Università degli Studi di Padova

Facoltà di Ingegneria

Corso di laurea triennale in Ingegneria Biomedica

Tesi di laurea

Identificazione del tumore della pelle: applicazioni correnti e introduzione ad una nuova tecnica di imaging molecolare basata sulle frequenze di rilassamento

Relatore: Prof. Enrico Grisan

Laureando: Matteo Bianchi

Anno accademico 2010/2011

Indice

Introduzione 6

Capitolo 1 La cute

- 1.1 Tipi e funzioni della cute 7
- 1.2 Microstruttura della cute
  - 1.2.1 Epidermide 10
  - 1.2.2 Derma 16
  - 1.2.3 Ipoderma 17
  - 1.2.4 Unità pilosebacea 17
  - 1.2.5 Ghiandole sudoripare 23
- 1.3 Apporto vascolare, drenaggio linfatico e innervazione
  - 1.3.1 Apporto vascolare e drenaggio linfatico 24
  - 1.3.2 Innervazione 25
- 1.4 Sviluppo della cute 26
- 1.5 Pieghe naturali e rughe della cute 30
- 1.6 Guarigione delle ferite cutanee e cicatrizzazione 32

Capitolo 2 Tumore della pelle: classificazione e tecniche di identificazione

- 2.1 Tipi di tumore della pelle
  - 2.1.1 Carcinoma basocellulare 34
  - 2.1.2 Carcinoma spinocellulare 35
  - 2.1.3 Melanoma 36
- 2.2 Tecniche di identificazione
  - 2.2.1 Microscopia a raggi-X a contrasto di fase 40
  - 2.2.2 Dermatoscopia ad infrarossi 41
  - 2.2.3 Radiazioni pulsate 43
  - 2.2.4 Spettroscopia ad infrarossi 44
  - 2.2.5 Riflettometro a microonde 46

Capitolo 3 Introduzione al modello per ricavare i tempi di rilassamento

- 3.1 Modello del tessuto introdotto da Eskandari et al.
  - 3.1.1 Modello lineare viscoelastico 48
  - 3.1.2 Analisi spettrale e funzioni di trasferimento 50
  - 3.1.3 Stima del parametro elastico 52
  - 3.1.4 Effetto della leggi di potenza 52
- 3.2 Simulazione del modello
  - 3.2.1 Simulazione con 4 elementi 53
  - 3.2.2 Stima dei parametri e calcolo del tempo di rilassamento 54
  - 3.2.3 Calcolo dell'errore di stima e del rapporto contrasto-rumore 56
- 3.3 Sperimentazione
  - 3.3.1 Spiegazione del sistema di sperimentazione 60
  - 3.3.2 Primo test di misurazione 61
  - 3.3.3 Secondo test di misurazione 63

Capitolo 4 Conclusioni 65

Bibliografia 67

Introduzione

L'imaging molecolare sta assumendo una grande importanza in medicina per la prevenzione e la diagnosi di patologie di ogni genere, grazie soprattutto all'utilizzo di nuove tecnologie. Per quanto riguarda l'identificazione del tumore della pelle, alla tradizionale visita fatta dal dermatologo, si sono sviluppate molte tecniche che aiutano lo specialista e incrementano l'accuratezza nel classificare le varie patologie cutanee. L'obiettivo di questa tesi è quello di introdurre una nuova caratteristica per identificare il tumore della pelle: il rilassamento molecolare. Il principio di questa idea si basa sulle diverse caratteristiche morfologiche che contraddistinguono una cellula tumorale da una cellula sana. La cellula sana, sotto eccitazione, avrà una frequenza di rilassamento diversa da una cellula malata, sempre sotto eccitazione. Cercheremo di introdurre quindi un metodo che mi permetta di ricavare i tempi di rilassamento e verificheremo se tale metodo può essere usato per uno sviluppo futuro per l'analisi in vitro e in vivo di cute malata.

Nel primo capitolo si parla della cute e delle struttura delle sue parti fondamentali (epidermide, derma, unità pilosebacea e ghiandole sudoripare). Si continua descrivendo l'apporto vascolare, il drenaggio linfatico e l'innervazione, che sono direttamente coinvolti in caso di metastasi del tumore cutaneo. Poi una breve paragrafo tratta dello sviluppo della pelle in età embrionale. Si chiude il capitolo parlando del processo di guarigione con formazione della cicatrice.

La prima parte del secondo capitolo illustra le tre forme più importanti di cancro della pelle con le opportune descrizioni e approfondimenti. La seconda parte del capitolo descrive le ultime novità sulla ricerca di nuove tecniche per l'identificazione del tumore della pelle.

Il terzo capitolo riporta quasi in toto, la ricerca di Eskandari et al., che introduce una nuova e robusta tecnica per stimare i tempi di rilassamento del tessuto molle. Questo nuovo metodo viene sia confermato da una simulazione al computer, sia attraverso un metodo elastografico su campioni di materiale con caratteristiche molto vicine al tessuto molle.

Nel quarto capitolo vengono discussi i risultati illustrati precedentemente.

Capitolo 1

La cute

1.1 Tipi e funzioni della cute

La cute copre l'intera superficie del corpo [1] e ne costituisce l'8 % della massa corporea; la sua superficie varia con l'altezza e con il peso, ad esempio, in un individuo di 1,8 metri e peso di 90 km, la superficie della pelle è di circa 2,2 m². Il suo spessore varia tra 1,5 e 4 mm a seconda dello stato di maturazione, dell'invecchiamento e della specializzazione adibita.

La cute forma un'interfaccia di comunicazione tra corpo e ambiente circostante; entro certi limiti, costituisce un'efficace barriera contro l'invasione microbica con proprietà che possono proteggerla da danni meccanici, chimici, osmotici, termici e dalle radiazioni UV. La pelle svolge diversi processi biochimici, compresa la formazione di vitamina D sotto l'influenza dei raggi ultravioletti di tipo B (UVB) e la sintesi di citochine e dei fattori di crescita. È anche il bersaglio di diversi ormoni, i quali ne influenzano l'aspetto e la funzione.

Il controllo della temperatura corporea è un'importante funzione della pelle e viene svolto agendo sulla perdita di calore dalla circolazione cutanea attraverso la riduzione o l'aumento del flusso sanguigno di una vasta area di superficie. La pelle è coinvolta nella comunicazione socio sessuale e, nel caso della pelle del viso, può segnalare gli stati emotivi grazie a reazioni muscolari e vascolari. È uno dei maggiori organi di senso, riccamente fornito di terminazioni nervose e recettori specializzati per il tatto, per la temperatura, per il dolore e per altri stimoli.

Ha buone proprietà di attrito ed essendo elastica può essere allungata e compressa entro certi limiti. La superficie esterna è coperta da varie marcature, le linee della pelle, e possono essere ben visibili o microscopiche.

Il colore della cute umana deriva da, e varia con, la quantità di sangue nella circolazione cutanea, lo spessore dello strato cornificato e l'attività delle cellule specializzate che producono il pigmento melanina. La melanina ha un ruolo protettivo contro i raggi

ultravioletti e agisce come uno spazzino di radicali liberi nocivi. Le variazioni razziali di colore sono dovute principalmente alle differenze nella quantità e nella distribuzione di melanina e sono determinate geneticamente.

L'aspetto della pelle è determinato da molti altri fattori, ad esempio, i cambiamenti associati con l'invecchiamento, con il metabolismo e con la gravidanza. Lo stato generale della salute si riflette nella condizione della pelle e i primi segnali di molte malattie sistemiche appaiono proprio sulla pelle.

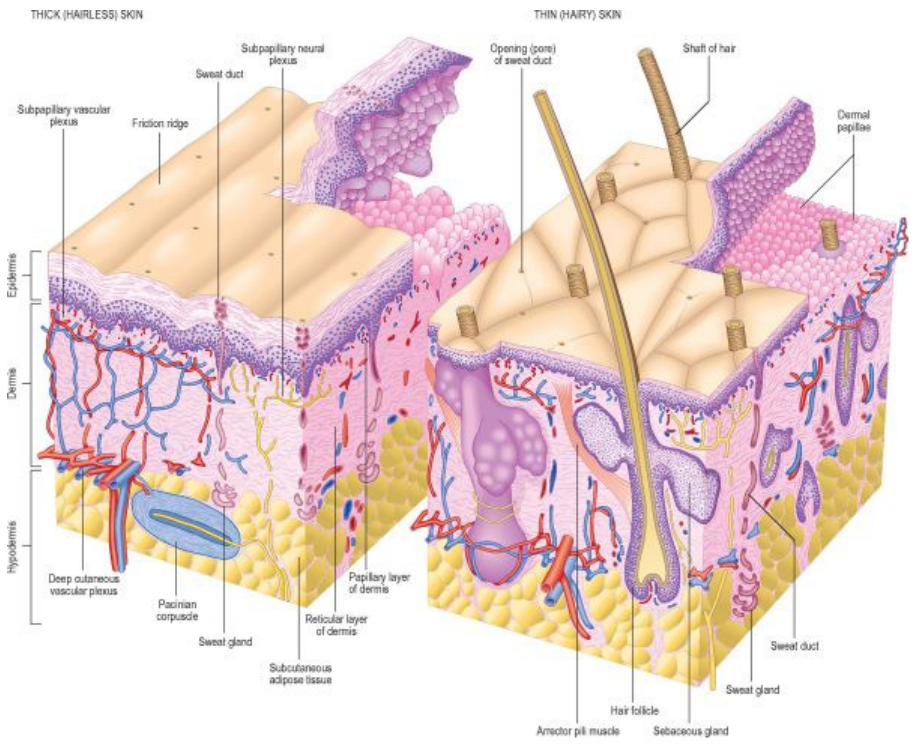


Fig. 1.1 L'organizzazione della pelle: si mette a confronto la struttura senza peli (plantare e palmare), più spessa, con la struttura pelosa, più sottile.

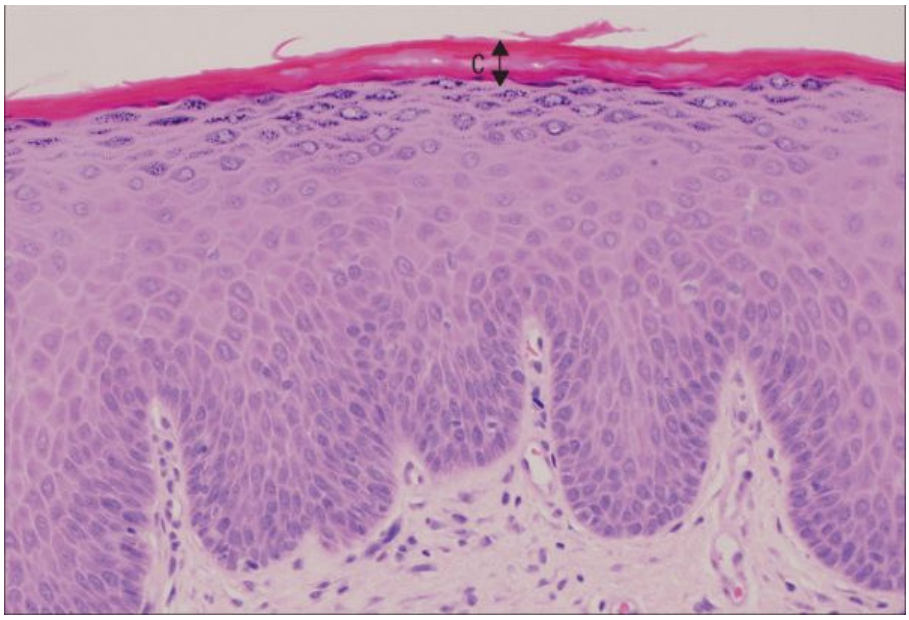


Fig 1.2 L'epidermide interfollicolare di uno strato sottile di pelle umana. Si noti il sottile strato cornificato (C).

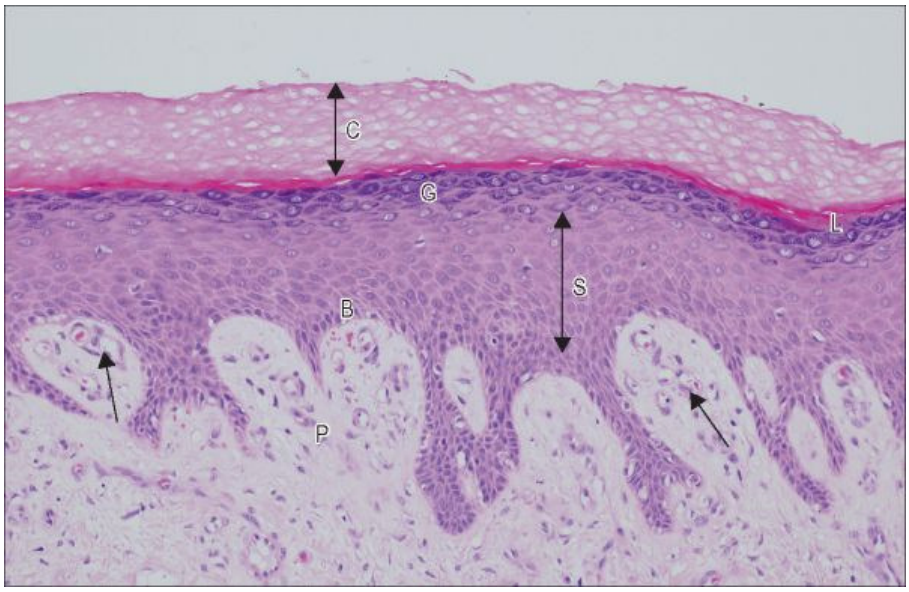


Fig 1.3 L'epidermide e il derma papillare (P) di uno strato spesso di pelle umana. In evidenzia lo spesso strato corneificato (C), lo strato lucido (L), lo strato granuloso (G), lo strato spinoso (S) e lo strato basale (B).

1.2 Microstruttura della cute

1.2.1 EPIDERMIDE

L'epidermide è un epitelio pavimentoso pluristratificato e cheratinizzato, dotato di lamina basale. Le cellule principali sono chiamate cheratinociti. I non cheratinociti all'interno dell'epidermide maturo sono i melanociti (responsabili della colorazione della pelle), le cellule di Langerhans (presentano l'antigene), e i linfociti. Le cellule di Merkel, le quali possono funzionare come sensori meccanorecettori o, eventualmente, come parte del sistema neuroendocrino, sono in collegamento con le terminazioni nervose.

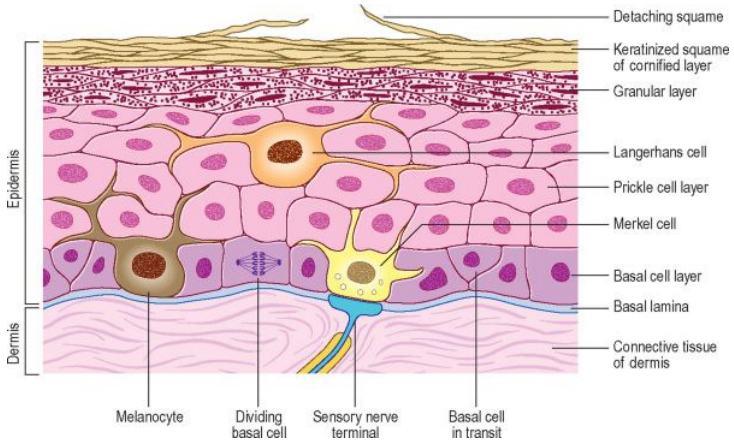


Fig 1.4 Le principali caratteristiche dell'epidermide, compresi i suoi strati cellulari e i diversi tipi di cellule. I melanociti e le cellule di Merkel sono derivati dalla cresta neurale, mentre le cellule di Langerhans dalle cellule precursori del midollo osseo.

La popolazione dei cheratinociti subisce un continuo rinnovamento per tutta la vita: uno strato di cellule alla base sostituisce quelle in superficie. Mentre si allontanano dalla base dell'epidermide i cheratinociti subiscono cambiamenti progressivi di forma e contenuto. Essi si trasformano da cellule viventi poligonali a squame appiattite non vitali ricche di filamenti intermedi di proteine (cheratina), incorporate in una matrice densa di proteine citoplasmatiche , andando così a formare la cheratina matura.

L'epidermide può essere diviso in strati dal più profondo al più superficiale come segue: strato basale, strato spinoso, strato granuloso, strato lucido e strato corneo (Fig. 1.3). I primi tre di questi strati sono compartimenti metabolicamente attivi, attraverso i quali le

cellule passano e cambiano la loro forma. Gli strati più superficiali delle cellule che stanno finalizzando la loro cheratinizzazione sono coinvolti non solo in cambiamenti strutturali, ma anche in alterazioni dei rapporti con gli altri cheratinociti e non cheratinociti.

Strato basale

Nello strato basale, adiacente al derma, ha luogo la proliferazione delle cellule nell'epidermide. Questo strato è in contatto con una lamina basale, la quale è una matrice extracellulare specializzata, non visibile al microscopio ottico. La membrana plasmatica basale dei cheratinociti basali, la lamina basale e le fibrille di ancoraggio del derma sottostante costituiscono la zona di membrana basale (BMZ), detta anche giunzione dermo-epidermica (Fig. 1.5).

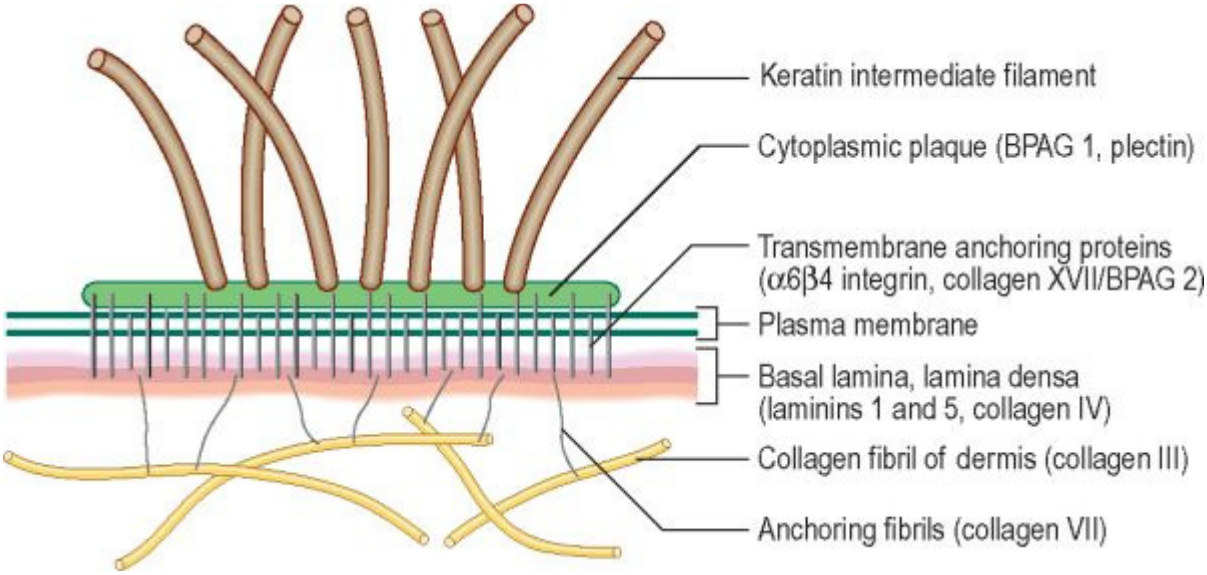


Fig. 1.5 La zona di membrana basale con i principali componenti.

La maggior parte delle cellule dello strato basale (Fig. 1.4) sono delle colonne di forma cubica con larghi nuclei. Il citoplasma contiene un numero variabile di melanosomi e fasci di filamenti di cheratina. Nei cheratinociti basali queste cheratine sono per lo più vitamine di tipo K5 e K14. I melanociti, le cellule di Langerhans e le cellule di Merkel si alternano tra i cheratinociti basali.

I cheratinociti dello strato basale possono avere destini diversi. Alcuni di essi comprendono anche cellule staminali che possono auto rinnovarsi oppure possono

produrre cellule figlie che si differenziano entrando nello strato spinoso dell'epidermide.

L'organizzazione dello strato basale e delle cellule sovrastanti forma una serie di colonne. Molti strati di cellule granulose e spinose si sovrappongono a gruppi di sei o otto cellule basali ottenendo l'unità proliferativa colonnare. Ogni gruppo di cellule basali consiste in una cellula staminale centrale con attorno, come a formare un anello, cellule proliferative o già mature. Alla periferia dell'unità le cellule mature si trasferiscono nello strato spinoso. Il tempo totale di ricambio epidermico è compreso tra i 52 e i 75 giorni.

Strato spinoso

Questo strato è formato da diversi layer di cheratinociti strettamente legati che interagiscono tra di loro grazie a numerose sporgenze sulla superficie delle cellule stesse. Le cellule sono ancorate tra di loro per mezzo dei desmosomi che forniscono resistenza alla trazione e alla coesione. Queste cellule soprabasali sono impegnate nella differenziazione terminale e gradualmente si muovono nello strato corneo tante più cellule vengono prodotte nello strato basale. Il citoplasma contiene fasci di filamenti di cheratina disposti attorno al nucleo e uniti ai desmosomi, può contenere anche melanosomi e cellule di Langerhans.

Strato granuloso

Lo strato granuloso è formato da cellule appiattite nelle quali si verificano grandi cambiamenti nella struttura dei cheratinociti. I nuclei iniziano a disintegrarsi; organelli come i ribosomi, mitocondri legati alla membrana e apparati del Golgi degenerano. I fasci di filamenti di cheratina diventano più compatti e vengono associati, in modo irregolare, con granuli di cheratoialina, privi di membrana, contenenti la proteina filaggrina, la cui funzione è quella di aggragare, appunto, i fasci di cheratina. Questi granuli costituiscono una componente fondamentale della barriera dell'epidermide, rendendola relativamente impermeabile.

Strato lucido

E' uno strato di transizione, costituito da pochi strati di cellule appiattite, ancora vitali ma prive di nucleo. Sono cellule ricche di eleidina e tonofilamenti che servono per avviare l'apoptosi della cellula. Questo strato è più facilmente riscontrabile nell'epidermide del palmo della mano e della pianta del piede.

Strato corneo

Lo strato corneo è il prodotto finale della differenziazione epidermica, o cheratinizzazione. E' costituito da fitti strati di squame poliedriche appiattite che vanno a costituire un'area superficiale di 800 – 1100 μm^2. Queste cellule si sovrappongono nei loro bordi e interagiscono con le cellule degli strati opposti per mezzo di creste, scanalature e microvilli. Nella pelle sottile lo strato corneo è formato da poche cellule in profondità, mentre nella pelle spessa lo strato può raggiungere e superare le 50 cellule in profondità. Le membrane cellulari sono molto spesse a causa della presenza di uno sviluppato involucro cellulare cornificato costituito principalmente dalle proteine involucrina, filaggrina e loricrina. La superficie esterna è inoltre coperta da un monostrato di lipidi. La regione intercellulare contiene ampi fogli di glicolipidi provenienti dai granuli dello strato granuloso. Le cellule sono prive di nucleo e di organelli e consistono solamente in densi filamenti di cheratina incastrati nella matrice citoplasmatica. In condizioni normali la produzione di cheratinociti epidermici nello strato basale è compensata dalla perdita di cellule nello strato corneo. Lo spessore dello strato corneo è influenzato da fattori ambientali e dalle abitudini dell'individuo.

Cheratina

La cheratina è una proteina filamentosa e si trova in tutte le cellule epiteliali. Ci sono due tipi di cheratina, il tipo I (acida) e il tipo II (neutro/basica); questa coppia viene assemblata in filamenti intermedi di lunghezza di 10 nm. Cinquantaquattro geni differenti di cheratina sono stati riconosciuti e i loro prodotti proteici sono stati numerati. Le cheratine K5 e K14 sono sintetizzate a livello basale mentre K1 e K10 vengono sintetizzate negli strati superiori.

Lipidi epidermici

L'epidermide funge da barriera alla perdita di acqua e di altre sostanze ad eccezione del sudore e della secrezione sebacea. Molti lipidi sono sintetizzati nell'epidermide, compresi trigliceridi e acidi grassi, fosfolipidi, colesteroli, esteri del colesterolo, glicosfingolipidi e ceramidi. Un intermedio della sintesi dl colesterolo, il 7-deidrocolesterolo, è il precursore della vitamina D, che è sintetizzata nella pelle. Il contenuto e la composizione dei lipidi epidermici cambiano con la differenziazione. I fosfolipidi e i glicolipidi si accumulano nei cheratinociti sopra lo strato basale soprattutto, infatti nello strato corneo sono praticamente assenti. Il colesterolo e i suoi esteri, gli acidi grassi e i ceramidi sono invece abbondanti nello strato corneo. La disposizione lamellare dei lipidi extracellulari è un fattore importante nel loro ruolo di barriera.

Melanociti

I melanociti sono le cellule che contengono il pigmento melanina e derivano dalla cresta neurale (Fig. 1.6). Essi sono presenti nell'epidermide e nelle sue appendici, nell'epitelio orale, in alcune membrane mucose, nel tratto uveale del bulbo oculare, in parti dell'orecchio medio e dell'orecchio interno e nelle meningi alla base del cervello. Le melanine sono polimeri ad alto peso molecolare legate a proteine strutturali. Negli umani esistono due classi di melanina, l'eumelanina di colore marrone e nero e la feomelanina di colore giallo e rosso, entrambe derivate dalla tirosina. La maggior parte delle melanine naturali sono miscele di eumelanina e feomelanina.

I melanociti sono cellule dendritiche a contatto desmosomiale con la lamina basale ma non con i cheratinociti. Appaiono come cellule chiare nello strato basale dell'epidermide e variano da 2300 su mm^2 nella pelle della guancia a 800 su mm^2 nella pelle dell'addome. Si pensa che un singolo melanocita sia in contatto funzionale attraverso il suo sistema dendritico con 30 cheratinociti. Il nucleo è grande e rotondo, il citolplasma contiene filamenti intermedi, un complesso del Golgi molto avanzato oltre al reticolo endoplasmatico rugoso, mitocondri e ad un caratteristico organello: il melanosoma.

Il melanosoma è una struttura membranosa dove avviene una sequenza di stadi di sviluppo che porta la melanina a sintetizzarsi e a depositarsi all'interno attraverso una reazione tirosina-tirosinasi. I melanosomi maturi si muovono nei dendriti attraverso le

superfici dei microtubuli e vengono trasferiti nei cheratinociti attraverso fagocitosi, i cheratinociti infatti interiorizzano la punta del dendrite con il conseguente riversamento dei melanosomi nel citoplasma.

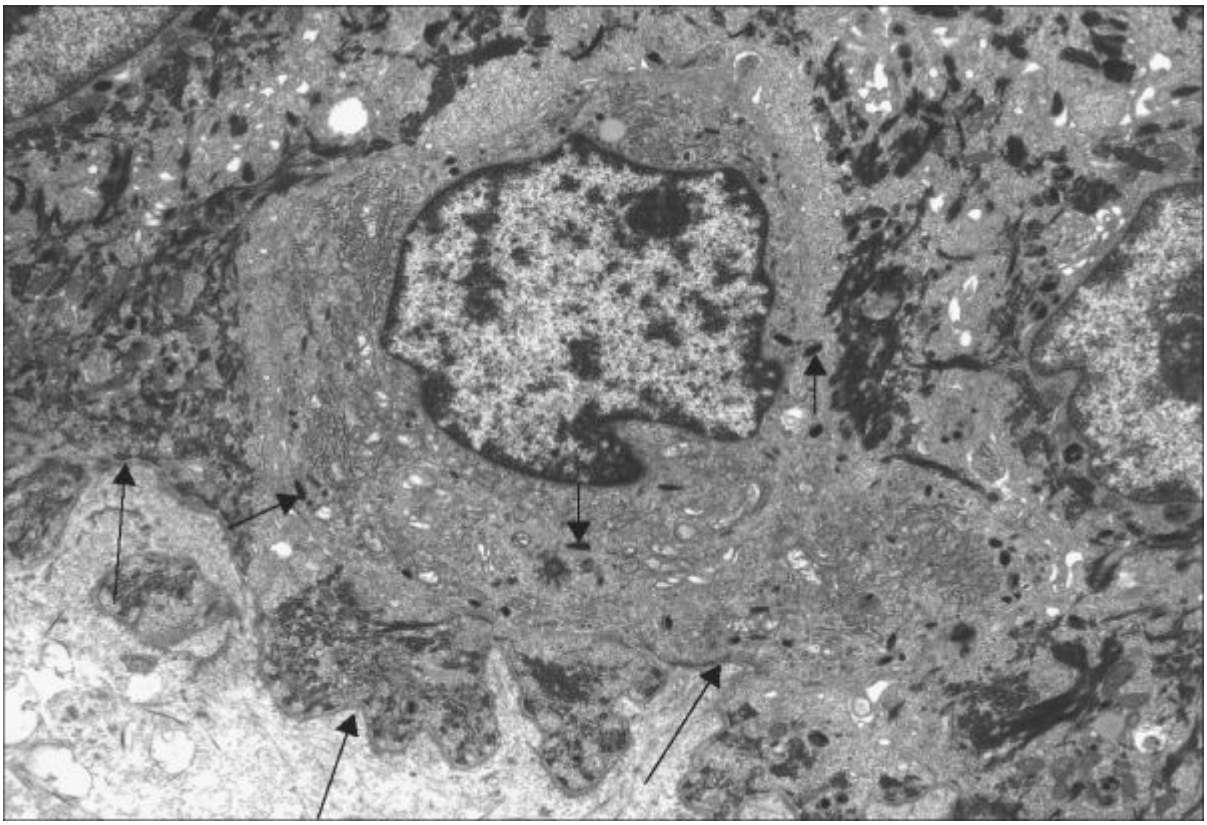


Fig. 1.6 Melanocita basale dell'epidermide al microscopio elettronico. In evidenzia il nucleo e il citoplasma contenente i melanosomi (frecce corte). Le frecce lunghe indicano la giunzione dermo-epidermica.

La melanina protegge dagli effetti dannosi dovuti alle radiazioni UV sul DNA ed inoltre protegge dai danni dovuti ai radicali liberi. La pigmentazione della melanina è sia costitutiva che facoltativa. La pigmentazione costitutiva è il livello intrinseco della pigmentazione ed è determinato geneticamente, mentre la pigmentazione facoltativa rappresenta i cambiamenti reversibili indotti dagli agenti ambientali, quali i raggi X e i raggi UV, le sostanze chimiche e gli ormoni. Nelle pelli fortemente pigmentate i melanociti tendono ad essere più grandi, più dendritici e con melanosomi in fase più avanzata più larghi dei corrispondenti melanociti delle pelli più chiare. Gli stessi cheratinociti contengono più melanosomi.

1.2.2 DERMA

Il derma è un tessuto connettivo denso, ha una matrice composta da una rete di collagene e elastina intrecciate in una sostanza amorfa formata da glicosaminoglicani, glicoproteine e acqua. Meccanicamente il derma fornisce una considerevole resistenza alla pelle in virtù del numero e della disposizione delle fibre di collagene e delle fibre elastiche. La densità delle fibre varia all'interno di una zona, in differenti parti del corpo, con l'età e il sesso. Il derma è vitale per la sopravvivenza dell'epidermide e importanti segnali sono scambiati all'interfaccia tra le due parti durante lo sviluppo. Il derma può essere diviso in due zone: uno strato sottile superficiale, detto strato papillare e uno strato più profondo, detto strato reticolare. Il loro confine è indistinto.

Il collagene dermico dell'adulto è principalmente di tipo I e III, in proporzioni dell' 80-85 % e del 15-20 % rispettivamente. Le grosse fibre di tipo I sono presenti nel derma più profondo, mentre il tipo III si trova nel derma papillare e attorno ai vasi sanguigni. Il collagene di tipo IV si trova nella lamina basale che separa il derma dall'epidermide, intorno alle cellule di Schwann dei nervi periferici e nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Due maggiori categorie di cellule sono presenti nel derma dell'adulto: le permanenti e le migranti. Le cellule permanenti includono cellule di strutture organizzate come i nervi, i vasi e le cellule del muscolo pilo erettore, e i fibroblasti, che sintetizzano tutti i componenti della matrice extracellulare dermica. Le cellule migranti sono originarie del midollo osseo e includono macrofagi, mastociti, eosinofili, neutrofili, cellule T e cellule B, e cellule dendritiche interstiziali che assicurano una sorveglianza immunitaria.

Strato papillare

Lo strato papillare è immediatamente sotto l'epidermide ed è specializzato per fornire ancoraggio meccanico, supporto metabolico e manutenzione trofica per l'epidermide sovrastante, oltre a fornire terminazioni nervose sensoriali e vasi sanguigni. Il citoscheletro dei cheratinociti basali epidermiali è legato alla matrice fibrosa del derma papillare attraverso delle fibrille di ancoraggio del collagene di tipo VII, che si estendono in profondità nel derma papillare (Fig. 1.5).

La parte superficiale del derma è formata da papille e creste, che interagiscono con la rete a pioli dello strato basale dell'epidermide formando la giunzione dermo-epidermica. Le papille hanno un apice rotondo o smussato che può essere suddiviso in

diverse cuspidi. Nella pelle sottile queste papille sono molto piccole e di minore quantità, mentre nelle regioni di pelle spesse, quali il palmo della mano e la pianta del piede, sono molto larghe e numerose, strettamente aggregate e disposte in linee curve parallele.

Strato reticolare

Lo strato reticolare si fonde con la parte più profonda dello strato papillare. I suoi fasci di collagene sono più spessi di quelli dello strato papillare e si intrecciano tra loro per formare un reticolo molto forte ma deformabile.

1.2.3 IPODERMA

L'ipoderma è uno strato di tessuto connettivo lasso di spessore variabile che si fonde con l'aspetto più profondo dello strato reticolare. È spesso adiposo, in particolare tra il derma e la muscolatura del corpo. Esso media la mobilità della pelle e contribuisce all'isolamento termico, agisce inoltre come armonizzatore e costituisce una riserva energetica.

La quantità e la distribuzione del grasso sottocutaneo differisce nei due sessi. È generalmente più abbondante e ampiamente distribuito nelle femmine. Nei maschi diminuisce dal tronco alle estremità e questa distribuzione è più evidente con la mezza età. La quantità di tessuto adiposo nell'ipoderma riflette la quantità di lipidi immagazzinati negli adipociti. L'ipoderma è più distinto nelle parte addominale ed è quasi assente nella orecchie ma è particolarmente denso nel cuoio capelluto, nel palmo della mano e nelle pianta del piede, dove è attraversato da numerose bande di tessuto connettivo vincolando l'ipoderma e la pelle alle strutture sottostanti.

1.2.4 UNITA' PILOSEBACEA

L'unità pilo sebacea è costituita dal pelo e dal suo follicolo con associato il muscolo pilo erettore, la ghiandola sebacea e, talvolta, una ghiandola apocrina. Non tutti questi elementi si presentano insieme nelle varie regioni del corpo.

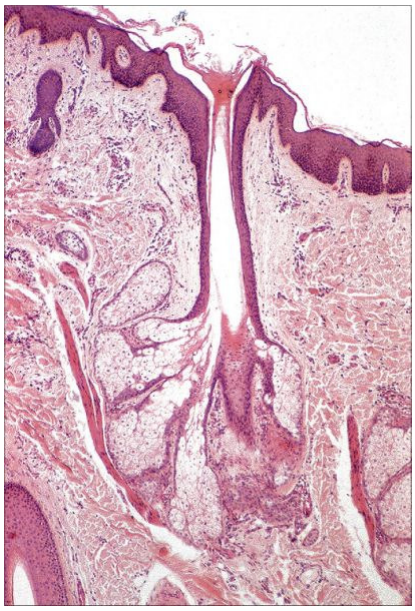


Fig 1.7 Unità pilo sebacea in pelle sottile. Il follicolo, il fusto e la radice del pelo si estendono verticalmente per tutto il campo d'esame, alla sinistra del follicolo si trovano gli acini della ghiandola sebacea. La ghiandola si apre nel follicolo al centro della figura, mentre il muscolo pilo erettore (sottile fascio di fibre rosse) si vede a sinistra della ghiandola sebacea.

Peli

I peli sono strutture filamentose cornificate presenti nella quasi totalità della superficie corporea. Crescono fuori dalla pelle in modo obliquo come è evidente dall'inclinazione del pelo dell'avambraccio per esempio. I peli sono assenti in diverse parti del corpo, inclusa la spessa pelle del palmo delle mani e delle piante dei piedi, nelle superfici flessorie delle dita, nella sottile pelle dell'ombelico, dei capezzoli, del glande e del clitoride. La presenza, la distribuzione e la relativa abbondanza di peli in certe parti del corpo, come nel volto, nel pube e nelle ascelle, sono caratteristiche sessuali secondarie che svolgono un ruolo delicato nella comunicazione socio sessuale. I peli aiutano minimamente nella termoregolazione: il cuoio capelluto protegge dai danni dovuti alle radiazioni solari. Essi hanno una funzione sensoriale.

I peli si distribuiscono, approssimativamente, da circa 600 su cm^2 sul viso a circa 60 su cm^2 sul resto del corpo. In lunghezza variano da meno di un millimetro a più di un metro, mentre in larghezza da 0.005 a 0.6 mm. Essi variano nella forma e nel colore a seconda del grado e del tipo di pigmentazione.

Follicolo pilifero

Il follicolo pilifero (fig. 1.8) è una sottocrescita dell'epidermide contenente il pelo, il quale può estendersi in profondità nell'ipoderma (3 mm) o essere più superficiale fermandosi al derma (1 mm). In genere l'asse longitudinale del follicolo è obliquo alla superficie della pelle.

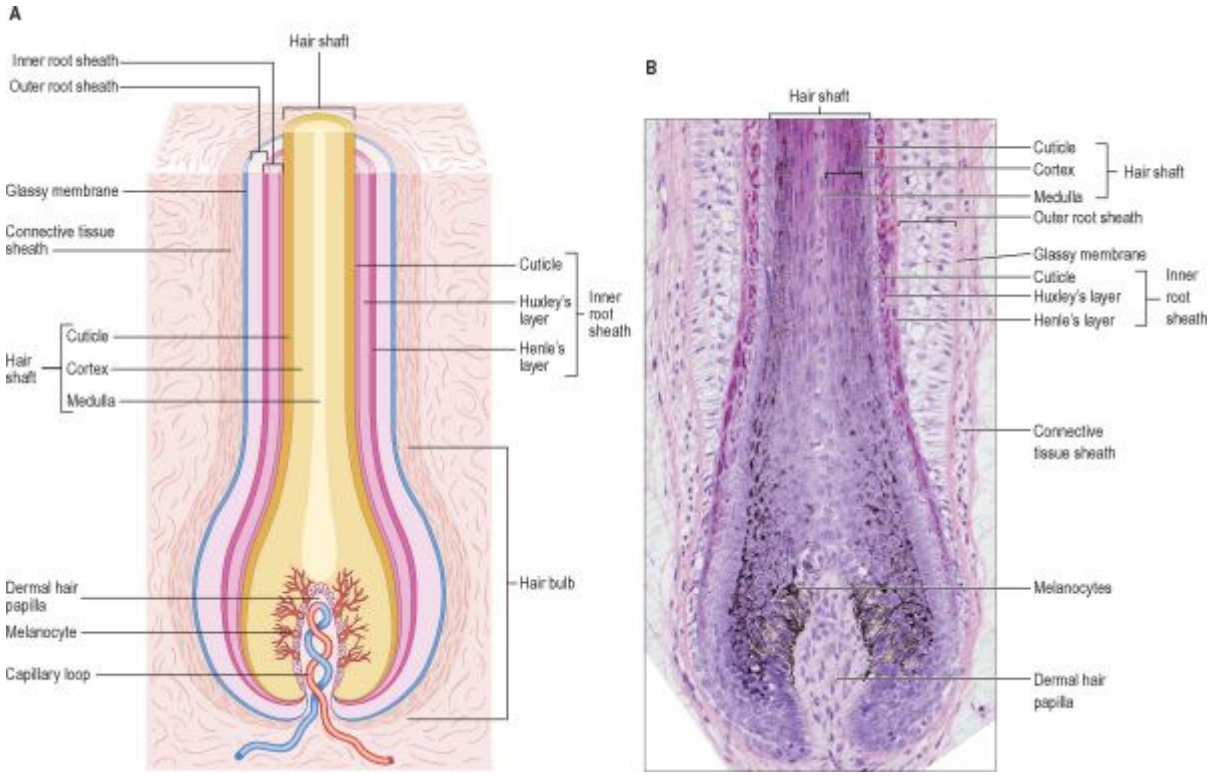


Fig 1.8 A, Le principali caratteristiche strutturali del follicolo pilifero. Una papilla invagina il bulbo e lungo lo strato basale dell'epidermide i melanociti inseriscono i loro dendriti nei cheratinociti formanti il pelo. B, Il bulbo del pelo alla base del follicolo pilifero umano.

Bulbo pilifero

Il bulbo pilifero forma la parte più bassa del follicolo epiteliale e racchiude la papilla dermica formata da cellule di tessuto connettivo (Fig. 1.8 B). La papilla dermica pilifera svolge un ruolo importante per la crescita del follicolo pilifero. Il bulbo pilifero genera il pelo e la corrispettiva guaina interna della radice. Possiamo dividere il bulbo con un'ipotetica linea in due zone: una matrice germinale di minore estensione e una zona più alta di maggiore estensione. La matrice germinale è formata da cheratinociti impachettati in modo molto fitto, tra i quali si alternano i melanociti e alcune cellule di

Langerhans. Il bulbo superiore è costituito da cellule che vengono generate dalla matrice sottostante. Questi migrano e si differenziano lungo diverse linee, dando origine al pelo vero e proprio.

Struttura del pelo

Un fusto di pelo pienamente sviluppato consiste in tre zone concentriche che, partendo dall'esterno, si chiamano cuticola, corteccia e midolla. Ognuno di questi strati ha differenti tipi di cheratina e diversi gradi di cheratinizzazione. Nei peli più sottili la midolla e praticamente assente. La cuticola forma la superficie del pelo e consiste in tanti strati di squame cornificate e sovrapposte dirette apicalmente e leggermente verso l'esterno. Le cellule immature della cuticola si presentano come granuli amorfi e densi allineati lungo la membrana plasmatica esterna con pochi filamenti. La corteccia consiste nella parte maggiore del pelo e si compone di numerose squame, fitte e allungate, che contengono residui nucleari e melanosomi. Le cellule immature contengono fasci di filamenti ravvicinati ma con granuli densi e quando sono pienamente cornificate hanno l'aspetto caratteristico dell'impronta del pollice con filamenti disposti in vertici. La midolla, quando presente, è composta da liberi aggregati di cellule contenenti vacuoli, filamenti sparsi, materiale granulare e melanosomi.

Fasi di sviluppo del pelo

L'attività ciclica ricorrente nel pelo comprende la crescita, l'involuzione e la fase di riposo. Negli esseri umani questi cicli sono irregolari. Nella fase di crescita, o anagena, si attivano i melanociti che producono melanosomi, i quali passano nei cheratinociti midollari e corticali. Il cambiamento del colore dei peli, e quindi dei capelli, nell'età adolescenziale, è dovuto ad alterazioni del tipo dominante di melanosoma prodotto.

La fase anagena e seguita dalla fase di involuzione, o fase catagena, durante la quale l'attività mitotica della matrice germinale cessa, il pelo viene eretto dall'attività del muscolo pilo erettore e l'intero segmento inferiore del follicolo degenera. Anche la papilla dermica sale e viene inglobata nel follicolo pilifero accorciato, situazione che persiste anche nella fase di riposo, o fase telogena. Durante la fase telogena i melanociti perdono la loro pigmentazione e possono essere riconosciuti solo per la loro struttura. All'inizio della nuova fase anagena le cellule epiteliali alla base del follicolo si dividono

per formare un rudimentale pelo secondario coinvolgendo la papilla dermica a formare un nuovo bulbo pilifero.

L'azioni degli ormoni nella crescita dei peli sono complessi e molto vari: oltre agli ormoni sessuali intervengono gli ormoni prodotti dall'ipofisi, dalla tiroide e dalla corteccia surrenale. Gli androgeni stimolano la generazione dei peli del viso e del corpo e, dopo i trent'anni, stimolano il cambiamento del cuoio capelluto, provocando la calvizie parziale, o totale. Il tasso medio di crescita, anche se è molto vario, è di circa 0.2-0.44 mm in 24 ore. Il tasso più alto si verifica nel cuoio capelluto.

Ghiandole sebacee

Le ghiandole sebacee sono piccole strutture sacciformi situate nel derma (Fig. 1.9), insieme al follicolo pilifero e al muscolo pilo erettore costituisce l'unità pilo sebacea. Esse sono presenti in tutto il corpo ad eccezione del palmo della mano, della pianta del piede e delle zone flessorie delle dita. Tipicamente queste ghiandole consistono in grappoli di acini secretori che si aprono tramite un condotto comune nel canale pilifero del follicolo. Rilasciano il loro prodotto lipidico, il sebo, nel canale o ,in alcune zone della pelle dove manca il follicolo pilifero, direttamente in superficie.

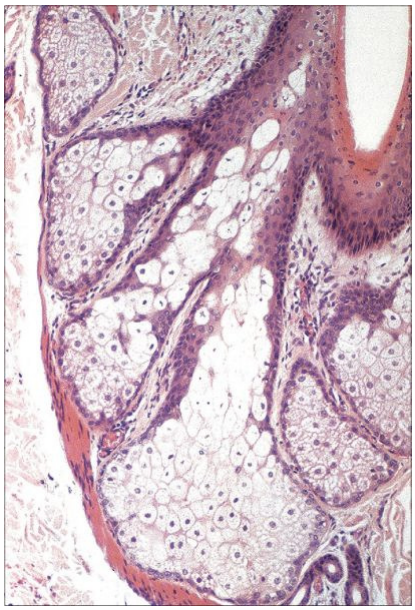


Fig. 1.9 Una ghiandola sebacea, viene mostrato un gruppo di acini secretori che si aprono nel follicolo pilifero (in alto a destra).

In generale il numero di ghiandole sebacee in una determinata zona rispecchia il numero di follicoli piliferi e vanno da una media di 100/cm² su gran parte del corpo a di 400-900 /cm² sul viso e sul cuoio capelluto. Microscopicamente, gli acini ghiandolari sono

racchiusi in una lamina basale supportata da una sottile capsula e da una rete ricca di capillari. Ogni acino è rivestito da un singolo strato di cellule epiteliali che assomigliano ai cheratinociti non differenziati dell'epidermide interfollicolare. Possiedono nuclei e grandi nucleoli, filamenti di cheratina, ribosomi liberi, mitocondri e reticoli endoplasmatici lisci, sono attaccati tra di loro grazie ai desmosomi. Funzionalmente sono cellule staminali attive la cui progenie si muove al centro dell'acino, incrementando il volume e l'accomulazione di vacuoli lipidici. Alla fine queste cellule si disintegrano, riversando la loro massa grassa nella cavità e nel condotto principale. Il processo impiega 2-3 settimane.

Le normali funzioni del sebo sono l'apporto di uno strato protettivo sui peli, contribuendo all'impermeabilizzazione dell'epidermide, scoraggiando in questo modo i parassiti. Appena formato, il sebo è una miscela complessa formata da oltre il 50% con digliceridi e trigliceridi, con piccole percentuali di esteri della cera, esteri del colesterolo e acidi grassi liberi.

Ghiandole apocrine

Le ghiandole apocrine sono ghiandole particolarmente grandi poste nel derma o nell'ipoderma. Dal momento che si sviluppano come escrescenza del follicolo pilifero e il loro secreto si riversa nel canale pilifero, vengono trattate in questa sezione. Nell'adulto sono presenti nelle ascelle, nella regione perianale, nella regione ombelicale, nello scroto, nelle areole mammarie e nelle piccole labbra.

La ghiandola apocrina è costituita da una struttura a forma di bobina e da un condotto rettilineo che si apre nel canale pilifero o direttamente sulla superficie della pelle, in assenza del pelo. La regione secretoria può raggiungere i 2 mm di larghezza. L'attività di queste ghiandole è minima prima della pubertà, dopo di che diventa androgena-dipendente e reagisce a stimoli emozionali. È controllata dai nervi adrenergici ed è sensibile all'attività dell'adrenalina e della noradrenalina. La secrezione è inizialmente senza odore, ma sotto l'effetto della decomposizione batterica si generano odori forti, composti di muschio, acidi grassi e steroidi. In molti animali sono potenti segnali ormonali, ma negli umani il loro ruolo è più incerto.

Muscolo piloerettore

I muscoli pilo erettori sono piccoli fasci di cellule muscolari lisce che formano legami tra la guaina dermica del follicolo pilifero e lo strato papillare del derma. Essi mostrano le caratteristiche tipiche del muscolo liscio e le cellule sono separate da spazi ristretti contenenti fibre di collagene e assoni amielinici e noradrenergici appartenenti al sistema simpatico. I muscoli sono attaccati al follicolo da fibrille di elastina e la ghiandola sebacea occupa uno spazio tra il muscolo e il follicolo pilifero, la contrazione muscolare aiuta così l'espulsione del contenuto della ghiandola.

1.2.5 GHIANDOLE SUDORIPARE

La grande maggioranza delle ghiandole sudoripare sono classificate come eccrine, cioè come ghiandole esocrine che producono il loro secreto rimanendo integre. Si presentano come lunghe strutture tubulari e sono situate in profondità o nel derma o nell'ipoderma, per poi percorrere la parte restante, fino alla superficie, in modo elicoidale (Fig. 1.1). Il tubo è in contatto con la rete epidermica passando tra i cheratinociti e sfocia in superficie tramite un diaframma arrotondato (poro). Le ghiandole sudoripare hanno un importante ruolo di termoregolazione e di miglioramento della sensibilità e della presa nei palmi delle mani e nelle piante dei piedi, sono assenti nelle membrana timpanica, nei margini delle labbra, nel capezzolo, nelle piccole labbra, nel pene e nel clitoride. Altrove sono numerose e la loro frequenza va da 80 a più di 600/cm². Il numero totale di queste ghiandole è compreso tra 1.6 e 4.5 milioni.

Microscopicamente si notano tre tipi di cellule: le cellule chiare, adibite alla secrezione, le cellule scure, con funzioni di rivestimento e le cellule mio epiteliali, simili a quelle associate agli acini delle ghiandole salivari, contengono abbondanti miofilamenti. Il condotto del sudore è formato da uno strato basale più esterno e da uno strato di cellule luminali più interno connesse da numerosi desmosomi.

Il sudore è un fluido chiaro e inodore, contiene principalmente ioni cloro e sodio, ma anche potassio, bicarbonato, calcio, urea, lattato, aminoacidi, immunoglobuline e altre proteine. Metalli pesanti e vari composti organici sono espulsi con il sudore. Le ghiandole sudoripare sono un grado di produrre più di 10 litri di sudore al giorno in risposta a vari stimoli.

1.3 Apporto vascolare, drenaggio linfatico e innervazione

1.3.1 APPORTO VASCOLARE E DRENAGGIO LINFATICO

La domanda metabolica della cute non è elevata e sotto normali condizioni il suo flusso di sangue supera i requisiti nutrizionali di 10 volte e può raggiungere il 5% della gittata cardiaca. Questo perché la circolazione cutanea ha un importante ruolo nella termoregolazione ed è organizzata in modo da incrementare o decrementare la sua capacità di ben 20 volte, in risposta a richieste di perdita o conservazione di calore.

L'afflusso di sangue alla cute proviene da tre fonti principali: dal sistema cutaneo diretto, dal sistema muscolo cutaneo e dal sistema fascio cutaneo. Il sistema cutaneo diretto deriva dai tronchi arteriosi principali e dalle corrispondenti vene. I vasi maggiori decorrono nel grasso sottocutaneo, parallelamente alla superficie cutanea. I vasi perforanti muscolocutanei originano dai vasi intramuscolari, attraversano la superficie del muscolo, quindi perforano la fascia profonda e raggiungono la cute distribuendosi ai tessuti sottocutanei. Il sistema vascolare fascio cutaneo è costituito da rami perforanti provenienti da vasi localizzati in profondità, i quali decorrono lungo i setti intermuscolari per poi distribuirsi a ventaglio a livello della fascia profonda, raggiungendo infine la cute.

I vasi cutanei diretti e i vasi perforanti prendono parte alla formazione di sei plessi reticolari di arteriole a decorso orizzontale (Fig 1.10), tra di loro interconnessi, che sono responsabili dell'irrorazione dell'apparato tegumentario. Tre di questi plessi sono localizzati nella cute e riforniscono tutte le strutture cutanee, comprese le ghiandole sudoripare e le unità pilosebacee. Il plesso sotto-papillare si localizza alla giunzione tra gli stati papillare e reticolare del derma. Il plesso dermico-reticolare, posto in una posizione intermedia del derma, è prevalentemente venoso. Il plesso dermico-profondo è localizzato nella giunzione dermoipodermica.

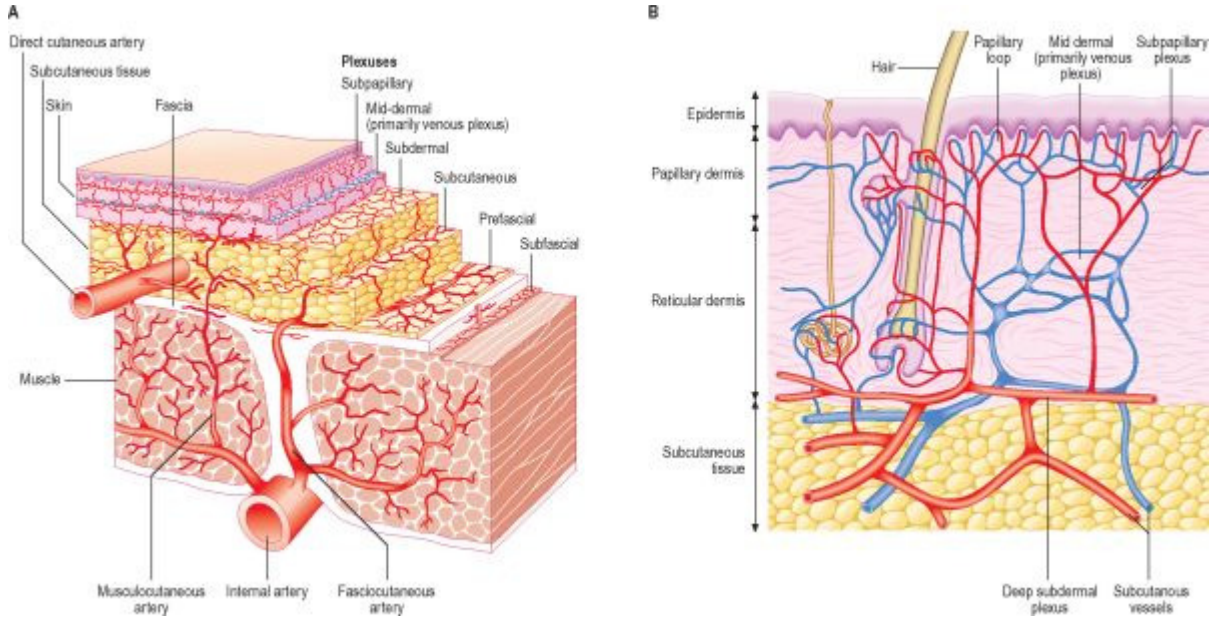


Fig 1.10 Vascolarizzazione della cute. A Si noti come i vari plessi orizzontali generano dai tre tipi di arterie. B Vascolarizzazione cutanea a maggior ingrandimento

I rimanenti tre plessi sono a localizzazione sottocutanea, due dei quali associati alla fascia profonda. La fascia profonda presenta un plesso a livello della sua superficie profonda ed un altro a livello della superficie esterna.

Quando, per effetto della stimolazione vasomotoria autonoma, gli shunt vascolari si rilasciano, dirottano il sangue lontano dal plesso superficiale riducendo la perdita di calore e impedendo l'insorgere dell'anossia di importanti strutture quali i nervi. In generale il flusso ematico cutaneo è regolato in base alle necessità termo regolative e, in alcune zone del corpo, agli stati emotivi. In condizioni di freddo estremo, la circolazione periferica è enormemente ridotta dalla vasocostrizione.

Nella pelle i vasi linfatici sono presenti come piccoli vasi terminali che raccolgono il fluido interstiziale in eccesso e varie macromolecole, rimettendole in circolo attraverso vasi di calibro maggiore. Trasportano inoltre linfociti, cellule di Langerhans e macrofagi ai linfonodi. Originano al di sotto del derma papillare come anse o strutture tubulari rivestite da endotelio.

1.3.2 INNERVAZIONE

La pelle è dotata di una ricca innervazione la cui componente autonoma è coinvolta, in particolare, nella funzione termoregolativa. La sensibilità cutanea fornisce informazione sull'ambiente esterno attraverso recettori che rispondono a stimoli meccanici, termici o nocicettivi. I corpuscoli di Pacini, localizzate profondamente nel derma o nell'ipoderma mediano le sensazioni di pressione profonda o vibrazione. I corpuscoli di Meissner, posti all'interno delle papille dermiche, rispondono a stimolazioni di tipo tattile.

L'input primario è trasmesso dai neuroni i cui corpi cellulari di trovano nei gangli cranici e spinali e i cui assoni sono distribuiti all'interno del derma. Le fibre autonome efferenti innervano le arteriole, i muscoli erettori dei peli e le cellule delle ghiandole sudoripare. Con l'eccezione dei capezzoli e dell'area genitale, l'attività di questi nervi è volta principalmente al controllo della perdita di calore attraverso la vasodilatazione e la vasocostrizione, la produzione di sudore e la pilo erezione.

1.4 Sviluppo della cute

La cute si sviluppa dalla superficie ectodermica e dal sottostante mesenchima. L'ectoderma dà origine alla superficie epidermica generale cornificata e ai suoi annessi. I cheratinociti rappresentano la progenie completamente differenziata delle cellule ectodermiche e, come abbiamo detto in precedenza, le cellule non cheratinociti sono rappresentate dalle cellule di Merkel, dalle cellule di Langerhans e dai linfociti.

Il derma deriva dal mesenchima somatopleurico (nel tronco e negli arti), dalla cresta neurale (nella testa) e dal mesenchima somitico (a livello della muscolatura epiassiale). Il mesenchima angiogenetico dà origine ai vasi sanguigni del derma.

Epidermide comune (interfollicolare)

Nelle prime 4-5 settimane la cute dell'embrione si presenta come un singolo strato di cellule ectodermiche poste superficialmente ad un mesenchima che contiene cellule di aspetto stellato-dendritico, interconnesse da una matrice micro fibrillare lassa (Fig. 1.11). L'interfaccia tra ectoderma e mesenchima, nota come zona membrana basale (BMZ), è un importante sito di interazione reciproca. Questo primo stato embrionale si evolve ben presto in un epitelio bilaminare e compaiono anche giunzione desmosomiali.

Lo strato basale, germinativo, dà origine all'epidermide postnatale definitiva, mentre lo strato superficiale genera il periderma, uno strato cellulare transitorio, presente solo in fase fetale. Piatte in origine, le cellule del periderma aumentano in volume, la membrana plasmatica sviluppa un gran numero di microvilli superficiali ricoperti da uno strato esterno di glicosaminoglicani. Questa evoluzione morfologica del periderma è massima tra la dodicesima e la diciottesima settimana. A partire dalla ventesima settimana circa le protrusioni globulari si sfaldano e infine si staccano fluttuando libere nel liquido amniotico. Le cellule del periderma, appiattite, vanno incontro ad una particolare differenziazione terminale formando uno strato protettivo temporaneo, la cui funzione sembra quella di proteggere l'epidermide dal liquido amniotico. Fino al parto, le lamelle peridermiche desquamano continuamente nel liquido amniotico.

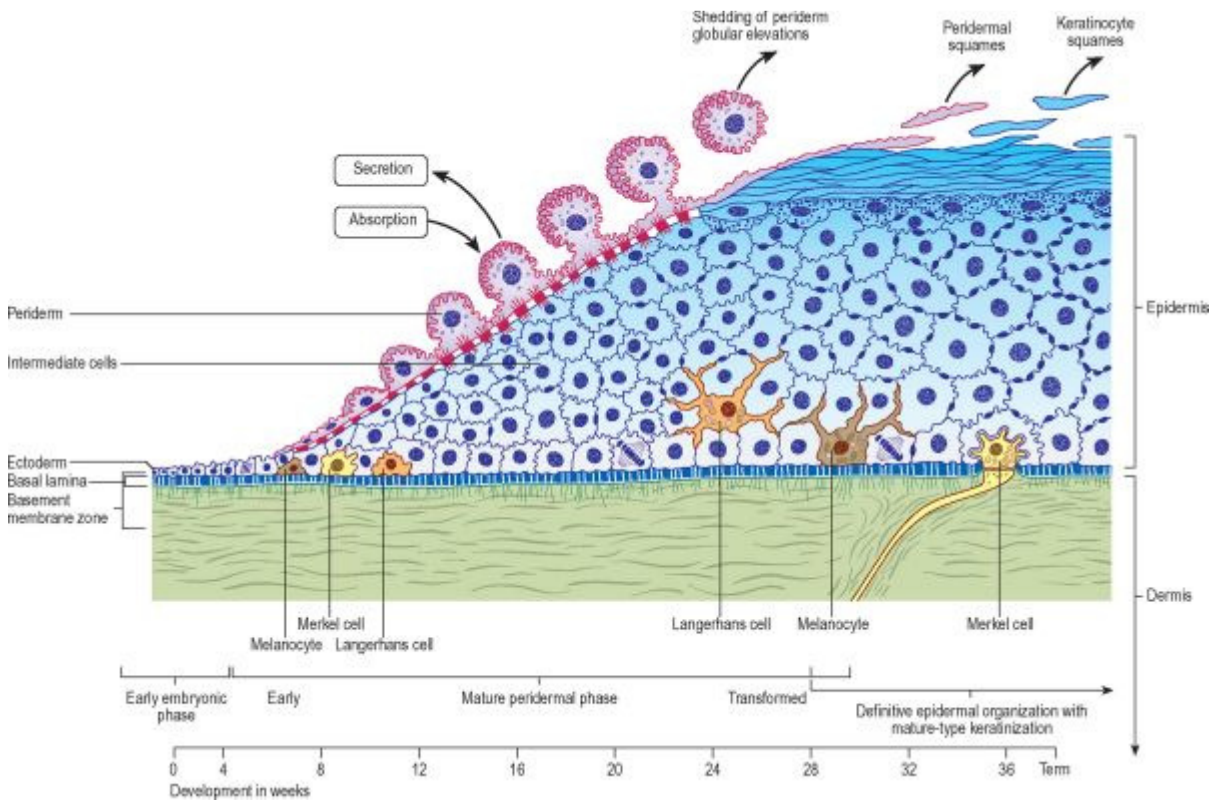


Fig. 1.11 Sviluppo della cute.

La proliferazione dello strato germinativo dell'epidermide porta alla formazione di diversi strati adiacenti di cellule intermedie che si interpongono tra lo strato basale e il periderma. Fino dai primi stadi dello sviluppo, le cellule di tutti gli strati contengono abbondanti granuli di glicogeno, utilizzati molto probabilmente come fonti di energia

per la differenziazione delle prime fasi di sviluppo. Le cheratine epiteliali semplici presenti da prima dell'impianto (K8 e K18) vengono sostituite dalle cheratine tipiche dei cheratinociti basali (K5 e K14) seguite, nel primo strato soprabasale, dalle forma a più alto peso molecolare (K1 e K10). Subito dopo segue l'espressione di profilaggrina in filaggrina e, verso la ventesima settimana, compaiono i granuli di cheratoialina tra i fasci di filamenti delle cellule dello strato intermedio più superficiali. Poco dopo compaiono i primi cheratinociti completamente differenziati. Verso la trentesima settimana appare lo strato corneo.

I non cheratinociti si reperiscono nell'epidermide fetale a partire dall'ottava settimana di gestazione. Sono i cheratinociti a regolare il rapporto finale tra il loro numero e quello dei melanociti, attraverso la produzione di fattori di crescita, macromolecole di superficie e altri segnali cellulari.

Unità pilosebacea

Le unità pilosebacee si sviluppano verso la nona settimana, inizialmente nelle regioni sopracciliari e a livello delle labbra e del mento, quindi progressivamente nelle altre regioni del corpo, procedendo in senso caudale. Il primo abbozzo è rappresentato da un cumulo di cellule dello strato basale dell'epidermide, il placode pilifero, adiacente ad un raggruppamento di cellule mesenchimali da cui avrà origine la papilla dermica del pelo. Tra la tredicesima e la quindicesima settimana si forma il germe pilifero che protrude in profondità nel mesenchima in associazione alla papilla dermica primitiva. Alla fine della quindicesima settimana appaiono due o tre rigonfiamenti che non sono altro che l'abbozzo della ghiandola apocrina, della ghiandola sebacea e del bulbo. A livello di quest'ultimo si inserisce in una fase successiva il muscolo erettore del pelo. Il pelo raggiunge la superficie verso la diciottesima settimana di gestazione. Nella cute postnatale non si sviluppano nuovi follicoli.

Ghiandole sudoripare eccrine

Abbozzi di queste ghiandole compaiono al secondo e al terzo mese come gemmazioni cellulari , si allungano progressivamente nel derma e alla sedicesima settimana l'estremità profonda inizia a formare il glomerulo secernente. Si forma successivamente la porzione intradermica del dotto escretore. Come per i follicoli, non si formano nuove ghiandole eccrine dopo la nascita.

Derma

Le cellule del derma embrionale sono molto più numerose di quelle del derma in età adulta e la maggior parte di queste sono coinvolte nel processo di differenziazione cellulare. Le cellule mesenchimali sottostanti la superficie ectodermica e il primitivo epidermide entrano in contatto tra di loro grazie ad una rete di intercomunicazione. Si produce in questa fase una matrice ricca di ioni, acqua, macromolecole, proteoglicani / glicosaminoglicani, collagene ed elastina. Il successivo sviluppo di questa matrice comporta la differenziazione delle singole cellule, dei fibroblasti, dei mastociti e l'assemblaggio di questi componenti in fibre di collagene e elastina. Successivamente, circa al terzo mese, il derma si separa dalla sottocute, si generano cambiamenti nella composizione e nel numero di fibre di collagene e si organizzano plessi nervosi e vascolari. Le regioni papillari e reticolari sono già evidenti dalla quattordicesima settimana, ma l'organizzazione complessiva del derma continua anche dopo la nascita.

Vascolarizzazione e drenaggio linfatico

La vascolarizzazione cutanea deriva dalla trasformazione delle cellule mesenchimali angiogenetiche. Canali endoteliali contenenti globuli rossi sono presenti già dalla sesta settimana nell'ectoderma e dall'ottava settimana questi canali sono disposti in un singolo piano parallelo nell'epidermide: essi formeranno il plesso sotto-papillare. Un secondo plesso profondo e orizzontale è evidente dal cinquantesimo giorno. Questi due plessi daranno luogo alla matrice finale di arteriole, venule e capillari. I vasi linfatici sono formati da cellule mesenchimali che si organizzano per racchiudere porzioni di liquido proteico fuoriuscito dai capillari in via di sviluppo.

Innervazione

I nervi sensoriali cutanei (assoni e cellule di Schwann) derivano dalle creste neurali. Essi si sviluppano con la crescita dell'embrione. Piccoli assoni sono presenti superficialmente nello stato dell'epidermide bilaminare e dopo otto settimane di gestazione c'è già un plesso cutaneo funzionante. Dopo il quarto mese i plessi cutanei sono riccamente sviluppati e i corpuscoli di Pacini e Meissner appaiono.

1.5 Pieghe naturali e rughe della cute

La superficie cutanea e le sue strutture in profondità mostrano vari segni lineari come scanalature che si estendono in una determinata direzione. Alcune di queste scanalature sono evidenti nella pelle, altre invece appaiono dopo qualche tipo di intervento.

Le linee della pelle visibili esternamente sono correlate alla formazione di creste, alla cordonatura epidermica, alla presenza di cicatrici e al grado di pigmentazione. Un semplice reticolo di linee cutanee è presente in tutte le maggiori aree del corpo tranne che nella superficie plantare e volare. Il reticolo è formato tipicamente da poligoni formati da pieghe primarie relativamente profonde e visibili ad occhio nudo, le quali sono irregolarmente divise in aree triangolari da pieghe secondarie. Queste aree triangolari sono divise a loro volta da pieghe terziarie limitate dallo stato corneo dell'epidermide e, infine, a livello microscopico, da linee quaternarie che non sono altro che i contorni delle singole squame.

Le rughe della cute sono causate dalla contrazione dei muscoli sottostanti e di solito sono perpendicolari al loro asse di accorciamento. Sul viso esse sono note come le linee dell'espressione e, con la progressiva perdita di elasticità della pelle con l'invecchiamento, diventano permanenti.

Creste papillari

Le creste papillari sono presenti nel palmo della mano, nella pianta del piede e nelle parti flessori delle dita, dove formano matrici parallele o curve separate da solchi molto stretti. I dotti del sudore si aprono ad intervalli regolari lungo la sommità di ogni cresta. La disposizione delle creste rimane stabile per tutta la vita e pertanto può essere utilizzata come mezzo di identificazione. Il grande numero di terminazioni sensitive tattili che si addensano al di sotto delle creste indica che esse sono importanti anche per la funzione sensitiva.

Le figure formate dalle creste epidermiche in un'impronta digitale possono essere distinte in tre tipi principali: archi (5%), anse (70%) e vortici (25%). Se le sollecitazioni meccaniche che agiscono a livello cutaneo eccedono la capacità massima di distensione delle pieghe cutanee e del derma, la coesione delle fibre dermiche collagene viene meno, con conseguente emorragia e reazione cellulare e, da ultimo, con la formazione di un tessuto cicatriziale scarsamente vascolarizzato. In queste sedi compaiono

caratteristiche linee o strie cutanee (striae). Anche variazioni della pigmentazione possono rendersi responsabili della formazione di linee visibili sulla cute, sono più frequenti nelle razze scure.

Cambiamenti cutanei correlati all'età

Due fattori principali, uno di carattere cronologico e l'altro ambientale, condizionano l'invecchiamento cutaneo. Uno dei più importanti fattori ambientali è l'esposizione cronica alla radiazione solare, responsabile di un processo noto come foto-invecchiamento.

Il normale invecchiamento cutaneo si accompagna ad atrofia del derma e dell'epidermide, responsabile di alterazioni nell'aspetto, nella microstruttura e nella funzione della cute. Queste alterazioni includono la comparsa di rughe, secchezza, perdita di elasticità e assottigliamento della cute. La giunzione dermo-epidermica risulta appiattita riducendone la resistenza alle forze di taglio. Lo spessore dello strato corneo si mantiene pressoché inalterato anche in età avanzata e le sue caratteristiche di permeabilità non risultano modificarsi. L'attività proliferativa dell'epidermide e la velocità di rinnovamento cellulare si riducono con l'età, fino ad un 50% nei soggetti più anziani, così come si riduce la sintesi della vitamina D. Dopo la mezza età si riduce il numero di melanociti del 10-20% e anche le cellule di Langerhans diventano più scarse. Inoltre si osserva un certo grado di rarefazione dei peli in quasi tutte le regioni del corpo. La riduzione generale dello spessore del derma è dovuto al declino dell'attività di sintesi del collagene da parte di una ridotta popolazione di fibroblasti. Si verifica, infine, un abbassamento della soglia di percezione sensitiva, dovuto alla perdita di un certo numero di recettori sensitivi specializzati.

Il foto-invecchiamento è una condizione di notevole importanza clinica per via della sua associazione alle neoplasie epidermiche. Si ritiene infatti che gli effetti dell'esposizione cronica ai raggi solari sui melanociti e sulle cellule di Langerhans siano correlati all'aumento dell'incidenza del melanoma maligno in alcuni gruppi di individui, in cui una ridotta attività di monitoraggio immunologico da parte delle cellule di Langerhans può essere un fattore di rischio.

1.6 Guarigione delle ferite cutanee e cicatrizzazione

Il processo di guarigione delle ferite cutanee nei mammiferi termina con la formazione di una cicatrice. L'epidermide è in grado di rigenerarsi in maniera completa mentre l'architettura del derma risulta anormale e la tipica formazione ondulata delle papille dermiche non viene ricostituita. Sotto il profilo biomeccanico il tessuto cicatriziale è meno efficiente rispetto alla cute illesa. Gli annessi cutanei non si rigenerano con la guarigione della ferita. La guarigione delle ferite è spesso descritta in quattro fasi cronologicamente sovrapposte: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento (Fig. 1.12).

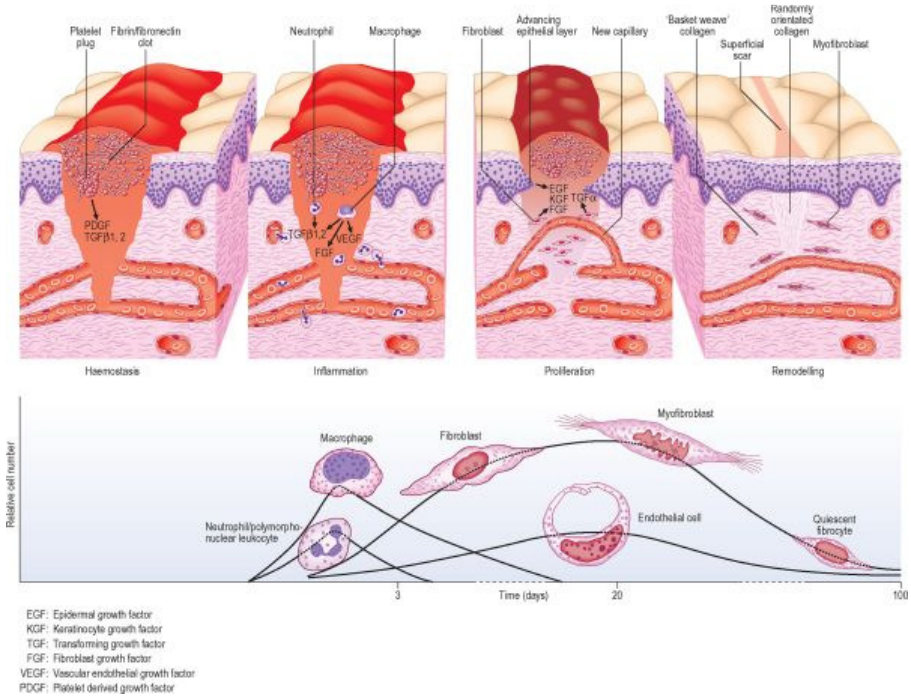


Fig 1.12 Schematizzazione dei processi coinvolti nella guarigione di una ferita cutanea.

Emostasi

Una ferita che causa danno vascolare innesca un processo che porta alla formazione di un coagulo di fibrina/fibronectina. Il coagulo è costituito da piastrine intrappolate in un reticolo fibroso di fibrina e fibronectina, stabilizzato dalla presenza di legami crociati. Tale coagulo funge da tappo emostatico temporaneo e forma una matrice attraverso la quale le cellule migrano durante la riparazione.

Infiammazione

Entro pochi minuti dal danno, neutrofili e monociti vengono richiamati nel sito danneggiato da segnali chemiotattici. I neutrofili agiscono contro i contaminanti batterici mentre i monociti si differenziano in macrofagi che fagocitano sia organismi patogeni sia neutrofili in degenerazione, detriti cellulari e della matrice. I macrofagi, inoltre, producono fattori aggiuntivi che attivano i fibroblasti, le cellule endoteliali e i cheratinociti.

Proliferazione

Citochine come il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), il fattore di crescita dei cheratinociti (KGF), il fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1) e il TGF-α sono rilasciate dai cheratinociti e dai fibroblasti attivati precedentemente e stimolano il processo di riepitelizzazione. La migrazione dei cheratinociti cessa quando essi ricoprono completamente la ferita. L'epidermide e la sottostante lamina basale vengono rigenerate e il raggiungimento della piena maturazione dell'epidermide nuova è testimoniato dalla comparsa delle fibrille di ancoraggio che legano la lamina basale al sottostante tessuto connetivo. Entro 72 ore dal danno i fibroblasti sintetizzano i componenti della nuova matrice extracellulare. La matrice neoformata si compone inizialmente di fibronectina e acido ialuronico, che formano il substrato provvisorio per la migrazione cellulare. La fibronectina funge da sito d'inizio per la fibrillogenesi del collagene e costituisce il substrato di ancoraggio per i miofibroblasti per portare a termine la fase di contrazione della ferita. L'acido ialuronico contribuisce alla formazione di una matrice fortemente idratata e facilmente attraversabile dalle cellule in migrazione. Infine l'acido ialuronico viene sostituito da collagene di tipo III che conferisce alla cicatrice matura la caratteristica resistenza.

Rimodellamento

Responsabili del rimodellamento sono i fibroblasti. Questi sostituiscono inizialmente l'acido ialuronico con proteoglicani elasticizzando il tessuto. Con la deposizione di collagene il tessuto acquisisce una maggiore resistenza meccanica e si verifica una concentrazione sempre maggiore di collagene di tipo I rispetto al collagene di tipo III. Le fibre collagene del derma cicatriziale hanno un potere di resistenza del 70% di quello della normale cute.

Capitolo 2

Tumore della pelle: classificazione e tecniche di identificazione

2.1 Tipi di tumori della pelle

I tumori della pelle si possono suddividere in due grandi gruppi [2]: melanoma e non-melanoma. Per entrambi la prima causa di insorgenza è un'esposizione eccessiva o incontrollata ai raggi ultravioletti. Il melanoma rappresenta solo il 4% circa dei casi totali di tumori cutanei, tuttavia provoca la maggior parte dei decessi. Fra i non-melanomi i più diffusi sono il carcinoma basocellulare (BCC) e il carcinoma spinocellulare (SCC).

2.1.1 CARCINOMA BASOCELLULARE

Il carcinoma basocellulare inizia nello strato basale dell'epidermide e cresce in modo molto lento e indolore. Una superficie cutanea che sanguina con facilità o che non guarisce in modo corretto può comportare un carcinoma basocellulare. La maggior parte di questi tumori si verificano sulle zone della cute che sono regolarmente esposte ai raggi solari o ad altre radiazioni ultraviolette. Il carcinoma basocellulare viene riscontrato, in media, nei pazienti con più di 40 anni, ma in tempi recenti è spesso diagnosticato in età più giovane. Le persone con pelle e occhi chiari sono maggiormente propense alla formazione di tumori basocellulari. Questo tipo di carcinoma, nella maggior parte dei casi, non si diffonde, ma, se non seguito e trattato in modo opportuno può crescere nelle zone limitrofe penetrando nei tessuti e nelle ossa. Esso si presenta come chiazze rosse, di solito sul petto, sulle spalle, sul dorso, sulle braccia o sulle gambe, un'ulcera che sanguina spesso e rimane aperta per più di tre settimane, un piccolo nodulo rosa con bordo rigonfio e una rientranza al centro coperta da una crosta,

una zona biancastra simile ad una cicatrice oppure ad un nodulo di colorito perlaceo e lucido rosa, bianco o rosso (Fig. 2.1).

Fig 2.1 Esempi di carcinoma basocellulare.

2.1.2 CARCINOMA SPINOCELLULARE

Il carcinoma spinocellulare è il secondo tumore più comune della pelle e anche in questo caso interessa maggiormente aree esposte alla luce solare di individui con la pelle chiara. Il rischio di metastasi è basso, ma è molto più elevato rispetto al carcinoma basocellulare, soprattutto se vengono interessate le orecchie e il labbro. Il carcinoma spinocellulare è almeno due volte più frequente negli uomini che nelle donne. Raramente compare prima dei 50 anni, molto più frequente negli individui intorno ai 70. Sebbene, per un certo periodo, il carcinoma rimane circoscritto all'epidermide, nel caso in cui non viene curato, col tempo può penetrare nei tessuti sottostanti e in piccola percentuale può diffondersi anche negli organi, portando alla morte.

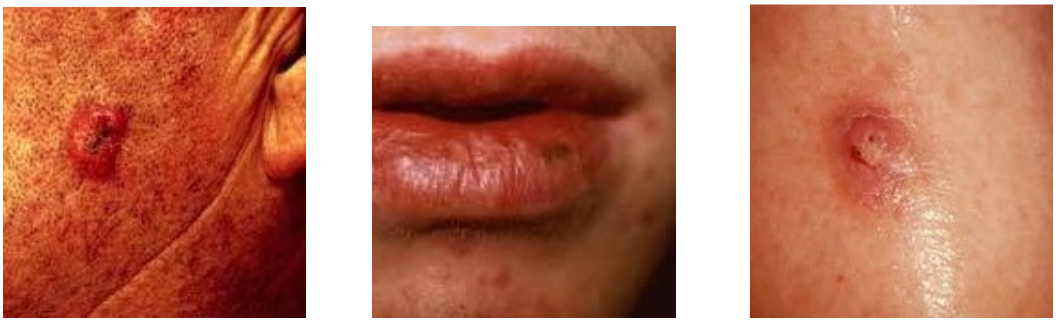


Fig. 2.2 Esempi di carcinoma spinocellulare.

Vale la pena di considerare certe condizioni precancerose che favoriscono l'insorgere di tumori. Fanno parte di questa categoria: la cheratosi attinica o solare (escrescenze ruvide e squamose che colpiscono gli anziani), la cheilite attinica (un tipo si cheratosi

attinica che colpisce le labbra), la leucoplachia (macchie bianche all'interno della lingua), la malattia di Bowen (una macchia squamosa e permanente, di colore rosso-bruno).

2.1.3 MELANOMA

Il melanoma, tumore maligno che ha origine nei melanociti, è una neoplasia complessivamente rara ma in aumento progressivo durante gli ultimi cinquant'anni nella popolazione bianca di ogni parte del mondo. Questa neoplasia, infatti, rappresenta il 2-3% di tutti i tumori maligni nel Nord Europa e negli USA. La cute è la sede elettiva di origine del tumore, ma possono verificarsi melanomi maligni extracutanei, ad esempio nelle mucose e nell'occhio. Studi epidemiologici hanno rilevato che negli ultimi vent'anni l'incidenza per questa malattia è praticamente raddoppiata. Globalmente l'aumento di incidenza del melanoma è evidente in entrambi i sessi, mentre il tasso di mortalità sembra in diminuzione, probabilmente a causa della migliore educazione sanitaria che consente una precoce identificazione delle lesioni con piccolo spessore e quindi più facilmente curabili con la chirurgia. In Italia il tasso di incidenza è di circa 8/10 nuovi casi all'anno ogni 100.000 abitanti. Il tasso più elevato di incidenze per il melanoma è tuttora osservato in Australia e in Nuova Zelanda (50 casi all'anno ogni 100.000 abitanti), il più basso si registra in Giappone (Fig. 2.3). Nelle donne caucasiche la sede di localizzazione predominante è situata negli arti inferiori, nell'uomo bianco è invece nel tronco. Il melanoma è eccezionale nel bambino e si manifesta soprattutto sui grandi nevi pigmentati congeniti. Questa neoplasia è rara nell'età inferiore a 20 anni (< 4% di tutti i casi), il picco di incidenza è tra i 35 e i 50 e dopo tale età la frequenza diminuisce.

Fig. 2.3 Incidenza del melanoma in alcune zone e città del mondo.

Gli studi sull'eredità del melanoma sono relativamente recenti e consentono di affermare che esiste una correlazione genetica nel 3% dei casi. In particolare il melanoma multiplo è più frequente nei casi familiari. La frequenza del melanoma familiare varia dal 5 al 10%. I due fattori principali per l'insorgenza del melanoma sono: presenza di un fenotipo a pelle chiara, presenza di un elevato numero di nevi.

L'esposizione ai raggi ultravioletti è ritenuto il fattore causale più importante per l'insorgenza del melanoma cutaneo anche se esistono alcuni elementi che sembrano non confermare questa ipotesi. Tra questi, da ricordare, la mancanza di correlazione diretta nell'aumento di incidenza del melanoma in diverse aree geografiche con l'aumentare dell'intensità dei raggi solari ed inoltre non sembra esistere in tutte le casistiche una corrispondenza chiara tra regioni anatomiche esposte comunemente alla luce solare e quelle maggiormente colpite da melanoma. Recenti dati epidemiologici hanno evidenziato come il fattore di rischio sia rappresentato dalle ustioni solari avvenute in età giovanile e dalle esposizioni intense intermittenti.

Lo sviluppo biologico del melanoma, come riportato in figura 2.4 è caratterizzato da due fasi distinte: la fase di crescita orizzontale e la fase di crescita verticale. La

transizione dalla crescita orizzontale a quella verticale è un elemento estremamente negativo.

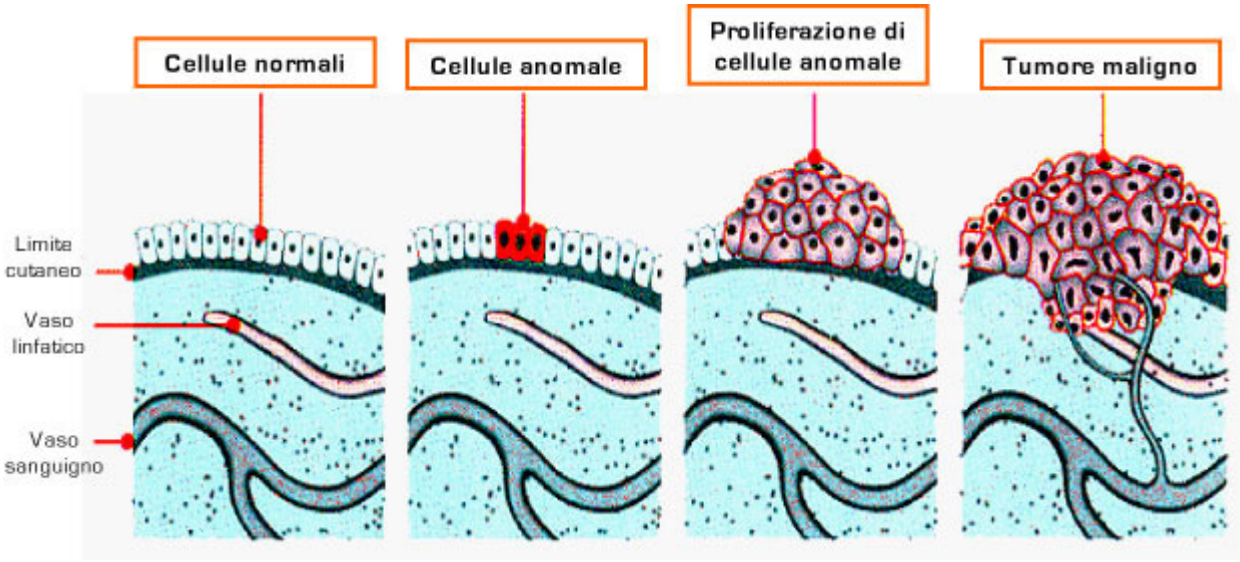


Fig. 2.4 Sviluppo del melanoma.

La neoplasia diffonde sia per via linfatica che per via ematica. La tendenza per uno dei due tipi di diffusione non è prevedibile anche se è ragionevole supporre che melanomi sottili diano preferibilmente metastasi per via linfatica. Esistono casi in cui la lesione primaria ha tendenza a rimanere a lungo cicatrizzata, ma ci sono altri casi in cui il decorso clinico può essere considerato esplosivo con una rapidissima disseminazione viscerale e cutanea malgrado una diagnosi tempestiva. Durante la prima fase (crescita orizzontale) la neoplasia si estende radialmente, secondo cerchi concentrici, rimanendo confinata nell'epidermide (melanoma in situ) o dimostrando una iniziale focale infiltrazione nel derma cutaneo in forma di cellule isolate o piccoli nodi. Questa fase può avere una durata variabile, da pochi mesi ad anni. Il passaggio alla seconda fase (crescita verticale) inizia con la comparsa di uno o più cloni cellulari che acquisiscono capacità di proliferazione autonoma e di crescita coesiva con formazione di aggregati e noduli che si estendono nel derma e nell'ipoderma. Questa fase insorge in modo non prevedibile e il melanoma acquisisce proprietà invasive e metastatizzanti.

Cercando di classificare i vari tipi di melanoma possiamo dividerli in due grandi gruppi: il melanoma non invasivo e il melanoma invasivo. Il melanoma non invasivo a sua volta si divide in: melanosi premaligna, lentigo maligna di Hutchinson-Dubreuilh, melanoma non invasivo di tipo acrale lentigginoso. Il melanoma invasivo si divide in: melanoma

nodulare (caratterizzato da crescita verticale fin dall'inizio dello sviluppo tumorale), melanoma tipo lentigo maligna, melanoma acrale lentigginoso, melanoma di diffusione superficiale (il più frequente).

Le lesioni cutanee, pigmentate e non, che più frequentemente possono simulare un melanoma sono le seguenti: basalioma pigmentato (è a lentissima crescita e spesso è ulcerata, il colorito è azzurro-grigiastro, a bordi irregolari), nevo blu (ha colorito bluastro, piano e poco rilevato, con superficie liscia e mai ulcerata), cheratosi seborroica senile (ha una evoluzione lentissima con scarsa o nulla potenzialità maligna), istiocitoma benigno (presenta superficie convessa, di colorito roseo o marrone).

Fig 2.5 Esempi di melanoma.

2.2 Tecniche di identificazione

L'identificazione del tumore della pelle allo stato iniziale è di fondamentale importanza nel trattamento della malattia. Attualmente, il primo passo nella diagnosi della malattia, coinvolge un'ispezione visiva del dermatologo, seguita da biopsia quando si sospetta la presenza del cancro. In questi anni sono state sviluppate molte tecniche di imaging molecolare, in modo tale da migliorare l'accuratezza della identificazione del cancro da parte dei dermatologi. Alcune di queste tecniche includono il microscopio a raggi-x, la dermatoscopia ad infrarossi, le radiazioni pulsate in terahertz, la spettroscopia ad impedenza, la diagnosi con microonde, e sono brevemente trattate di seguito.

2.2.1 MICROSCOPIA A RAGGI-X A CONTRASTO DI FASE (PCXM)

Nel 2007 Sang Wook Son e il suo gruppo di ricerca [3] introdussero la microscopia a raggi-x per il rilevamento del carcinoma delle cellule basali in campioni ex-vivo. Le immagini prodotte con una scansione a raggi-x in modo tradizionale vengono generate dalle differenze di assorbimento degli stessi raggi nel materiale attraversato e, a causa del basso potere di assorbimento, questa tecnica non ha avuto molto successo. Contrariamente, l'imaging di raggi-x basato sul contrasto di fase (PCXM) migliora notevolmente la qualità dell'immagine e la visibilità dei bordi tra regioni con differente indice di rifrazione. Recentemente, questa tecnologia si è ulteriormente sviluppata grazie all'introduzione dei raggi-x duri (di lunghezza d'onda minore dei tradizionali raggi-x) prodotti da un sincrotrone.

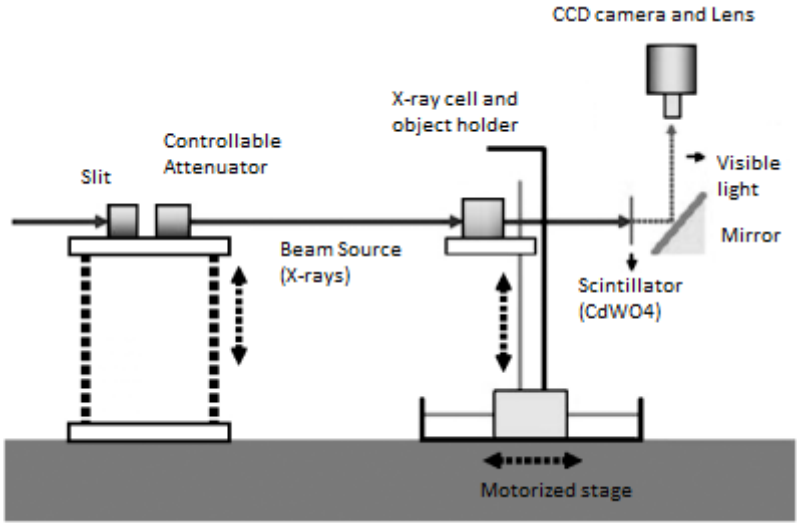


Fig 2.6 Il diagramma schematico di un PCXM

Come si vede dalla figura 2.6 i campioni sono montati in un supporto che può ruotare e traslare ed è tipicamente posizionato a 200 mm dal rivelatore per indurre il miglior contrasto. I raggi-x trasmessi vengono captati da un scintillatore che converte l'energia della particella incidente in immagine visibile. Le immagini prodotte da PCXM, sfortunatamente, richiedono una tecnologia molto avanzata per quanto riguarda la sorgente di raggi-x, l'implementazione ottica e gli strumenti di rilevamento. Attualmente, le dimensioni della sorgente di raggi-x a contrasto di fase rimane un ostacolo e si sta cercando di sviluppare una sorgente di minori dimensioni in modo tale da poterla usare nell'ambiente ospedaliero.

2.2.2 DERMATOSCOPIA AD INFRAROSSI

La ricerca in questo campo è molto avanzata [4] e molti strumenti di imaging ottico non invasivo sono attualmente nel mercato (Nevoscope, Dermascope, DermLite e altri). Il metodo comune per esaminare la cute consiste nell'uso di una superficie di illuminazione e di lenti di ingrandimento. La maggior parte delle informazioni che si acquisiscono provengono dalla luce riflessa dalla frontiera cute/aria ma la struttura cutanea in profondità è frequentemente superata dalla luce. Una migliore accuratezza può essere ottenuta con l'uso della microscopia a luce epiluminescente (ELM), dove la riflessione della luce in superficie è ridotta grazie ad una interfaccia di olio e vetro sulla pelle. Il metodo ELM può essere migliorato utilizzando luce polarizzata o non-polarizzata. Nel primo caso si usano polarizzatori lineari nella luce incidente e lenti ottiche per cancellare la luce che è stata riflessa dalla cute. Dal momento che la maggior parte della luce riflessa ha lo stesso angolo polarizzato della luce incidente, questo metodo blocca il più della luce riflessa dalla superficie e lascia passare solo la luce che si è diffusa sotto la cute, visualizzandola. Purtroppo questo metodo ha una capacità di penetrazione piuttosto limitata.

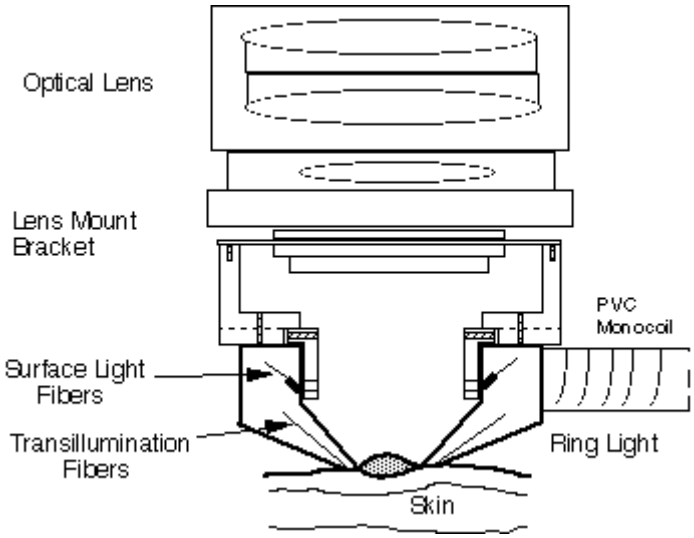


Fig 2.7 Struttura del nevoscopio.

Transilluminazione (TLM)

Per le immagini di tipo TLM (transillumination light microscopy) la luce viene trasmessa direttamente dentro la pelle, precisamente appena sotto la lesione con un angolo ben preciso. La luce proveniente dall'anello illuminante che non è stata riflessa a

causa di una mancata corrispondenza tra indici di rifrazione, entra nella pelle e va incontro ad ulteriori riflessioni e dispersioni. Questa luce viene poi diffusa attraverso gli strati della pelle e fotoni sparsi emergono dalla cute formando un'immagine transilluminata dello strato sotto la superficie e delle strutture vascolari della lesione.

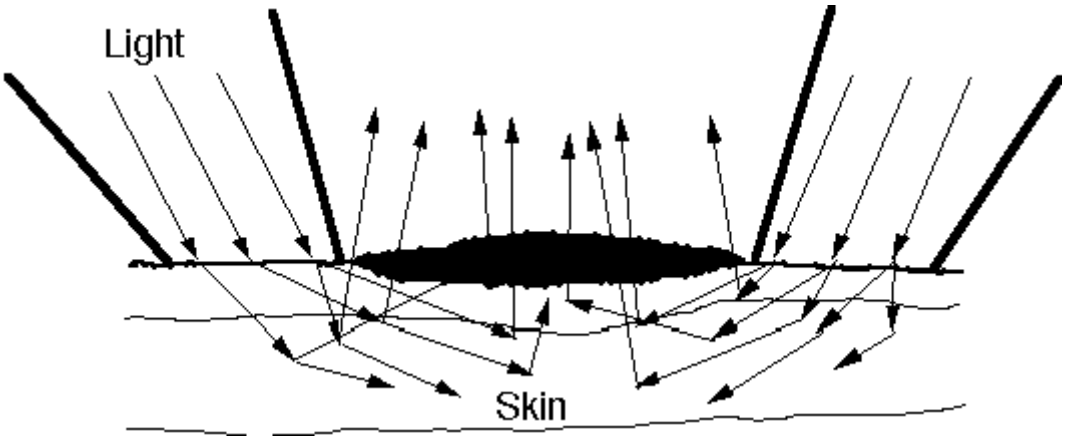
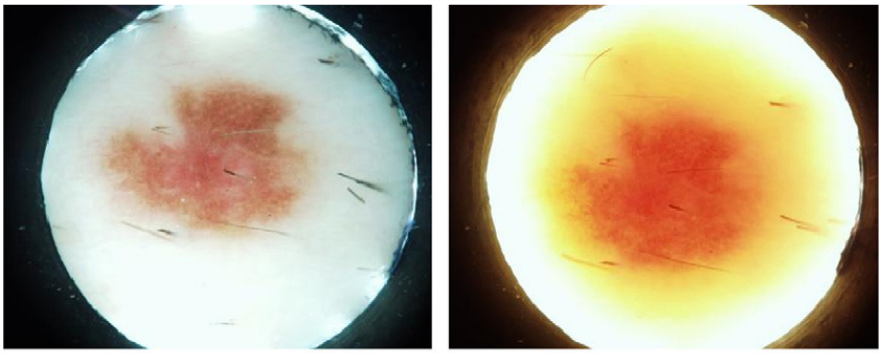
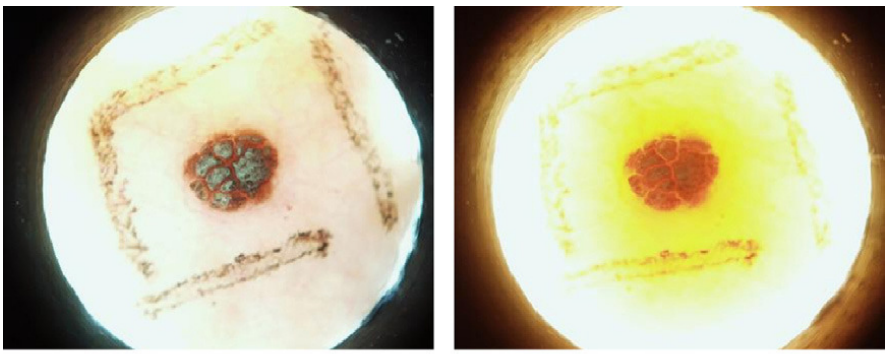


Fig. 2.8 TLM, principio di funzionamento.



(a) (b)

Fig 2.9 Immagini XLM (a) e TLM (b) di una lesione cutanea maligna.



(a) (b)

Fig 2.10 Immagini XLM (a) e TLM (b) di una lesione cutanea benigna.

2.2.3 RADIAZIONI PULSATE (TERAHERTZ)

Le radiazioni usate in questo tipo di applicazione [5] sono collocate tra gli infrarossi e le microonde. Tipicamente il range oscilla tra i 0.1 e i 10 THz e questa regione era scarsamente utilizzata per l'assenza di sorgenti e rilevatori lavoranti in questo spettro. Negli ultimi anni lo sviluppo nella tecnologia dei semiconduttori ha dato il via a numerose opportunità. Le radiazioni a queste frequenze sono non ionizzanti e sono di particolare interesse per come eccitano le interazioni molecolari. Il contenuto di acqua nei tessuti cambia in relazione alle condizioni della pelle e l'interazione tra il tessuto biologico e le radiazioni può darne un'indicazione. Nel 2004 a Cambridge un gruppo di ricercatori hanno sviluppato una macchina capace di studiare il carcinoma delle cellule basali su tessuto inciso e, per la prima volta con questa tecnologia, in vivo. Il TPI (Terahertz pulsed imaging) è un metodo non invasivo, infatti le lunghezze d'onda oscillano tra i 3 mm e i 100 µm, con effetti di scattering molto minori rispetto al vicino infrarosso o al visibile. La risoluzione assiale e laterale ottenuta a 3 THz è di 20 µm e 150 µm rispettivamente. Il TPI, inoltre, è una tecnica coerente, cioè sia l'ampiezza che la fase delle pulsazioni in terahertz possono essere ottenute, dalle quali l'assorbimento di banda e l'indice di rifrazione di un mezzo possono essere determinati. Di conseguenza il TPI mostra caratteristiche morfologiche e strutturali della pelle in quel campo di frequenze. Le immagini sono ottenute per riflessione delle pulsazioni ultraveloci (100 fs) che illuminano il campione, e vengono misurate da un rilevatore ad alta velocità. Una tipica scansione di un area di 25 x 25 mm impiega un tempo minore di 100 s. Il tempo di risoluzione è di circa 200 fs, il quale è limitato dalla durata dell'impulso del laser mentre il rapporto segnale rumore è di circa 5000 : 1. La forma d'onda nel dominio del tempo genera informazioni in profondità nell'ordine di 1 mm. Normalmente il valore dell'ampiezza dell'onda riflessa nel tessuto malato è più alto del valore in quello sano, specialmente se è riscontrato nella superficie della lesione. Il valore minimo dell'onda nel tessuto malato arriva in un tempo maggiore che nel tessuto sano, entrambe le onde ritornano nello zero dopo 5 ps. Si possono usare varie tecniche per generare le immagini, tra le quali plottare l'ampiezza espressa in terahertz a Emax, mettendo in evidenza le caratteristiche superficiali, oppure usando l'ampiezza in terahertz Et, al tempo t, normalizzato per il valore assoluto del picco minimo, |Emin|, fornendo così informazioni in profondità. Questo studio è la prima dimostrazione che il TPI può rivelare tumori in vivo e successivi sviluppi porteranno questa tecnica a fornire informazioni più dettagliate sulla diffusione laterale e assiale del tumore.

2.2.4 SPETTROSCOPIA AD IMPEDENZA

L'impedenza elettrica di un tessuto [6] dipende dalle sua macro struttura e micro struttura così come dalla sua composizione chimica. Molti studi hanno mostrato un largo grado di variabilità nelle proprietà bioelettriche tra tipi di tessuti e tra stati tissutali. Il cancro e le altre manifestazioni di degrado cutaneo cambiano l'impedenza tessutale con significative differenze tra cute sana e cute malata. La maggior parte degli studi in vivo fatti con lo spettrometro di impedenza sono basati sul confronto di quattro indici: l'indice di ampiezza (MIX), l'indice di fase (PIX), l'indice della parte reale (RIX) e l'indice della parte immaginaria (IMIX), definiti come:

$$MIX = {abs(Z_{20\,KHz})}/{abs\,(Z_{500\,KHZ})}$$

$$PIX = arg(Z_{20\,KHz}) - arg\,(Z_{500\,KHZ})$$

$$RIX = {Re(Z_{20\,KHz})}/{abs(Z_{500\,KHZ})}$$

$$IMIX = {Im(Z_{20\,KHz})}/{abs(Z_{500\,KHZ})}$$

Negli studi portati come esempio, le impedenze sono misurate con 31 frequenze logaritmiche che vanno da 1 kHz a 1 MHz. La misura è eseguita con la sonda mostrata in figura 2.11.

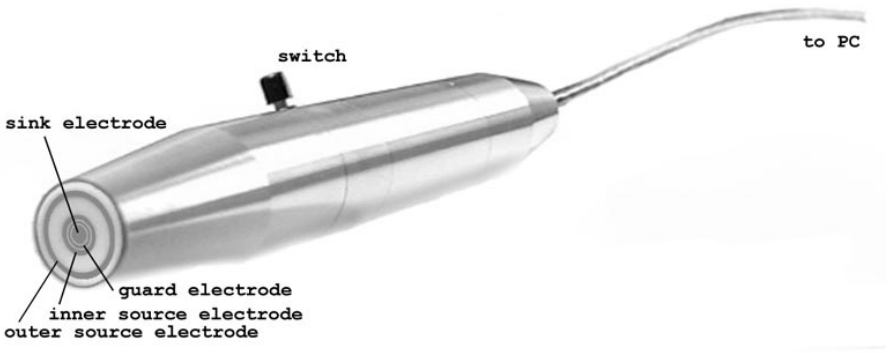


Fig 2.11 Sonda usata per le misure di impedenza.

L'elettrodo più esterno ha un diametro di 10 mm. Ad un cambiamento di corrente tra i due elettrodi sorgente , la posizione di un elettrodo virtuale tra di loro cambia. Da questa

variazione di posizione lo spettrometro può misurare l'impedenza in cinque profondità che vanno da misure superficiali a pochi millimetri. Prima della misura la cute viene bagnata con una soluzione salina allo 0.9% per due minuti per incrementare la conduttività dello strato corneo e per un minuto tra le varie misure dello stesso sito.

		Depth 1	Depth 3	Depth 5
MIX	BCC	6.9±3.2	7.1±3.5	6.6±2.4
	NOR	10.2±3.2	9.9±2.8	8.8±2.2
	BEN	9.4±3.1	8.9±2.7	7.8±2.5
PIX	BCC	8.1±15.8	11.9±14.2	23.8±10.9
	NOR	12.8±16.8	18.0±14.4	27.7±10.4
	BEN	18.7±15.5	23.1±11.4	32.4±9.7
IMIX	BCC	5.4±3.6	5.5±3.4	5.5±2.6
	NOR	8.9±3.9	8.8±3.4	7.9±2.4
	BEN	8.0±3.7	7.9±3.0	6.9±2.6
RIX	BCC	3.9±1.5	4.0±2.2	3.4±0.9
	NOR	4.2±1.6	4.0±1.2	3.7±0.8
	BEN	4.1±1.4	3.8±1.2	3.3±0.8

		Depth 1	Depth 3	Depth 5
MIX	BCC & NOR	**0.0000007**	**0.0000018**	**0.000012**
	BCC & BEN	**0.0027**	**0.0032**	**0.037**
	NOR& BEN	NS	NS	**0.041**
PIX	BCC& NOR	**0.042**	**0.008**	NS
	BCC & BEN	**0.0001**	**0.0001**	**0.0003**
	NOR & BEN	**0.014**	**0.034**	**0.028**
IMIX	BCC & NOR	**0.0000037**	**0.0000017**	**0.000006**
	BCC & BEN	**0.0012**	**0.0018**	**0.026**
	NOR & BEN	NS	NS	NS
RIX	BCC & NOR	NS	NS	NS
	BCC & BEN	NS	NS	NS
	NOR & BEN	NS	NS	**0.015**

Tabella 1: Media e deviazione standard degli indici . Tabella 2: Probabilità di similarità tra le misure.

I valori di MIX, IMIX e PIX sono bassi in BCC piuttosto che nelle lesioni benigne (BEN) e nella cute sana (NOR) nella maggior parte delle misure. L'eccezione si nota nel profondità 5, dove non ci sono significative differenze tra BCC e la cute normale. Significative differenze non si notano con l'indice RIX. Si deve evidenziare che una lesione di 2 mm in diametro costituisce solamente il 4% dell'intera area sottoposta alla sonda. Il resto del tessuto è cute normale e va ad interferire con la misura di impedenza. Per questo si stanno studiando sonde più piccole in modo da incrementare la differenza fra gli indici delle diverse forme cutanee studiate. Inoltre il BCC ha un tessuto differente dalla cute normale, questa differenza non è così evidente per le altre forme tumorali e le applicazioni sono in fase di studio e poiché la sonda deve essere piazzata su un'area sospetta non si risolve il problema di lesioni che sono completamente nascoste da uno screening visivo.

2.2.5 RIFLETTOMETRO A MICROONDE

Un potenziale metodo non invasivo che permette un precoce rilevamento del cancro della pelle coinvolge l'uso del riflettometro a microonde [7] per evidenziare le differenze dielettriche tra pelle normale e pelle malata. Le proprietà elettriche della cute sono direttamente relazionate a parametri quali l'acqua, il sodio, le proteine, con sostanziali differenze tra pelle sana, lesioni benigne e lesioni maligne. L'acqua contenuta nella cute normale è intorno al 60.9% mentre per la lesioni cancerogene raggiunge l'81.7%. Questa differenza di contenuto dell'acqua risulta evidente con gli strumenti funzionanti con microonde. Le proprietà dovute alla riflessione di queste onde infatti sono direttamente influenzate dalle proprietà dielettriche del materiale interrogato. Nell'esempio qui riportato è stata usata una sonda coassiale con un diametro del conduttore più esterno di 3.62 mm e del conduttore più interno di 1.08 mm. Le misure sono state condotte usando un analizzatore di rete calibrato nel range di frequenze che vanno da 300 MHz a 6 GHz. Sono state fatte misure in diverse locazioni in modo tale da investigare l'influenza delle proprietà della pelle, che variano a seconda delle parti del corpo, sulle frequenze misurate. Dal momento che il contenuto acquoso delle lesioni maligne è più alto che nella pelle normale, la cute sotto esame è stata bagnata con del cotone imbevuto d'acqua per circa 20 minuti. Successivamente la pelle è stata leggermente asciugata per togliere l'acqua in eccesso in superficie. Dai risultati ottenuti si vede che la cute bagnata ha un coefficiente di riflessione che differisce del 14 % rispetto a quello della pelle normale, non bagnata, a 3GHz. Quindi la pelle bagnata per un lungo periodo di tempo potrebbe simulare una situazione simile a quella delle lesioni maligne. Gli esperimenti in vivo su lesioni maligne sono in fase di sperimentazione e i risultati parziali sono molto promettenti.

Capitolo 3

Introduzione al modello per ricavare i tempi di rilassamento

In questo capitolo illustreremo il lavoro svolto da Eskandari et al. [8] focalizzandoci sulla principale novità per ricavare i tempi di rilassamento di campioni che riproducono le caratteristiche del tessuto molle e quindi anche della pelle. Viene riportata anche la simulazione al computer, svolta sempre dall'equipe canadese, dove viene simulato e variato il rumore permettendo di ricavare l'errore di stima ed il rapporto contrasto/rumore. Per confermare la simulazione riporto anche il loro esperimento fatto su campioni preparati in laboratorio. Esperimento caratterizzato da un reometro, per misurare le proprietà meccaniche del materiale e da un dispositivo di imaging elastografico, tramite ultrasuoni. L'algoritmo sviluppato è stato testato in campioni che riportano le caratteristiche principali di un tessuto molle, esaltando i contrasti nell'elasticità e nella viscosità. I campioni utilizzati sono stati costruiti usando una combinazione di gelatina e spugne di alcool polivinilico per riprodurre le proprietà viscoelastiche.

Le proprietà meccaniche di un tessuto molle possono essere affette da anormalità e malignità. La pelle rientra nella categoria dei tessuti molli e le lesioni hanno caratteristiche viscoelastiche diverse dalla cute normale, vista la diversa composizione strutturale. Sappiamo che il carcinoma con un'alta concentrazione di vasi sanguigni mostra un'alta viscosità rispetto all'area circostante, quindi cercheremo di introdurre un modello di calcolo dei tempi di rilassamento che sia correlato con la viscosità e il modello introdotto da Eskandari et al. risulta essere molto interessante da questo punto di vista.

3.1 Modello del tessuto introdotto da Eskandari et al.

Il tessuto molle ha un comportamento non lineare in conseguenza ad eccitazioni esterne. Effetti come l'isteresi, grandi deformazioni e proprietà meccaniche tempo invarianti e non lineari possono generare armoniche di alto ordine. Queste non linearità hanno un effetto piuttosto insignificante sulla risposta della maggior parti dei tessuti molli a piccole sollecitazioni. Quindi sotto l'ipotesi di basse frequenze operative il gruppo di ricerca canadese ha adottato un contesto lineare per analizzare e modellare la risposta del tessuto molle.

3.1.1 MODELLO LINEARE VISCOELASTICO

Una struttura meccanica, come detto precedentemente, comprende sia proprietà elastiche, sia proprietà viscose, sia densità intrinseca. Il comportamento elastico di una struttura la rende resistente ad una forza esterna o ad una deformazione. L'elasticità nei tessuti molli può essere modellata con un numero finito di elementi, detti molle, nella direzione della compressione, assumendo la compressione una forza unidirezionale. Tuttavia, a causa di frizioni interne ed effetti di rilassamento, Eskandari et al. è stato obbligati ad introdurre nella vibrazione un termine di smorzamento. Questo effetto è indotto principalmente dalla viscosità del materiale. Nella teoria dei solidi viscoelastici, la viscosità può essere modellata con elementi smorzatori. Come detto prima, è stato assunto di agire nella linearità, quindi, la relazione forza-velocità degli ammortizzatori è lineare, come è lineare la relazione forza-spostamento delle molle. Oltretutto, ogni elemento con massa mostra una relazione lineare tra forza e accelerazione. Concludendo, il tessuto molle è stato modellato come una serie di elementi interconnessi, ognuno dei quali caratterizzati da una molla, da uno smorzatore e da una massa (punto di massa).

In questo lavoro, l'inerzia nei tessuti molli è stata ignorata perché si è lavorato alle basse frequenze, considerando anche la relativa bassa densità del tessuto umano. Questa approssimazione, come viene mostrato successivamente, è valida per frequenze sotto i 50 Hz. Eskandari et al. ha utilizzato il modello di Voigt per modelizzare il tessuto molle, cioè ha considerato le molle e gli smorzatori messi in parallelo come mostrato in fig. 3.1.

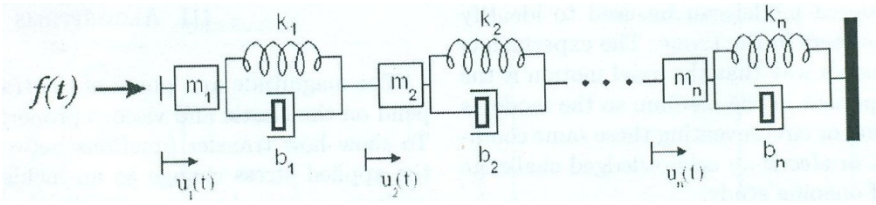


Fig 3.1 Modello unidimensionale di tessuto molle con molle, smorzatori e punti massa. Misurando lo spostamento con l'aiuto degli ultrasuoni, i parametri del modello possono essere identificati.

La relazione tra tensione (σ) e deformazione (ε) di un elemento di Voigt è un'equazione differenziale lineare del primo ordine come segue:

$$\mu\varepsilon(t) + \eta\dot{\varepsilon}(t) = \sigma(t), \qquad (1)$$

dove μ è il modulo di Young o modulo elastico e η è la viscosità. L'equazione del moto per questo modello è stata ottenuta discretizzando la (1). Per un tipico elemento i, avremo:

$$k_i[u_i(t) - u_{i+1}(t)] + b_i[\dot{u}_i(t) - \dot{u}_{i+1}(t)] = f(t), \qquad (2)$$

dove k_i e b_i sono rispettivamente i coefficienti di rigidezza e di smorzamento viscoso dell' i-esimo elemento. Quando una compressione dinamica è applicata in un campione non omogeneo di dimensioni finite, il risultante moto sarà determinato da diversi fattori. Questi fattori includono il metodo con il quale il campione è stato eccitato, la riflessione, la rifrazione, le risposte non lineari e altri complessi fenomeni. In questo studio i ricercatori hanno cercato di creare un moto assiale minimizzando gli altri moti attraverso un'attenta progettazione degli apparati sperimentali. Come sarà mostrato più avanti, il gruppo di ricerca ha cercato di applicare una forza distribuita sulla superficie del campione, in modo tale da poter minimizzare le componenti di tensione non complanari. È stato assunto che la risposta deformante è lineare.

L'introduzione di un modello che predice tutti gli effetti non lineari è oltre lo scopo dello studio svolto da Eskandari et al. e va oltre anche lo scopo della nostra tesi. In questo modello lineare a una dimensione i moti laterali e le deformazione non simmetriche sono state ignorate.

3.1.2 ANALISI SPETTRALE E FUNZIONI DI TRASFERIMENTO

Se il modello di fig. 3.1 viene eccitato da una forma d'onda a singola frequenza, lo spostamento e le deformazioni locali avranno la stessa frequenza ma differenti ampiezze e fasi, se invece la sollecitazione ha una certa banda di frequenze anche gli spostamenti e le deformazioni copriranno un certo range di frequenze. La forma di ogni spettro dipende dai parametri del modello e dalle proprietà meccaniche del tessuto. Le funzioni di trasferimento tra la forza applicata e gli spostamenti sono stati studiati in recenti ricerche e sono stati illustrati dal lavoro di Eskandari et al., ricerche che riporterò anch'io e che ci serviranno per ricavare il tempo di rilassamento.

La relazione costitutiva di un elemento di Voigt può essere ottenuta nel dominio della frequenza usando la trasformata di Fourier [8] :

$$(\mu + j\omega\eta)\varepsilon(\omega) = \sigma(\omega), \qquad (3)$$

dove ε(ω) è la trasformata di Fourier della deformazione in una specifica locazione nel tessuto, e σ(ω) è la trasformata di Fourier della tensione applicata. μ e η sono i valori locali di elasticità e viscosità.

Eskandari et al. definisce la funzione di trasferimento tra deformazione e tensione come

$$H_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega) = \frac{P_{\varepsilon\sigma}(\omega)}{P_{\sigma\sigma}(\omega)}, \qquad (4)$$

dove $P_{\varepsilon\sigma}(\omega)$ è la densità spettrale di potenza incrociata tra ε(t) e σ(t) e $P_{\sigma\sigma}(\omega)$ è la densità spettrale di potenza per σ(t).

Con σ nota la (3) può essere espressa come [8]:

$$(\mu + j\omega\eta) = \frac{1}{H_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega)}. \qquad (5)$$

Oppure, se la tensione di applicazione viene rimossa la (3) è così modificata[8]:

$$(\mu + j\omega\eta)\varepsilon(\omega) = \left(\mu_0 + j\omega\eta_0\right)\varepsilon_0(\omega), \qquad (6)$$

dove μ_0 e η_0 sono i parametri di qualsiasi locazione arbitraria e ε_0 è la deformazione di quel punto. Prendendo la funzione di trasferimento tra le deformazioni di due punti, Eskandari et al. ha ottenuto il seguente risultato:

$$\frac{(\mu + j\omega\eta)}{(\mu_0 + j\omega\eta_0)} = \frac{1}{H_{\varepsilon_0}^{\varepsilon}(\omega)}. \qquad (7)$$

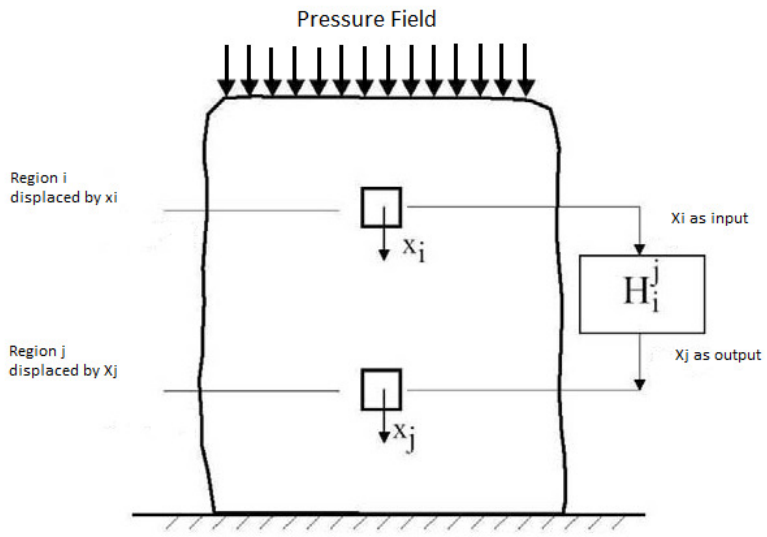


Fig. 3.2 Gli spostamenti possono essere considerati come input e output di un sistema dinamico lineare.

L'identificazione delle differenti caratteristiche delle funzioni di trasferimento, come l'ampiezza e la fase, che dipendono dalle proprietà del tessuto, come ripetuto più volte, risultano avere una buona stima, sia perché la quantità di medie temporali per calcolare la funzione della densità di potenza spettrale può essere incrementata in modo arbitrario, sia perché la funzione di trasferimento può essere analizzata a varie frequenze per estrarre le caratteristiche richieste.

Invece di usare la funzione di trasferimento tra la stato di tensione applicato e la conseguente deformazione, Eskandari et al. introduce anche un'alternativa, cioè si possono usare la forza applicata e gli spostamenti nodali per calcolare le funzioni di trasferimento. Dalla (2) quindi risulterà [8]:

$$(k_i + j\omega b_i) = \frac{1}{H_f^i(\omega) - H_f^{i+1}(\omega)}, \qquad (8)$$

dove $H_f^i(\omega)$ rappresenta la funzione di trasferimento tra la forza e lo spostamento al nodo i.

3.1.3 STIMA DEL PARAMETRO ELASTICO

Usando la (5) i ricercatori canadesi hanno ottenuto la seguente stima elastica:

$$\widehat{\mu} = \frac{1}{|\bar{H}_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega)|}, \qquad (9)$$

dove $\widehat{\mu}$ è la stima del modulo elastico e $\bar{H}_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega)$ è l'asintoto a bassa frequenza della funzione di trasferimento. Il termine jωη nella (5) viene è stato ignorato grazie alla approssimazione a bassa frequenza e al fatto che ωη << μ [8].

Se la tensione applicata non può essere misurata, Eskandari et al. utilizza la (7) per ottenere la stima relativa per l'elasticità, nel modo seguente:

$$\widehat{\mu} = \frac{\mu_0}{|\bar{H}_{\varepsilon_0}^{\varepsilon}(\omega)|}. \qquad (10)$$

Le stime dovrebbero essere normalizzate rispetto a μ_0, il quale però non è noto. Quindi solo il profilo dell'elasticità relativa può essere ottenuto tramite la 10.

3.1.4 EFFETTO DELLA LEGGE DI POTENZA

Il tessuto molle umano e la maggior parte dei campioni che riproducono le caratteristiche del tessuto umano si comportano come fluidi non-Newtoniani in presenza di una eccitazione dinamica. I fluidi Newtoniani, come l'acqua, mantengono le loro proprietà elastiche e viscose a tutte le frequenze, mentre non è così per i materiali non-Newtoniani. In molti materiali la variazione della viscosità con la frequenza può essere modellata grazie ad una legge di potenza [9]:

$$\eta = \eta_c\, \omega^n, \qquad (11)$$

dove η_c è l'indice di consistenza, ω è la frequenza angolare e n è l'indice di flusso.

Per i fluidi Newtoniani $n = 0$. Il caso $n > 0$ è raramente riscontrabile nei tessuti biologici e si parla di dilatanza. Il caso $n < 0$ è noto come effetto pseudo-plastico ed è molto comune nei polimeri e nei composti gelatinosi. Si nota che all'aumentare della frequenza le differenze di viscosità decadono rapidamente quindi devo applicare basse frequenze per notare le reali differenze di viscosità nel materiale e, come vedremo più avanti, per notare le differenze nei tempi di rilassamento.

3.2 Simulazione del modello

3.2.1 SIMULAZIONE CON 4 ELEMENTI

Per mostrare come le funzioni di trasferimento tra la deformazione e la tensione applicata cambiano, Eskandari et al. ha simulato una rete di quattro elementi composti da molle, masse e smorzatori. Al secondo elemento è stato posto un alto indice di elasticità, mentre al terzo è stato imposto un'alta viscosità. La densità è stata assunta costante e pari a 1000 kg/m^3. Le fig. 3.3(a) e 3.3(b) mostrano i valori di elasticità e viscosità nel mezzo simulato. Il modello è stato eccitato per 10 secondi con rumore Gaussiano bianco a 40 Hz filtrato con un passa basso. La funzione di trasferimento tra la forza applicata e le deformazioni di ogni elemento è stata calcolata e il modulo e la fase sono raffigurati in fig. 3.3(c) e 3.3(d). Si può osservare il cambiamento negli asintoti in bassa frequenza dei moduli con differenti proprietà elastiche. La fase cambia seguendo uno sviluppo che può essere associato al rapporto tra la viscosità e la elasticità. È proprio questo rapporto che definisce il *tempo di rilassamento* del tessuto e come mostra il lavoro dell'equipe canadese, questo tempo può essere ricostruito dalla fase o parte immaginaria delle funzioni di trasferimento. Per il secondo elemento con un tempo di rilassamento piccolo, la fase è più vicina allo zero, mentre per il terzo elemento, con un tempo di rilassamento più elevato, la fase della funzione di trasferimento è più larga. Questo ci fa ben sperare dal momento che, come abbiamo detto prima le forme cancerogene della pelle hanno una viscosità più alta e quindi, seguendo questo modello, dovrebbero mostrare tempi di rilassamento più elevati rispetto alla pelle sana circostante.

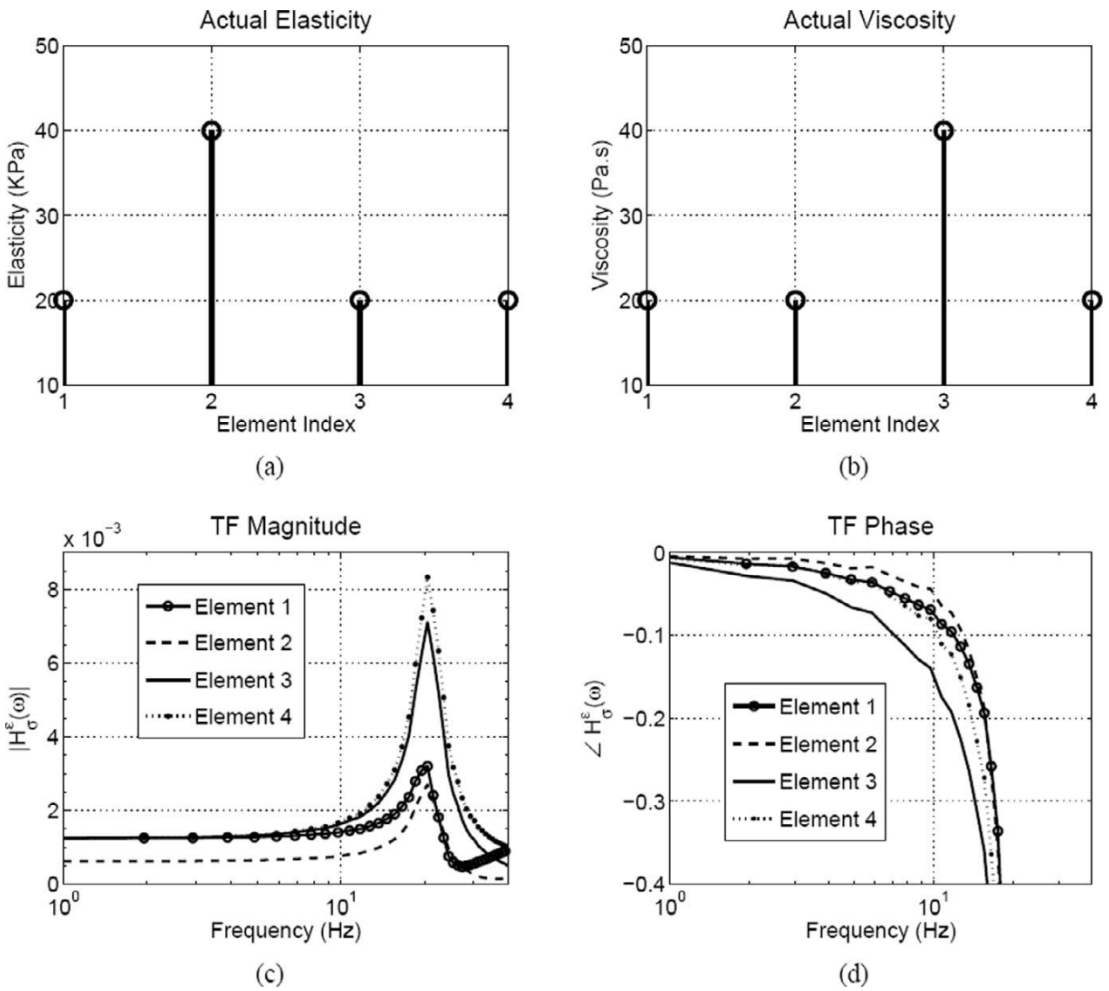


Fig. 3.3 (a) e (b) Mostrano l'elasticità e la viscosità dei 4 elementi formanti il campione simulato. (c) e (d) il modulo e la fase delle funzioni di trasferimento tra la deformazione e lo stress applicato.

3.2.2 STIMA DEI PARAMETRI E CALCOLO DEL TEMPO DI RILASSAMENTO

Se la frequenza è sufficientemente piccola il movimento del tessuto sarà governato solo dalle proprietà elastiche e gli effetti dinamici non giocano un ruolo importante. Questo è evidente dalle figura 3.3(c) dove l'ampiezza alle basse frequenze ha un andamento quasi piatto. Quindi si può ottenere una stima per l'elasticità dall'asintoto alle basse frequenze della funzione di trasferimento, visto anche precedentemente.

La fase cambia nella funzione grazie al contributo sia dell'elasticità sia della viscosità. È stato mostrato che la funzione di trasferimento tra la deformazione locale e la tensione di stress può essere parametrizzata in termini di elementi di Voigt come segue:

$$H_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega) = \frac{1}{(\mu + j\omega\eta)}. \qquad (12)$$

e assumendo ωη molto minore di μ, si ha [8]:

$$\frac{\omega\eta}{\mu} \approx -\angle H_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega). \qquad (13)$$

L'equazione sopra mostra che una regione ad alta viscosità influenza la fase nello stesso modo di una regione a bassa elasticità. Sebbene si possa stimare la viscosità calcolando η da (13), Eskandari et al. definisce e stima un tempo di rilassamento (τ) per i tessuti viscoelastici, come segue:

$$\tau = \frac{\eta}{\mu} \approx -\frac{1}{\omega}\angle H_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega). \qquad (14)$$

Un τ grande indica una risposta lenta per l'elemento corrispondente. Questo è equivalente a un ritardo di gruppo della funzione di trasferimento a quella frequenza, considerando che la fase cambia linearmente con la frequenza. È proprio questo tempo di rilassamento che può essere usato come caratteristica per classificare le varie forme di tumore della cute.

Se la viscosità ha un andamento che segue la legge di potenza e l'elasticità è indipendente dalla frequenza, il tempo di rilassamento sarà soggetto ad un comportamento similare. La distribuzione dell'indice di flusso risultante dalla legge di potenza nel tempo di rilassamento produrrà un altro parametro da identificare. Se l'andamento della legge di potenza viene ignorato, il tempo di rilassamento può essere assunto costante in un range di frequenze dove l'inerzia non interferisce. Pertanto, invece di operare con una singola frequenza, Eskandari et al. ha pensato bene di calcolare la pendenza della fase in (14) rispetto a più frequenze, ottenendo una stima più robusta del tempo di rilassamento.

Se lo stress è sconosciuto, la funzione di trasferimento verrà calcolata rispetto alla deformazione ad una specifica locazione [8]:

$$\hat{\tau} = \tau_0 - \frac{1}{\omega}\angle H_{\varepsilon_0}^{\varepsilon}(\omega), \qquad (15)$$

dove $\tau_0 = \eta_0/\mu_0$ è il tempo di rilassamento dell'elemento di riferimento. Poiché τ_0 è sconosciuto, può essere eliminato da (15) assumendolo come una costante, che ritroveremo però in ogni elemento. Perciò la relazione sopra darà un profilo relativo ma corretto della distribuzione del tempo di rilassamento nel tessuto.

3.2.3 CALCOLO DELL'ERRORE DI STIMA E DEL RAPPORTO CONTRASTO-RUMORE

Il moto dinamico del tessuto può essere descritto da una serie di elementi formati da molle, masse e smorzatori come descritto in fig. 3.1. In una tale rete, il moto del tessuto è governato dalla seguente equazione [10]:

$$KX(t) + B\dot{X}(t) + M\ddot{X}(t) = F(t), \tag{16}$$

dove $X(t)$ è la matrice contenente gli spostamenti di tutti i nodi nel tempo e $F(t)$ è la forza esterna. Le matrici K, B e M sono la rigidezza, lo smorzamento e la massa, dipendenti dalle proprietà del tessuto [10]:

$$M = \begin{bmatrix} m_1 & 0 & 0 & & 0 \\ 0 & m_2 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & m_3 & & 0 \\ & \vdots & & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & m_n \end{bmatrix}, \tag{17a}$$

$$B = \begin{bmatrix} b_1 & -b_1 & 0 & & 0 \\ -b_1 & (b_1 + b_2) & -b_2 & \cdots & 0 \\ 0 & -b_2 & (b_2 + b_3) & & 0 \\ & \vdots & & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & b_n + b_{n-1} \end{bmatrix}, \tag{17b}$$

$$K = \begin{bmatrix} k_1 & -k_1 & 0 & & 0 \\ -k_1 & (k_1 + k_2) & -k_2 & \cdots & 0 \\ 0 & -k_2 & (k_2 + k_3) & & 0 \\ & \vdots & & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & k_n + k_{n-1} \end{bmatrix}, \tag{17c}$$

dove per i = 1 a n, m_i è il parametro della massa riferita all'elemento i, b_i è il parametro di smorzamento tra m_i e m_{i+1}, k_i è il parametro di rigidezza tra m_i e m_{i+1}.

Può essere generato, quindi, un modello di spazio di stato per calcolare lo spostamento nodale vettoriale [8]:

$$\begin{pmatrix} \dot{X}(t) \\ \ddot{X}(t) \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & I \\ -M^{-1}K & -M^{-1}B \end{bmatrix} \begin{pmatrix} X(t) \\ \dot{X}(t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ M^{-1} \end{pmatrix} F(t), \tag{18}$$

$$X(t) = [I \quad 0] \begin{pmatrix} X(t) \\ \dot{X}(t) \end{pmatrix}. \tag{19}$$

Il modello è stato poi discretizzato da Eskandari et al. con un passo di discretizzazione fissato, utilizzando la funzione di Matlab, lsim.

Il gruppo di ricercatori canadese ha simulato una rete costituita da 100 elementi rappresentati come in fig. 3.1. Una forza a banda limitata è stata applicata e sono stati calcolati gli spostamenti. Eskandari ha assunto che il modello rappresenti un'area di 1 mm^2 e una profondità di 50 mm (quindi una profondità che va oltre lo spessore della cute umana), con una elasticità omogenea di 20 kPa e una viscosità di 20 Pa·s. Questi valori sono stati scelti in modo arbitrario facendo una media dei valori caratteristici dei tessuti molli. La densità è di 1000 kg/m^3, valore uguale a quello dell'acqua e di molti tessuti molli. Il frame-rate della simulazione è di 1 kHz e la durata di ogni test è di 10 secondi. Il segnale di stress è un rumore bianco filtrato con un passa basso con una frequenza di 30 Hz. Gli spostamenti sono stati calcolati in ogni nodo e le funzioni di trasferimento sono state calcolate tra la deformazione e lo stress applicato.

Usando la (9) e la (15) sono state ottenute la stime per l'elasticità e per il tempo di rilassamento. Per il campione omogeneo simulato, Eskandari et al. si aspettava che i parametri degli elementi risultassero uguali. Un'alta deviazione standard indica una stima non buona. Se p_0 è il valore reale del parametro e il vettore $\hat{p}$ è la stima di tutti gli elementi, l'errore di stima (Er_e) è stato ricavato dalla deviazione standard (STD) come segue [8]:

$$Er_e = \frac{STD(\hat{p})}{p_0}. \tag{20}$$

Un certo livello di rumore è stato poi aggiunto alle deformazioni per rappresentare l'errore di quantizzazione e la risoluzione limitata nelle stime degli spostamenti, l'interferenza del moto laterale del tessuto, le non linearità del tessuto e l'imperfezione del modello.

L'accuratezza dei metodi proposti è stata valutata da Eskandari et al. per un ampio intervallo di rapporti segnale di deformazione/rumore (SNR). La fig. 3.4 mostra l'errore di stima dei moduli elastici e del tempo di rilassamento. L'elasticità è stata ricostruita dall'asintoto in bassa frequenza dei moduli della funzione di trasferimento, mentre il tempo di rilassamento è stato calcolato dalla fase, come descritto precedentemente. L'errore di stima per il tempo di rilassamento è stato diviso di un fattore pari a 10 per visualizzare entrambe le curve nella stessa figura.

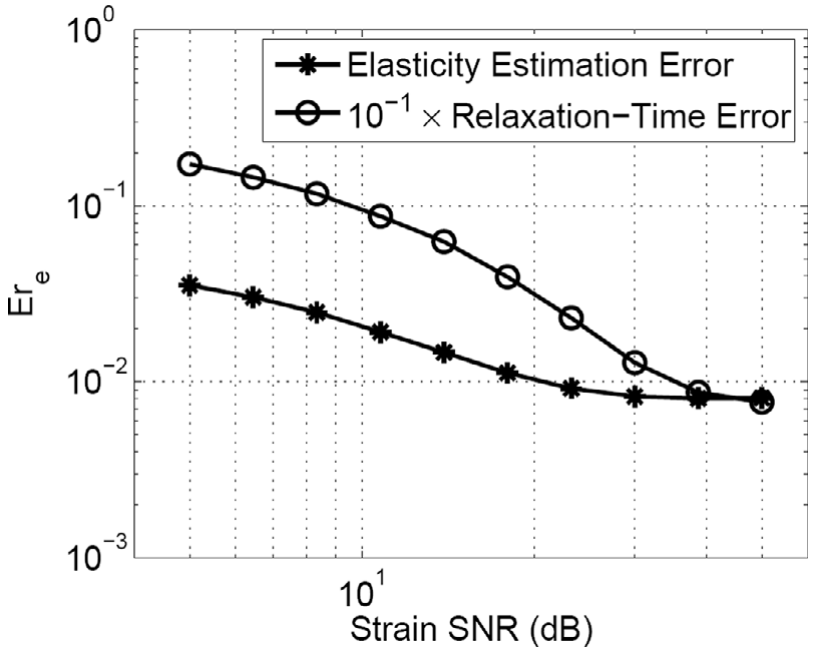


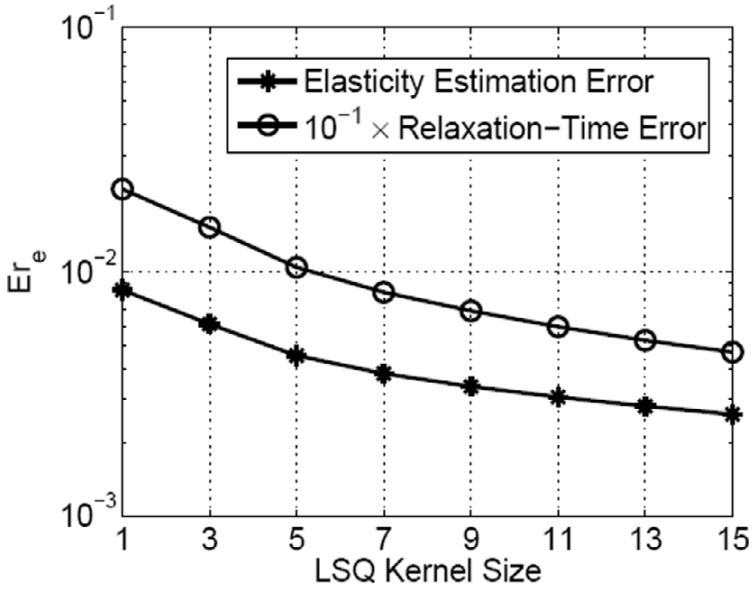
Fig. 3.4 L'errore nello stimare l'elasticità (stelle) e il tempo di rilassamento (punti) per differenti livelli di SNR. L'errore di stima del tempo di rilassamento è stato diviso per 10.

Le deformazioni nei precedenti calcoli sono state ottenute prendendo le derivate degli spostamenti. Diversamente, si può usare il metodo dei minimi quadrati per calcolare il gradiente degli spostamenti che riduce la varianza della stima al costo di una riduzione del contrasto [11]. L'applicazione del metodo dei minimi quadrati è stato studiato da Eskandari e nella figura 3.5(a) egli mostra l'effetto della lunghezza del kernel dei minimi quadrati nell'errore di stima. La rete, per questo tipo di analisi, è stata simulata con 100 elementi, i primi 50 con una elasticità e un tempo di rilassamento rispettivamente di 20 kPa e 2ms, mentre i secondi 50 con valori di 40 kPa e 1 ms. E' stato assunto per la deformazione un SNR di 15 dB. Si nota nella fig. 3.5(a) che incrementando la lunghezza del kernel si ha una riduzione della varianza stimata di entrambi i parametri. La figura 3.5(b) mostra l'effetto della lunghezza del kernel sul rapporto contrasto/rumore per i due layer formati da 50 elementi. Il CNR è stato definito come segue [8]:

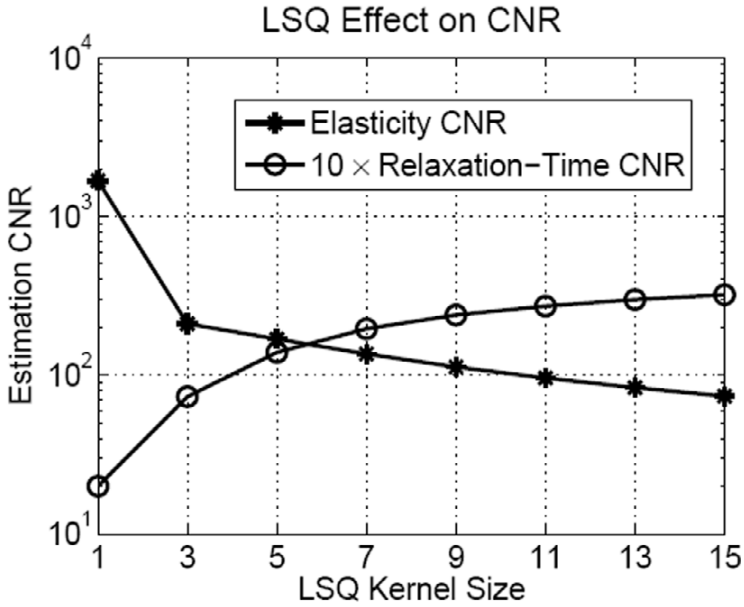
$$CNR = \frac{2(M_1 - M_2)^2}{STD_1^2 + STD_2^2}, \qquad (21)$$

dove M_1 e M_2 sono le medie e STD_1 e STD_2 sono le deviazioni standard dei parametri stimati nelle due regioni. Focalizzandoci nella parte di grafico del tempo di rilassamento

si vede che aumentando la lunghezza del kernel del metodo dei minimi quadrati, il rapporto tra contrasto e rumore migliora.



(a)



(b)

Fig 3.5 (a) L'effetto della lunghezza del kernel nella stima. (b) L'effetto della lunghezza del kernel nel CNR.

3.3 Sperimentazione

3.3.1 SPIEGAZIONE DEL SISTEMA DI SPERIMENTZIONE

In questa sezione ripropongo gli esperimenti fatti da Eskandari et al. su campioni che riproducono le proprietà viscoelastiche dei tessuti molli per mostrare come il suo metodo possa essere un mezzo efficace per calcolare i tempi di rilassamento. Lo schematico dell'intero sistema usato per la sperimentazione è raffigurato in figura 3.6 e consiste di una piattaforma fissa con collocati un sistema di attuazione, sensori e trasduttori. Il moto di vibrazione è eseguito da un motore in corrente continua con un "tumbler", un cilindro montato in modo obliquo. Il dispositivo può essere usato sia come reometro e sia come sistema vibro-elastografico.

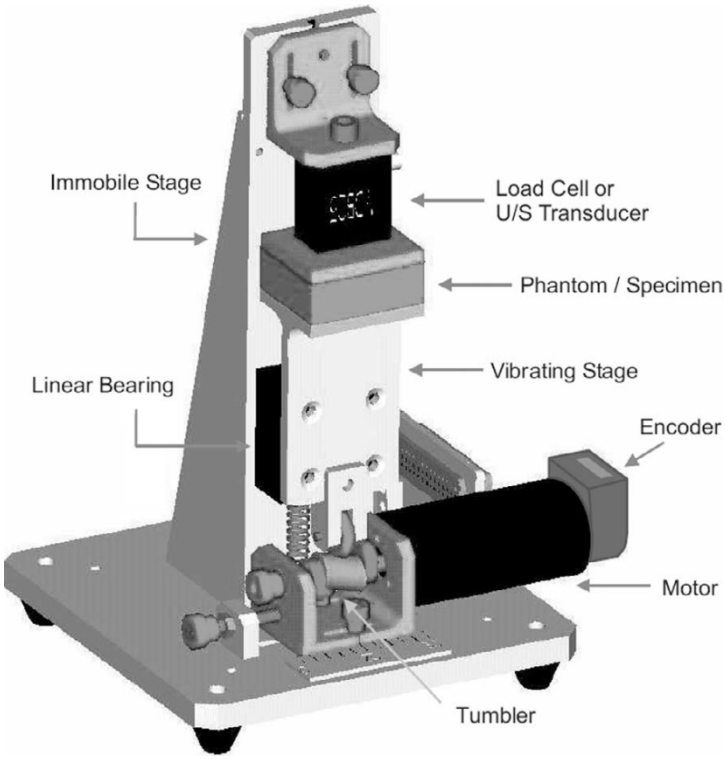


Fig 3.6 Il sistema usato per la sperimentazione.

In questo ultimo caso un trasduttore ad ultrasuoni formato da un array lineare è stato montato in un contenitore di alluminio. Il campione è stato posto tra la parte che vibra e il trasduttore. L'eccitazione generata dal motore è a basse frequenze rispettando la legge di potenza sulla viscosità, il moto all'interno del campione è stato identificato dagli

ultrasuoni. Le sequenze di radio frequenze hanno una frequenza di 5 MHz e sono state campionate a 20 MHz. Gli spostamenti assiali sono stati stimati usando una tecnica nel dominio del tempo sviluppata recentemente che si basa sulla correlazione incrociata [12]. Il kernel del filtro LSQ e la sovrapposizione sono stati tenuti costanti ai valori di 1.5 mm e 40% rispettivamente. Le funzioni di trasferimento di una linea sono state calcolate da Eskandari rispetto ad un blocco arbitrario in posizione centrale della medesima linea e la coerenza è stata calcolata per assicurare la linearità della risposta del tessuto in esame. Un'alta coerenza è indice che la relazione ingresso/uscita è lineare e il rumore è basso. Se lo stress applicato è conosciuto la funzione di coerenza tra σ(t) e ε(t) è definita da [8]:

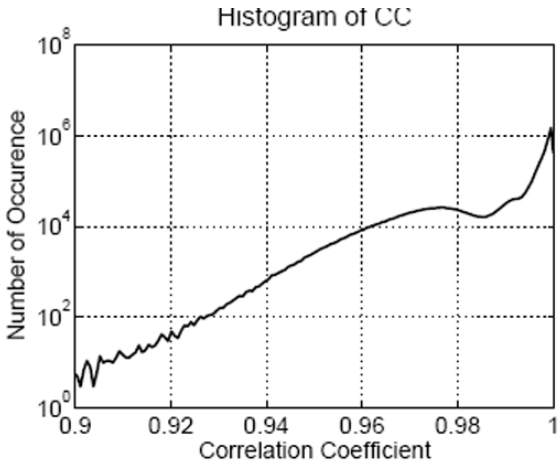
$$C_{\sigma}^{\varepsilon}(\omega) = \frac{|P_{\varepsilon\sigma}(\omega)|^2}{P_{\sigma\sigma}(\omega)P_{\varepsilon\varepsilon}(\omega)}. \qquad (22)$$

In presenza di rumore e non linearità il valore della coerenza diminuisce. Fattori che influenzano la coerenza nell'esperimento canadese sono un largo movimento laterale e l'isteresi.

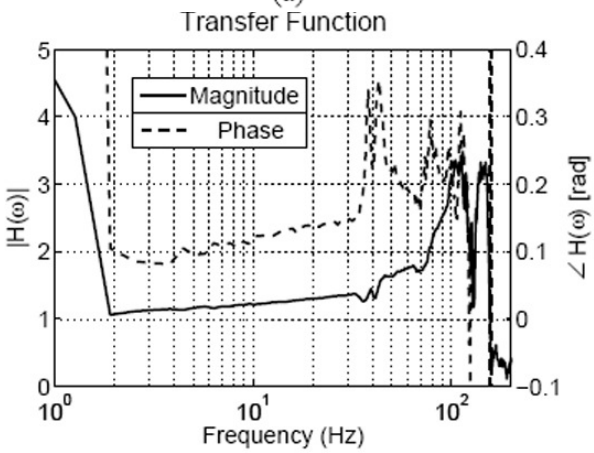
3.3.2 PRIMO TEST DI MISURAZIONE

Nel primo test un piccolo pezzo di spugna in PVA (5 mm di spessore) è stato inserito nel centro del campione di gelatina, prossimamente 13 mm sotto la faccia che è a contatto con la sonda. Il campione è stato eccitato con rumore bianco Gaussiano con una banda limitata di 3-30 Hz. La deviazione standard della gaussiana è di 80 μm e la tensione media applicata non varia di più del 0.3%. Le radio frequenze sono state raccolte da Eskandari et al. per 60 secondi a 1300 frames/sec agendo con il metodo Doppler per una singola linea A passante attraverso il campione. Gli spostamenti sono stati stimati con 70 blocchi di 1.5 mm ciascuno con una percentuale di sovrapposizione del 40%. L'istogramma dei coefficienti di correlazione di tutti i blocchi è mostrato in fig. 3.7(a), parametro che fornisce l'accuratezza degli spostamenti stimati e che mostra una media del 99.4% [8]. La deformazione è stata calcolata con il metodo dei minimi quadrati con un filtro LSQ di lunghezza 7 che corrisponde a 4 mm nel tessuto. Le funzioni di trasferimento e di coerenza per le deformazioni sono state calcolate usando blocchi di 1 secondo con un 50% di sovrapposizione. Il blocco di riferimento per calcolare le funzioni di trasferimento è stato assegnato al numero 30, in posizione

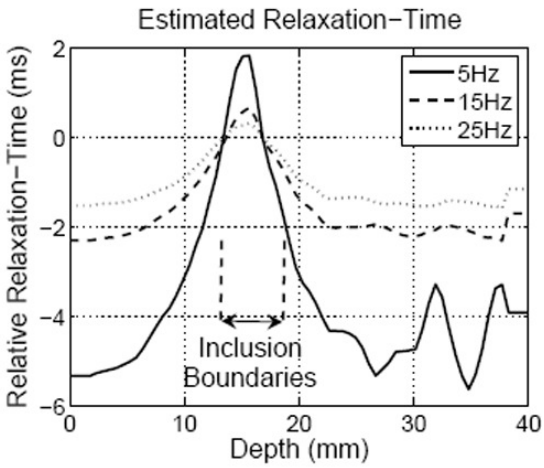
centrale del campione, con un alto coefficiente di correlazione con i blocchi limitrofi. Il modulo e la fase della funzione di trasferimento del blocco 18 (10 mm in profondità) è mostrato in fig. 3.7(b). Si nota che la funzione di trasferimento è accettabile per frequenze comprese tra 3-30 Hz. La stima del tempo di rilassamento a 3 differenti frequenze è mostrata in fig. 3.7(c) e si nota come la differenza tra il tempo di rilassamento della gelatina e della spugna diminuisce all'aumentare della frequenza.



(a)



(b)



(c)

Fig. 3.7 (a) Istogramma dei coefficienti di correlazione. (b) Modulo e fase dell'elemento 18. (c) Stima del tempo di rilassamento a 3 differenti frequenze.

3.3.3 SECONDO TEST DI MISURAZIONE

In un altro esperimento condotto da Eskandari et al., un campione di gelatina è stato costruito con due inclusioni al suo interno. Questo esperimento è molto importante perché può simulare, su grande scala, una malignità, posta anche in profondità, della cute umana. La prima inclusione consiste in un cilindro di gelatina più dura (18% contro il 12% in peso del normale campione) e la seconda invece in una spugna in PVA saturata con acqua. La spugna ha una viscosità molto più alta della gelatina quindi ci aspettiamo tempi di rilassamento diversi. Le linee A del trasduttore sono state catturate ad una frequenza di 98 scansioni al secondo per una durata di 20 secondi. La finestra di immagine è di 40 mm x 40 mm con 64 linee RF nella direzione laterale. Gli spostamenti unidimensionali sono stati stimati con 70 blocchi per tutte le linee risultando una correlazione media del 98.6%. Le deformazioni sono state calcolate con un filtro LSQ di 4 mm. Le funzioni di trasferimento sono calcolate rispetto ad un elemento vicino alla sonda (elemento 5). E' stato applicato anche un filtro 5x5 all'immagine risultante in modo da renderla più nitida. In fig. 3.8(b) si evidenzia l'elasticità stimata e si denota chiaramente l'inclusione dura e la spugna. Il tempo di rilassamento è stimato dalla fase delle funzioni di trasferimento a 15 Hz ed è mostrato in fig. 3.8(c), che evidenzia la presenza della spugna all'interno del campione di gelatina.

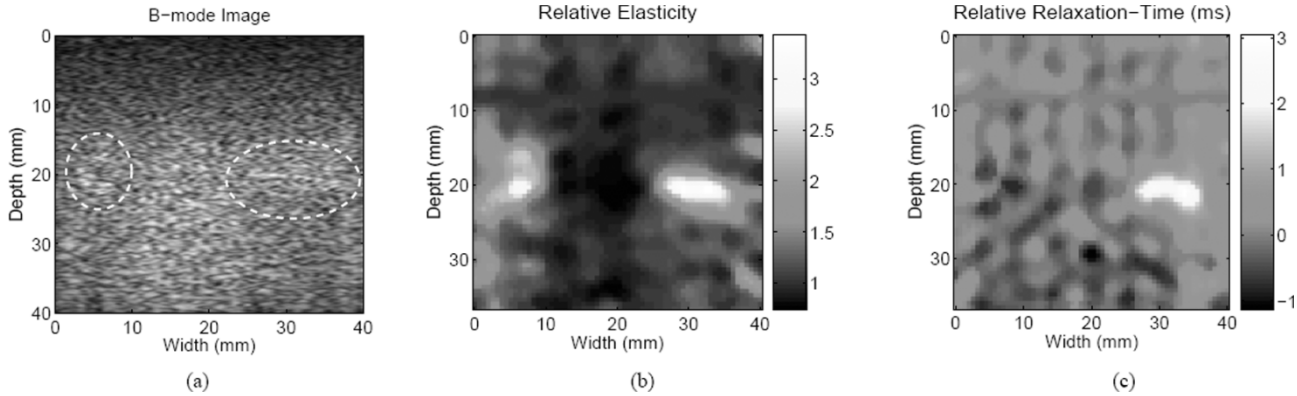


Fig 3.8 Parametri stimati per il campione di gelatina (12 % di peso in acqua) con gelatina dura (18 % di peso in acqua) nella sinistra e spugna in PVA nella destra. Nell'immagine ad ultrasuoni B-mode (a) le inclusioni non sono facilmente individuabili. (b) La stima dell'elasticità evidenzia entrambe le inclusioni ma non le distingue tra loro. (c) Il tempo di rilassamento invece distingue la spugna dalla gelatina dura, come ci aspettavamo.

La fig. 3.8 (c) evidenzia dunque la fattibilità del metodo di Eskandari et al. per la stima del tempo di rilassamento dei tessuti molli.

Capitolo 4

CONCLUSIONI

La frequenza di rilassamento, come mostrato dai metodi proposti da Eskandari et al. nel capitolo 3 di questa tesi, può diventare una caratteristica concreta per l'identificazione e la classificazione delle diverse patologie riguardanti la cute umana. Si nota che sono state fatte delle approssimazioni, supportate dalle frequenze di lavoro relativamente basse: sotto i 30 Hz l'inerzia può essere ignorata, la legge di potenza non ha una particolare influenza sulla viscosità e la densità può essere considerata costante. Si nota inoltre nella fig. 3.7 (c) un'alta varianza del tempo di rilassamento nell'intervallo di profondità che va da 25 a 40 mm, dovuto ai bassi coefficienti di correlazione a quella sezione di campione. Questo, dal nostro punto di vista non ci deve allarmare perché la profondità massima della cute arriva a 4 mm. Un approccio futuro potrebbe essere quello di applicare il metodo di Eskandari et al. in maniera più dettagliata, cioè su campioni che riproducono le proprietà viscoelastiche dei vari tipi di tumori cutanei e ricavare i tempi di rilassamento corrispondenti. Se le differenze sono marcate, l'imaging molecolare basato sui tempi di rilassamento con il metodo delle funzioni di trasferimento di Eskandari et al. può realmente diventare una potente tecnica di identificazione delle patologie cutanee.

Bibliografia

[1] Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 40th edition

[2] www.amicixlapelle.it

[3] S. W. Song e altri, "Ex vivo imaging of basal cell carcinoma using synchrotron phase-contrast X-ray microscopi", 2007

[4] X. Yuan, N. Situ e G. Zouridakis, "Automatic segmentation of skin lesion images using evolution strategy", Agosto 2007

[5] V. P. Wallace e altri, "Terahertz pulsed imaging of basal cell carcinoma ex vivo and in vivo", Maggio 2004

[6] D. G. Beetner e altri, "Differentiation among basal cell carcinoma, benign lesions and normal skin, using elctric impedance", Agosto 2003

[7] K. Chand e altri, "Microwave Reflectometry as a Novel Diagnostic Method for Detection of Skin Cancers", Maggio 2005

[8] H.Eskandari, S.E.Salcudean e R.Rohling, "Viscoelastic parameter estiamtion based on spectral analysis", Luglio 2008

[9] N. Phan-Thien, S. Nasseri e L.Bilston, "Oscillatory squeezing flow of a biological material", 2000

[10] E. Turgay, S.E.Salcudean e R.Rohling, "Identifying the mechanical properties of tissue by ultrasound strain imaging", Settembre 2005

[11] F. Kallel e J. Ophir, "a least-squares strain estimator for elastography", Luglio 1997

[12] R. Zahiri-Azar e S. Salcudean, "Motion estimations in ultrasound images using the time domain cross correlation with prior estimates", Ottobre 2006