto zbadać, czy obserwowane zmiany strukturalne korelują z zaburzeniami funkcji za pomocą bardziej czułego narzędzia, jakim jest MP, która umożliwia precyzyjną ocenę funkcjonalną obszaru plamki na obszarze $\pm 5^\circ$ wokół punktu fiksacji. Dzięki zastosowaniu systemu eye-tracking dodatkowo można skorelować położenie punktów o obniżonej czułości z obszarami zmniejszonej grubości warstw siatkówki. Zależności parametrów funkcjonalnych ze zmianami strukturalnymi oraz analiza stabilności fiksacji mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patofizjologii choroby, a uzyskane wyniki – pomóc w opracowaniu raportów klinicznych pozwalających na dokładną i wczesną diagnostykę jaskry, zanim pojawią się ubytki w polu widzenia.

Mikroperymetria w diagnostyce jaskry

Microperimetry in the Management of Glaucoma

Katarzyna Zabel^{1,2,3}, Przemysław Zabel^{1,2,3}, Jakub J. Kałużny^{1,3}

¹ Katedra Badania Narządów Zmysłów, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jakub Kałużny

² Klinika Chorób Oczu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Grażyna Malukiewicz

³ Klinika Okulistyczna „Oftalmika” w Bydgoszczy

Summary: Glaucoma is a degenerative optic neuropathy leading to characteristic optic nerve head features, alternations in retinal nerve fiber layer thicknesses and visual field defects. Decrease of retinal sensitivity in the macular area is considered an important sign of glaucomatous damage. Accurate assessment of the function of the retina in macular region is possible thanks to microperimetry. Simultaneously, it is possible to evaluate the fixation behavior using the eye-tracking feature independent of eye movement and to correct gaze movements. To date, small number of studies have reported alternations in fixation stability in glaucoma eyes. The microperimetry test is reliable and reproducible. Microperimetry allowing for the assessment of changes in the central part of the field of view, both in qualitative and quantitative terms. Comparative studies on microperimetry and standard automated perimetry have shown that there is a good quantitative correlation between the two devices in glaucoma. The usefulness of microperimetry in the management of glaucoma is currently the subject of research. The aim of this article is to review of clinical utility of microperimetry in patients of glaucoma.

Key words: microperimetry (MP), glaucoma, fixation stability, retinal sensitivity.

Słowa kluczowe: mikroperymetria, jaskra, fiksacja, czułość siatkówki.

Jaskra to grupa chorób neurodegeneracyjnych, których wspólnymi cechami są apoptoza komórek zwojowych siatkówki (ang. Retinal Ganglion Cells – RGCs) i związany z nią zanik wewnętrznych warstw siatkówki w obszarze plamki. Skutkiem zmian strukturalnych, w objętych procesem chorobowym warstwach siatkówki, są zaburzenia funkcjonalne w postaci obniżenia czułości siatkówki oraz ubytki w polu widzenia (1).

Standardowa automatyczna perymetria (ang. Standard Automated Perimetry – SAP) jest uważana za złoty standard w diagnostyce jaskry i jej monitorowaniu. Najczęściej stosowane protokoły w statycznej perymetrii do wykrywania jaskrowych uszkodzeń funkcji siatkówki oceniają obszar 24° lub 30° od centrum, a punkty testowe są oddalone od siebie o 6° stopni. W plamce, która leży w centralnych 5–10°, znajduje się większość RGCs (2–3). W aktualnych badaniach sugeruje się, że w konwencjonalnych testach SAP w niewystarczającym stopniu badany jest obszar plamki, w którym RGC są najbardziej skoncentrowane. Ponadto wynik SAP może pozostać prawidłowy, jeśli utrata RGC mieści się w przedziale 25–50% (4). Dodatkowym ograniczeniem badania perymetrycznego są rozbieżności w wynikach z powodu zmęczenia pacjenta, słabej fiksacji gałek ocznych i ich ruchu podczas trwania testu. Warto zaznaczyć, że ostrość wzroku, główny parametr funkcjonalny używany do oceny utraty widzenia centralnego, jest zwykle zachowany u chorych na jaskrę pierwotną otwartego kąta (JPOK, ang. Primary Open Angle Glaucoma – POAG), pomimo znacznego zmniejszenia wrażliwości siatkówki. Wrażliwość plamki oraz stabilność fiksacji można ocenić za pomocą mikroperymetrii (ang. Microperimetry – MP).

Użyteczność kliniczna MP w przebiegu jaskry jest obecnie przedmiotem badań. Celem artykułu jest przegląd aktualnych doniesień naukowych dotyczących przydatności MP w diagnostyce jaskry i jej monitorowaniu.

Mikroperymetria

Mikroperymetria jest szczegółową metodą badania czułości siatkówki, w której dzięki zastosowaniu obrazowania dna oka bo-

dziec jest wyświetlany bezpośrednio na powierzchni siatkówki, a jego położenie jest kontrolowane przez system śledzenia ruchów gałki ocznej (eye-tracking). System eye-tracking pozwala na badanie stabilności fiksacji i dokładnej prezentacji bodźców we wcześniej określonych miejscach na siatkówce dzięki aktywnej kompensacji ruchów gałek ocznych.

Aktualnie na rynku są dostępne różne urządzenia. Macular Integrity Assessment (MAIA) (CenterVue, Padova, Włochy) – wprowadzony do praktyki klinicznej w 2009 roku, i Microperimeter-3 (MP-3 Nidek, Gamagori, Japonia), który jest następcą Microperimeter-1 (MP-1). Najnowszym urządzeniem jest perymetr Compass (CMP, CenterVue, Padova, Włochy), powszechnie dostępny od 2015 roku. Urządzenie MP-3 Nidek do obrazowania dna oka wykorzystuje fundus kamerę, natomiast MAIA i CMP – oftalmoskopowy laser skaningowy (ang. Ophthalmoscopic Scanning Laser – SLO). Szczegółowa specyfikacja techniczna urządzeń znajduje się w tabeli I. Na początku badania obraz dna oka jest rejestrowany automatycznie lub manualnie, a także wybierane są odpowiednie punkty odniesienia o wysokim kontraście (duże naczynia, margines tarczy nerwu wzrokowego lub zmiany barwnikowe) jako region zainteresowania (ang. Region of Interest – ROI) w celu ułatwienia śledzenia ruchów oczu. Rozszerzenie źrenicy ani stosowanie korekcji okularowej nie są wymagane do przeprowadzenia badania.

Mikroperymetr MAIA dostarcza informacje o stanie funkcjonalnym plamki w postaci unikalnych wskaźników takich jak czułość progowa siatkówki (ang. Average Threshold – AT) oraz wskaźnik integralności plamki (ang. Macular Integrity – MI), a także umożliwia oszacowanie stabilności fiksacji. Parametr AT stanowi średnią czułość punktów pomiarowych położonych na obszarze $\pm 5^\circ$ wokół plamki, a uzyskany wynik jest przedstawiony na wydruku w postaci wykresu: kolory zielony, żółty i czerwony oznaczają wrażliwość siatkówki odpowiednio: prawidłową, podejrzaną bądź nieprawidłową (5). Parametr MI jest zastrzeżoną wartością statystyczną obliczaną z użyciem wielowymiarowego modelu sieci neuronowej na podstawie m.in. wieku, wartości AT oraz parametrów stabilności

Model mikroperymetru			
	MAIA	MP-3	CMP
System obrazowania	Skaningowy laser oftalmoskopowy	Fundus camera	Konfokalny system obrazowania TrueColor
Pole widzenia	36°	45°	60°
Zakres bodźca	0–36 dB	0–34 dB	0–50 dB
Czas trwania bodźca	200 ms	200 ms	200 ms
Maksymalna jasność	1000 asb	10 000 asb	10 000 asb
Kontrola fiksacji (eye-tracking)	25 Hz	30 Hz	25 Hz

Tab. 1. Porównanie specyfikacji technicznej mikroperymetrów.

Tab. 1. Comparison of technical specifications of microperimeters.

fiksacji. Uzyskana wartość liczbowego wskaźnika MI opisuje prawdopodobieństwo, czy odpowiedzi pacjenta są prawidłowe, podejrzane lub nieprawidłowe w porównaniu z danymi normatywnymi skorygowanymi względem wieku. Sam wskaźnik integralności plamki nie odzwierciedla ciężkości procesu chorobowego, jedynie wskazuje, że wyższe wartości sugerują większe prawdopodobieństwo wystąpienia patologicznych zmian, podczas gdy niższe wartości wskazują na prawidłową funkcję plamki. Nie wykazano bezpośredniego związku między średnią wartością AT a wskaźnikiem MI.

Fiksacja za pomocą MP jest oceniana na dwa sposoby. Z zastosowaniem pierwszej metody jest obliczany procent punktów fiksacji w okręgach o promieniach 1° i 2° (zdefiniowanych odpowiednio jako P1 i P2) wyśrodkowanych w barycentrum chmury punktów fiksacji. Główną zaletą tej metody jest kliniczna klasyfikacja stabilności fiksacji, którą zaproponowali Fuji i wsp., wg której oczy z P1 powyżej 75% klasyfikuje się jako posiadające stabilną fiksację. Jeśli P1 jest mniejsze niż 75%, a P2 jest większe niż 75%, fiksację klasyfikuje się jako stosunkowo niestabilną. Jeśli zarówno P1, jak i P2 są mniejsze niż 75%, wynik jest opisywany jako niestabilna fiksacja (6). Crossland zasugerował analizę opartą na wyznaczeniu dwuwymiarowej powierzchni elipsy konturowej (ang. Bivariate Contour Ellipse Area – BCEA), która jest obszarem otaczającym wszystkie ruchy fiksacyjne w zakresie 1 lub 2 odchyłeń standardowych, w konsekwencji obejmującym 95% (BCEA95) i 63% (BCEA63) punktów fiksacji (7).

Mikroperymetria vs. standardowa automatyczna perymetria

Od wielu lat SAP pozostaje złotym standardem diagnostycznym monitorowania progresji jaskry. W SAP bodźce świetlne są rzutowane na czaszę perymetru, podczas gdy w MP bezpośrednio na powierzchnię siatkówki. Dzięki systemowi eye-tracking MP zapewnia lepszą kontrolę ruchów oczu. Przeprowadzono liczne badania porównawcze metod MP i SAP. Wyniki pokazały, że istnieje dobra korelacja między MP a SAP w wykrywaniu ubytków w centralnej części pola widzenia u pacjentów jaskrowych. Analizy porównawcze MP i SAP potwierdziły, że wyniki są zgodne również w zaawansowanych przypadkach choroby (8–10).

W 2018 roku Matsuura i wsp. wykazali bardzo dobrą korelację wyników MP i SAP, analizując dane uzyskane za pomocą MP-3 i perymetru Humphrey Field Analyzer (HFA) u chorych na POAG. Powtarzalność wyników była podobna, w przypadku MP-3 natomiast udowodniono lepszą niż w przypadku HFA korelację czułości siatkówki z jej budową (11).

Lima i wsp. zauważyli, że 21% prawidłowych wyników, w poszczególnych kwadrantach, uzyskanych metodą SAP odpowiadało nieprawidłowym wynikom uzyskanym za pomocą mikroperymetrii. Dodatkowo stwierdzono odpowiadające topograficznie istot-

ne zmniejszenie całkowitej grubości plamki w 75% tych kwadrantów w spektralnej optycznej koherentnej tomografii (ang. Spectral Domain Optical Coherence Tomography – SD-OCT) (12).

Montesano i wsp. porównali CMP i HFA w celu oceny zdolności do wykrywania neuropatii jaskrowej. Zdolność diagnostyczna tych dwóch urządzeń była podobna, jednakże czułość w wykrywaniu jaskry w przypadku CMP była minimalnie większa, gdy analizowano parametr średniego odchylenia (ang. Mean Deviation – MD). Powtarzalność wyników uzyskanych testami CMP i HFA również była nieznacznie lepsza w przypadku CMP (13).

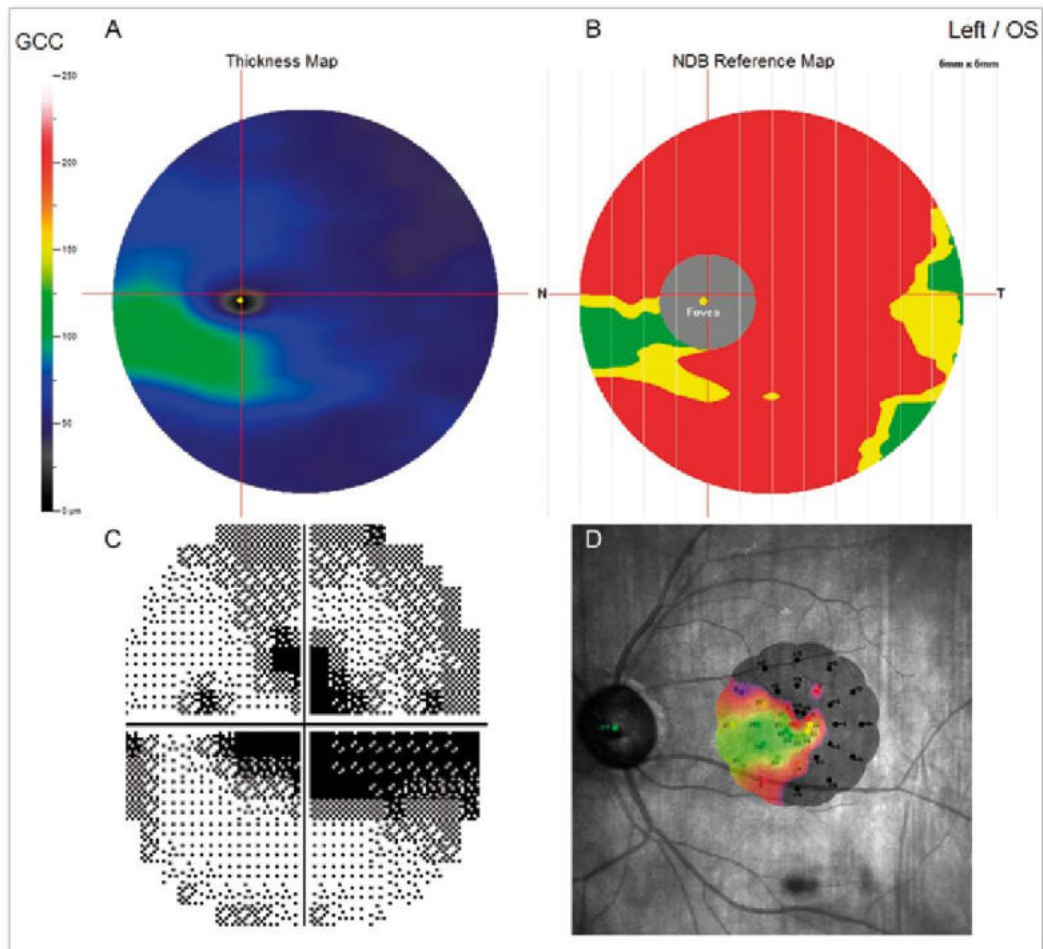
W kolejnym badaniu dokonano analizy porównawczej ubytków pola widzenia z czułością siatkówki u chorych na wczesną postać jaskry. W SAP wykazano ubytki w nosowych kwadrantach, analiza czułości siatkówki za pomocą MP natomiast zobrazowała rozległe defekty wrażliwości siatkówki w skroniowej hemisferze. Dzięki MP zidentyfikowano nieprawidłową funkcję siatkówki na znacznie większym obszarze oczu niż techniką SAP (14).

Zaletą MP jest wbudowany system eye-tracking, który zapewnia aktywną kompensację ruchów gałek ocznych oraz zapobiega utracie fiksacji, a to ma istotne znaczenie dla wiarygodności testu.

Ocena parametrów funkcjonalnych i strukturalnych siatkówki w przebiegu jaskry a zastosowanie mikroperymetrii

Wczesne rozpoznawanie jaskry i jej monitorowanie w praktyce klinicznej opiera się głównie na ocenie parametrów strukturalnych i czynnościowych siatkówki, a analiza grubości okolicy warstwy włókien nerwowych siatkówki (ang. Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer – pRNFL) za pomocą SD-OCT i ocena pola widzenia za pomocą SAP są jak dotychczas standardem (15). Istnieją jednak pewne ograniczenia ww. metod, na przykład w przypadku jaskry preperymetrycznej, wysokiej krótkowzroczności czy trudności w utrzymaniu fiksacji, to przyczynia się do poszukiwania nowych metod.

Ze względu na umiejscowienie RGC, które w znaczącej większości znajdują się w plamce, coraz większą uwagę skupia się na ocenie struktury i funkcji siatkówki w biegunie tylnym (16). Scheffer i wsp. jako pierwsi zastosowali perymetrię zorientowaną na dno oka na obszarze plamki z indywidualnie skondensowanymi siatkami testowymi w ocenie zmian czynności siatkówki w oczach zajętych jaskrą. Wykrywalność zmian w polu widzenia związanych z uszkodzeniem jaskrowym była większa, gdy badany obszar siatkówki był cały czas widoczny podczas trwania testu, a punkty testowe znajdowały się blisko siebie (17). Kolejne badania potwierdziły przydatność MP w ocenie funkcji siatkówki w oczach zajętych jaskrą i wykazały istotny związek między zmniejszeniem czułości siatkówki w badaniu MP a zmniejszeniem grubości warstw wewnętrznych siatkówki (11, 18–22).



Ryc. 1. Wyniki badań lewego oka u 58-letniej chorej na średnio zaawansowaną jaskrę pierwotną otwartego kąta. A i B – obniżenie grubości kompleksu komórek zwojowych siatkówki oszacowane za pomocą spektralnej optycznej koherentnej tomografii. C – mroczek łukowaty w dolnej hemisferze z paracentralnym ubytkiem w górnej hemisferze w badaniu perymetrycznym. D – brak czułości siatkówki skroniowo od dołka z zachowaną reakcją na bodziec w dołku oraz nosowej części plamki w badaniu mikroperymetrycznym odpowiada zachowanym komórkom zwojowym siatkówki w badaniu spektralnej optycznej koherentnej tomografii.

Fig. 1. The results of the left eye examination in a 58-year-old female patient with primary open-angle glaucoma in moderate stage. A and B – thickness reduction of the retinal ganglion cell complex estimated by spectral optical coherence tomography. C – arcuate scotoma in the inferior hemisphere with a paracentral defect in the superior hemisphere on a perimetric examination. D – the loss of sensitivity in the retina temporarily from the fovea with the reaction to the stimulus in the fovea and the nasal part of the macula in the microperimetric examination corresponds to the preserved ganglion cells of the retina in the spectral optical coherence tomography examination.

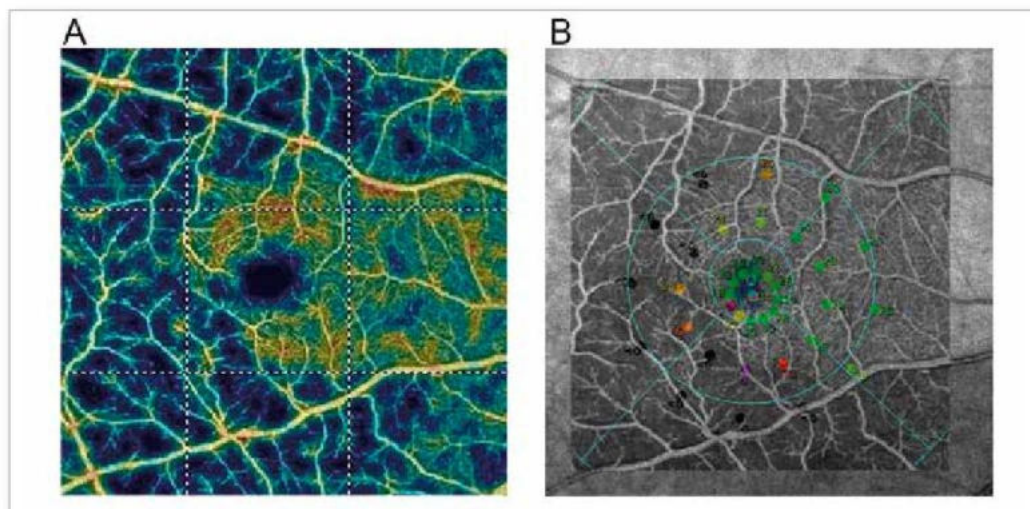
Lima i wsp. za pomocą MP potwierdzili u chorych na POAG zmniejszenie wrażliwości siatkówki na obszarach uszkodzeń strukturalnych w SD-OCT, nawet jeśli wyniki SAP były prawidłowe (12). Sato i wsp. wykorzystując MP, analizie poddali zależność pomiędzy zaburzeniem struktury a uszkodzeniem funkcji siatkówki u chorych na jaskrę. Stwierdzili statystycznie istotny związek analizowanej grubości warstwy komórek zwojowych siatkówki (ang. Ganglion Cell Analysis – GCA), oszacowanej za pomocą Cirrus HD-OCT, z wrażliwością centralnego obszaru plamki, ocenianą za pomocą MAIA MP (19).

Wyniki dalszych badań wykazały, że zmniejszenie parametru AT w badaniu MP odpowiada obszarom zaniku naczyń włosowatych w splocie naczyniowym powierzchniowym (ang. Superficial Vascular Plexus – SVP) w badaniu angiografii OCT (ang. angiogra-

phy OCT – OCT-A). W porównaniu wyników korelacji, w przypadku oceny strukturalnej plamki, analiza grubości kompleksu komórek zwojowych siatkówki (ang. Ganglion Cell Complex – GCC) oraz gęstości naczyń w SVP pokazała, że silniejsze zależności występowały z AT w badaniu MP, okołotarczowa gęstość naczyń oraz grubość pRNFL natomiast silniej korelowały ze wskaźnikami SAP (23).

Ocena stabilności fiksacji

Badanie fiksacji jest obiektywnym testem wykonywanym poprzez śledzenie punktów orientacyjnych siatkówki, a następnie wykreślenie chmury rozproszenia punktów fiksacji na mapie odniesienia obrazu siatkówki. Rozmieszczenie przestrzenne punktów fiksacji jest związane ze stabilnością fiksacji: mały obszar fiksacji



Ryc. 2. Wyniki badań prawego oka 61-letniej chorej na jaskrę pierwotną otwartego kąta obrazujące zależność między punktami progowymi czułości siatkówki w badaniu mikroperymetrycznym a wynikiem angiogramu en face powierzchownego spłatu naczyniowego siatkówki za pomocą angiografii optycznej koherentnej tomografii. A – angiogram 6 x 6 mm² przedstawiający pozadołeczkowy zanik drobnej sieci mikronaczyni siatkówki (zimne kolory) z zachowaniem naczyń włosowatych (cieple kolory) w sektorze nosowym w splocie powierzchownym. B – na obraz uzyskany z mikroperymetri z punktami progowymi czułości siatkówki nałożono angiogram en face spłatu naczyniowego powierzchownego, aby pokazać związek między funkcją siatkówki a jej strukturą. Obszary siatkówki z głębokimi mroczkami (czarne kropki) lub o obniżonym progu czułości w badaniu mikroperymetrii dokładnie odpowiadały miejscom zaniku naczyń włosowatych siatkówki.

Fig. 2. The results of the right eye examination of a 61-year-old patient with primary open-angle glaucoma illustrating the relationship between the threshold points of retinal sensitivity in the microperimetric examination and the result of the en face angiogram of the superficial vascular plexus of the retina using optical coherence tomography angiography. A – 6 x 6 mm² angiogram showing the perifoveal loss of the microvascular network (cold colors) with preservation of capillaries (warm colors) in the nasal sector in the superficial vascular plexus. B – en face angiogram of the superficial vascular plexus was superimposed on the image obtained from a microperimeter with retinal sensitivity thresholds to show the relationship between the function of the retina and its structure. Areas of the retina with deep scotomas (black dots) or with a decreased threshold in the microperimetry study exactly matched the sites of retinal capillary loss.

odzwierciedla bardziej stabilną fiksjację niż większy obszar. U zdrowych osób stosujących fiksjację centralną wielkość ruchów galek ocznych jest niewielka. Zdolność do utrzymywania stabilnej fiksjacji jest osłabiona u osób dotkniętych chorobami oczu i chorobami neurodegeneracyjnymi (24). Zmiany we wzorcu fiksjacji w przebiegu jaskry nie są jeszcze dobrze poznane, jednakże aktualne doniesienia naukowe dowodzą o zaburzeniach stabilności fiksjacji w przebiegu tej choroby (25).

Longhin i wsp. wykazali w oczach z POAG obniżoną stabilność fiksjacji w porównaniu do tego parametru w oczach ze zdrowej grupy kontrolnej oraz zaprezentowali istotne statystycznie różnice w BCEA. Autorzy wnioskowali, że analiza BCEA charakteryzuje się większą dokładnością w wykrywaniu minimalnych ilościowych zmian stabilności fiksjacji niż standardowa klasyfikacja kliniczna (26).

Shi i wsp. porównali chorych na POAG w stadiach wczesnym i umiarkowanym ze zdrowymi osobami i przeanalizowali dane dotyczące fiksjacji uzyskane za pomocą MP-1 (NIDEK, Vigonza, Włochy). Pomiędzy grupami zaobserwowano istotne różnice w stabilności fiksjacji oraz potwierdzono zależność między stabilnością fiksjacji w obrębie centralnych 2° (odpowiednio P1 w MP MAIA) a wrażliwością progową siatkówki (AT). Ta praca nie obejmowała analizy BCEA (27).

W kolejnym badaniu przeprowadzono analizę zaburzeń stabilności fiksjacji w przebiegu POAG za pomocą MP MAIA oraz określono wpływ stopnia zaawansowania POAG na parametry fiksjacji. Stabilność fiksjacji u chorych na POAG uległa pogorszeniu wraz ze wzrostem stopnia nasilenia choroby, a wartość wskaźnika BCEA95 różniła się istotnie statystycznie między grupami o różnym stadium zaawansowania choroby. Dodatkowo potwierdzono kore-

lację wskaźników fiksjacji z nieprawidłowościami strukturalnymi uwidocznionymi technikami SD-OCT i OCT-A oraz zmianami funkcjonalnymi w badaniach MP i SAP (28).

Podsumowanie

Ocena wrażliwości siatkówki w plamce i badanie stabilności fiksjacji mogą być wykorzystywane w diagnostyce jaskry i monitorowaniu jej przebiegu. Ciągłe obrazowanie dna oka ze śledzeniem punktów orientacyjnych siatkówki w badaniu MP umożliwia nie tylko ocenę fiksjacji, ale również precyzyjną korelację anatomii z czułością siatkówki na badanym obszarze. Dostępne wyniki badań wskazują, że czułość MP w rozpoznawaniu mroczków jaskrowych jest podobna jak w przypadku SAP. Mikroperymetria natomiast okazuje się cennym narzędziem diagnostycznym w przypadku zmian w obrębie RNFL i GCC, kiedy wynik SAP pozostaje prawidłowy bądź niemiernodajny. Potwierdzone korelacje parametrów funkcjonalnych uzyskanych w czasie badania MP z parametrami strukturalnymi uzyskanymi technikami SD-OCT i OCT-A są dowodem na wiarygodność badania mikroperymetrycznego w oczach zajętych jaskrą.

Piśmiennictwo:

1. Gupta N, Yücel YH: *Glaucoma as a neurodegenerative disease*. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007; 18(2): 110–114.
2. Hood DC, Raza AS, de Moraes CGV, Johnson CA, Liebmann JM, Ritch R: *The nature of macular damage in glaucoma as revealed by averaging optical coherence tomography data*. *Transl Vis Sci Technol.* 2012; 1(1): 3–3.
3. Hood DC, Raza AS, de Moraes CGV, Liebmann JM, Ritch R: *Glaucomatous damage of the macula*. *Prog Retin Eye Res.* 2013; 32(1): 1–21.

4. de Moraes CGV, Hood DC, Thenappan A, Girkin CA, Medeiros FA, Weinreb RN, et al.: *24-2 visual fields miss central defects shown on 10-2 tests in glaucoma suspects, ocular hypertensives, and early glaucoma*. *Ophthalmology*. 2017; 124(10): 1449–1456.
5. Dolar-Szczasny J, Święch-Zubilewicz A, Mackiewicz J: *Macular integrity assessment and fixation analysis in chronic central serous chorioretinopathy*. *J Ophthalmol*. 2018.
6. Fujii GY, de Juan Jr. E, Sunness J, Humayun MS, Pieramici DJ, Chang TS: *Patient selection for macular translocation surgery using the scanning laser ophthalmoscope*. *Ophthalmology*. 2002; 109(9): 1737–1744.
7. Crossland MD, Dunbar HM, Rubin GS: *Fixation stability measurement using the MP1 microperimeter*. *Retina*. 2009, 29(5), 651–656.
8. Okada K, Watanabe W, Koike I, Tsumamoto Y, Mishima HK: *Alternative method of evaluating visual field deterioration in very advanced glaucomatous eye by microperimetry*. *Jpn J Ophthalmol*. 2003; 47(2): 178–181.
9. Rensch F, Jonas JB: *Direct microperimetry of alpha zone and beta zone parapapillary atrophy*. *Br J Ophthalmol*. 2008; 92(12): 1617–1619.
10. Öztürk F, Yavas GF, Küsbeci T, Ermis SS: *A comparison among Humphrey field analyzer, Microperimetry, and Heidelberg Retina Tomograph in the evaluation of macula in primary open angle glaucoma*. *J Glaucoma*. 2008; 17(2): 118–121.
11. Matsuura M, Murata H, Fujino Y, Hirasawa K, Yanagisawa M, Asoka R: *Evaluating the usefulness of MP-3 microperimetry in glaucoma patients*. *Am J Ophthalmol*. 2018; 187: 1–9.
12. Lima VC, Prata TS, de Moraes CG, Kim J, Seiple W, Rosen RB, et al.: *A comparison between microperimetry and standard achromatic perimetry of the central visual field in eyes with glaucomatous paracentral visual-field defects*. *Br J Ophthalmol*. 2010; 94(1): 64–67.
13. Montesano G, Bryan SR, Crabb DP, Fogagnolo P, Oddone F, McKendrick AM, et al.: *A comparison between the compass fundus perimeter and the Humphrey field analyzer*. *Ophthalmology*. 2019; 126(2): 242–251.
14. Phuljhele S, Angmo D, Aalok L, Parwal S, Azad RV, Gupta V, et al.: *Functional evaluation of the macular area in early glaucoma using microperimetry*. *Indian J Ophthalmol*. 2021; 69(4): 876.
15. Sharma P, Sample PA, Zangwill LM, Schuman JS: *Diagnostic tools for glaucoma detection and management*. *Surv Ophthalmol*. 2008; 53(6): S17–S32.
16. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA: *The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma A Review*. *Jama – J Am Med Assoc*. 2014; 311(18): 1901–1911.
17. Schieffer U, Flad M, Stumpp F, Malsam A, Paetzold J, Vonthein R, et al.: *Increased detection rate of glaucomatous visual field damage with locally condensed grids: a comparison between fundus-oriented perimetry and conventional visual field examination*. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121(4): 458–465.
18. Huang P, Shi Y, Wang X, Zhang SSM, Zhang C: *Use of microperimetry to compare macular light sensitivity in eyes with open-angle and angle-closure glaucoma*. *Jpn J Ophthalmol*. 2012; 56(2): 138–144.
19. Taradaj K, Gościńiewicz P, Romaniuk D, Steuer E, Drzazga Z, Romaniuk W: *Central retinal sensitivity assessment with microperimetry in patients with primary open angle glaucoma*. *Klin Oczna*. 2015; 117(2): 77–82.
20. Sato S, Hirooka K, Baba T, Tenkumo K, Nitta E, Shiraga F: *Correlation between the ganglion cell-inner plexiform layer thickness measured with cirrus HD-OCT and macular visual field sensitivity measured with microperimetry*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(4): 3046–3051.
21. Rao HL, Januwada M, Hussain RS, Pillutla LN, Begum VU, Chaitanya A: *Comparing the structure-function relationship at the macula with standard automated perimetry and microperimetry*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56(13): 8063–8068.
22. Hirooka K, Misaki K, Nitta E, Ukegawa K, Sato S, Tsujikawa A: *Comparison of Macular Integrity Assessment (MAIA™), MP-3, and the Humphrey Field Analyzer in the Evaluation of the Relationship between the Structure and Function of the Macula*. *Plos one*. 2016; 11(3): e0151000.
23. Zabel K, Zabel P, Kaluzna M, Lamkowski A, Jaworski D, Wietlicka-Piszcz M, et al.: *Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma*. *Plos one*. 2020; 15(7): e0235571.
24. Schönbach EM, Ibrahim MA, Kong X, Strauss RW, Munoz B, Birch DG, et al.: *Metrics and acquisition modes for fixation stability as a visual function biomarker*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58(6): BIO268–BIO276.
25. Scuderi L, Gattazzo I, de Paula A, Iodice CM, Di Tizio F, Perdicchi A: *Understanding the role of microperimetry in glaucoma*. *Int Ophthalmol*. 2022: 1–13.
26. Longhin E, Convento E, Pilotto E, Bonin G, Vujosevic S, Kotsafti O, et al.: *Static and dynamic retinal fixation stability in microperimetry*. *Can J Ophthalmol*. 2013; 48(5): 375–380.
27. Shi Y, Liu M, Wang X, Zhang C, Huang P: *Fixation behavior in primary open angle glaucoma at early and moderate stage assessed by the MicroPerimeter MP-1*. *J Glaucoma*. 2013; 22(2): 169–173.
28. Zabel K, Zabel P, Suwala K, Górczyca A, Jaworski D, Kaluzna M, et al.: *Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry*. *Clin Med*. 2022; 11(9): 2368.

Adres do korespondencji/ Reprint requests to:

lek. Katarzyna Zabel (e-mail: kasia.zabel1@gmail.com)
 Katedra Badania Narządów Zmysłów, Collegium Medicum w Bydgoszczy,
 UMK w Toruniu
 ul. Sandomierska 16, 85-830 Bydgoszcz

Cele pracy doktorskiej

Mikroperymetria jest nowoczesną technologią umożliwiającą monitorowanie zmian funkcjonalnych siatkówki oraz ocenę stabilności fiksacji. Do tej pory nie zostały potwierdzone zależności między obniżeniem czułości siatkówki w MP a uszkodzeniem mikrokrążenia w badaniu OCTA oraz parametrami stabilności fiksacji u pacjentów z POAG, co skłoniło nas do pogłębienia wiedzy w tym temacie.

Celami prowadzonych badań były:

1. Ocena zależności między gęstością naczyń w OCTA a parametrami funkcjonalnymi siatkówki w MP u pacjentów z POAG i osób zdrowych.
2. Analiza porównawcza parametrów strukturalnych siatkówki uzyskanych za pomocą OCT i OCTA z wynikami testów funkcjonalnych otrzymanych z MP i SAP.
3. Ocena czułości siatkówki w plamce i wskaźników fiksacji za pomocą MP u pacjentów z POAG i osób zdrowych oraz określenie wpływu stopnia zaawansowania POAG na parametry fiksacji.
4. Określenie korelacji między wskaźnikami fiksacji z parametrami funkcjonalnymi siatkówki w badaniu MP i SAP oraz strukturalnymi w OCT i OCTA.

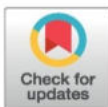
RESEARCH ARTICLE

Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma

Katarzyna Zabel^{1,2,3*}, Przemysław Zabel^{1,2,3}, Martyna Kaluzna², Aleksander Lamkowski², Damian Jaworski², Magdalena Wietlicka-Piszc⁴, Jakub J. Kaluzny^{1,2}

1 Department of Sensory Organ Studies, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland, **2** Oftalmika Eye Hospital, Bydgoszcz, Poland, **3** Department of Ophthalmology, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland, **4** Department of Biostatistics and Biomedical Systems Theory, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland

* kasia.zabel1@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Zabel K, Zabel P, Kaluzna M, Lamkowski A, Jaworski D, Wietlicka-Piszc M, et al. (2020) Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. PLoS ONE 15(7): e0235571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571>

Editor: Dorota Skowronska-Krawczyk, University of California San Diego School of Medicine, UNITED STATES

Received: April 8, 2020

Accepted: June 17, 2020

Published: July 6, 2020

Copyright: © 2020 Zabel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Purpose

To evaluate the correlation between retinal sensitivity in microperimetry (MP) with vessel density (VD) using optical coherence tomography angiography (OCTA) in primary open-angle glaucoma (POAG).

Methods

We enrolled 30 participants (52 eyes) with POAG and 15 participants (23 eyes) in the healthy control group. All participants were examined for retinal structure using OCTA to assess VD and Spectral domain OCT (SD-OCT) to assess ganglion cell complex (GCC) and peripapillary retinal nerve fiber layer (pRNFL) thickness. Retinal sensitivity was tested with MP and standard automatic perimetry (SAP).

Results

The VD in moderate/severe POAG was lower than that in mild POAG and healthy control in the macular superficial vascular plexus (SVP) ($38.7 \pm 6.3\%$ vs. $42.9 \pm 5.2\%$, $49.7 \pm 2.6\%$ respectively, $P < 0.001$) and peripapillary radial peripapillary capillaries (pRPC) ($36.4 \pm 5.7\%$ vs. $43.6 \pm 6.6\%$, $49.1 \pm 2.4\%$ respectively, $P < 0.001$). The Pearson's correlations between function-structure parameters were strongest with MP average sensitivity threshold and SVP VD in the area of whole macula ($r = 0.68$); followed by SAP mean deviation (MD) and pRNFL thickness ($r = 0.63$); SAP MD and pRPC VD ($r = 0.59$) and MP average threshold and GCC thickness ($r = 0.54$). We found the AUROCs for discriminating between glaucomatous and healthy eyes were highest for structural parameters as follows: pRNFL (0.94),

macular SVP whole (0.92), pRPC (0.92) and GCC (0.91). Pairwise comparison of the above parameters showed no difference ($P>0.05$).

Conclusion

The relationship between microvascular damage in the macular SVP whole and the decrease of MP average sensitivity threshold is stronger than the pRNFL thickness measurements and SAP parameters. OCTA and MP techniques are valuable methods that allow clinically monitor structural and functional changes in glaucomatous eyes.

Introduction

Primary open angle-glaucoma (POAG) is a progressive optic neuropathy of the optic nerve characterized by retinal ganglion cell (RGC) apoptosis [1]. Increasing evidence indicates that abnormalities in retinal microcirculation and impairment of ocular blood flow have significant impact on development of POAG, but the exact role of vascular disorders in the pathogenesis of glaucoma has not been established [2–4].

Optical Coherence Tomography Angiography (OCTA) is an objective and non-invasive method of imaging the retinal and choroidal vessels. OCTA allows of repeatable, quantitative assessment of microcirculation in the macula and peripapillary [5, 6]. The reduction of retinal vascular density (VD) within the macula and optic nerve head (ONH) has been repeatedly confirmed in patients with POAG [7–11]. Takusagawa et al. observed with the use of projection-resolved OCTA focal capillary dropout in the macular superficial vascular plexus (SVP), but not the intermediate and deep vascular plexus (DVP) in glaucomatous eyes. Among the overall macular parameters, the SVP VD had the best diagnostic accuracy and was highly correlated with the corresponding retinal ganglion cell complex (GCC) thickness and visual field (VF) sensitivity [12].

Standard automated perimetry (SAP) is most often performed to detect glaucomatous retinal function damage and is still the preferred method for assessing the 24° or 30° area of the VF center in patients with POAG. The macula, in which is most of the RGC, is located in the center of 5°–10° VF, which means that using the 24–2 SAP program, you might not notice the subtle changes in sensitivity in the macula that occur before defects appear in the peripheral parts of VF [13–16]. Microperimetry (MP) is a newer method of retinal function examination thanks to the use of eye-tracking system can measure retinal sensitivity at appropriate retinal points. During a single examination, it combines digital fundus photography and VF examination, along with an assessment of retinal sensitivity, allowing for the assessment of changes in the central part of the field of view, both in qualitative and quantitative terms [17].

The aim of our study was to determine whether the disturbances in retinal VD parameters are associated with the presence of retinal function abnormalities using MP and SAP. While there have been studies that looked at the relationship between function disorder and damage to the structure of the retina, to date, to our knowledge, the relationship between macular retinal sensitivity using MP and VD in OCTA has not been evaluated in patients with POAG. We hypothesized that the sites of reduced VD in the macula of the eyes with POAG have a lower retinal sensitivity measured by MP.

Materials and methods

This was an cross-sectional study and included patients with POAG and a healthy control group. The protocol of the study was approved by the Bioethical Commission of Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz. Approval number:600/2019. Each participant signed a voluntary consent form to participate. The examinations were conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration between June 2019 and January 2020 at the Oftalmika Eye Hospital.

All patients included in the study had detailed ophthalmological examinations which included: best-corrected visual acuity (BCVA), slit-lamp biomicroscopy, dilated fundus examination, tonometry (Icare TAO1i, USA), pachymetry (Tomey EM-3000, Tomey Corporation, Japan), gonioscopy and axial length measurement (IOL Master 500, Zeiss Humphrey, Dublin, CA, USA). The thickness of the peripapillary retinal nerve fiber layer (pRNFL) and GCC were also measured using Spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT), retinal VD assessment using OCTA, and VF and retinal sensitivity examination using SAP and MP were performed. These examinations were carried out over the course of one day, by the same ophthalmologist.

Patients with POAG were enrolled in the study based on the presence of features of glaucomatous optic neuropathy (diffuse or focal thinning of the neural retinal ring, ONH hemorrhagia, abnormal C/D ratio >0.6 , C/D asymmetry between two eyes above 0.2), which was accompanied by a decrease in pRNFL thickness corresponding to the loss of VF in SAP with an open anterior chamber angle. Glaucoma was confirmed by the presence of repeated abnormal SAP results with a glaucoma hemifield test (GHT) outside normal limits or pattern standard deviation (PSD) outside the 95% normal limits or a cluster of 3 or more adjacent points in a typical localization for glaucoma. Patients with POAG were further classified into 2 groups based on the severity of VF damage in SAP; mild glaucoma was defined as mean deviation (MD) VF greater than -6dB , and moderate/severe glaucoma when MD was less than -6dB .

Healthy participants had intraocular pressures less than 21mmHg , normal ONH appearance without asymmetry, pRNFL thickness within normal limits, normal results in VF examination defined as a PSD within the 95% confidence limits and a GHT result within normal limits. The healthy control did not present with any ocular disease except for small refractive errors.

The general exclusion criteria were: age below 50 and above 85, $\text{BCVA} \leq 0.6$, refractive defect above $\pm 3.0\text{Dsph}$, $\text{IOP} > 23\text{mmHg}$, ophthalmic surgery, with the exception of uncomplicated cataract phacoemulsification and uncomplicated anti-glaucoma surgery, when at least 3 months have passed since the surgery. People with vascular or non-vascular retinopathies, ocular or systemic diseases known to impair the VF, non-glaucomatous optic neuropathies and macular disease were also excluded.

Optical coherence tomography angiography

The study used the Avanti Angiovue system (Optovue, Inc. Fremont, CA, USA), which provides non-invasive visualization of the retinal vascular network through the split-spectrum amplitude-decorrelation angiography (SSADA) algorithm. The Avanti RTVue XR device has the ability to scan at $70,000\text{ A-scans/second}$ and allows measurements with an axial resolution of $5\mu\text{m}$ using a light source with a wavelength of $840 \pm 10\mu\text{m}$. The software version that was used, was the latest commercially available version (version 2017.1.0.151). The study was conducted on all of the patients between 12:00 and 16:00 after pupil dilation. The protocol that was used for macula analysis consisted of B-scans covering a $6 \times 6\text{mm}$ area repeated horizontally and vertically. Each of the B-scans contained 400 A-scans with the center located at the

fixation point. For peripapillary vessel analysis, a measurement that covered an area of 4.5x4.5mm centered on ONH, was made. The images also consisted of two sets of B-scans repeated horizontally and vertically, each consisting of 400 A-scans. The data were analyzed with commercially available software that enabled automatic segmentation of SVP and DVP within the macula and the radial peripapillary capillaries (RPC) layer in ONH area. VD was calculated as the percent area occupied by flowing blood vessels in the selected region. In the macula, the VD analysis covered the entire test area of 6x6mm (VD whole), the parafoveal area between the rings 1mm and 3mm from the center of the fovea, and the perifoveal area between the rings 3mm and 6mm from the center of the fovea. The macular SVP was comprised between the inner limiting membrane (ILM) to outer boundary of the inner plexiform layer (IPL), while the DVP was comprised between outer boundary of the IPL to outer boundary of the outer plexiform layer. For the ONH scan, VD was analyzed on the entire surface of the en face image 4.5x4.5mm and in the peripapillary area—extending outwards from the ONH border measured in an elliptical area between 2 and 4mm. The RPC layer was defined as extending from the ILM to the posterior border of RNFL. For further analysis, an experienced ophthalmologist qualified good technical measurements with a scan quality (SQ) index of 6 or more on a 10-point scale with which a commercial device was equipped. The SQ index combines the previously used parameter the signal strength index (SSI), as well as an automated assessment of motion artifacts and defocus measure. Measurements with the presence of motion artifacts on en face images (irregular vascular patterns or blurred ONH border), and those with incorrect segmentation of individual plexuses were rejected.

OCTA is a modern imaging technique uses motion contrast for imaging of the vascular network enables qualitative and quantitative measurements of vessels at various retinal depths.

Spectral domain optical coherence tomography

All patients underwent an SD-OCT examination to measure pRNFL thickness using a Spectralis OCT device (Heidelberg Engineering, Germany). The pRNFL was measured on the area of a circular scan that consisted of 768 A-scans. The scanning circle was 3.46mm in diameter and centered on the center of ONH. The global value of pRNFL thickness in the 360 degree range was analyzed. The GCC thickness assessment was carried out using an Avanti RTVue XR device camera. To measure the thickness of the retinal GCC, the built-in Avanti glaucoma module was used. The GCC scan was centered 1mm temporal from the fovea and covered a circular macula area of 6mm in diameter.

Microperimetry

Each participant underwent an MP examination using the CenterVue MAIA device (CenterVue, Padova, Italy). The system is equipped with a scanning laser ophthalmoscope that provides accurate tracking and compensation of eye movement in real time. Tests were conducted prior to administering the mydriatics, in a quiet, dark room, and the lights were turned off after applying the veil to the untested eye. The target of fixation was a red ring with a diameter of 2° divided into four segments. The weak white background had a luminance level of 1.27cd/m²; the maximum stimulus intensity was 317.5cd/m², which gives a dynamic range of 0–36dB; the stimulus size was Goldmann III; the stimulus duration was 200ms; and the test protocol was a 4–2 threshold strategy. The observer's task was to press the button to indicate the presence of a light spot each time it was detected, while maintaining a central fixation. VF locations that required brighter stimuli to reach the threshold showed reduced sensitivity, and therefore lower dB values indicate lower retinal sensitivity, and conversely, higher dB values correspond to darkening stimuli and represent higher retinal sensitivity. The Expert Exam protocol was

used in order to assess the average sensitivity threshold at various locations within the macula. The test grid consisted of 37 light points in a concentric area, 5° from the central fixation point, which means that a center area of 10° was tested, with 12 points on each concentric ring (2°, 6° and 10°) plus the measurement of one center point. In addition to assessing the sensitivity threshold of the retina, the device also gives the opportunity of estimating the index of macular integrity (a numerical value that describes the probability of a patient's response to a stimulus to be normal, suspicious or abnormal compared to normative data corrected for age where higher number suggests greater likelihood of abnormal findings) and records the stability of the fixation.

MP, also known as fundus related perimetry, includes a system to image the retina and an eye tracker to compensate eye movements during visual field testing. The device allows to precisely create a retinal sensitivity map of the quantity of light perceived in designated parts of the retina.

Standard automated perimetry

SAP examination was performed using a Humphrey Field Analyzer II (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA). Visual fields were acquired using the Swedish Interactive Threshold Algorithm (SITA) standard 24-2 strategies. Only reliable tests ($\leq 33\%$ fixation losses, $\leq 10\%$ false-positives, and $\leq 10\%$ false-negatives) VF without rim and eyelid artifacts; and cases with no evidence that the abnormal results were caused by diseases other than glaucoma were included. The severity of glaucoma was recorded as the MD value.

Statistical analysis

The summary statistics for normally distributed continuous variables are presented as mean and standard deviation (SD) and as a median with interquartile range (IQR) for non-normally distributed variables. Categorical variables are presented as frequencies. Differences between continuous normally distributed variables were analyzed by the t test or by ANOVA together with the Bonferroni-type adjustment for multiple testing. In the case the data were not normally distributed, differences were tested by the Wilcoxon or Kruskal-Wallis test. When multiple patient groups were compared, multiple testing corrections were also applied. Differences for categorical variables were tested using the chi-square or Fisher exact test for independence. To compare the distributions of functional and structural parameters of eyes in various groups of patients, the Linear Mixed Effects model (LMM), which takes into account the correlation between repeated observations from the same individual, was used (with application of the inter-eye correlation). The models were also adjusted for age and SQ (where applicable). To study the association between the functional and structural parameters the LMM has also been used. The functional parameters were included in the models as the dependent variables, while the structural parameters, as well as the age of patients, were included as independent variables. The results were reported by the coefficient of determination (R^2), which evaluates the proportion of variance in the dependent variable explained by the model. To assess the strength of the association between the structural and functional parameters, the Pearson's correlation coefficient was calculated. Area under receiver operating characteristic curve (AUROC) was used to assess the diagnostic accuracy of considered variables to differentiate between healthy control and POAG eyes. The deLong's or bootstrap test was used to compare the AUROC curves. The results were considered as statistically significant when the p-value was less than 0.05. The statistical analysis was performed with the use of the R-software, version 3.6.2 (packages lme4, gls, r2glmm and pROC).

Results

Initially, 58 eyes of 30 participants with POAG, and 27 eyes of 15 participants from the healthy group who met the outlined inclusion and exclusion criteria, qualified for the study. However, of these, 52 eyes with POAG and 23 eyes from the healthy group were subjected to final analysis. 8 eyes were excluded due to poor image quality (motion artifacts, vitreous floaters, incorrect segmentation) in OCTA and SD-OCT examinations, and 2 eyes were excluded due to unreliable MP and SAP results. When both eyes of the same patient were included in the study, the correlation between the eyes was controlled in our analyses. Based on the degree of VF loss in SAP, 30 eyes of patients with POAG were assigned to the group with mild POAG (MD -2.6 ± 1.6 dB) and 22 eyes were included in the group with moderate/severe POAG (MD -13.4 ± 7.1 dB). There was no significant difference in age, sex, hypertension, diabetes, central corneal thickness, or intraocular pressure between the POAG and healthy groups (Table 1). Among patients with POAG, at least one type of anti-glaucoma drops was used in 47 eyes (90.4%). In the mild POAG group, anti-glaucoma surgery was performed in 2 (6.7%) eyes, and in the group with moderate/severe POAG, in 3 (13.6%) eyes. We also assessed whether any of the drug classes was associated with any OCTA parameter by controlling the age and severity of the disease, however we did not find such impact.

Healthy eyes with normal pRNFL and GCC thickness had a clearly visible microvessel network in pRPC and SVP in the macula compared to eyes with POAG. As the disease progresses, the tendency to have a less frequent retinal microvessel network, and the appearance of sites where vascular flows are completely invisible, can be demonstrated (Fig 1). Comparing the results obtained in the angiograms of the macula with MP, it can be seen that the places where the density of the microvessels network in SVP was reduced, corresponded exactly to the areas

Table 1. Demographic data and clinical characteristics of patients.

Parameter	Healthy	POAG		P Value [‡]
		Mild	Moderate/Severe	
Number of eyes (patients)	23(15)	30(20)	22(16)	
Age (years)	69±5.2	70.2±8.3	71.9±8.2	0.573
Gender (Male/Female)	6/9	8/12	9/6	0.429
Self-Reported History of Hypertension (patients)	8(53.3) †	9(45) †	9(60) †	0.674
Self-Reported History of Diabetes (patients)	4(26.7) †	4(20) †	2(13.3) †	0.622
Number of Glaucoma Medications	0	1.5±0.9	2.1±1.1	0.049
Eyes on Timolol	0	13(43.3) †	13(59.1) †	0.401
Eyes on Brymonidine	0	3(10) †	8 (36.4) †	0.037
Eyes on Prostaglandin Analogs	0	20(66.7) †	8(36.4) †	0.048
Eyes on Carbonic Anhydrase Inhibitors	0	10(33.3) †	16(72.7) †	0.011
History of Glaucoma Surgery (eyes)	0	2(6.7) †	3 (13.6) †	0.639
BCVA (Snellen)	1(1–1)*	1(1–1)*	1(1–1)*	0.270
CCT (microns)	540(532–549)*	537.5(497.5–564.5)*	517(486–540)*	0.485
IOP (mmHg)	17.8±2.1	18.3±2.1	17.6±2.5	0.552
Axial Length (mm)	22.9±0.7	23.2±1.0	23.37±0.8	0.296

Mean (standard deviation).

*Median (interquartile range).

†n (%).

Statistical significance tested by ANOVA or Kruskal-Wallis test (for continuous variables) and by chi-square or Fisher exact test (for categorical variables).

Abbreviations: POAG = primary open-angle glaucoma; BCVA = best corrected visual acuity; CCT = central corneal thickness; IOP = intraocular pressure.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.t001>

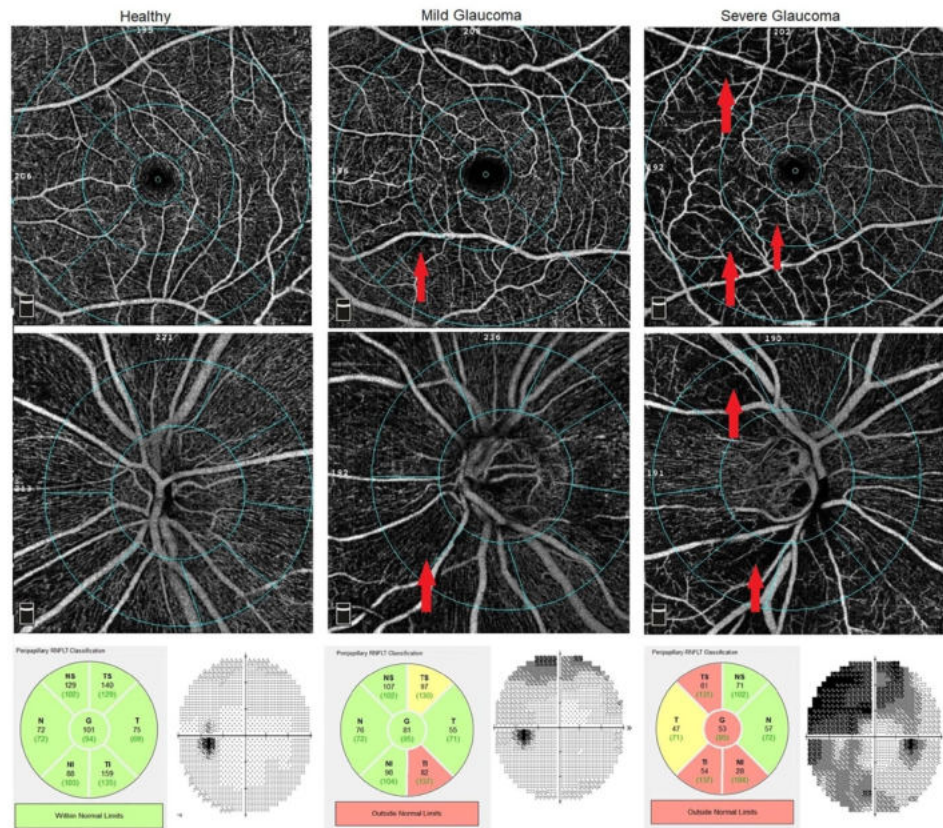


Fig 1. Optical coherence tomography angiography (OCTA) of vessel density (VD) map in healthy, mild and severe glaucoma. Top row and second row show the macular superficial vascular plexus (SVP) (scan 6x6mm) and radial peripapillary capillaries (RPC), respectively. Bottom row: Peripapillary retinal nerve fiber layer (pRNFL) analysis from Spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) and standard automated perimetry (SAP) visual field (VF). The first column shows the healthy patient with normal VD. The second column: patient with mild glaucoma. Notable VD reduction at the inferonasal region of peripapillary RPC (pRPC) and perifoveal retina was observed (red arrows). pRNFL defects at the inferotemporal sector were noted on SD-OCT. pRNFL defects and capillary dropout area were compatible with superior VF scotomas observed in the SAP. Third column: In patient with severe glaucoma the superior arcuate scotoma and defects in inferotemporal quadrant are consistent with capillary dropout at the inferior and superior region of the pRPC and parafoveal and perifoveal retina (red arrows). The pRNFL evaluation shows abnormalities in the temporal and inferior quadrants.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.g001>

where the retinal sensitivity threshold was decreased. Moreover, the capillary dropout places in the macular SVP corresponded to deep scotoma points (0dB) in the MP (Fig 2).

Quantitative analysis confirmed that the severity of POAG was significantly associated with deterioration of parameters of retinal function and structure. The evaluation of images obtained with OCTA showed significant reduction in retinal VD in pRPC and macular SVP whole in eyes with POAG. The moderate/severe POAG had significantly less VD in both the pRPC (36.4±5.7%) and macular SVP whole (38.7±6.3%) compared to the mild POAG

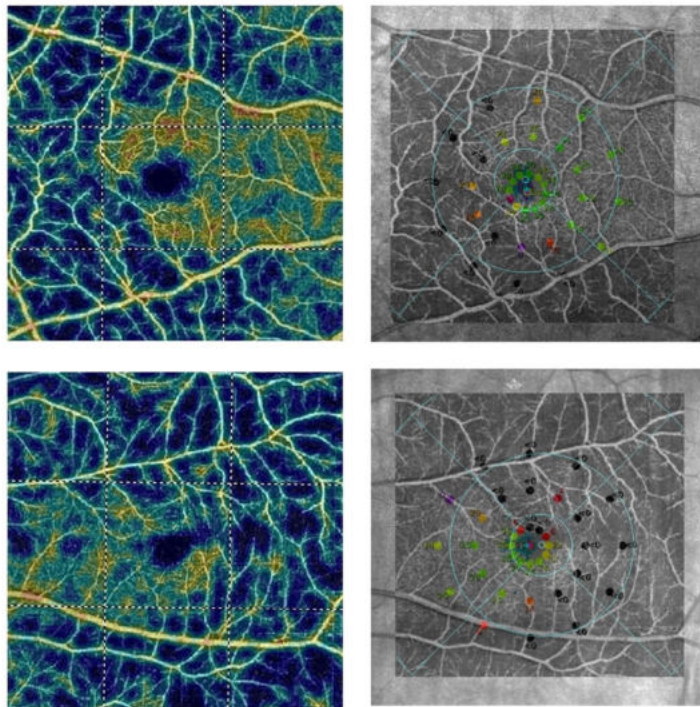


Fig 2. Relationship between sensitivity threshold points in the microperimetric (MP) examination of the retina and en face angiogram of superficial retinal vascular plexus (SVP) in the macula using optical coherence tomography angiography (OCTA). Top row: Right eye of female with primary open-angle glaucoma (POAG). Bottom row: Left eye of male with POAG. First column: The OCTA colour-coded vascular map of macular SVP. Cold colours on angiograms indicate capillary dropout areas. Second column: on the Scanning Laser Ophthalmoscope image with sensitivity threshold points in the MP examination, en face angiogram of macular SVP was superimposed to show the relationship between function and structure of the retina. Points at which sensitivity threshold was reduced or where there were deep scotoma points (black dots) in the MP, corresponded exactly to capillary dropout areas in OCTA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.g002>

($43.6 \pm 6.6\%$, $42.9 \pm 5.2\%$, respectively) and healthy group ($49.1 \pm 2.4\%$, $49.7 \pm 2.6\%$, respectively) ($P < 0.001$ for all pairwise comparisons, except VD comparison in macular SVP whole in eyes with mild POAG and moderate/severe POAG ($P = 0.002$)). Differences in VD in macular DVP between groups were not statistically significant. The DVP/SVP whole ratio in the healthy group was 1 ± 0.1 and was significantly different from the mild POAG group (1.1 ± 0.1), and the moderate/severe POAG group (1.2 ± 0.1) ($P < 0.001$). The SD-OCT study confirmed a significant reduction in pRNFL and GCC thickness in the eyes of POAG, and the fact that the degree of damage to the retinal structure increases with the severity of the disease (Table 2).

Assessment of retinal sensitivity in the MP showed that eyes with moderate/severe POAG had significantly worse parameters: average sensitivity threshold (20.2 ± 5.4 dB) compared to eyes with mild POAG (25.3 ± 2.3 dB) and the healthy group (26.7 ± 1.4 dB) ($P < 0.001$). Despite

Table 2. Structural characteristics of the studied groups.

Parameter	Healthy	Mild POAG	Moderate/Severe POAG	P Values†		
				Mild vs Healthy	Moderate/ Severe vs Healthy	Moderate/ Severe vs Mild
Optical Coherence Tomography Angiography						
SVP whole VD (%)	49.7±2.6)	42.9±5.2	38.7±6.3	0.001	<0.001	0.002
SVP superior-hemi VD (%)	50.2±3	43.3±5.3	39.1±6.1	0.001	<0.001	0.003
SVP inferior-hemi VD (%)	49.6±2.7	42.5±5.2	38.4±6.6	<0.001	<0.001	0.003
SVP parafovea VD (%)	52.4±4.1	46.9±5.9	43.6±6.1	0.015	<0.001	0.018
DVP whole VD (%)	49.3±3.4	47.8±5.7	46.9±5.5	0.976	0.571	0.504
DVP/SVP VD index	1.±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1	0.001	<0.001	0.011
SQ Macula index	8(7–8)*	7(7–8)*	7(7–8)*	0.208	0.162	0.782
pRPC VD (%)	51.2±2.9	43.6(6.6)	36.2±7.2	0.001	<0.001	<0.001
RPC whole VD (%)	49.1±2.4	42.7±5.6	36.4±5.7	0.001	<0.001	<0.001
RPC superior-hemi VD (%)	51.4±3.2	44.1±6.6	37.2±7.1	0.001	<0.001	0.001
RPC inferior-hemi VD (%)	51.1±2.9	43.1±6.9	35.1±8.1	0.001	<0.001	<0.001
SQ OpticDisc index	9(8–9)*	8(7–9)*	8(8–9)*	0.124	0.401	0.521
Spectral Domain Optical Coherence Tomography						
GCC average (µm)	98.2±9.8	82.3±10.9	71.6±11.3	<0.001	<0.001	0.001
GCC superior (µm)	97.4±1	82.7±11	71.6±10.8	<0.001	<0.001	0.001
GCC inferior (µm)	99.1±9.8	82.2±11.2	71.6±12.2	<0.001	<0.001	0.001
pRNFLglobal (µm)	101.8±10.3	78.8±13.9	61.4±14.2	<0.001	<0.001	<0.001
pRNFLsuperior (µm)	122.4±12.2	97.4±17.9	74.6±20.2	<0.001	<0.001	<0.001
pRNFLinferior (µm)	131±18.1	98.7±22.2	69.2±25.1	<0.001	<0.001	<0.001
pRNFLtemporal (µm)	72.4±17.6	57±15.9	49.4±11.9	0.003	<0.001	0.094
pRNFLnasal (µm)	81.6±11.7	62.1±15.2	52.2±15.6	<0.001	<0.001	0.027

Mean (standard deviation).

*Median (interquartilerange).

†P Values adjusted for age, inter-eye correlation and SQ (in OCTA), based on Linear Mixed Effects Model.

Abbreviations: POAG = primary open-angle glaucoma; SQ = scan quality; SVP = superficial vascular plexus; DVP = deep vascular plexus; p- = peripapillary;

RPC = radial peripapillary capillaries; VD = vessel density; GCC = ganglion cell complex; RNFL = retinal nerve fiber layer; OCTA = optical coherence tomography angiography.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.t002>

the fact that patients with mild POAG had lower average sensitivity threshold than healthy, the difference was not significant ($P = 0.134$). For the macular integrity index, a significant difference was only between moderate/severe POAG (92.2 ± 15.4) and healthy (71.6 ± 20.2) ($P = 0.005$). In the 24–2 SAP, VF testing in eyes with moderate/severe POAG showed significant differences in VFI ($62.1 \pm 27\%$) and MD (-13.4 ± 7.3 dB), and the group with mild POAG ($95.8 \pm 3.6\%$, -2.6 ± 1.5 dB) and healthy ($98 \pm 1.5\%$, -1.8 ± 1.5 dB, respectively) ($P < 0.001$). There were no significant differences in retinal function parameters between eyes with mild POAG and healthy control (Table 3).

In order to examine the correlation between retinal function assessed in MP and SAP, and retinal structure analyzed using OCTA and SD-OCT, the values of partial correlations corrected for age, inter-eye correlation and SQ (in OCTA) were determined. The analysis showed that the strongest correlation occurs between SVP whole VD in the macula and average sensitivity threshold (Pearson's $r = 0.68$, $P < 0.001$). Strong correlations also existed between pRNFL thickness and MD, pRNFL thickness and VFI (Pearson's $r = 0.63$, $r = 0.61$, $P < 0.001$, respectively), while there were moderately strong correlations between pRPC VD and MD (Pearson's $r = 0.59$, $P < 0.001$), pRPC VD and VFI (Pearson's $r = 0.58$, $P < 0.001$), pRPC VD and PSD,

Table 3. Functional characteristics of the studied groups.

Parameter	Healthy	Mild POAG	Moderate/Severe POAG	P Values†		
				Mild vs Healthy	Moderate/ Severe vs Healthy	Moderate/ Severe vs Mild
Average sensitivity threshold (dB)	26.7±1.4	25.3±2.3	20.2±5.4	0.134	<0.001	<0.001
Macular integrity index	71.6 ±20.2	80.2±21.5	92.2±15.4	0.173	0.005	0.07
VFI (%)	98±1.5	95.8±3.6	62.1±27	0.573	<0.001	<0.001
MD (dB)	-1.8±1.5	-2.6±1.5	-13.4±7.3	0.431	<0.001	<0.001
PSD (dB)	2.4±0.6	2.8±1.6	8.6±3.7	0.221	0.023	0.187

† P Values adjusted for age and inter-eye correlation based on Linear Mixed Effects Model.

Abbreviations: POAG = primary open-angle glaucoma; VFI = visual field index; MD = mean deviation; PSD = pattern standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.t003>

GCC thickness and average sensitivity threshold (Pearson's $r = 0.59$, $r = -0.55$ $r = 0.54$, respectively, $P < 0.001$) (Table 4). The dependence between the functional and structural parameters has also been studied with LMM (Fig 3). The highest values of the coefficient of determination have been obtained for the model displaying the dependence between SVP whole VD in the macula and MP average sensitivity threshold: $R^2 = 0.67$ for the linear- and $R_1^2 = 0.73$ for the curvilinear dependence, which indicates that about 67% and 73% respectively, of variation in average sensitivity threshold is explained by the model.

The AUROC was used to reflect the diagnostic accuracy of structural parameters of the retina obtained using OCTA and SD-OCT imaging (Table 5). To distinguish healthy eyes from eyes with POAG, the highest diagnostic accuracy was obtained for pRNFL, macular SVP whole, pRPC, GCC (AUROC 0.94, 0.92, 0.92, 0.91, respectively). The pRPC VD, pRNFL thickness and macular SVP whole VD showed the highest sensitivity at 95% specificity (0.79, 0.77, 0.74, respectively). Pairwise comparisons showed that diagnostic accuracy among all structural parameters did not differ significantly.

Discussion

The results of this study confirmed our hypothesis showing a significant relationship between the assessment of retinal sensitivity using MP and the loss of retinal microvascular network in

Table 4. Pearson correlation coefficient between structure and function of the retina.

Parameter	Average sensitivity threshold	Macular integrity index	VFI	MD	PSD
SVP whole VD	0.68 (<0.001)	-0.33 (0.004)	0.47 (<0.001)	0.42 (<0.001)	-0.44 (<0.001)
DVP whole VD	0.34 (0.003)	-0.16 (0.166)	0.2 (0.082)	0.166 (0.156)	-0.03 (0.766)
DVP/SVP VD index	-0.44 (<0.001)	0.27 (0.021)	-0.33 (0.004)	-0.31 (0.007)	0.45 (<0.001)
pRPC VD	0.48 (<0.001)	-0.31 (0.008)	0.58 (<0.001)	0.59 (<0.001)	-0.55 (<0.001)
GCC average	0.54 (<0.001)	-0.25 (0.029)	0.47 (<0.001)	0.47 (<0.001)	-0.3 (0.009)
pRNFLglobal	0.47 (<0.001)	-0.26 (0.024)	0.61 (<0.001)	0.63 (<0.001)	-0.38 (0.001)

Pearson's r (P Value) adjusted for age, inter-eye correlation and scan quality (in OCTA).

Abbreviations: VFI = visual field index; MD = mean deviation; PSD = pattern standard deviation; SVP = superficial vascular plexus; DVP = deep vascular plexus; pRPC = peripapillary radial peripapillary capillaries; VD = vessel density; GCC = ganglion cell complex; pRNFL = peripapillary retinal nerve fiber layer; OCTA = optical coherence tomography angiography.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.t004>

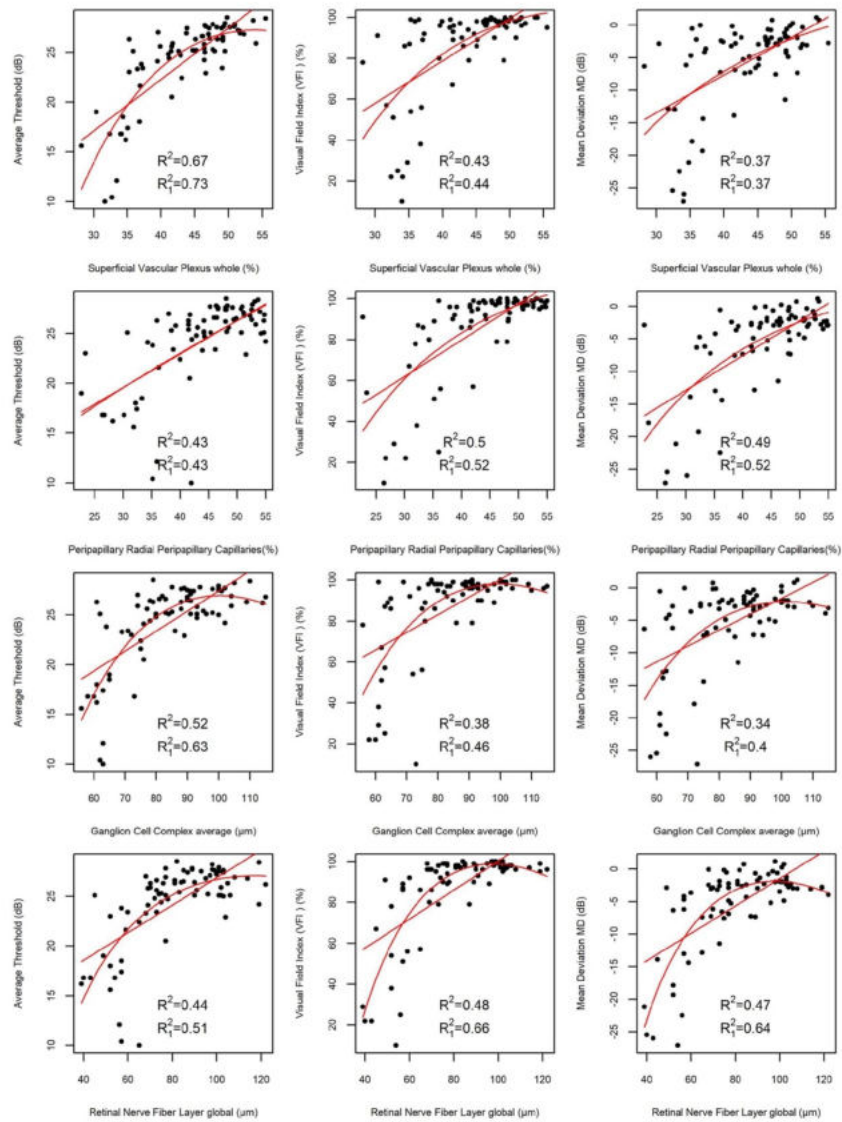


Fig 3. Scatter plots illustrating the correlation between structural and functional parameters with linear and quadratic regression curves. The first column shows dependence between average sensitivity threshold and macular superficial retinal vascular plexus whole(SVP whole), average sensitivity threshold and peripapillary radial peripapillary capillaries (pRPC), average sensitivity threshold and ganglion cell complex (GCC), average sensitivity threshold and peripapillary retinal nerve fiber layer (pRNFL). The second column illustrates correlation between visual field index (VFI) and macular SVP whole, VFI and pRPC, VFI and GCC, VFI and pRNFL. The third column shows dependence between mean deviation (MD) and macular SVP whole, MD and pRPC, MD and GCC, MD and pRNFL. Additionally the values of the adjusted coefficient of determination for the linear (R^2) and quadratic dependence (R_1^2) for the depicted variables, obtained from the LMM fit adjusted for age, inter-eye correlation and SQ (where applicable) are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.g003>

Table 5. Area under the receiver operating characteristic curve and diagnostic sensitivity of the structural to diagnose primary open-angle glaucoma.

Parameter	AUROC (95% CI)	Sensitivity (95% specificity)	P Value for pairwise AUROC comparison*			
			SVP whole VD	DVP/ SVP index	pRPC VD	GCC average
SVP whole VD	0.92 (0.85–0.98)	0.74	-	-	-	-
DVP/SVP VD index	0.89 (0.81–0.96)	0.65	0.526	-	-	-
pRPC VD	0.92 (0.86–0.98)	0.79	0.827	0.353	-	-
GCC average	0.91 (0.83–0.98)	0.5	0.8	0.658	0.645	-
pRNFL global	0.94 (0.9–0.99)	0.77	0.4	0.079	0.299	0.147

Sensitivities at 95% specificity were evaluated.

* DeLong's or bootstrap test.

Abbreviations: AUROC = area under the receiver operating characteristic curve; CI = confidence interval; VFI = visual field index; MD = mean deviation;

PSD = pattern standard deviation; SVP = superficial vascular plexus; DVP = deep vascular plexus; pRPC = peripapillary radial peripapillary capillaries; VD = vessel density; GCC = ganglion cell complex; pRNFL = peripapillary retinal nerve fiber layer.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235571.t005>

the OCTA examination. The strongest correlation was between average sensitivity threshold decrease and loss of microvascular density in macular SVP whole.

Diagnosis and monitoring of glaucoma in clinical practice is based on the assessment of functional and structural parameters of the retina, and pRNFL thickness analysis using SD-OCT and VF assessment using SAP has been the standard so far [18]. However, there are some limitations to these methods, which results in the search for new diagnostic markers. Jia et al. were the first to prove that OCTA could be useful in glaucoma diagnosis. They found that eyes with an early form of glaucoma in relation to a healthy group have a lower ONH VD and a reduced disc flow index [19, 20]. Since then, many scientific reports have confirmed the usefulness of OCTA imaging in the diagnosis of glaucoma, and have shown that the reduction of VD in patients with glaucoma also occurs in the peripapillary area and macula [21–24]. Liu et al. found that the peripapillary flow index and peripapillary VD are significantly lower in glaucomatous eyes and showed a correlation with SAP. Moreover, the disc flow index proved to be an unreliable parameter because of the absence of an OCT signal in segments of major blood vessels [25].

The development of OCTA software has enabled the quantification of angiograms, along with more accurate segmentation. The microcirculation assessment in RNFL has become possible, which reflects the RPC plexus formed by a unique network of capillary microvessels that are playing a key role in meeting the nutritional requirements of RGC axons [26]. Yarmohammadi et al. used OCTA to assess VD in the RPC layer in glaucomatous eyes. They were the first to demonstrate that circumpapillary VD and whole en face image VD in the RPC layer were significantly lower in eyes with POAG compared to healthy and glaucoma suspected [24]. Subsequent reports confirmed that patients with POAG have a decrease of VD in RPC, which may correlate with the loss of retinal function in SAP [27–32].

We showed that the correlation of structural parameters in the peripapillary area (pRNFL thickness and pRPC VD) had a stronger relationship with SAP parameters than with MP parameters. This is probably due to the function of RGC axons and the associated microvessel network, which in the peripapillary area, come from different regions of the retina where the cell bodies of RGCs are located. Therefore the observed changes of pRNFL thickness reduction may result in damage to retinal function in the remote area. In view of this, it seems that a larger area used to test retinal function in 24–2 SAP corresponds better with structural peripapillary indicators in glaucoma than MP does. The functional parameters that correlated best with pRNFL thickness and pRPC VD, in our study, were MD and VFI, while MP average

sensitivity threshold showed weaker correlation. Yarmohammadi et al. were the first to evaluate the correlation between the severity of retinal function damage in the 24–2 SAP examination and the loss of RPC VD using OCTA in POAG patients. They showed that linear associations between SAP MD with RPC VD was significantly stronger than the relationship between SAP MD and RNFL thickness [33]. The results of our research also showed linear associations between loss of pRPC VD and SAP MD damage, which did not differ significantly from the correlation between SAP MD and pRNFL thickness. The reason for the difference in the obtained results may be the use of a different device to assess the thickness of the pRNFL.

Contrary to peripapillary parameters, structural indicators of the retina in the macula (SVP whole VD, GCC thickness) had a higher correlation with the study of retinal function tested by MP. This is because MP focuses only on the central macular area where most of the RGC is located, and mostly coincides with the analyzed area in the SVP whole. We showed that VD in macular SVP whole compared to GCC thickness has a higher correlation with MP average sensitivity threshold, which may indicate the special role of vascular mechanisms in the pathogenesis of glaucoma. Our research also showed that peripapillary parameters show a stronger correlation with SAP than macular parameters, as confirmed by other authors [34]. This may be because the macula, in which most of the RGC is located, is represented in the center of 5°–10° VF, whereas the standard 24–2 SAP program is tested only by 8–16 points (out of 54). Test points spaced 6° apart in 24–2 SAP may be an inaccurate test when assessing macular sensitivity [13–15]. In SAP, in addition to programs 30–2 and 24–2, it is also possible to examine a 10° VF center with a higher resolution, i.e. with 64 test points spaced 2° apart. It is suggested that using 24–2 SAP, you might not see the changes in the macula before defects appear in the peripheral parts of VF. Therefore, for this purpose, the VF test can be used, which assesses the central 10° VF better than the 24–2 SAP program [16, 35]. Penteadó et al. found that the relationship between 10–2 SAP mean sensitivity and GCC thickness was stronger than with macular SVP VD [36]. In contrast, our results showed a higher correlation between SVP whole VD and MP average sensitivity threshold, which could be due to the difference in the size of angiograms. The small scanning area they used (3x3mm, which is unlike our study where the scanning area was 6x6mm) could result in the overlooking of significant microvascular pathology in glaucoma, located peripherally outside the scan area. Additionally, the obtained angiograms were smaller than the area covered by the 10–2 SAP program, which might have influenced the strength of the structure-function relationship that was found.

A new method of assessing visual function fundus-driven perimeters has emerged in recent years, known as microperimetry. Previously, Scheifer et al. used fundus-oriented perimeters using individually condensed test grids and found increased detection of VF glaucoma lesions in morphologically visible areas of the retina in the macula and when test points are located close to each other, compared to conventional automated perimetry [37]. Studies have confirmed the usefulness of MP in assessing retinal function in eyes with glaucoma, and showed a significant relationship between the reduction in retinal sensitivity in the MP examination and the decrease in GCIPL thickness [38–43]. Lima et al. showed that retinal sensitivity in MP examination not only significantly correlated with retinal sensitivity in the 10–2 SAP study, but also detected retinal areas with reduced sensitivity in quadrants where normal results were obtained in 10–2 SAP. The reduced retinal sensitivity in these areas corresponded to a reduction of up to 75% in spot thickness in the OCT imaging [44]. We found no reports assessing the relationship between retinal sensitivity using MP and vessel density in OCT-A examination.

Based on the AUROC interpretation, we have shown that structural parameters obtained using OCTA (VD in macular SVP whole and in pRPC) and using SD-OCT (thickness of pRNFL and GCC) have high diagnostic ability (AUROC > 0.9 for all parameters), and pairwise

comparison revealed that they have the same diagnostic power performance, which was confirmed in numerous studies [25, 27–34]. In the current study patients with mild glaucoma have lower VF parameters than healthy, however we believe that due to the early stage of the disease these changes were not statistically significant. Defects in VF appear only when about 30% of RGC is damaged, and retinal structural changes precede the occurrence of functional abnormalities in patients with glaucoma [45, 46]. In studies where the diagnostic capabilities of functional parameters were compared using MP with structural parameters, the advantage of structural assessment in glaucoma diagnostics was also demonstrated [47–49]. Contrary to our results and other reports, a study by Rao et al. showed that the diagnostic ability to distinguish healthy eyes from glaucoma eyes was much stronger for structural parameters obtained using SD-OCT such as pRNFL and GCC thickness than for VD measurements of the ONH, pRPC and SVP on OCTA [50]. The reason for which they obtained poor results of diagnostic accuracy of VD parameters in ONH and pRPC may be because of lower SSI of the analyzed angiograms. Images with a higher SSI value give better clarity and segmentation, which results in better repeatability, and additionally this may affect the quantitative indicators [51]. In the macular density analysis, low AUROC value for SVP could be due to the 3x3mm scanning area, which may result in overlooking significant RGC pathology and peripheral microvessels outside the scanning area. Similar results of AUROC analysis were obtained by Penteadó et al. who also used the OCTA scan size 3x3mm. Diagnostic accuracy of structural parameters in SD-OCT and OCTA was higher for GCC thickness than VD to distinguish between glaucoma and healthy eyes. They obtained the opposite results when distinguishing between glaucoma suspect eyes and healthy eyes. The diagnostic accuracy of the VD was better than the GCC thickness suggesting that detectable changes in the form of a reduction in VD within macula may precede the loss of RGC in glaucoma [36].

We found no significant difference in VD in macular DVP whole between the healthy and POAG groups as confirmed by other reports [12]. Glaucoma primarily affects RNFL, GCL and partly IPL layers that are supplied by SVP, while DVP supplies blood to the middle layers of the retina that do not contain RGCs [52, 53]. When analyzing DVP, there are concerns of projection artifacts caused by superficial vessels casting shadows on the deeper layers of the retina, which may affect the obtained results. Despite the fact that we are using the latest version of the software equipped with the AngioVue three-dimensional Projection Artifact Removal (3D PAR) algorithm, projection artifacts in the deeper layers of the retina are still noticeable, which can affect the results obtained in each group. Due to this and the lack of normative values for OCTA results, we calculated the DVP/SVP whole ratio. We have shown that as the glaucoma progresses, the DVP/SVP whole ratio increases, as in HC it was 1, in mild POAG it was 1.1, and in moderate/severe POAG it was 1.2. The results of this analysis are consistent with our previous study where the DVP/SVP whole ratio in patients with Alzheimer's disease (AD) was the lowest and differed significantly from the healthy and POAG groups [54]. In our opinion, this can be a useful parameter in the event of an unexplained reason for decreased pRNFL thickness. The results suggest a different vascular phenotype in POAG than in AD where microvascular damage was noticeable in macular DVP and differed from that in POAG.

Several limitations of the current study should be considered. The first limitation was the relatively small number of subjects. The second was the inclusion of both eyes of subjects for the analysis. However, we accounted for the correlation between the two eyes of subjects using validated statistical methods. The severity of glaucoma was determined on the basis of the severity of VF damage in SAP, which could have an impact on the diagnostic accuracy of the other parameters. In addition to glaucoma, VF parameters are also affected by refractive errors or lens opacities. Another limitation was the lack of a normative database for MP to recognize and determine the severity of glaucoma. Due to the lack of a normative database, we were not

able to classify patients with glaucoma and assess clinically significant dark spots in MP and compare the results with SAP. Additionally, the possible effects of various systemic diseases or drugs, blood pressure and perfusion pressure on retinal VD have not been determined. Patients in the POAG group used anti-glaucoma drugs that were not discontinued, but we found that none of the drug classes was related to the OCTA parameter that was analyzed. The cross-sectional nature of the study limits the determination of the temporal relationship between loss of vessel density in OCTA and glaucomatous structural and functional damage to the retina.

In summary, the quantitative and qualitative angiograms analysis of the SVP in the macula and pRPC layer showed decline VD in patients with more severe POAG, and the reduction in MP average sensitivity threshold corresponds to the capillary dropout areas in SVP. The links between microvessel damage in macular SVP and average sensitivity threshold decrease in MP are stronger than standard analyses, such as pRNFL thickness and VF assessment in SAP. Comparing the correlation results, in the case of structural assessment of the macula (GCC thickness, SVP whole VD), stronger relationships occur with MP average sensitivity threshold, while peripapillary parameters (pRNFL thickness, pRPC VD) correlate stronger with SAP. This is because testing retinal function in the macula using MP involves testing a larger number of points in the central 10° area, as well as real-time eye movement compensation, which means that the test points are located at pre-determined retinal locations. For these reasons, OCTA and MP are promising technologies that enable us to clinically monitor structural and functional changes in glaucoma. These methods can also potentially contribute to a better understanding of the pathophysiology of this disease, but require further research in this direction.

Supporting information

S1 Dataset.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Katarzyna Zabel, Jakub J. Kaluzny.

Data curation: Martyna Kaluzna, Aleksander Lamkowski, Damian Jaworski.

Formal analysis: Katarzyna Zabel, Przemyslaw Zabel, Martyna Kaluzna, Aleksander Lamkowski, Damian Jaworski, Magdalena Wietlicka-Piszcz.

Investigation: Przemyslaw Zabel.

Methodology: Katarzyna Zabel, Przemyslaw Zabel, Magdalena Wietlicka-Piszcz.

Project administration: Przemyslaw Zabel.

Resources: Martyna Kaluzna.

Supervision: Jakub J. Kaluzny.

Visualization: Martyna Kaluzna.

Writing – original draft: Katarzyna Zabel, Przemyslaw Zabel, Magdalena Wietlicka-Piszcz, Jakub J. Kaluzny.

Writing – review & editing: Katarzyna Zabel, Przemyslaw Zabel, Magdalena Wietlicka-Piszcz, Jakub J. Kaluzny.

References


1. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama*. 2014; 311(18):1901–11. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192> PMID: 24825645
2. Nakazawa T. Ocular blood flow and influencing factors for glaucoma. *Asia-Pacific J Ophthalmol (Phila)*. 2016; 5(1):38–44.
3. Weinreb RN, Harris A. *Ocular Blood Flow in Glaucoma: Consensus Series 6*. The Netherlands: Kugler Publications; 2009.
4. Kornzweig AL, Eliasoph I, Feldstein M. Selective atrophy of the radial peripapillary capillaries in chronic glaucoma. *ArchOphthalmol*. 1968; 80(6):696–702.
5. Spaide RF, Klancnik JM, Cooney MJ. Retinal Vascular Layers Imaged by Fluorescein Angiography and Optical Coherence Tomography Angiography. *JAMA Ophthalmol*. 2014; 133(1):45–50.
6. Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK. Optical Coherence Tomography Angiography. *Retina*. 2015; 35(11):2161–2. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000881> PMID: 26502006
7. Kromer R, Glusa P, Framme C, Pielon A, Junker B. Optical coherence tomography angiography analysis of macular flow density in glaucoma. *Acta Ophthalmol*, 2019; 97(2):e199–e206. <https://doi.org/10.1111/aos.13914> PMID: 30178601
8. Akagi T, Iida Y, Nakanishi H, et al. Microvascular density in glaucomatous eyes with hemifield visual field defects: an optical coherence tomography angiography study. *Am J Ophthalmol*. 2016; 68:237–249.
9. Yarmohammadi A, Zangwill LM, Diniz-Filho A, et al. Peripapillary and macular vessel density in patients with glaucoma and single-hemifield visual field defect. *Ophthalmology*. 2017; 124(5):709–719. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.01.004> PMID: 28196732
10. Ghahari E, Bowd C, Zangwill LM, et al. Association of macular and circumpapillary microvasculature with visual field sensitivity in advanced glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2019; 204:51–61. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2019.03.004> PMID: 30878489
11. Werner AC, Shen LQ. A review of OCT angiography in glaucoma. *SeminOphthalmol*. 2019; 34:279–86.
12. Takusagawa HL, Liu L, Ma KN, et al. Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography of Macular Retinal Circulation in Glaucoma. *Ophthalmology*. 2017; 124(11):1589–1599. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.06.002> PMID: 28676279
13. Hood DC, Raza AS, de Moraes CG, Liebmann JM, Ritch R. Glaucomatous damage of the macula. *ProgRetinEye Res*. 2013; 32:1–21.
14. Raza AS, Cho J, de Moraes CG, et al. Retinal ganglion cell layer thickness and local visual field sensitivity in glaucoma. *ArchOphthalmol*. 2011; 129(12):1529–1536.
15. Langerhorst CT, Carenini LL, Bakker D, De Bie-Raakman MAC. Measurements for description of very early glaucomatous field defects. In: Wall M Heijl A eds. *Perimetry Update 1996/1997*. New York: Kugler Publications; 1997:67–73.
16. De Moraes CG, Hood DC, Thenappan A, et al. 24–2 visual fields miss central defects shown on 10–2 tests in glaucoma suspects, ocular hypertensives, and early glaucoma. *Ophthalmology*. 2017; 124(10):1449–1456. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.04.021> PMID: 28551166
17. Rohrschneider K, Bultmann S, Springer C. Use of fundus perimetry (microperimetry) to quantify macular sensitivity. *ProgRetinEye Res*. 2008; 27(5):536–548.
18. Sharma P, Sample PA, Zangwill LM, Schuman JS. Diagnostic tools for glaucoma detection and management. *SurvOphthalmol*. 2008; 53(6):17–32.
19. Jia Y, Morrison JC, Tokayer J, et al. Quantitative OCT angiography of optic nerve head blood flow. *BiomedOpt Express*. 2012; 3(12):3127–3137.
20. Jia Y, Wei E, Wang X, et al. Optical coherence tomography angiography of optic disc perfusion in glaucoma. *Ophthalmology*. 2014; 121(7):1322–1332. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.01.021> PMID: 24629312
21. Chen CL, Zhang A, Bojikian KD, et al. Peripapillary retinal nerve fiber layer vascular microcirculation in glaucoma using optical coherence tomography-based microangiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(9):OCT475–OCT485. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18909> PMID: 27442341
22. Kim SB, Lee EJ, Han JC, Kee C. Comparison of peripapillary vessel density between preperimetric and perimetric glaucoma evaluated by OCT-angiography. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0184297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184297> PMID: 28859176
23. Bekkers A, Borren N, Ederveen V, et al. Microvascular damage assessed by optical coherence tomography angiography for glaucoma diagnosis: a systematic review of the most discriminative regions. *Acta Ophthalmol*. 2020

24. Yarmohammadi A, Zangwill LM, Diniz-Filho A, Suh MH, Manalastas PI, Fatehee N. Optical coherence tomography angiography vessel density in healthy, glaucoma suspect, and glaucoma eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(9):OCT451–OCT459. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18944> PMID: 27409505
25. Liu L, Jia Y, Takusagawa HL, et al. Optical Coherence Tomography Angiography of the Peripapillary Retina in Glaucoma. *JAMA Ophthalmol*. 2015; 133(9):1045–1052. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.2225> PMID: 26203793
26. Yu PK, Balaratnasingam C, Xu J, et al. Label-free density measurements of radial peripapillary capillaries in the human retina. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0135151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135151> PMID: 26252395
27. Scripsema NK, Garcia PM, Bavier RD, et al. Optical coherence tomography angiography analysis of perfused peripapillary capillaries in primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(9):OCT611–OCT620. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18944> PMID: 27742922
28. Rao HL, Kadambi SV, Weinreb RN, et al. Diagnostic ability of peripapillary vessel density measurements of optical coherence tomography angiography in primary open-angle and angle-closure glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 2017; 101(8):1066. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309377> PMID: 27899368
29. Mammo Z, Heisler M, Balaratnasingam C, et al. Quantitative optical coherence tomography angiography of radial peripapillary capillaries in glaucoma, glaucoma suspect, and normal eyes. *Am J Ophthalmol*. 2016; 170:41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.07.015> PMID: 27470061
30. Lee EJ, Lee KM, Lee SH, Kim TW. OCT angiography of the peripapillary retina in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(14):6265–6270. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20287> PMID: 27849312
31. Rao HL, Pradhan ZS, Weinreb RN, et al. Relationship of optic nerve structure and function to peripapillary vessel density measurements of optical coherence tomography angiography in glaucoma. *J Glaucoma*. 2017; 26(6):548–554. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000670> PMID: 28333896
32. Geyman LS, Garg RA, Suwan Y, et al. Peripapillary perfused capillary density in primary open-angle glaucoma across disease stage: an optical coherence tomography angiography study. *Br J Ophthalmol*. 2017; 101(9):1261–1268. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309642> PMID: 28148529
33. Yarmohammadi A, Zangwill LM, Diniz-Filho A, et al. Relationship between optical coherence tomography angiography vessel density and severity of visual field loss in glaucoma. *Ophthalmology*. 2016; 123:2498–2508. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.08.041> PMID: 27726964
34. Chen HS, Liu CH, Wu WC, Tseng HJ, Lee YS. Optical coherence tomography angiography of the superficial microvasculature in the macular and peripapillary areas in glaucomatous and healthy eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58(9):3637–3645. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21846> PMID: 28728171
35. Traynis I, De Moraes CG, Raza AS, Liebmann JM, Ritch R, Hood DC. Prevalence and nature of early glaucomatous defects in the central 10 degrees of the visual field. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132(3):291–297. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.7656> PMID: 24407153
36. Penteado RC, Zangwill LM, Daga FB, et al. Optical coherence tomography angiography macular vascular density measurements and the central 10–2 visual field in glaucoma. *J Glaucoma*. 2018; 27(6):481–489. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000964> PMID: 29664832
37. Schiefer U, Flad M, Stumpp F, et al. Increased detection rate of glaucomatous visual field damage with locally condensed grids: a comparison between fundus-oriented perimetry and conventional visual field examination. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121(4):458–465.
38. Huang P, Shi Y, Wang X, Zhang SSM, Zhang C. Use of microperimetry to compare macular light sensitivity in eyes with open-angle and angle-closure glaucoma. *Jpn J Ophthalmol*. 2012; 56(2):138–144. <https://doi.org/10.1007/s10384-011-0111-6> PMID: 22160406
39. Taradaj K., Gosciniewicz P, Romaniuk D, Steuer E, Drzazga Z, Romaniuk W. Central retinal sensitivity assessment with microperimetry in patients with primary open angle glaucoma. *Klin oczna*. 2015; 117(2):77–82. PMID: 26638542
40. Matsuura M, Murata H, Fujino Y, Hirasawa K, Yanagisawa M, Asaoka R. Evaluating the usefulness of MP-3 microperimetry in glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*. 2018; 187: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2017.12.002> PMID: 29248331
41. Sato S, Hirooka K, Baba T, Tenkumo K, Nitta E, Shiraga F. Correlation between the ganglion cell-inner plexiform layer thickness measured with cirrus HD-OCT and macular visual field sensitivity measured with microperimetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(4):3046–3051. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11173> PMID: 23580483

42. Rao HL, Januwada M, Hussain RS, et al. Comparing the structure-function relationship at the macula with standard automated perimetry and microperimetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56(13):8063–8068. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17922> PMID: 26720457
43. Hirooka K, Misaki K, Nitta E, Ukegawa K, Sato S, Tsujikawa A. Comparison of Macular Integrity Assessment (MAIA), MP-3, and the Humphrey Field Analyzer in the evaluation of the relationship between the structure and function of the macula. *PLoS One.* 2016; 11(3):e0151000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151000> PMID: 26974468
44. Lima VC, Prata TS, De Moraes CGV. A comparison between microperimetry and standard achromatic perimetry of central visual field in eyes with glaucomatous paracentral visual-field defects. *Br J Ophthalmol.* 2010; 94(1):64–67. <https://doi.org/10.1136/bjo.2009.159772> PMID: 19692366
45. Kerrigan-Baumrind LA, Quigley HA, Pease ME, Kerrigan DF, Mitchell RS. Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold Visual field tests in the same persons. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(3):741–748. PMID: 10711689
46. Sommer A, Katz J, Quigley HA, et al. Clinically detectable nerve fiber atrophy precedes the onset of glaucomatous field loss. *ArchOphthalmol.* 1991; 109(1):77–83.
47. Klamann MKJ, Grünert A, Maier AK, Gonnermann J, Joussem AM, Huber KK. Comparison of functional and morphological diagnostics in glaucoma patients and healthy subjects. *Ophthalmic res.* 2013; 49(4):192–198. <https://doi.org/10.1159/000345074> PMID: 23306647
48. Rao HL, Hussain RSM, Januwada M. Structural and functional assessment of macula to diagnose glaucoma. *Eye.* 2017; 31(4):593–600. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.277> PMID: 27935606
49. Kita Y, Holló G, Saito T, Murai A, Kita R, Hirakata A. Circumpapillary microperimetry to detect glaucoma: a pilot study for sector-based comparison to circumpapillary retinal nerve fiber layer measurement. *IntOphthalmol.* 2019; 39(1):127–136.
50. Rao HL, Pradhan ZS, Weinreb RN, et al. A comparison of the diagnostic ability of vessel density and structural measurements of optical coherence tomography in primary open angle glaucoma. *PLoS One.* 2017; 12(3):e0173930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173930> PMID: 28288185
51. Lim HB, Kim YW, Kim JM, Jo YJ, Kim JY. The importance of signal strength in quantitative assessment of retinal vessel density using optical coherence tomography angiography. *Sci Rep.* 2018; 8(1):12897. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31321-9> PMID: 30150636
52. Zabel P, Kaluzny JJ, Wilkosc-Debczynska M, et al. Peripapillary retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer's disease: a comparison of eyes of patients with Alzheimer's disease, primary open-angle glaucoma, and preperimetric glaucoma and healthy controls. *MedSci Monit.* 2019; 25:1001–1008.
53. Provis JM. Development of the primate retinal vasculature. *ProgRetinEye Res.* 2001; 20(6):799–821.
54. Zabel P, Kaluzny JJ, Wilkosc-Debczynska M, et al. Comparison of retinal microvasculature in patients with Alzheimer's disease and primary open-angle glaucoma by optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019; 60:3447–3455. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-27028> PMID: 31408108

Article

Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry

Katarzyna Zabel ^{1,*}, Przemyslaw Zabel ¹, Karolina Suwala ¹, Aleksandra Gorczyca ¹, Damian Jaworski ², Martyna Kaluzna ², Martyna Gebaska-Toloczek ¹, Kacper Wnuk ³, Katarzyna Buszko ³  and Jakub J. Kaluzny ¹

- ¹ Department of Sensory Organ Studies, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, 85-830 Bydgoszcz, Poland; przemo.zab@gmail.com (P.Z.); karolinasuwala4@gmail.com (K.S.); agorczyca@doktorant.umk.pl (A.G.); martyna.gebska@gmail.com (M.G.-T.); jkcaluzny@oftalmika.pl (J.J.K.)
- ² Division of Ophthalmology and Optometry, Department of Ophthalmology, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, 85-168 Bydgoszcz, Poland; jaworski.damian94@gmail.com (D.J.); martynakaluzna93@gmail.com (M.K.)
- ³ Department of Biostatistics and Biomedical Systems Theory, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, 85-067 Bydgoszcz, Poland; kcpr.wnuk@gmail.com (K.W.); buszko@cm.umk.pl (K.B.)
- * Correspondence: kasia.zabel1@gmail.com

Abstract: The aim of this study was to determine whether primary open-angle glaucoma (POAG) is associated with changes in fixation stability parameters assessed by microperimetry (MP) and whether the severity of glaucoma is related to a deterioration in these indicators. This study analyzed fixation stability using MP macular analyzer integrity assessment (MAIA) in patients with mild and moderate/severe POAG and healthy controls. The resulting fixation indices were correlated with parameters used to assess retinal function with MP and standard automated perimetry (SAP) and retinal structure with optical coherence tomography (OCT) and OCT angiography (OCTA). We enrolled 54 eyes in the POAG groups (32 eyes with mild POAG and 22 eyes with moderate/severe POAG) and 24 eyes in the healthy group. It was shown that fixation stability in POAG eyes deteriorated with increasing disease severity, and significant differences in bivariate contour ellipse area (BCEA) including 95% of fixation points were observed among groups ($p = 0.042$). Quantitative analysis of structural and functional retinal parameters also showed significant deterioration with the progression of glaucoma ($p < 0.001$). Correlations among fixation parameters and abnormalities in the retinal structure and function were confirmed. We concluded that POAG is associated with disturbances in the fixation pattern, which worsen as the disease progresses and can be effectively assessed by performing a MP test.

Keywords: primary open-angle glaucoma (POAG); fixation stability; microperimetry (MP); retinal function; retinal structure



Citation: Zabel, K.; Zabel, P.; Suwala, K.; Gorczyca, A.; Jaworski, D.; Kaluzna, M.; Gebaska-Toloczek, M.; Wnuk, K.; Buszko, K.; Kaluzny, J.J. Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2368. <https://doi.org/10.3390/jcm11092368>

Academic Editor: Jose Javier Garcia-Medina

Received: 19 March 2022

Accepted: 21 April 2022

Published: 23 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Primary open-angle glaucoma (POAG) is a chronic progressive optic neuropathy, leading to the degeneration of retinal ganglion cells, typical changes in optic disc morphology, and characteristic visual field (VF) defects [1]. Although the first signs of the disease are associated with retinal nerve fiber layer (RNFL) damage in the peripheral part of the retina, previous studies have revealed structural and functional abnormalities in the central part of the macula [2]. Best-corrected visual acuity (BCVA), the main functional parameter used to assess central vision loss, is usually preserved in patients with POAG, despite a significant reduction in retinal sensitivity [3]. To better understand this discrepancy, fixation behavior should be examined as an additional parameter for assessing central macular function [4].

The macular sensitivity of the retina and fixation behavior can be assessed using microperimetry (MP). The MP technique uses continuous infrared scanning laser ophthalmoscopy (SLO) imaging to track the retina and assess macular function. Fundus imaging

with retinal landmark tracking enables precise correlation of macular anatomy with light sensitivity in MP. In addition, it is possible to control a patient's fixation independent of eye movement and to correct gaze movements. Fixation stability is an objective test performed by tracking retinal landmarks then plotting the scatter of a cloud of fixations points (CFP) on a retinal image reference map. A normal emmetropic subject fixating on a point at optical infinity will exhibit some retinal movement. This is due to involuntary eye movements such as physiological nystagmus, drift, as well as microsaccades as corrective movements to compensate for involuntary head movements [5]. Fixational eye movements have a large influence on visual perception. Ocular drift transforms visual stimuli in a way that increases spatial acuity. Microsaccades improve vision by displacing the fovea and stimulating many photoreceptors. The spatial distribution of these fixation points is related to the stability of fixation: a small fixation area is associated with a more stable fixation compared with a larger area. In healthy subjects using central fixation, the size of these eye movements is small, and all fixations fall within a few minutes of the arc of the target center. This ability to maintain stable fixation is impaired in people with eye diseases and diseases affecting the central nervous system [6–10].

Alterations in fixation pattern in glaucoma are not well understood. Only a small number of studies have been reported; however, the results indicate the possibility of disturbances in the stability of fixations in eyes with glaucoma [11–13]. To the authors' knowledge, no studies have compared the fixation patterns in patients with POAG at different stages of disease advancement with those of a healthy control group. Moreover, correlations among disturbances in the structure/function of the retina and changes in fixation stability have not been analyzed. Information on the fixation pattern could make a significant contribution by not only deepening the knowledge of the pathophysiology of POAG, but, in the future, may also become a biomarker used in diagnosis and for monitoring the severity of glaucoma.

The aim of this study was to determine whether POAG is associated with changes in fixation stability parameters assessed by MP and whether the severity of glaucoma is related to the deterioration in these indicators. Additionally, we analyzed correlations among fixation indices and retinal function/structure parameters assessed by MP, standard automated perimetry (SAP), optical coherence tomography (OCT), and OCT angiography (OCTA) in eyes with mild and moderate/severe POAG and healthy controls.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Patient Recruitment

In this cross-sectional study, all subjects were recruited and assessed at the Oftalmika Eye Hospital (Bydgoszcz, Poland) between 2019 and 2020. The study was performed according to the tenets of the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent prior to their inclusion in the study. The study protocol was approved by the Bioethical Commission of Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval number 600/2019).

All participants underwent a detailed ophthalmological examination, including measurement of the following parameters: refractive error (Topcon KR-890, Tokyo, Japan), BCVA, slit-lamp biomicroscopy with gonioscopy and dilated fundus examination using a Volk lens, intraocular pressure (IOP; Icare TAO1 i, Finland Oy, Vantaa, Finland), pachymetry (Tomey EM-3000, Tomey Corporation, Nagoya, Japan), and axial length measurement (IOL Master 500, Zeiss Humphrey, Dublin, CA, USA). In addition, patients were examined using a Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany), OCTA (Optovue, Inc., Fremont, CA, USA), Humphrey Field Analyzer II (HFA; Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA), and macular analyzer integrity assessment (MAIA) MP (Centervue, Padova, Italy). All examinations were performed in one day by the same ophthalmologist.

Patients treated for perimetric glaucoma for at least 6 months were included in the study. All participants were required to have POAG and meet the following criteria: the presence of features of glaucomatous optic neuropathy accompanied by a decrease in peri-

papillary RNFL (pRNFL) thickness corresponding to VF loss in SAP with a normal anterior chamber and open angle based on slit-lamp and gonioscopic examinations, respectively. Glaucomatous disc changes were defined as a vertical cup-to-disc ratio greater than 0.7, asymmetry greater than 0.2 between the two eyes, optic disc hemorrhage, and neuroretinal rim changes consisting of pallor or localized notching in the absence of any other ocular or neurological pathology. Glaucomatous VF losses were identified by static perimetry using a threshold approach. One of the following changes observed in two consecutive visual field tests were used as a criterion for glaucomatous damage: a cluster of three or more adjacent points in a typical localization for glaucoma with a *p*-value less than 0.05 in pattern standard deviation (PSD) and one point with a *p*-value less than 0.01 in PSD, a glaucoma hemifield test result outside normal limits, and/or an average PSD value calculated for the entire tested area in less than 5% of healthy eyes. Patients with POAG were further classified into two groups based on the severity of VF damage in SAP: mild glaucoma was defined as a VF mean deviation (MD) greater than -6 dB; moderate/severe glaucoma was defined as an MD less than -6 dB.

Age- and sex-matched subjects with no ocular or neurological pathology and normal VF in SAP were taken as controls.

The general exclusion criteria were: BCVA less than 0.6, refractive error above ± 3.0 Dsph, IOP less than 23 mmHg, any media opacity, ophthalmic surgery, except for uncomplicated phacoemulsification cataract and uncomplicated anti-glaucoma surgery if at least six months had passed since the surgery. People with vascular or nonvascular retinopathies, ocular or systemic diseases known to impair VF, nonglaucomatous optic neuropathies, and macular pathology were also excluded.

2.2. Microperimetry

The MAIA MP technique combines SLO, static perimetry, and fundus imaging. The mechanism of observation is an infrared superluminescent diode with a wavelength of 850 nm, which provides high-quality images, even with pupil diameters of 2.5 mm. The maximum level of illumination is 318.47 cd/m². The light appears in ranges of attenuation from 0 to 36 dB in 1 dB steps. The background luminance is 1.27 cd/m². Goldmann-type size III stimuli were presented for a duration of 200 ms. MP delivers information in the form of retinal threshold sensitivity and fixation stability. The average sensitivity threshold (average threshold—AT) in dB was measured using the expert exam option with a MAIA standard macular grid pattern (37 stimulus points) over 10 retinal degrees (± 5 degrees around the macula). The standard 4-2 projection strategy was used, and all measurements were performed monocularly in a darkened room. During the examination, patients were instructed to look at the center of the fixation target with correct operation of the response button when stimuli was shown. Eye movements were registered by an integrated eye-tracker system with a frequency of 25 Hz, with the dual purpose of correcting ocular misalignment and registering the subjects' fixation pattern. The MP system can describe fixation stability in two ways. The first method calculates the percentage of fixation points (PFP) within a circle of 1° and 2° radii (defined as P1 and P2, respectively) centered in the barycenter of the CFP. The second method measures the bivariate contour ellipse area (BCEA), which is the macular area surrounding all fixation movements within 1 or 2 standard deviations, consequently including 95% (BCEA95) and 63% (BCEA63) of fixation points. This analysis also considers the major and minor axes, which are two orthogonal diameters describing the range of fixation points. The BCEA orientation is the angle between the ellipse major axis (EMA) and the horizontal axis (HA) of the visual meridian, with values between 0° and +90° corresponding to angles measured counterclockwise between the HA and EMA; values between 0° and -90° corresponding to angles measured clockwise between the HA and EMA; 0° corresponding to a horizontal orientation and 90° corresponding to a vertical orientation.

Currently, the clinical interpretation of the MAIA results is based on the manufacturer's analysis printout. The printout reports the measured retinal sensitivity at each test loci

(pointwise sensitivity), as well as the mean sensitivity across all test loci. Retinal sensitivity indexes AT and Macular Integrity are shown in a color chart where green, yellow, and red, respectively, represent normal, suspect, or abnormal sensitivity. The analysis printout also includes a “histogram of thresholds frequencies”, which shows the distribution of retinal sensitivity compared to the Gaussian distribution of a “normal reference” of healthy eyes between 20 and 80 years of age. Furthermore, the analysis printout reports a fixation plot with numerical values for BCEA63 and BCEA95 expressed as the ratio of the EMA and HA, their area in square degrees, and angle. On the printout, there is also a scale of fixation stability based on P1 and P2 values, where green, yellow, and red mean stable, relatively stable, and unstable fixation, respectively. A graph with the duration of the test is also displayed.

2.3. Optical Coherence Tomography

All patients underwent OCT imaging with the objective of measuring the thickness of the pRNFL and ganglion cell complex (GCC). The pRNFL thickness in μm mean globally (G), and the defined quadrants, superior (S), inferior (I), temporal (T), nasal (N), were analyzed over 360° using a Spectralis OCT device (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Each circular scan consisted of 768 A-scans. The scanned circle was 3.46 mm in diameter and cocentered with the optic nerve head (ONH). A built-in Avanti RTVue XR (Optovue, Inc., Fremont, CA, USA) glaucoma module was used to measure the thickness of the retinal GCC. The GCC scan was centered 1 mm temporal to the fovea and covered a circular macular area of 6 mm in diameter. The global GCC thickness and the thickness of the superior and inferior hemifields in μm was assessed. Furthermore, all scans had to fulfil consensus criteria for retinal OCT quality assessment (OSCAR-IB) to ensure comparability and quality of OCT images [14].

2.4. Standard Automated Perimetry

VF examinations were performed with a 24-2 VF test grid using an HFA II with a standard Swedish interactive threshold algorithm (SITA). The 24-2 VF test measured retinal sensitivity thresholds at 24 degrees temporally and 30 degrees nasally, including 52 test points separated by 6 degrees (excluding two blind spot locations). A Goldmann-type size III stimulus with a background luminance of 31.5 asb was used. Near correction was provided as needed. Only reliable VF tests (fixation loss less than 33%, false-positive and false-negative rates less than 10%) without artifacts and cases with no evidence that the abnormal results were caused by diseases other than glaucoma were included. Global indices to assess glaucomatous defects MD, PSD, and visual field index (VFI) were evaluated for the statistical analysis. MD (in dB) is the average of the differences from the mean of age-adjusted normal values of all visual field locations tested. The severity of glaucoma was recorded as a MD value. PSD (in dB) is an indication of any local abnormalities in an individual's visual field calculated by the device. The VFI is a trend analysis that scales the overall visual field status from 100% (normal) to 0% (end-stage glaucoma).

2.5. Optical Coherence Tomography Angiography

OCTA imaging was carried out using an Avanti RTVue XR with AngioVue software (version 2017.1.0.151), which provides noninvasive qualitative visualization and quantitative assessment of the retinal vascular network using the split-spectrum amplitude-decorrelation angiography (SSADA) algorithm. We considered the obtained OCTA results as a structural parameter due to the fact that, after appropriate segmentation, only the density of the microvessel network is analyzed, not the blood flow. The OCTA device can perform 70,000 A-scans per second and achieves measurements with an axial resolution of $5 \mu\text{m}$ using a light source with a wavelength of $840 \pm 10 \text{ nm}$ and a bandwidth of 45 nm. To correct for motion artifacts, the device is equipped with DualTrac Motion Correction technology, and orthogonal fast-scan directions (horizontal and vertical) are combined. The AngioVue software is equipped with three-dimensional Projection Artifact Removal

(3D PAR), which reduces projection artifacts in deeper retinal layers while maintaining their authentic layout. The macula was analyzed using B-scans covering an area of , on an area of $4.5 \times 4.5 \text{ mm}^2$ centered on the ONH, and peripapillary vessels were analyzed. The images consisted of two sets of B-scans repeated horizontally and vertically, each consisting of 400 A-scans. Data analyses including automatic segmentation of the superficial vascular plexus (SVP) and deep vascular plexus (DVP) of the macula and the peripapillary radial peripapillary capillary (pRPC) layer in the ONH area were performed on commercially available software and expressed in %. The en face OCTA image is a grayscale image composed of a range of pixels from black with a value of 0 to white with a value of 255. Each of the thresholding strategies uses a different approach to define the level above which pixels are white and below which pixels are black. Using these tools, images are converted from grayscale images to binary images, and vessel density is calculated as the ratio of the area occupied by the vessels divided by the total area. In ONH scans, vessel density was analyzed in the peripapillary area, which extends outward from the ONH border with an elliptical area between 2–4 mm. The RPC layer was defined as extending from the inner limiting membrane (ILM) to the posterior border of the RNFL. In the macula, vessel density was analyzed on the entire surface of the $6 \times 6 \text{ mm}^2$ en face images. The SVP is comprised of the area between the ILM and the outer boundary of the inner plexiform layer (IPL), whereas the DVP is comprised of the area between the outer boundary of the IPL and the outer boundary of the outer plexiform layer (OPL). Both eyes of each patient were examined after pupil dilation on the same day between 1:00 and 4:00 PM. Only measurements of good technical quality with a signal quality (SQ) of 6 or more on a 10-degree scale, with which the commercial camera was equipped, qualified for further analysis. Measurements with motion artifacts on the en face images (irregular patterns of vessels or a blurred ONH boundary of the) were rejected.

2.6. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed in R (version 3.6.2.). Prior to the study, our goal was to determine the sample size required to compare BCEA95 values (parameter considered as primary endpoint) between healthy and POAG patients with a test power of >80% and $\alpha = 0.05$; however, there are no data available regarding the mean and variance of BCEA95 for POAG patients. Therefore, we decided to conduct a small pilot study ($n_1 = n_2 = 15$ for both healthy and POAG patients) in order to determine the sample size. The mean value of BCEA95 for healthy patients in the pilot study was 2.10, and for POAG patients—4.31. The standard deviation was 3.05. We determined the sample size based on pilot study results in order to obtain >80% power of a test with $\alpha = 0.05$, a sample size of at least 25 for each group was required + additional 20% to take account for possible dropouts. In the end, 77 eyes were included in the study. Due to absence of a normal distribution (as assessed by Shapiro–Wilk test), all continuous variables were analyzed using nonparametric tests. Differences between group means were assessed using the Kruskal–Wallis test or χ^2 test for continuous and categorical variables, respectively. Spearman’s rank correlation coefficient was calculated to determine the correlation among fixation indices and retinal function parameters. A two-sided p -value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Initially, 56 eyes of 32 POAG patients and 24 eyes of the 16 participants of the healthy group who met the outlined inclusion and exclusion criteria qualified for the study. Of these eyes, 2 with POAG (3.5%) and 1 healthy eye (2.4%) were subsequently excluded due to poor-quality imaging tests or unreliable VF test results. A total of 54 eyes from 31 POAG subjects were included in the final analysis. Based on the degree of VF loss in SAP, 32 eyes of patients with POAG were assigned to the mild POAG group (MD $-2.57 \pm 1.54 \text{ dB}$) and 22 eyes were included in the moderate/severe POAG group (MD $-12.77 \pm 7.67 \text{ dB}$). The studied groups did not differ in age ($p = 0.522$) or sex ($p = 0.932$). There were no

significant differences among groups in terms of BCVA, IOP, AL, CCT, and MP examination time ($p > 0.05$). Demographic and clinical characteristics of the study participants are summarized in Table 1.

Table 1. Demographic data and clinical characteristics of patients.

Parameter	Healthy	POAG		p-Value
		Mild	Moderate/Severe	
Number of eyes	23	31	23	
Male:female ratio	5:11	7:13	6:10	0.932
Age, year	67.88 ± 7.61	69.05 ± 8.70	71.06 ± 8.50	0.522
BCVA, Snellen	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.02	0.96 ± 0.08	0.085
IOP, mmHg	18.13 ± 2.07	18.25 ± 2.02	17.66 ± 2.47	0.764
AL, mm	23.32 ± 1.11	23.4 ± 1.06	23.37 ± 0.73	0.965
CCT, μm	532.9 ± 27.20	527.2 ± 40.07	527 ± 55.83	0.574
MP examination time, s	320.84 ± 74.14	307.61 ± 62.79	313.83 ± 78.26	0.387

Data are presented as mean ± one standard deviation or number. Differences among groups were assessed using the χ^2 test for categorical variables and Kruskal–Wallis test for continuous variables. Abbreviations: POAG, primary open-angle glaucoma; BCVA, best-corrected visual acuity; IOP, intraocular pressure; AL, axial length; CCT, central corneal thickness; MP, microperimetry.

3.1. Structural and Functional Data

Quantitative analysis of structural (GCC and pRNFL thickness, SVP and pRPC vessel density) and functional (VFI, MD, PSD, AT) retinal parameters showed significant deterioration with the progression of glaucoma ($p < 0.001$). Although eyes with glaucoma showed reduced vessel density at DVP, these differences were not significant among study groups ($p = 0.1641$). The ratio of DVP to SVP whole density was 0.99 in the healthy group, which differed significantly from values obtained in the mild and moderate/severe POAG groups, with index increases of 1.11 and 1.21, respectively ($p < 0.001$). Comparisons of structural and functional characteristics are presented in Table 2.

Table 2. Differences in structural and functional characteristics between study groups.

Parameter	Healthy	POAG		p-Value
		Mild	Moderate/Severe	
GCC average, μm	98.17 ± 9.89	83.32 ± 10.02	72.22 ± 11.38	<0.001
pRNFL global, μm	101.74 ± 10.06	79.42 ± 13.82	61.87 ± 14.12	<0.001
SVP whole VD, %	50.09 ± 2.50	43.47 ± 5.11	39.01 ± 6.32	<0.001
DVP whole VD, %	50.17 ± 3.71	47.94 ± 5.64	47.06 ± 5.45	0.164
DVP/SVP whole VD ratio	0.99 ± 0.08	1.11 ± 0.13	1.21 ± 0.13	<0.001
pRPC VD, %	51.73 ± 2.56	44.48 ± 6.71	36.60 ± 7.36	<0.001
VFI, %	98.30 ± 1.56	95.81 ± 3.53	63.74 ± 27.52	<0.001
MD, dB	−1.52 ± 1.62	−2.57 ± 1.54	−12.77 ± 7.67	<0.001
PSD, dB	2.25 ± 0.66	2.89 ± 1.61	8.26 ± 3.88	<0.001
AT, dB	26.77 ± 1.34	25.32 ± 2.26	20.15 ± 5.38	<0.001

Data are presented as mean ± one standard deviation. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are indicated in bold. The Kruskal–Wallis test was used to compare groups. Abbreviations: POAG, primary open-angle glaucoma; GCC, ganglion cell complex; pRNFL, peripapillary retinal nerve fiber layer; VD, vessel density; SVP, superficial vascular plexus; DVP, deep vascular plexus; pRPC, peripapillary radial peripapillary capillaries; VFI, visual field index; MD, mean deviation; PSD, pattern standard deviation; AT, average threshold.

3.2. Fixation Indices

Fixation parameters were analyzed in each group. Although the P1 and P2 indices deteriorated with increasing POAG severity, differences between groups were not statistically significant ($p > 0.05$). Both BCEA63 and BCEA95 values increased with the degree of POAG. However, of the fixation indices analyzed, only BCEA95 was statistically significantly different between study groups ($p = 0.042$). The difference in BCEA63 values was almost statistically significant ($p = 0.051$). The diameters describing the extent of the fixation area

along the horizontal and vertical axes (H95 and V95) increased with severity of the disease (Figure 1). However, the analysis revealed no statistically significant differences among study groups ($p > 0.05$). In the POAG and healthy groups, the ratio of H95 to V95 was close to one and the fixation ellipse was close to a circle. Results of the comparative analysis are presented in Table 3.

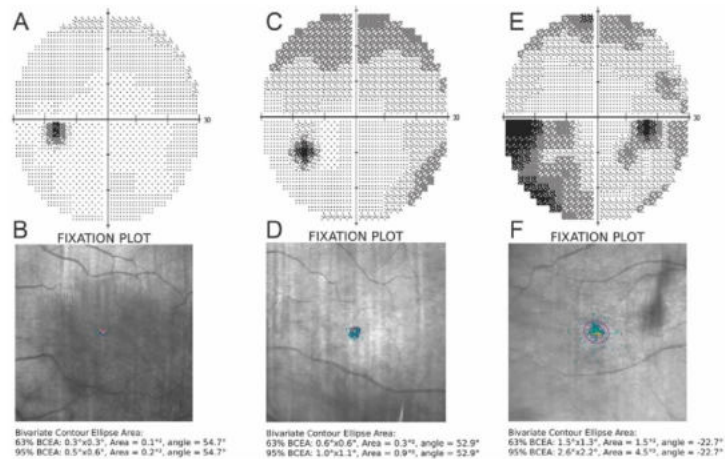


Figure 1. The figures show changes in the visual field and fixation pattern in a healthy control eye (A,B), respectively, in the eye with mild POAG (C,D), respectively, and in the eye with moderate/severe POAG (E,F), respectively. As the severity of glaucoma progresses, the fixation parameters deteriorate, as shown in the figure.

Table 3. Differences in fixation indices among study groups.

Parameter	Healthy	POAG		p-Value
		Mild	Moderate/Severe	
BCEA63, ° ²	0.74 ± 0.60	0.97 ± 0.90	1.64 ± 1.57	0.051
BCEA95, ° ²	2.20 ± 1.80	2.93 ± 2.72	4.51 ± 4.12	0.042
H95, °	1.49 ± 0.72	1.89 ± 0.91	2.15 ± 1.07	0.135
V95, °	1.54 ± 0.88	1.63 ± 0.93	2.14 ± 1.29	0.091
P1, %	95.39 ± 4.72	92.97 ± 8.40	89.52 ± 13.02	0.127
P2, %	98.65 ± 2.08	98.84 ± 1.57	97.26 ± 3.52	0.196
Angle, °	-11.37 ± 3.93	1.54 ± 33.82	-8.23 ± 46.28	0.480
H95/V95 ratio	1.16 ± 0.59	1.25 ± 0.38	1.05 ± 0.30	0.198

Data are presented as mean ± one standard deviation. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are indicated in bold. The Kruskal–Wallis test was used to compare groups. Abbreviations: POAG, primary open-angle glaucoma; BCEA, bivariate contour ellipse area; H, horizontal; V, vertical.

When analyzing the relationships between fixation indices and global structural parameters, we found a significant correlation of P1, BCEA63, BCEA95, and H95 only with global GCC thickness and SVP vessel density. In analyzing the relationship between fixation indices and regional structural parameters, the strongest correlations were found with pRNFL thickness in the temporal and superior quadrants, and GCC thickness in the superior and inferior hemifields. The results are presented in Table 4.

Table 4. Spearman’s rank correlation coefficient measuring the relationship between fixation indices and retinal structural parameters (GCC and pRNFL thickness, pRPC and SVP vessel density) of study groups.

Parameter	GCC	GCC S	GCC I	pRNFL G	pRNFL S	pRNFL I	pRNFL T	pRNFL N	pRPC	pRPC S	pRPC I	SVP
P1	0.247 (0.031)	0.255 (0.025)	0.216 (0.059)	0.149 (0.196)	0.231 (0.043)	0.091 (0.43)	0.333 (0.003)	−0.008 (0.946)	0.153 (0.184)	0.169 (0.142)	0.119 (0.302)	0.299 (0.008)
P2	0.111 (0.336)	0.114 (0.325)	0.099 (0.392)	0.043 (0.71)	0.113 (0.328)	0.005 (0.966)	0.234 (0.04)	−0.128 (0.267)	0.07 (0.544)	0.099 (0.393)	0.031 (0.786)	0.171 (0.136)
BCEA63	−0.256 (0.025)	−0.255 (0.025)	−0.239 (0.036)	−0.172 (0.135)	−0.265 (0.02)	−0.116 (0.316)	−0.325 (0.004)	−0.029 (0.802)	−0.174 (0.131)	−0.193 (0.092)	−0.141 (0.221)	−0.323 (0.004)
BCEA95	−0.273 (0.016)	−0.269 (0.018)	−0.255 (0.025)	−0.183 (0.111)	−0.278 (0.014)	−0.136 (0.239)	−0.327 (0.004)	−0.028 (0.807)	−0.187 (0.103)	−0.204 (0.075)	−0.156 (0.175)	−0.337 (0.003)
H	−0.232 (0.043)	−0.222 (0.053)	−0.22 (0.056)	−0.134 (0.249)	−0.221 (0.055)	−0.085 (0.466)	−0.325 (0.004)	−0.003 (0.978)	−0.119 (0.305)	−0.137 (0.236)	−0.098 (0.4)	−0.309 (0.007)
V	−0.2 (0.084)	−0.2 (0.084)	−0.181 (0.118)	−0.139 (0.23)	−0.242 (0.035)	−0.107 (0.359)	−0.208 (0.071)	−0.006 (0.956)	−0.201 (0.082)	−0.213 (0.064)	−0.166 (0.152)	−0.251 (0.029)

Statistically significant ($p < 0.05$) coefficient values are indicated in bold. p -values are presented in brackets. Abbreviations: BCEA, bivariate contour ellipse area; H, horizontal; V, vertical; GCC, ganglion cell complex; pRNFL, peripapillary retinal nerve fiber layer; pRPC, peripapillary radial peripapillary capillaries; SVP, superficial vascular plexus; G, global; S, superior; I, inferior; T, temporal; N, nasal.

In 77 eyes, analysis of the relationships between fixation indices and retinal function parameters showed significant correlations between all fixation parameters and AT, assessed by MP. There was also a weak but significant correlation between BCEA (95 and 63) and VFI, assessed by SAP, and between BCEA63 and BCVA. The fixation index BCEA95 exhibited the strongest correlations with both structural and functional parameters of the retina. The results are reported in Table 5.

Table 5. Spearman’s rank correlation coefficient measuring the relationship between fixation indices and retinal function parameters of study groups.

Parameter	AT	VFI	MD	PSD	BCVA
P1	0.339 (0.003)	0.203 (0.083)	0.076 (0.52)	−0.097 (0.411)	0.191 (0.096)
P2	0.226 (0.049)	0.101 (0.393)	0.036 (0.76)	−0.022 (0.849)	0.090 (0.436)
BCEA63	−0.370 (0.001)	−0.247 (0.034)	−0.131 (0.267)	0.127 (0.282)	−0.233 (0.041)
BCEA95	−0.384 (0.001)	−0.248 (0.033)	−0.126 (0.283)	0.134 (0.255)	−0.213 (0.063)
H95	−0.302 (0.008)	−0.21 (0.075)	−0.092 (0.438)	0.105 (0.376)	−0.178 (0.125)
V95	−0.287 (0.012)	−0.21 (0.075)	−0.101 (0.393)	0.084 (0.482)	−0.163 (0.161)

Statistically significant ($p < 0.05$) coefficients are indicated in bold. p -values are presented in brackets. Abbreviations: BCEA, bivariate contour ellipse area; H, horizontal; V, vertical; AT, average threshold; VFI, visual field index; MD, mean deviation; PSD, pattern standard deviation; BCVA, best-corrected visual acuity.

4. Discussion

This study analyzed fixation stability using MP MAIA in patients with mild and moderate/severe glaucoma and healthy controls. The resulting fixation indices were correlated with parameters used to assess retinal function with MP and SAP and retinal structure with OCT and OCTA. Fixation stability in glaucoma patients deteriorated with increasing disease severity and significant differences in BCEA95 were observed among groups. The correlation among fixation parameters and abnormalities in retinal structure and function were also confirmed.

MP is a modern method that allows detailed analysis of the macular function based on direct correlation with anatomical aspects of the retina observed using an eye tracker. Recently, fixation pattern analysis has attracted increasing interest from researchers as an objective method for studying the function of the visual system. Fixation is recorded during standard MP tests (dynamic fixation) performed to assess retinal threshold sensitivity but can also be recorded as an isolated fixation task (static fixation) [15,16]. In our study, we evaluated dynamic fixation during retinal sensitivity testing. The MP software automatically analyzed the fixation stability using two different methods: the clinical classification proposed by Fujii et al. and BCEA analysis [17,18]. The main advantage of the method of Fujii et al. is the clinically relevant classification of fixation stability: Eyes with a P1 value greater than 75% are classified as having stable fixation. If P1 is less than 75% and P2 is greater than 75%, fixation is classified as relatively unstable; if both P1 and P2 are less than 75%, the pattern is described as unstable fixation [17]. However, this method has come under scrutiny in the literature due to the arbitrarily selected fixed circular area of 1° and 2° in radius used to determine the stability index [19]. The BCEA analysis method for evaluating fixation stability in MP proposed by Crossland et al. calculates the area and orientation of an ellipse encompassing a specific portion of the fixation point dataset. The advantage of the BCEA calculation is that it is based on a mathematical model used to describe the movement of variables in statistics; however, the BCEA is not associated with any clinical classification in MP [20,21].

Our results support previous reports on the suitability of MP for assessing fixation behavior, especially when the BCEA is analyzed. In 2016, Morales et al. published a study in which a clinical reference database for fixation stability metrics measured by MP MAIA was established, based on measurements obtained from 358 healthy volunteers. Average values of $0.80^{\circ 2}$ for the BCEA63 index and $2.40^{\circ 2}$ for the BCEA95 index were obtained. The mean values of P1 and P2 were 95% and 99%, respectively [19]. These values are consistent with the fixation indices measured in our healthy group. Importantly, our analysis showed significant differences in fixation stability among study groups when described by BCEA95. Despite deterioration in the P1 and P2 indices with increasing severity of glaucoma, we did not show any statistical significance. Our results confirm those of Longhin et al., which concluded that BCEA analysis results in a greater accuracy in detecting minimal quantitative changes in fixation stability, compared with the standard clinical classification [22]. Moreover, a strong relationship was previously demonstrated between fixation stability, as measured by BCEA, and a very weak correlation between P1 and P2 and many reading ability parameters used to assess visually impaired patients, which demonstrates the advantage of the fixation stability based on BCEA rather than the Fujii classification system [23].

In our study, we demonstrated the usefulness of fixation stability assessment, confirmed by correlations among the disruption of retinal structure/function and changes in fixation stability parameters in the study groups. The strongest correlation was observed between AT of the retina and BCEA indices. In a previous study, Shi et al. compared patients with early and moderate stages of glaucoma to healthy controls and analyzed fixation data from microperimetric tests using MP-1 (NIDEK Technologies, Vigonza, Italy). Significant differences in fixation stability were observed among groups if the PFP was maintained within the central 2° circle. A relationship between fixation stability within the central 2° (P1 in MAIA microperimeter, respectively) and AT of the retina was also observed in the POAG group. However, in this work, the assessment of fixation indicators did not include BCEA analysis [12]. The reduced retinal sensitivity in MP associated with alterations in microcirculation in glaucomatous eyes was previously investigated. The correlation between decreasing AT in MP and microvascular network damage in macular SVP in all patients with POAG was demonstrated. This relationship was stronger than the correlation between pRNFL thickness measurements and VF parameters in SAP [3]. Additionally, our current study showed a significant correlation between fixation indices and vessel density in SVP assessed by OCTA.

Montesano et al. also reported differences in fixation patterns in patients with glaucoma and the healthy control group. Fixation stability was measured as BCEA using two novel metrics: mean Euclidean distance (MED) and sequential Euclidean distance (SED). These measures were designed to capture the spread of fixation points and the frequency of position changes during fixation, respectively. The authors reported subtle changes in fixation more accurately described by features of the temporal sequence displacements (SED), rather than measures of fixation spread such as BCEA. They suggest that glaucoma patients try to enhance perception of the fixation target by frequent shifting between different positions. Moreover, it was observed that SED has a significant association with MD, but neither BCEA nor MED were significantly correlated [11].

We found that the horizontal (H95) and vertical (V95) axes increased with the severity of glaucoma in relation to the healthy group. However, despite the larger area, the BCEA remained circular in all POAG groups. An analysis of major BCEA axis values was performed by Gil-Casas et al. using MP in subjects with multiple sclerosis (MS), with and without previous optic neuritis (ON). They found that the shape and size of the fixation ellipse differed among groups. The sizes of the axes (H95 and V95) were similar in the control group, and the BCEA was circular in shape. In the MS group without a history of ON, the size of both axes increased compared with the control group. In the MS group with previous ON and contralateral eyes without ON, values of BCEA increased more on the vertical axis than on the horizontal axis, resulting in a vertical ellipse [24]. Changes in fixation pattern, including the ellipse shape and size, described in neurodegenerative diseases may be different, which may have prognostic and diagnostic significance. Post-mortem and in vivo studies conducted to date have shown that neurodegenerative disorders are characterized by a loss of specific neuron populations. In glaucoma, vision loss and dysfunction are the result of retinal ganglion cell death, atrophy, and axon degeneration extending to central visual targets in the brain [25,26]. Glaucomatous damage has an impact on vision and oculomotor structures in the brain, including the lateral geniculate nucleus and visual cortex [27]. Dysfunction in oculomotor control has also been described in various neurodegenerative disorders (e.g., Alzheimer's disease, parkinsonian disorders, MS) [28]. Fixation is a dynamic process that is actively controlled by neuronal mechanisms localized in the cerebrum, brainstem, and cerebellum. During fixation, eyes continue to move with a combination of microsaccades, smooth ocular drifts, and tremors. Microsaccades are the largest of these fixational eye movements. Abnormal eye movement, fixation instability, and foveation are likely a sign of inflammatory and neurodegenerative effects on the optic nerve and the widespread network of central afferent and efferent visual and oculomotor control pathways that are necessary for normal fixation [5,28,29]. These theories are supported by our results that in glaucoma, as in other neurodegenerative diseases, fixation disorders occur.

There are several limitations to this study. Due to relatively small sample size, the results might not be completely representative of the general population. For this reason, both eyes were included in the analyses when the study criteria were met. To our advantage, the evaluation of the results showed that in such cases, when eyes were at different stages of glaucoma advancement, fixation parameters also differed and were worse in the eye with more advanced glaucoma, based on the VF in SAP. Patients with POAG did not discontinue ocular hypotensive eye drops, which might affect ocular blood flow. The effect of antihypertensive eye drops is likely to persist for 1–4 weeks from the time of withdrawal; therefore, for ethical and medical reasons, patients with POAG involved in the present study did not stop using them. For the same reasons, when patients from both study groups were taking systemic drugs, their use was not discontinued during the study. Nevertheless, it seems that these topical and systemic drugs should not affect the obtained fixation parameters [30–32].

5. Conclusions

In summary, this was the first study to analyze fixation parameters obtained using MP MAIA and to correlate them with structural and functional changes in the retina in patients with mild POAG, moderate/severe POAG, and healthy controls. The results show that POAG is associated with disturbances in the fixation pattern, which worsen as the disease progresses and can be effectively assessed by performing a MP test. We demonstrated that changes in fixation indices correlate with structural changes in OCT and OCTA, as well as functional changes in MP and SAP. The observed alterations in fixation are probably a way of adapting visual perception to operating under conditions of reduced RGC. Due to the stimulation of photoreceptors in a larger area of the retina and, therefore, more RGCs, the deficit of damaged RGCs in glaucomatous eyes is likely to be compensated for. This would explain why visual acuity in glaucoma patients is normal despite the decrease in macular sensitivity. We believe that assessing fixation stability offers an advantage as an objective method that is relatively easy for patients to perform, compared with perimetric tests. The results are promising, and further research is warranted to determine whether this approach could become a useful method for diagnosing and monitoring not only glaucoma but also other neurodegenerative diseases, as suggested in previous studies.

Author Contributions: Conceptualization, K.Z., P.Z. and J.J.K.; Data curation, K.Z. and P.Z.; Formal analysis, P.Z., K.W. and K.B.; Investigation, K.Z., P.Z., K.S., D.J. and M.K.; Methodology, P.Z.; Project administration, K.Z.; Software, K.W. and K.B.; Supervision, J.J.K.; Visualization, M.G.-T.; Writing—original draft, K.Z. and P.Z.; Writing—review & editing, K.Z., A.G. and J.J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethical Commission of Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval number 600/2019), The approval date is 25 June 2019.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Quigley, H.A. Glaucoma. *Lancet* **2011**, *377*, 1367–1377. [[CrossRef](#)]
2. Bowd, C.; Zangwill, L.M.; Berry, C.C. Detecting Early Glaucoma by Assessment of Retinal Nerve Fiber Layer Thickness and Visual Function. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 1993–2003.
3. Zabel, K.; Zabel, P.; Kaluzna, M. Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0235571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Oztürk, F.; Yavas, G.F.; Küsbeci, T.; Ermis, S.S. A comparison among Humphrey field analyzer, Microperimetry, and Heidelberg Retina Tomograph in the evaluation of macula in primary open angle glaucoma. *J. Glaucoma* **2008**, *17*, 118–121. [[CrossRef](#)]
5. Krauzlis, R.J.; Goffart, L.; Hafed, Z.M. Neuronal control of fixation and fixational eye movements. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2017**, *372*, 20160205. [[CrossRef](#)]
6. Culham, L.; Fitzke, F.W.; Timberlake, G.T. Assessment of fixation stability in normal subjects and patients using a scanning laser ophthalmoscope. *Clin. Vis. Sci.* **1993**, *8*, 551–561.
7. Rohrschneider, K.; Becker, M.; Kruse, F.E. Stability of fixation: Results of fundus-controlled examination using the scanning laser ophthalmoscope. *Ger. J. Ophthalmol.* **1995**, *4*, 197–202.
8. Bellmann, C.; Feely, M.; Crossland, M.D. Fixation stability using central and pericentral fixation targets in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2004**, *111*, 2265–2270. [[CrossRef](#)]
9. Schönbach, E.M.; Ibrahim, M.A.; Kong, X. Metrics and Acquisition Modes for Fixation Stability as a Visual Function Biomarker. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2017**, *5*, 268–276. [[CrossRef](#)]
10. Kosnik, W.; Fikre, J.; Sekuler, R. Visual fixation stability in older adults. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1986**, *27*, 1720–1725.
11. Montesano, G.; Crabb, D.P.; Jones, P.R. Evidence for alterations in fixational eye movements in glaucoma. *BMC Ophthalmol.* **2018**, *18*, 191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Shi, Y.; Liu, M.; Wang, X. Fixation behavior in primary open angle glaucoma at early and moderate stage assessed by the MicroPerimeter MP-1. *J. Glaucoma* **2013**, *22*, 169–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kameda, T.; Tanabe, T.; Hangai, M. Fixation behavior in advanced stage glaucoma assessed by the MicroPerimeter MP-1. *Jpn. J. Ophthalmol.* **2009**, *53*, 580–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tewarie, P.; Balk, L.; Costello, F.; Green, A.; Martin, R.; Schippling, S.; Petzold, A. The OSCAR-IB Consensus Criteria for Retinal OCT Quality Assessment. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Midena, E.; Radin, P.P.; Pilotto, E. Fixation pattern and macular sensitivity in eyes with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. A microperimetry study. *Semin. Ophthalmol.* **2004**, *19*, 55–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vujosevic, S.; Midena, E.; Pilotto, E. Diabetic macular edema: Correlation between microperimetry and optical coherence tomography findings. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 3044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Fujii, G.Y.; de Juan, E., Jr.; Sunness, J.S. Patient selection for macular translocation surgery using the scanning laser ophthalmoscope. *Ophthalmology* **2002**, *109*, 1737–1744. [[CrossRef](#)]
18. Steinman, R.M. Effect of target size, luminance, and color on monocular fixation. *J. Opt. Soc. Am.* **1965**, *55*, 1158–1165. [[CrossRef](#)]
19. Morales, M.U.; Saker, S.; Wilde, C. Reference clinical database for fixation stability metrics in normal subjects measured with the MAIA microperimeter. *Trans. Vis. Sci Technol.* **2016**, *5*, 6. [[CrossRef](#)]
20. Crossland, M.D.; Rubin, G.S. The use of an infrared eyetracker to measure fixation stability. *Optom Vis. Sci.* **2002**, *79*, 735–739. [[CrossRef](#)]
21. Tarita-Nistor, L.; Gonzalez, E.G.; Markowitz, S.N. Fixation characteristics of patients with macular degeneration recorded with the mp-1 microperimeter. *Retina* **2008**, *28*, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Longhin, E.; Convento, E.; Pilotto, E. Static and dynamic retinal fixation stability in microperimetry. *Can. J. Ophthalmol.* **2013**, *48*, 375–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Crossland, M.D.; Dunbar, H.M.; Rubin, G.S. Fixation stability measurement using the MP1 microperimeter. *Retina* **2009**, *29*, 651–656. [[CrossRef](#)]
24. Gil-Casas, A.; Llorens, D.P.P.; Molina-Martin, A. Ocular fixation and macular integrity by microperimetry in multiple sclerosis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2021**, *259*, 157–164. [[CrossRef](#)]
25. Quigley, H.A. Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin Eye Res.* **1999**, *18*, 39–57. [[CrossRef](#)]
26. Weber, A.J.; Harman, C.D. Structure-function relations of parasol cells in the normal and glaucomatous primate retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 3197–3207. [[CrossRef](#)]
27. Gupta, N.; Yücel, Y.H. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2007**, *18*, 110–114. [[CrossRef](#)]
28. Anderson, T.J.; MacAskill, M.R. Eye movements in patients with neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 74–85. [[CrossRef](#)]
29. Mallery, R.M.; Poolman, P.; Thurtell, M.J. Visual fixation instability in multiple sclerosis measured using SLO-OCT. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 196–201. [[CrossRef](#)]
30. Medeiros, F.A.; Weinreb, R.N. Medical Backgrounders: Glaucoma. *Drugs Today* **2002**, *38*, 563–570. [[CrossRef](#)]
31. Hong, Y.J.; Shin, D.H.; Ahn, B.H.; McCarty, B. Intraocular Pressure after a Two-Week Washout Following Long-Term Timolol or Levobunolol. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **1995**, *11*, 107–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Stewart, W.C.; Holmes, K.T.; Johnson, M.A. Washout Periods for Brimonidine 0.2% and Latanoprost 0.005%. *Am. J. Ophthalmol.* **2001**, *131*, 798–799. [[CrossRef](#)]

Omówienie prac wchodzących w skład pracy doktorskiej

Celem pracy *Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma* było określenie zależności między czułością siatkówki w MP a gęstością mikronaczyń siatkówki za pomocą OCTA u pacjentów z POAG.

Wszyscy pacjenci mieli wykonane szczegółowe badanie okulistyczne, które obejmowało: najlepszą skorygowaną ostrość wzroku (BCVA), biomikroskopię w lampie szczelinowej, badanie dna oka, tonometrię, pachymetrię, gonioskopię oraz pomiar długości osiowej gałki ocznej. Wykonano badanie czułości siatkówki za pomocą SAP i MP oraz pomiary grubości pRNFL i GCC za pomocą OCT, a także ocenę VD siatkówki z wykorzystaniem OCTA. Pacjentów z POAG zakwalifikowano do badania na podstawie obecności cech jaskrowej neuropatii nerwu wzrokowego, czemu towarzyszyło obniżenie grubości pRNFL odpowiadające utracie VF w SAP. Podzielono ich na dwie grupy w oparciu o ciężkość uszkodzenia VF w SAP: jaskrę łagodną zdefiniowano jako średnie odchylenie (mean deviation – MD) VF większe niż -6dB, a jaskrę umiarkowaną/ciężką – jako MD mniejsze niż -6dB.

Zdrowi uczestnicy mieli ciśnienie śródgałkowe poniżej 21 mmHg, prawidłowy wygląd tarczy nerwu wzrokowego bez asymetrii, grubość pRNFL w granicach normy, prawidłowe wyniki w VF zdefiniowane jako PSD w granicach 95% i wynik GHT w granicach normy. Zdrowa grupa kontrolna nie wykazywała żadnej choroby oczu poza niewielkimi wadami refrakcji. Ogólnymi kryteriami wykluczenia były: wiek poniżej 50 i powyżej 85 lat, BCVA $\leq 0,6$, wada refrakcji powyżej $\pm 3,0$ Dsph, IOP > 23 mmHg, operacja okulistyczna, z wyjątkiem niepowikłanej fakoemulsyfikacji zaćmy i niepowikłanej operacji przeciwjaskrowej, gdy od operacji minęły co najmniej trzy miesiące.

Badanie OCTA wykonano urządzeniem Avanti RTVue XR. Protokół zastosowany do analizy plamki składał się ze skanów B obejmujących obszar o wymiarach 6×6 mm², powtórzonych w pozycji poziomej i pionowej, natomiast do analizy naczyń okołotarczowych wykonano pomiar obejmujący obszar $4,5 \times 4,5$ mm² wyśrodkowany na tarczę nerwu wzrokowego (optic nerve head – ONH). Dane analizowano za pomocą dostępnego na rynku oprogramowania, które umożliwiało automatyczną segmentację SVP i splotu głębokiego (deep vascular plexus – DVP) w obrębie plamki i warstwie RPC. W plamce analizowano gęstość naczyń na obszarze o wymiarach 6×6 mm² (VD whole) oraz w wyodrębnionych

obszarach: przydołkowym (parafoveal) między pierścieniami 1 mm i 3 mm od środka dołka oraz okołodołkowym (perifoveal) między pierścieniami 3 mm i 6 mm od centrum dołka. Skany obejmujące ONH wykorzystano do pomiaru VD w warstwie RPC na całym obrazie en face o wymiarach $4,5 \times 4,5 \text{ mm}^2$ oraz w obszarze okołotarczowym (peripapillary RPC – pRPC), rozciągającym się pomiędzy eliptycznymi liniami konturowymi o średnicy 2 i 4 mm wokół krawędzi tarczy.

Grubość pRNFL zmierzono za pomocą urządzenia Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Niemcy). Do tego celu zastosowano skan kołowy o średnicy 3,46 mm, składający się z 768 A-skanów, wyśrodkowany na ONH. Ocenę grubości GCC przeprowadzono za pomocą kamery urządzenia Avanti RTVue XR. Skan GCC był wyśrodkowany 1 mm skroniowo od dołka i obejmował okrągły obszar plamki o średnicy 6 mm.

Badanie mikroperymetryczne przeprowadzono za pomocą urządzenia MAIA (CenterVue, Padova, Włochy). System wyposażony jest w skaningowy oftalmoskop laserowy, który zapewnia dokładne śledzenie i kompensację ruchu oka w czasie rzeczywistym. Do oceny średniego progu czułości w różnych miejscach w obrębie plamki wykorzystano protokół Expert Exam. Siatka testowa składa się z 37 punktów świetlnych, oddalonych o 5° od centralnego punktu fiksacji. W czasie testu badany był obszar z 12 punktami na każdym koncentrycznym pierścieniu (2° , 6° i 10°) oraz pomiar jednego punktu środkowego. Poza oceną progu czułości siatkówki (average threshold – AT), urządzenie umożliwia również oszacowanie wskaźnika integralności plamki (macular integrity – MI). Jest to liczbowa wartość opisująca prawdopodobieństwo, że reakcja pacjenta na bodziec będzie prawidłowa, podejrzana lub nieprawidłowa w porównaniu z danymi normatywnymi skorygowanymi o wiek; wyższa liczba wskazuje na większe prawdopodobieństwo nieprawidłowych wyników.

Badanie SAP wykonano za pomocą Humphrey Field Analyzer II (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA), przy użyciu standardowej strategii SITA 24–2.

Do badania zakwalifikowano 52 oczu 30 osób z POAG oraz 23 oczu 15 osób z grupy kontrolnej, które spełniły określone kryteria włączenia i wyłączenia. Nie było istotnej różnicy w wieku, płci, centralnej grubości rogówki i ciśnieniu wewnątrzgałkowym między badanymi grupami. Na podstawie stopnia utraty VF w SAP 30 oczu przydzielono do grupy z łagodną postacią POAG ($\text{MD } -2,6 \pm 1,6 \text{ dB}$), a 22 oczu – do grupy z umiarkowaną/ciężką postacią POAG ($\text{MD } -13,4 \pm 7,1 \text{ dB}$).

Zdrowe oczy z prawidłową grubością pRNFL i GCC na angiogramach miały wyraźnie widoczną sieć mikronaczyń w pRPC i SVP w plamce w porównaniu z oczami z POAG. Wraz z progresją choroby można wykazać tendencję do rozrzedzenia sieci mikronaczyń siatkówki i pojawiania się miejsc, w których przepływy naczyniowe są całkowicie niewidoczne. Porównując wyniki uzyskane na angiogramach plamki z badaniem MP, można zauważyć, że obszary o zmniejszonej gęstości mikronaczyń w SVP korespondowały z obszarami o obniżonym progu czułości siatkówki. Ponadto miejsca bez widocznych naczyń włosowatych w SVP odpowiadały punktom głębokich mroczków (0dB) w MP.

Analiza ilościowa potwierdziła związek między stopniem zaawansowania POAG a pogorszeniem parametrów funkcji i struktury siatkówki. Ocena angiogramów wykazała istotną redukcję VD siatkówki w pRPC i obszarze SVP whole w oczach z POAG. W umiarkowanej/ciężkiej postaci POAG wykazano istotnie obniżoną VD zarówno w pRPC ($36,4 \pm 5,7\%$), jak i SVP whole ($38,7 \pm 6,3\%$) w porównaniu z grupą łagodną POAG (odpowiednio $43,6 \pm 6,6\%$, $42,9 \pm 5,2\%$) i grupą zdrową (odpowiednio $49,1 \pm 2,4\%$, $49,7 \pm 2,6\%$). Różnice w VD w DVP plamki pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie. Całkowity stosunek DVP/SVP w grupie osób zdrowych wynosił $1 \pm 0,1$ i różnił się istotnie od grupy łagodnej POAG ($1,1 \pm 0,1$) oraz grupy umiarkowanej/ciężkiej POAG ($1,2 \pm 0,1$) ($p < 0,001$). Badanie OCT potwierdziło istotne zmniejszenie grubości pRNFL i GCC w oczach POAG oraz fakt, że stopień uszkodzenia struktury siatkówki wzrasta wraz z ciężkością choroby.

Ocena czułości siatkówki w MP wykazała, że oczy z umiarkowaną/ciężką postacią POAG charakteryzowały się istotnie niższym progiem czułości ($20,2 \pm 5,4$ dB) w porównaniu z oczami z łagodną POAG ($25,3 \pm 2,3$ dB) i grupą osób zdrowych ($26,7 \pm 1,4$ dB). Pomimo faktu, że pacjenci w łagodnym stadium POAG mieli niższy próg średniej czułości siatkówki niż osoby zdrowe, różnica nie była istotna ($p = 0,134$). W badaniu SAP w oczach z umiarkowaną/ciężką POAG wykazano istotne różnice w parametrach VFI ($62,1 \pm 27\%$) i MD ($-13,4 \pm 7,3$ dB) w porównaniu do grupy z łagodną postacią POAG ($95,8 \pm 3,6\%$, $-2,6 \pm 1,5$ dB) i grupą zdrową (odpowiednio $98 \pm 1,5\%$, $-1,8 \pm 1,5$ dB) ($p < 0,001$). Nie stwierdzono istotnych różnic w parametrach funkcji siatkówki między oczami z łagodną postacią POAG a zdrowymi oczami.

W celu zbadania korelacji między funkcją siatkówki ocenianą w MP i SAP a strukturą siatkówki analizowaną metodami OCTA i OCT wyznaczono wartości korelacji cząstkowych

korygowanych ze względu na wiek, korelację między oczną oraz Scan Quality (w OCTA). Analiza wykazała, że najsilniejsza korelacja występuje między SVP whole VD a średnim progiem czułości AT (współczynnik korelacji Pearsona = 0,68, $p < 0,001$). Silne korelacje istniały również między grubością pRNFL a MD, grubością pRNFL i VFI (odpowiednio współczynnik korelacji Pearsona = 0,63, $r = 0,61$, $p < 0,001$). AUROC wykorzystano do odzwierciedlenia dokładności diagnostycznej parametrów strukturalnych siatkówki uzyskanych za pomocą obrazowania OCTA i SD-OCT. Najwyższą dokładność diagnostyczną dla odróżnienia oczu zdrowych od oczu z POAG uzyskano dla pRNFL, następnie SVP whole, pRPC i GCC (odpowiednio AUROC 0,94, 0,92, 0,92, 0,91).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że OCTA i MP są wartościowymi metodami, które pozwalają monitorować zmiany strukturalne i czynnościowe oczu z jaskrą.

Celem pracy *Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry* była analiza wzorca fiksacji za pomocą MP u pacjentów z POAG oraz określenie wpływu stopnia zaawansowania choroby na parametry stabilności fiksacji. Wszyscy pacjenci zostali szczegółowo zbadani okulistycznie. Wykonano badania czułości siatkówki za pomocą MP i SAP oraz pomiary grubości pRNFL i GCC za pomocą OCT, a także ocenę VD siatkówki za pomocą OCTA.

Grupę pacjentów z POAG zdefiniowano na podstawie cech neuropatii jaskrowej n. II z towarzyszącym zmniejszeniem grubości pRNFL, co odpowiadało ubytkom w badaniu pola widzenia przy otwartym kącie przesączania. Wśród pacjentów z POAG wyodrębniono dwie grupy w oparciu o ciężkość uszkodzenia VF w SAP: jaskrę łagodną zdefiniowano jako MD większe niż -6dB, a jaskrę umiarkowaną/ciężką – jako MD mniejsze niż -6dB.

Badanie mikroperymetryczne wykonano za pomocą urządzenia MAIA (CenterVue, Padova, Włochy), stosując protokół Expert Exam w celu oceny średniego progu czułości w obrębie plamki. Fiksacja w MP jest oceniana na dwa sposoby. W pierwszej metodzie oblicza się procent punktów fiksacji w okręgach o promieniu 1° i 2° (zdefiniowanych odpowiednio jako P1 i P2), wyśrodkowanych w barycentrum chmury punktów fiksacji. Wynik P1 powyżej 75% klasyfikuje się jako stabilną fiksację. Jeśli P1 jest mniejsze niż 75%, a P2 – większe niż 75%, fiksację ocenia się jako stosunkowo niestabilną. Jeśli zarówno P1, jak i P2 są mniejsze niż 75%, wynik jest opisywany jako niestabilna fiksacja. Druga metoda polega na analizie opartej na wyznaczeniu dwuwymiarowej powierzchni elipsy konturowej (BCEA), będącej obszarem otaczającym wszystkie ruchy fiksacyjne w zakresie jednego lub dwóch odchyień

standardowych, w konsekwencji obejmującym 95% (BCEA95) i 63% (BCEA63) punktów fiksacji.

Badanie SAP wykonano za pomocą Humphrey Field Analyzer II (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA), przy użyciu standardowej strategii SITA 24–2.

Dzięki obrazowaniu OCT za pomocą urządzenia Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Niemcy) wykonano pomiary grubości pRNFL. Analizie poddano średnią globalną (G) oraz dla określonych kwadrantów: górnego (S), dolnego (I), skroniowego (T) i nosowego (N). Każdy kolisty skan składał się z 768 skanów A, a zeskanowany okrąg miał średnicę 3,46 mm i był wyśrodkowany na ONH. Grubość GCC oszacowano z wykorzystaniem modułu jaskrowego w urządzeniu Avanti RTVue XR (Optovue, Inc., Fremont, CA, USA). Skan GCC był wyśrodkowany 1 mm skroniowo od dołka i obejmował okrągły obszar plamki o średnicy 6 mm. Oceniono globalną grubość GCC oraz grubość hemisfery górnej i dolnej. Ponadto wszystkie skany musiały spełniać kryteria oceny jakości OCT siatkówki (OSCAR-IB), aby zapewnić porównywalność i jakość obrazów OCT.

Obrazowanie OCTA w celu oceny VD przeprowadzono za pomocą aparatu Avanti RTVue XR z oprogramowaniem AngioVue, który zapewnia nieinwazyjną wizualizację i ilościową ocenę sieci naczyniowej siatkówki za pomocą algorytmu SSADA (Split-Spectrum Amplitude Decorrelation Angiography). VD w okolicy plamki analizowano za pomocą skanów B, obejmujących obszar 6×6 mm², natomiast w okolicy t.n.II analizowano okołotarczowy obszar RPC (pRPC), który znajduje się pomiędzy eliptycznymi liniami konturowymi o średnicy 2 i 4 mm wokół krawędzi tarczy. Automatyczną segmentację obejmującą SVP i DVP plamki oraz pRPC w przeprowadzono za pomocą dostępnego oprogramowania i VD wyrażono w %.

Do analizy włączono 54 oczy 31 pacjentów z POAG oraz 24 oczy 16 osób z grupy kontrolnej, które spełniały określone wcześniej kryteria włączenia i wyłączenia. Na podstawie stopnia utraty VF w SAP 32 oczu pacjentów z POAG przypisano do grupy z łagodną postacią POAG (MD $-2,57 \pm 1,54$ dB), natomiast 22 oczu – do grupy z umiarkowaną/ciężką POAG (MD $-12,77 \pm 7,67$ dB). Między badanymi grupami nie było istotnej różnicy w wieku, płci, BCVA, centralnej grubości rogówki, ciśnieniu wewnątrzgałkowym, długości gałki ocznej.

Analiza ilościowa parametrów strukturalnych (GCC i pRNFL, gęstość naczyń SVP i pRPC) i czynnościowych (VFI, MD, PSD, AT) siatkówki wykazała istotne pogorszenie wraz ze stopniem zaawansowania choroby ($p < 0,001$). Chociaż oczy z jaskrą wykazywały

zmniejszoną gęstość naczyń w DVP, różnice te nie były istotne między badanymi grupami. Stosunek całkowitej gęstości DVP do SVP w grupie osób zdrowych wyniósł 0,99, różniąc się istotnie od wartości uzyskanych w grupie z łagodną i umiarkowaną/ciężką postacią POAG, przy wzroście wskaźnika odpowiednio 1,11 i 1,21.

Dodatkowo w każdej grupie przeanalizowano parametry fiksacji. Chociaż wskaźniki P1 i P2 pogarszały się wraz ze wzrostem ciężkości POAG, różnice między grupami nie były istotne statystycznie. Zarówno wartości BCEA63, jak i BCEA95 wzrastały wraz ze stopniem zaawansowania POAG. Jednak spośród analizowanych wskaźników fiksacji tylko BCEA95 różnił się istotnie statystycznie między badanymi grupami ($p = 0,042$). Różnica wartości BCEA63 była prawie istotna statystycznie ($p = 0,051$). Średnice opisujące zasięg obszaru fiksacji wzdłuż osi poziomej i pionowej (H95 i V95) zwiększały się wraz z ciężkością choroby. Analiza nie wykazała jednak różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami. Zarówno w grupie jaskrowej, jak i kontrolnej stosunek H95 do V95 był bliski jedności, a uzyskany kształt elipsy zbliżał się do koła.

Analizując zależności między wskaźnikami fiksacji a globalnymi parametrami strukturalnymi, stwierdzono istotną korelację między P1, BCEA63, BCEA95 i H95 tylko z całkowitą grubością GCC i gęstością naczyń w SVP. Oceniając związek między wskaźnikami fiksacji a parametrami strukturalnymi w wybranych sektorach, najsilniejsze korelacje zauważono z grubością pRNFL w kwadrantach skroniowych i górnych oraz grubością GCC w hemisferze górnej i dolnej. Wykazano też istotną korelację między wszystkimi parametrami fiksacji a średnią czułością siatkówki w MP. Wystąpiła również słaba, ale istotna korelacja między BCEA (95 i 63) a VFI ocenianym w SAP oraz między BCEA63 a BCVA. Wskaźnik fiksacji BCEA95 wykazywał najsilniejsze korelacje zarówno z parametrami strukturalnymi, jak i czynnościowymi siatkówki.

Reasumując, zaburzenia stabilności fiksacji w przebiegu POAG nasilają się wraz z postępem choroby oraz mogą być skutecznie oceniane za pomocą MP.

Wnioski

1. Analiza angiogramów wykazała istotne zmniejszenie VD siatkówki w SVP whole plamki i warstwie pRPC w oczach z POAG. Obszary rozrzedzonej sieci mikronaczyń korespondowały z obszarami obniżonego średniego progu czułości w MP.
2. Porównując zależności między parametrami strukturalnymi z wynikami funkcjonalnymi siatkówki, zaobserwowano, że parametry plamkowe (grubość GCC, SVP whole VD) wykazują silniejszą dodatnią korelację ze średnią czułością siatkówki w MP, natomiast parametry okołotarczowe (grubość pRNFL, pRPC VD) korelują silniej dodatnio z parametrami SAP.
3. Wyniki analizy wskazują, że POAG wiąże się zarówno z obniżeniem czułości siatkówki w plamce, jak i zaburzeniami wzorca fiksacji, a stopień zaawansowania choroby wpływa niekorzystnie na stabilność fiksacji.
4. Zaburzenia wskaźników fiksacji korelują ze zmianami strukturalnymi w OCT i OCTA oraz zmianami funkcjonalnymi w MP i SAP. Najsilniejsze ujemne korelacje wykazano dla wskaźnika fiksacji BCEA95 zarówno z parametrami strukturalnymi (RNFL i SVP), jak i czynnościowymi siatkówki (AT).

Oświadczenia autorów publikacji

Przemysław Zabel
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Kaluzna, M., Lamkowski, A., Jaworski, D., Wietlicka-Piszczyńska, M., & Kaluzny, J. J. (2020). Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *Plos one*, 15(7).” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współtworzeniu koncepcji, zbieraniu i analizie danych, wykonywaniu części eksperymentalnej, pisaniu oraz redagowaniu tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



(Podpis)

Martyna Kałużna
(Imię i Nazwisko)

Klinika Okulistyczna „Oftalmika”
Bydgoszcz
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Kaluzna, M., Lamkowski, A., Jaworski, D., Wietlicka-Piszcz, M., & Kaluzny, J. J. (2020). Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *Plos one*, 15(7).” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na zbieraniu, analizie danych oraz opracowaniu grafiki tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

(Podpis)



Aleksander Lamkowski
(Imię i Nazwisko)

Klinika Okulistyczna „Oftalmika”
Bydgoszcz
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Kaluzna, M., Lamkowski, A., Jaworski, D., Wietlicka-Piszczyńska, M., & Kaluzny, J. J. (2020). Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *Plos one*, 15(7).” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na zbieraniu i analizie danych tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

A. Lamkowski
(Podpis)

Damian Jaworski
(Imię i Nazwisko)

Klinika Okulistyczna „Oftalmika”
Bydgoszcz
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Kaluzna, M., Lamkowski, A., Jaworski, D., Wietlicka-Piszczyńska, M., & Kaluzny, J. J. (2020). Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *Plos one*, 15(7).” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na zbieraniu i analizie danych tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

(Podpis)

Handwritten signature of Damian Jaworski in black ink, written in a cursive style.

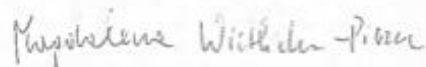
Magdalena Wietlicka-Piszc
(Imię i Nazwisko)

Katedra Biostatystyki i Teorii Układów Biomedycznych,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Kaluzna, M., Lamkowski, A., Jaworski, D., Wietlicka-Piszc, M., & Kaluzny, J. J. (2020). Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *Plos one*, 15(7).” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na analizie statystycznej wyników oraz pisaniu i redagowaniu tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



(Podpis)

Jakub J. Kałużny
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Kaluzna, M., Lamkowski, A., Jaworski, D., Wietlicka-Piszc, M., & Kaluzny, J. J. (2020). Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma. *Plos one*, 15(7).” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współtworzeniu koncepcji, nadzorze, pisaniu, redagowaniu oraz recenzji tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

(Podpis)
Kierownik
Katedry Badania Narządów Zmysłów

prof. dr hab. Jakub Kałużny

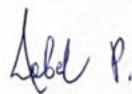
Przemysław Zabel
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwała, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współtworzeniu koncepcji, zbieraniu i analizie danych, wykonywaniu części eksperymentalnej oraz redagowaniu tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



(Podpis)

Karolina Suwała
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afiliacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwała, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współwykonywaniu części eksperymentalnej tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Karolina Suwała
(Podpis)

Aleksandra Gorczyca
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwala, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na recenzji oraz redagowaniu tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Aleksandra Gorczyca
(Podpis)

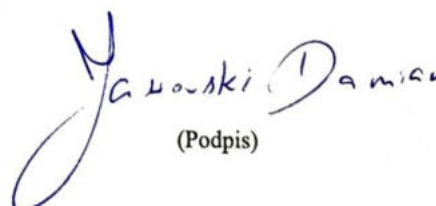
Damian Jaworski
(Imię i Nazwisko)

Klinika Okulistyki i Optometrii, Katedra Chorób Oczu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwala, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współwykonywaniu części eksperymentalnej tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.


(Podpis)

Martyna Kałużna
(Imię i Nazwisko)

Klinika Okulistyki i Optometrii, Katedra Chorób Oczu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwala, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współwykonywaniu części eksperymentalnej tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

(Podpis)



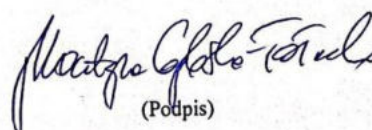
Martyna Gębska-Tołoczko
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwała, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na wizualizacji oraz zbieraniu danych tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



(Podpis)

Kacper Wnuk
(Imię i Nazwisko)

Katedra Biostatystyki i Teorii Układów Biomedycznych,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwała, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na analizie statystycznej wyników tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.


(Podpis)

Katarzyna Buszko
(Imię i Nazwisko)

Katedra Biostatystyki i Teorii Układów Biomedycznych,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P., Suwala, K., Gorczyca, A., Jaworski, D., Kaluzna, M., ... & Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na analizie statystycznej wyników tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.


(Podpis)

Jakub J. Kałużny
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P. Kaluzny, J. J. (2022). Alterations in fixation indices in primary open-angle glaucoma by microperimetry. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2368.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na współtworzeniu koncepcji, nadzorze oraz recenzji tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, nadzorowaniu projektu, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

(Podpis)
Katedry Badania Narządów Zmysłów
prof. dr hab. Jakub Kałużny



Przemysław Zabel
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P. Kaluzny, J. J. (2022). Mikroperymetria w diagnostyce jaskry. Okulistyka. 2/2022, s.21-25.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na analizie materiałów do tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, pisaniu i redagowaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.


(Podpis)

Jakub J. Kałużny
(Imię i Nazwisko)

Katedra Badania Narządów Zmysłów,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(Afilacja)

Oświadczam, że w pracy „Zabel, K., Zabel, P. Kaluzny, J. J. (2022). Mikroperymetria w diagnostyce jaskry. Okulistyka. 2/2022, s.21-25.” (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny polegał na nadzorze oraz recenzji tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Zabel jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Zabel przy opracowywaniu koncepcji, pisaniu i redagowaniu tej pracy, a udostępnienie pracy nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

(Podpis)
Kierownik
Katedry Badania Narządów Zmysłów

prof. dr hab. Jakub Kałużny

Streszczenie

Rozprawa doktorska stanowi serię powiązanych tematycznie trzech publikacji dotyczących użyteczności klinicznej mikroperymetrii (MP) w diagnostyce jaskry pierwotnie otwartego kąta (primary open-angle glaucoma – POAG).

POAG jest zwyrodnieniową neuropatią nerwu wzrokowego, prowadzącą do charakterystycznych zmian w morfologii tarczy nerwu wzrokowego (optic nerve head – ONH), zmniejszenia grubości okołotarczowej warstwy włókien nerwowych siatkówki (peripapillary retinal nerve fiber layer – pRNFL) oraz ubytków w badaniu pola widzenia (visual field – VF). W aktualnych badaniach wykazano nieprawidłowości strukturalne i czynnościowe w centralnej części plamki w oczach z jaskrą. Postępująca utrata funkcji komórek zwojowych siatkówki (retinal ganglion cells – RGCs) prowadzi do nieodwracalnych defektów VF. Standardowa automatyczna perymetria (SAP) jest uważana za złoty standard w diagnostyce i monitorowaniu POAG. Ograniczenia SAP obejmują rozbieżności w testach spowodowane zmęczeniem pacjenta, słabą fiksacją i ruchem gałek ocznych podczas badania. Co więcej, wynik SAP może pozostać prawidłowy przy utracie ponad 25% RGCs.

Obniżenie czułości siatkówki w obszarze plamki uważa się za istotny objaw uszkodzenia jaskrowego. W trakcie badania mikroperymetrycznego oceniania jest czułość siatkówki w plamce. W MP dzięki zastosowaniu obrazowania dna oka bodziec jest wyświetlany bezpośrednio na powierzchni siatkówki, a jego położenie kontroluje system śledzenia ruchów gałki ocznej (eye-tracking). System eye-tracking pozwala na badanie stabilności fiksacji i dokładnej prezentacji bodźców we wcześniej określonych miejscach na siatkówce dzięki aktywnej kompensacji ruchów gałek ocznych.

Przyjęto, że mikroperymetria jest przydatną metodą oceny funkcji siatkówki w obszarze plamki oraz obiektywną metodą analizy fiksacji. Postawiono hipotezę, że czułość siatkówki i stabilność fiksacji ulegają pogorszeniu wraz ze stopniem zaawansowania POAG i korelują z parametrami strukturalnymi w optycznej koherentnej tomografii (OCT) i angiografii OCT (OCTA). Celem badań było ustalenie przydatności mikroperymetrii w rutynowej diagnostyce i monitorowaniu POAG.

Praca poglądowa *Mikroperymetria w diagnostyce jaskry* została opublikowana w kwartalniku „Okulistyka” i przedstawia aktualny stan wiedzy na temat przydatności klinicznej badania mikroperymetrycznego w diagnostyce i monitorowaniu POAG. Ocena

wrażliwości siatkówki w plamce i badanie stabilności fiksacji mogą stanowić dodatkowe parametry wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej. Dostępne wyniki analiz wskazują, że czułość MP w rozpoznawaniu mroczków jaskrowych jest podobna jak w przypadku SAP. Mikroperymetria dodatkowo staje się cennym narzędziem diagnostycznym w przypadku zmian w obrębie pRNFL i GCC, kiedy wynik SAP pozostaje prawidłowy bądź niemiernodajny.

Celem pracy *Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma*, opublikowanej w „Plos One” (MNI_{SW} = 100 pkt; IF = 3,240) była analiza zależności między czułością siatkówki w MP a parametrami strukturalnymi ocenionymi za pomocą OCT oraz gęstością naczyń (vessel density-VD) w OCTA w oczach z POAG. Do badania zakwalifikowano 30 uczestników (52 oczu) z POAG i 15 uczestników (23 oczu) do zdrowej grupy kontrolnej. W badaniu okulistycznym wykorzystano OCTA celem oceny VD i OCT do analizy grubości kompleksu komórek zwojowych (ganglion cell complex – GCC) i pRNFL. Czułość siatkówki zbadano za pomocą MP i SAP.

Ocena angiogramów potwierdziła istotną redukcję VD siatkówki w obszarze okołotarczowych kapilar radialnych (peripapillary radial peripapillary capillaries – pRPC) i splocie naczyniowym powierzchniowym (superficial vascular plexus – SVP) w oczach z POAG. W umiarkowanej/ciężkiej postaci POAG wykazano istotnie obniżoną VD zarówno w pRPC, jak i SVP w porównaniu z grupą łagodną POAG i zdrową grupą kontrolną ($p < 0,001$). Korelacja Pearsona między parametrami strukturalnymi i funkcjonalnymi była najsilniejsza między średnim progiem czułości w MP oraz gęstością naczyń w SVP (Pearson's $r = 0,68$, $p < 0,001$). Zaobserwowano, że parametry plamkowe (grubość GCC, SVP whole VD) wykazują silniejszą dodatnią korelację ze średnią czułością siatkówki w MP, natomiast parametry okołotarczowe (grubość pRNFL, pRPC VD) korelują silniej dodatnio z parametrami SAP.

Potwierdzone korelacje parametrów funkcjonalnych uzyskanych w czasie badania MP z parametrami strukturalnymi uzyskanymi technikami OCT i OCTA są dowodem na wiarygodność badania mikroperymetrycznego w oczach zajętych jaskrą.

Celem publikacji zatytułowanej *Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry*, która ukazała się w „Journal of Clinical Medicine” (MNI_{SW} = 140 pkt; IF = 4,964) było ustalenie, czy POAG wiąże się z pogorszeniem parametrów stabilności fiksacji ocenianych za pomocą MP oraz czy stopień zaawansowania choroby ma

wpływ na te parametry. W badaniu analizowano stabilność fiksacji za pomocą MP u pacjentów z łagodną i umiarkowaną/ciężką postacią POAG oraz osób zdrowych. Wskaźniki fiksacji skorelowano z parametrami funkcjonalnymi siatkówki uzyskanych dzięki MP i SAP oraz strukturalnymi siatkówki otrzymanych za pomocą OCT i OCTA.

Włączono 54 oczy z POAG (32 oczy z łagodną POAG, 22 oczy z umiarkowaną/ciężką POAG) oraz 24 oczy do zdrowej grupy kontrolnej. Wykazano, że stabilność fiksacji w oczach z POAG pogarszała się wraz ze wzrostem ciężkości choroby, a między grupami obserwowano istotne różnice analizując parametr BCEA95, który obejmuje 95% punktów fiksacji na powierzchni dwuwymiarowej elipsy konturowej (Bivariate Contour Ellipse Area – BCEA). Ocena ilościowa parametrów strukturalnych i czynnościowych siatkówki również wykazała znaczne pogorszenie wraz z postępem jaskry. Potwierdzono korelacje między parametrami fiksacji a nieprawidłowościami w strukturze i funkcji siatkówki.

Podsumowując, POAG jest związana z zaburzeniami stabilności fiksacji, które nasilają się wraz z postępem choroby i mogą być oceniane za pomocą MP.

Summary

The doctoral thesis consists of a series of three publications on the usefulness of microperimetry in the management of primary open angle glaucoma (POAG). Glaucoma is a degenerative optic neuropathy leading to characteristic optic nerve head (ONH) features, thickness reduction in retinal nerve fiber layer (RNFL) and visual field (VF) defects. In previous studies was proved structural and functional abnormalities in the central part of the macula in glaucomatous eyes. Progressive loss of retinal ganglion cell (RGCs) function leads to irreversible VF defects. Standard automated perimetry (SAP) is still considered the gold standard technique for diagnosis and monitoring glaucoma. The limitations of SAP include discrepancies in the VF test due to patient fatigue, poor fixation, and eye movement during the test. Moreover, SAP can remain normal until 25% loss of RGCs.

Decrease of retinal sensitivity in the macular area is considered an important sign of glaucomatous damage. Accurate assessment of the function of the retina in macular region is possible thanks to microperimetry (MP). MP generates visual sensitivity maps with morphological correlation to retinal landmarks. Simultaneously, it is possible to evaluate the fixation behavior using the eye-tracking system independent of eye movement and to correct gaze movements. The MP test is reliable and reproducible. MP allowing for the assessment of changes in the central part of the field of view, both in qualitative and quantitative terms. Comparative studies on MP and SAP have shown that there is a good quantitative correlation between the two devices in glaucoma.

We assumed that MP is a useful method of assessing the function of the retina in the macular area and an objective method of fixation analysis. We hypothesized that macular retinal sensitivity and fixation indexes deteriorate with disease severity and correlate with structural parameters in optical coherence tomography (OCT) and OCT angiography (OCTA). The aim of our research is to establish the usefulness of MP in the routine diagnosis and monitoring of POAG.

The article *Microperimetry in the diagnosis of glaucoma* was published in "Okulistyka". The aim of this study is to review the clinical usefulness of MP in patients with POAG. The differences between SAP and MP as well as the advantages and disadvantages of the tests were described. MP allowing for the assessment of changes in the central part of the field of

view, both in qualitative and quantitative terms. Comparative studies on MP and SAP have shown that there is a good quantitative correlation between the two devices in glaucoma.

The aim of study *Correlation of retinal sensitivity in microperimetry with vascular density in optical coherence tomography angiography in primary open-angle glaucoma* published in "Plos One" was to evaluate the relationship between retinal sensitivity in MP with structural parameters using OCT and vessel density (VD) using OCTA in glaucomatous eyes.

We enrolled 30 participants (52 eyes) with POAG and 15 participants (23 eyes) in the healthy control group. All participants were examined for retinal structure using OCTA to assess VD and OCT to assess ganglion cell complex (GCC) and peripapillary RNFL (pRNFL) thickness. Retinal sensitivity was tested with MP and SAP. The VD in moderate/severe POAG was lower than that in mild POAG and healthy control in the macular superficial vascular plexus (SVP) and peripapillary radial peripapillary capillaries (pRPC). The Pearson's correlations between function and structure parameters were strongest with MP average sensitivity threshold and SVP VD in the area of whole macula. It was observed that the macular parameters (GCC thickness, SVP whole VD) showed a stronger positive correlation with the mean retinal sensitivity in MP, while the peripapillary parameters (pRNFL thickness, pRPC VD) correlated more strongly with SAP.

OCTA and MP techniques are valuable methods that allow clinically monitor structural and functional changes in glaucomatous eyes.

The purpose of the publication entitled *Alterations in Fixation Indices in Primary Open-Angle Glaucoma by Microperimetry* published in "Journal of Clinical Medicine" was to determine whether POAG is associated with changes in fixation stability parameters assessed by MP and whether the severity of glaucoma is related to a deterioration in these indicators. This study analyzed fixation stability using MP macular analyzer integrity assessment (MAIA) in patients with mild and moderate/severe POAG and healthy controls. The resulting fixation indices were correlated with parameters used to assess retinal function with MP and standard automated perimetry (SAP) and retinal structure with OCT and OCTA.

We enrolled 54 eyes in the POAG groups (32 eyes with mild POAG and 22 eyes with moderate/severe POAG) and 24 eyes in the healthy group. It was shown that fixation stability in POAG eyes deteriorated with increasing disease severity, and significant differences in bivariate contour ellipse area (BCEA) including 95% of fixation points were observed among

groups. Quantitative analysis of structural and functional retinal parameters also showed significant deterioration with the progression of glaucoma.

Correlations among fixation parameters and abnormalities in the retinal structure and function were confirmed. We concluded that POAG is associated with disturbances in the fixation pattern, which worsen as the disease progresses and can be effectively assessed by performing a MP test.