



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

OCT per studi su Zebrafish: risultati preliminari

Laureanda: SARA TRENTIN

Relatore: Dr. ENRICO GRISAN

Correlatore: Dr. LUCA PALMIERI

Corso di laurea magistrale in Bioingegneria

Data Laurea: 23 Aprile 2013

Anno Accademico 2012/2013

A chi mi ha teso una mano nei momenti di difficoltà

Ai miei nonni

1	INTRODUZIONE	9
2	TOMOGRAFIA A COERENZA OTTICA	11
2.1	Introduzione.....	11
2.2	Principi base di OCT.....	13
2.3	Luce: interferenza e coerenza.....	13
2.4	Interferometria a bassa coerenza	17
2.5	Modalità di produzione dell'immagine.....	19
2.5.1	Singola A-scan	20
2.5.2	B-scan	20
2.5.3	C-scan o 3D-OCT	21
3	INTERPRETAZIONE DELLA TOMOGRAFIA A COERENZA OTTICA.....	23
3.1	Proprietà ottiche del tessuto biologico	23
3.2	Parametri chiave per la valutazione della qualità delle immagini OCT	24
3.2.1	Sensibilità.....	24
3.2.2	Range dinamico	25
3.2.3	Risoluzione Spaziale.....	25
3.2.4	Velocità di <i>imaging</i>	28
3.2.5	Roll-off di Performance	31
3.3	Confronto con altre tecnologie di <i>imaging</i>	31
4	FUNZIONAMENTO e IMPLEMANTAZIONE DEI SISTEMI OCT	35
4.1	Principi di funzionamento e tecnologia dei sistemi OCT	35
4.2	Sistemi OCT nel dominio del tempo	43
4.3	Sistemi OCT nel dominio della frequenza	47
4.4	Metodi di implementazione dei sistemi SD-OCT	51
4.4.1	SD-OCT con spettrometro	51

4.4.2	SS-OCT <i>System</i>	53
4.5	Confronto tra implementazioni OCT nel dominio della frequenza	54
4.6	Sistemi OCT per acquisizione di dati tridimensionali.....	61
4.7	Altri tipi di OCT.....	65
4.7.1	<i>Adaptive Optics</i> OCT	65
4.7.2	OCT a contrasto molecolare	67
4.7.3	<i>Polarization-Sensitive</i> OCT	68
4.7.4	Sistemi OCT per la guida chirurgica.....	68
4.7.5	<i>Imaging</i> OCT su animali	68
4.8	Inconvenienti della tecnologia OCT.....	70
4.8.1	Dispersione	70
4.8.2	SNR <i>Drop-Off</i>	72
4.8.3	Segnale simmetrico	73
5	OPTOELETTRONICA E COMPONENTI OTTICI	75
5.1	Sorgenti.....	75
5.2	Interferometri	78
5.3	Linee di ritardo ottico	78
5.4	Rivelatori	81
5.4.1	CCD.....	81
5.5	Elettronica di rilevamento.....	83
5.5.1	TD-OCT.....	83
5.5.2	FD-OCT	84
5.6	Conversione Analogico-Digitale.....	85
6	ZEBRAFISH.....	87
6.1	Introduzione	87
6.2	Sviluppo dello Zebrafish: una visione generale	89
6.3	Lo Zebrafish come sistema modello per lo sviluppo e la malattia.....	93

6.4	OCT su Zebrafish	94
7	CARATTERIZZAZIONE OTTICA DEI MEZZI DI INCLUSIONE	111
7.1	Fasi di preparazione dei campioni biologici	111
7.2	I mezzi di inclusione	117
7.2.1	Agarosio	118
7.2.2	Metilcellulosa	127
7.2.3	Glicerolo.....	135
8	PROVE SPERIMENTALI.....	145
8.1	Preparazione dei campioni biologici di Zebrafish.....	145
8.2	Setup sperimentale e materiali impiegati.....	157
8.2.1	Fase 1: Materiali	157
8.2.2	Fase 2: Setup sperimentale.....	162
8.2.3	Fase 3: Risultati	168
8.3	Analisi Spettrale sui supporti	172
8.4	Conclusioni.....	182
9	CONCLUSIONI.....	185
10	BIBLIOGRAFIA	187
10.1	Sitografia:.....	191

1 INTRODUZIONE

Il seguente lavoro si propone di porre le basi di un progetto atto ad implementare un sistema di Tomografia a Coerenza Ottica (OCT) per lo studio di embrioni di Zebrafish.

Nella prima parte si presenta una ampia bibliografia dello stato dell'arte di questa recente tecnica di *imaging* clinico e dei problemi ad essa connessi. Si tratteranno le varie tipologie di implementazione OCT sia nel dominio del tempo sia nel dominio della frequenza, e si descriveranno i vari componenti che fanno parte dello strumento.

Successivamente verranno presi in esame alcuni studi inerenti l'applicazione dell'*imaging* OCT su Zebrafish, per dimostrare quali siano le enormi potenzialità di tale tecnica per la capacità intrinseca di fornire dati accurati, *in vivo*, e in tempo reale, di campioni biologici come lo Zebrafish.

Nella seconda parte del presente lavoro, si prenderanno in esame diversi materiali per la conservazione dei campioni biologici, nonché la struttura di supporto dei campioni stessi, allo scopo di verificarne la minima invasività in fase di indagine. In particolare, sono stati analizzati l'agarosio, la metilcellulosa ed il glicerolo, comunemente impiegati per montare i campioni biologici su vetrini per l'analisi.

Si è messo a punto un setup sperimentale per l'analisi ottica di differenti campioni, in modo da definirne le bande di assorbimento, e con lo stesso setup si sono analizzati anche diversi tipi di supporto per i campioni, i vetrini e le cuvette di plastica, per determinare quale dei due supporti meglio si adatti allo scopo prefisso, l'analisi ottica di embrioni di Zebrafish.

Con il presente lavoro, dunque, si propone di dare delle indicazioni su quali siano i migliori supporti da utilizzare per l'analisi di campioni biologici di Zebrafish e quali i mezzi otticamente meno invasivi per il montaggio degli stessi.

Sviluppi futuri prevedono l'ottimizzazione del setup sperimentale per l'implementazione di un sistema OCT in modo da poter acquisire dati su Zebrafish di notevole rilevanza clinica.

2 TOMOGRAFIA A COERENZA OTTICA

2.1 Introduzione

La Tomografia a Coerenza Ottica (OCT, *Optical Coherence Tomography*) è una recente tecnica di diagnostica per immagini che presenta dei principi di funzionamento molto simili all'ecografia. La differenza sta nel tipo di segnale usato come riferimento: l'OCT sfrutta infatti i fenomeni di riflessione, da parte di specifici tessuti, di segnali luminosi incidenti invece di segnali acustici, garantendo una risoluzione assiale molto maggiore rispetto a quella tipica dell'ultrasonografia standard utilizzata (nell'ordine di 1-15 μ m contro i 150-200 μ m dell'ecografia B-scan).

La breve storia della tomografia a coerenza ottica trova i suoi principi agli inizi degli anni '90 grazie alla collaborazione tra studiosi di medicina ed oculisti: James Fujimoto, Charles Lin, Joel Shuman, David Huang, studente del *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) che ebbe l'intuizione delle immagini trasverse, Eric Swanson, costruttore del primo apparecchio OCT e fondatore del gruppo *Advanced Ophthalmic Diagnostics* assieme a Carmen Puliafito.

La tomografia a coerenza ottica è caratterizzata dalla capacità di acquisire immagini tomografiche trasversali ad alta risoluzione delle microstrutture interne dei materiali e dei sistemi biologici attraverso la misura della luce retrodiffusa e riflessa. Le immagini OCT sono dataset bidimensionali che rappresentano la retrodiffusione ottica in piani trasversali, attraverso il tessuto; l'*imaging* ottico può essere ottenuto *in situ* e in tempo reale.

Il funzionamento dell'OCT, analogamente agli strumenti ad ultrasuoni, si basa sulla misura del ritardo e dell'ampiezza dell'eco di un segnale luminoso riflesso da un determinato tessuto.

L'uso di un segnale ottico permette di ottenere una notevole risoluzione assiale nelle immagini ma introduce anche un problema legato all'impossibilità di rilevare in maniera diretta gli echi ottici a causa della velocità della luce ($c \approx 3 \cdot 10^8$ m/s) molto più elevata di quella del suono.

L'interferometria a bassa coerenza è il metodo più efficace per ovviare a questo problema.

L'*imaging* OCT fu fatto *in vitro* sulla retina umana e come esempio di *imaging* in strutture trasparenti e poco diffusive, e successivamente in strutture non trasparenti ed altamente diffusive, come le placche arteriosclerotiche. OCT fu inizialmente applicata all'occhio e, da allora, ha avuto il più grande impatto clinico in oftalmologia. La prima tomografia in vivo del disco oculare umano e della macula fu fatta nel 1993. OCT permette un *imaging* senza contatto e non invasivo dell'occhio anteriore come anche delle caratteristiche morfologiche della retina, inclusa la fovea ed il disco ottico. Nel 1996 la tecnologia divenne industriale e passò al commercio per la diagnostica oftalmologica (Humphrey Systems, Dublin, CA).

La profondità dell'*imaging* è limitata dall'attenuazione ottica causata dalla diffusione e dall'assorbimento da parte del tessuto. Tuttavia, nella maggior parte dei tessuti si può arrivare ad una profondità di indagine di 2 o 3 mm. Si tratta della stessa profondità che si ottiene con immagini ottenute tramite biopsia o istologia convenzionale. Sebbene le profondità di *imaging* non sono così profonde come nell'ecografia, la risoluzione di OCT è maggiore di 10 o 100 volte rispetto a quella dell'ecografia clinica standard. OCT è stata applicata *in vitro* per ottenere immagini di patologie arteriali e riesce a diversificare la morfologia delle placche. Studi di *imaging* sono anche stati condotti *in vitro* per analizzare le applicazioni in dermatologia, gastroenterologia, urologia, ginecologia, chirurgia, neurochirurgia, e reumatologia. OCT è stata usata *in vivo* per avere immagini dello sviluppo biologico di alcune specie (*Xenopus laevis*, *Rana pipiens*, ed embrioni di *Brachydanio rerio*). Nelle applicazioni in biologia dello sviluppo, OCT è interessante perché permette un *imaging* ripetuto dello sviluppo morfologico senza bisogno di sacrificare le cavie.

OCT è stata interfacciata anche con cateteri, endoscopi e laparoscopi che permettono un *imaging* dell'interno del corpo. È stato effettuato un *imaging* OCT *in vivo* su modelli animali tramite cateteri ed endoscopi del tratto gastrointestinale, polmonare e urinario come anche un *imaging* arteriale. Sono stati anche riportati studi endoscopici tramite OCT in esseri umani ([1]).

In generale, ci sono tre tipi di scenari clinici in cui OCT può avere applicazioni importanti:

- dove la biopsia escissionale convenzionale è azzardata o impossibile;
- dove la biopsia convenzionale ha un'inaccettabile tasso di falsi negativi a causa di errori del campione,

-come guida nelle procedure di interventi chirurgici, grazie alla elevata capacità di vedere al di sotto della superficie dei tessuti in modo non invasivo.

2.2 Principi base di OCT

Per poter ottenere immagini ottiche di tessuti biologici tomografiche, è prima necessario ottenere dati sulle strutture interne. Nell'OCT il primo passo per ottenere tali immagini è misurare la distanza assiale all'interno del tessuto; quando un fascio di luce è diretto all'interno della struttura da analizzare, si riflette a livello delle interfacce tra i differenti tessuti e diffonde in maniera diversa da tessuti che hanno proprietà ottiche differenti. Le distanze e le dimensioni delle differenti strutture possono essere determinate misurando il tempo di ritardo dell'eco di luce che viene riflessa o retro diffusa dalle differenti strutture al variare della distanza assiale.

Si definisce

$$T = \Delta z / c$$

la risoluzione temporale associata allo strumento atto a misurare il ritardo dell'eco luminoso dove Δz è la distanza che percorre l'eco, mentre v è la velocità di propagazione dell'eco nel tessuto. Per valori tipici di Δz di $5\mu\text{m}$, con c pari a circa $3 \cdot 10^8 \text{m/s}$ si avranno risoluzioni temporali di circa 15 femtosecondi. L'unico modo per poter rilevare segnali tanto rapidi è avvalersi di strumenti di rilevazione che sfruttano il principio dell'interferometria.

2.3 Luce: interferenza e coerenza

La luce è una radiazione elettromagnetica, ossia un campo elettromagnetico che si propaga nello spazio e nel tempo, nel vuoto e nella materia con una velocità dipendente dalla natura del mezzo attraversato. La radiazione mostra una duplice natura: corpuscolare ed ondulatoria, infatti i processi in cui essa viene generata oppure assorbita sono spiegabili supponendo che sia costituita da particelle, i fotoni, mentre la propagazione nello spazio e nel tempo segue i fenomeni tipici di un comportamento ondulatorio. A seconda del mezzo in cui si propaga, la luce riduce la propria velocità di un fattore detto indice di rifrazione del mezzo n :

$$v = \frac{c}{n}$$

In ottica si chiama coerenza (o coerenza di fase) la proprietà di un'onda elettromagnetica di mantenere una certa relazione di fase con se stessa durante la sua propagazione. Il fenomeno macroscopico più noto dovuto alla coerenza di fase è quello dell'interferenza (Fig.1). Esistono due tipi di coerenza: la coerenza temporale e la coerenza spaziale. Quando si parla di fase di un'onda ci si riferisce sempre all'approssimazione di onde piane ovvero di onde perfettamente monocromatiche. In realtà ogni onda reale ha delle deviazioni rispetto a questo andamento ideale e quindi, dopo che si è propagata per una certa distanza (ovvero per un certo tempo) le deviazioni da un andamento perfettamente sinusoidale diventano sensibili. Queste deviazioni sono matematicamente descrivibili come una deviazione sulla fase dell'onda. Quando il rapporto di fase si perde per via di queste deviazioni si dice che l'onda ha perso la sua coerenza temporale. Si può dunque definire come tempo di coerenza l'intervallo medio di tempo nel quale l'onda oscilla in un modo prevedibile. Durante questo intervallo essa compirà un certo numero di oscillazioni prima di cambiare fase. Il prodotto tra il tempo di coerenza e la velocità della luce è detto lunghezza di coerenza. Un'onda perfettamente monocromatica sarebbe descrivibile come una perfetta senoide, la cui lunghezza di coerenza sarebbe infinita.

Due onde che provengano da due regioni diverse dello spazio, perpendicolari alla direzione di propagazione, si dicono coerenti spazialmente se la differenza di fase tra di loro rimane costante nel tempo. Maggiore è la dimensione di tale regione di spazio in cui si verifici questa correlazione tra le fasi, maggiore sarà la lunghezza di correlazione spaziale laterale.

Affinché si verifichi un'interferenza è necessario che le due onde ricombinate abbiano lo stesso periodo di oscillazione, ovvero la stessa frequenza. Se i segnali che si incontrano hanno i campi in concordanza fase si parla di interferenza costruttiva e il segnale risultante ha ampiezza pari alla somma delle ampiezze delle due onde. Al contrario, si ha interferenza distruttiva quando il segnale si annulla a causa dei campi in opposizione di fase.

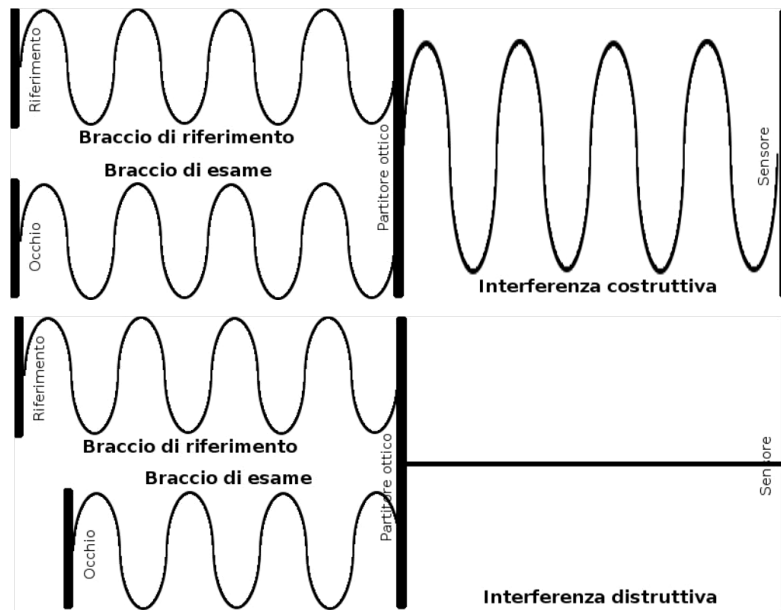


Figura 1: Rappresentazione di un'interferenza costruttiva e distruttiva

Nei casi reali le onde sono soggette a fluttuazioni attorno ad un certo valore medio, cioè hanno una propria larghezza di banda Δf .

La perturbazione risultante ha un'ampiezza e una fase che rimangono costanti solo per un certo intervallo di tempo, detto tempo di coerenza:

$$\Delta t = \frac{1}{\Delta f} .$$

Durante tale intervallo la perturbazione si comporta approssimativamente come una radiazione monocromatica.

Analogamente si definisce lunghezza di coerenza (Δz) il breve spazio in cui la radiazione può essere considerata perfettamente sinusoidale:

Equazione 1

$$\Delta z = c \cdot \Delta t$$

Consideriamo per esempio due punti P1 e P2 giacenti sulla semiretta uscente da una sorgente S (Figura 2) .

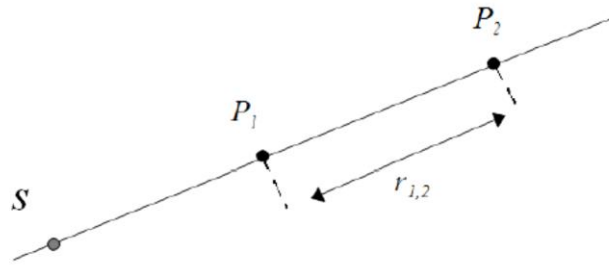


Figura 2: Distanza tra due punti P1 e P2 giacenti sulla semiretta uscente dalla sorgente S.

Se $\Delta z \gg r_{1,2}$ allora da P1 a P2 si presenta un singolo treno d'onda e la perturbazione in P1 è fortemente correlata con quella in P2. In caso contrario, se $\Delta z \ll r_{1,2}$, le perturbazioni nei due punti sono completamente scorrelate e sono presenti molti treni d'onda.

Se il raggio di luce è coerente e quindi ha una lunghezza di coerenza elevata, si osserveranno oscillazioni di interferenza per un ampio intervallo fra le relative differenze di lunghezza di traiettoria. Per applicazioni in ambito medico è necessario misurare con precisione la posizione di una struttura in un tessuto; è quindi richiesta luce a bassa coerenza ovvero lunghezza di coerenza breve.

Nella pratica OCT, questo viene implementato ad esempio attraverso un diodo superluminescente; si tratta di un dispositivo simile ad un diodo laser, basato sull'azionamento elettrico di una giunzione p-n che, quando polarizzato, diventa otticamente attivo e genera emissione spontanea amplificata in un ampio intervallo di lunghezze d'onda. Solitamente il semiconduttore impiegato per produrre tale dispositivo è alluminio o arseniuro di gallio. All'interno del materiale vengono realizzate due giunzioni p-n e n-p+ a differenti drogaggio e indice di rifrazione. Nel momento in cui viene fornita energia sufficiente ad un elettrone, questo viene promosso al livello energetico superiore; al cessare della stimolazione, l'elettrone ritorna allo stato fondamentale, rilasciando per intero l'energia fornita. Tale energia è rilasciata sotto forma di fotoni ad una specifica lunghezza d'onda (fascio monocromatico). I fotoni prodotti rimbalzano tra una giunzione e l'altra senza uscire dal dispositivo, stimolando la produzione di altri fotoni alla stessa lunghezza d'onda ed ottenendo l'amplificazione del segnale originario. La generazione di radiazione può anche essere vista come la ricombinazione di cariche elettriche positive (lacune) e negative (elettroni). Ciascuna giunzione p-n è progettata in modo tale che elettroni e lacune presentino una moltitudine di stati possibili (bande di energia) con energie differenti. Pertanto, la ricombinazione di elettroni e lacune genera luce in una vasta

gamma di frequenze ottiche, cioè luce a banda larga (da circa 40 a 300nm, a seconda delle sorgenti impiegate [21]).

2.4 Interferometria a bassa coerenza

L'interferometria a bassa coerenza è un metodo semplice che permette di misurare le distanze tra gli oggetti con elevata precisione, misurando la luce riflessa da questi e confrontandola con un fascio luminoso che viaggia su un percorso di riferimento.

Un interferometro ottico funziona facendo sovrapporre o interferire onde elettromagnetiche con la stessa frequenza. La Figura 3 mostra lo schema di funzionamento di un interferometro semplice di tipo Michelson.

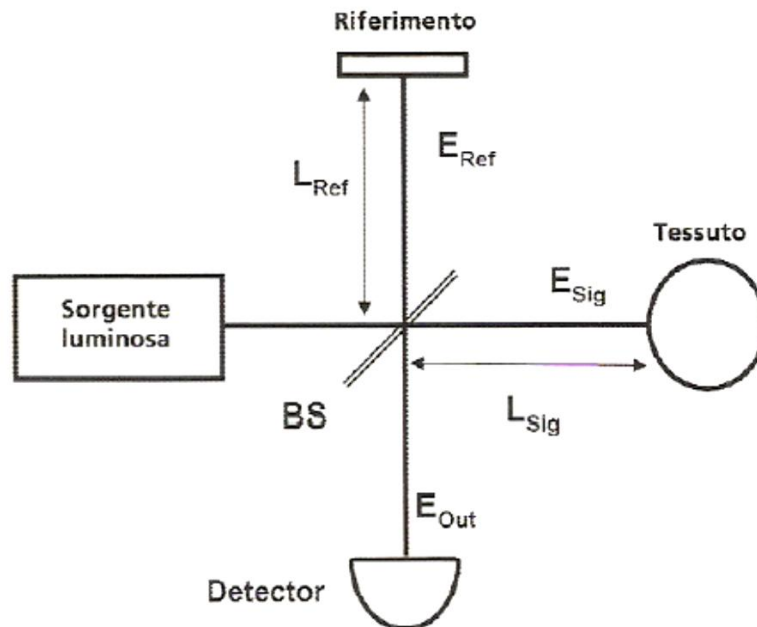


Figura 3: Schema base di un interferometro di tipo Michelson

Un'onda luminosa incide su uno specchio semiriflettente che funge da *beamsplitter*, separando in due componenti il fascio emesso dalla sorgente: una parte funge da riferimento, l'altra da segnale. Il segnale è riflesso o diffuso dal tessuto ed è rappresentato dal segnale E_{sig} , mentre quello riflesso dallo specchio di riferimento è rappresentato dal segnale E_{ref} . La combinazione di segnale e riferimento genera un'interferenza in

corrispondenza dello specchio semiriflettente, in uscita dall'interferometro si avrà quindi il segnale:

$$E_{out} = E_{sig} + E_{ref}$$

L'intensità dell'emissione luminosa verrà rilevata da un fotorecettore.

L'equazione 2 fornisce l'intensità di emissione in funzione di E_{sig} , E_{ref} e della differenza tra le traiettorie di segnale e di riferimento ΔL :

Equazione 2

$$I_{out}(t) \approx \frac{1}{4} |E_{ref}|^2 + \frac{1}{4} |E_{sig}|^2 + \frac{1}{2} E_{ref} \cdot E_{sig} \cdot \cos \left[2 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \Delta L \right]$$

dove l'ultimo termine è quello di interferenza.

Da questa equazione si vede che se $\Delta L \approx 0$ si genera un'interferenza totalmente distruttiva o costruttiva; si ha infatti $E_{sig} \approx E_{ref}$ e $I_{out} \approx E^2$.

Quindi, per una specifica posizione dello specchio di riferimento sarà possibile rilevare un segnale di interferenza, generato ad una profondità corrispondente.

Facendo variare la posizione dello specchio di riferimento all'interno di un range predefinito, corrispondente all'estensione della regione da indagare, sarà quindi possibile rilevare le interferenze ottiche provenienti dai vari tessuti a differenti profondità. La relazione tra la variazione di lunghezza dei due percorsi ottici e la lunghezza di coerenza Δz è mostrata in figura 4.

Come accennato in precedenza, affinché tale metodo di rilevazione degli echi ottici risulti efficace, è necessario che la sorgente emetta luce a bassa coerenza. In questa maniera si rileverà un'interferenza soltanto quando la differenza di ritardo temporale tra l'eco retrodiffuso dal tessuto e quello del riferimento sarà minore del tempo di coerenza della sorgente di luce. Quindi l'errore introdotto dalla misurazione della distanza sarà pari alla lunghezza di coerenza.

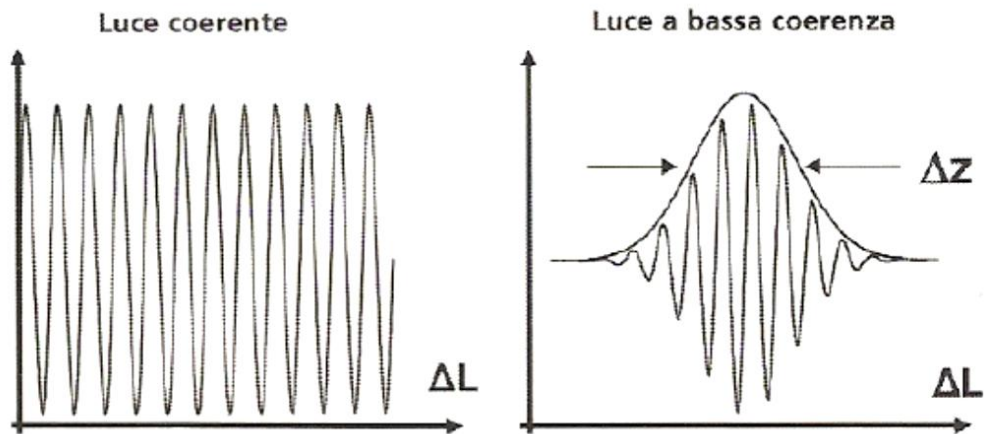


Figura 4: Rappresentazione di luce ad elevata coerenza (a sinistra) ed una a bassa coerenza (a destra). Si nota come il segnale a bassa coerenza sia costituito da un insieme di lunghezze d'onda e non da una sola, come nel caso del segnale sinusoidale (luce ad elevata coerenza).

2.5 Modalità di produzione dell'immagine

Come nell'ecografia, con l'OCT si possono ottenere tre diversi tipi di immagini definite A-scan, B-scan, e C-scan.

I tracciati *A-scan*, o monodimensionali, analizzano la riflettività delle strutture e la loro profondità lungo una singola direzione. In OCT sono utilizzate molto di rado, soprattutto per misurare con precisione la lunghezza dell'occhio.

I tracciati *B-scan*, o bidimensionali, vengono ottenuti affiancando circa 1600 scansioni A-scan, eseguite lungo una linea di circa 6mm di lunghezza in senso trasversale. Sono le rappresentazioni più frequentemente utilizzate in oculistica; sono inoltre immagini molto simili alle sezioni istologiche (i preparati utilizzati per gli esami microscopici tradizionali) dei tessuti. Consentono di valutare la struttura interna dei tessuti, e di eseguire misure degli spessori.

I tracciati *C-scan*, o tridimensionali, vengono ottenuti affiancando 265 scansioni B-scan orizzontali.

Indipendentemente da quale metodo di campionamento venga utilizzato, il risultato dell'insieme dei dati raccolti è essenzialmente un array o un campo scalare di valori relativi all'intensità del segnale campione. Per questo i valori ottenuti in uscita tramite scansione sono digitalizzati.

I processi di elaborazione e visualizzazione sono analoghi ad altre tecniche di *imaging* medico come la Tomografia Computerizzata (TC) ed Risonanza Magnetica Nucleare (RMN).

2.5.1 Singola A-scan

Nel caso di una singola A-scan la visualizzazione è banale ed i dati per ogni punto possono essere rappresentati in un grafico profondità-ampiezza (Fig.5).

Finché l'informazione è solo lungo una direzione, nessuna informazione può essere perduta e i cambiamenti significativi che subisce il segnale possono essere facilmente individuati.

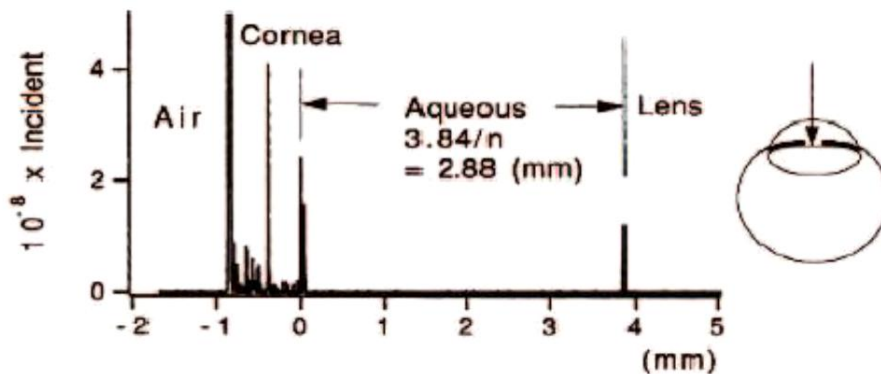


Figura 5: Rappresentazione in A-mode dell'intensità del segnale retro diffuso in funzione della distanza

2.5.2 B-scan

Quando si affianchino più scansioni A-scan, ancora non risulta difficile visualizzare il dataset e ciò accade nella modalità di acquisizione detta B-scan.

La profondità e la posizione della scansione lungo le coordinate x e y in una stessa immagine permettono la visualizzazione del segnale riflesso dai tessuti in una scala di grigi.

Spesso, per permettere un migliore contrasto tra valori differenti e quindi rendere più chiaramente visibili le differenze, si alternano alla rappresentazione in chiaro-scuro mappe a colori. Un esempio di B-scan è rappresentato in figura 6.

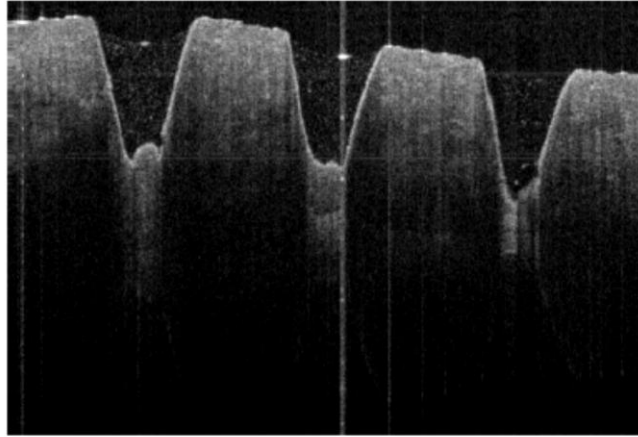


Figura 6: Immagine OCT B-scan del corpo ciliato

2.5.3 C-scan o 3D-OCT

Nel 3D-OCT, la visualizzazione è molto più complessa, infatti i dati acquisiti sono rappresentati come un insieme di voxel colorati in funzione dei valori retrodiffusi misurati, affiancando più B-scan l'una all'altra in uno spazio tridimensionale.

Questo processo spesso porta ad ottenere immagini poco chiare a livello di interpretazione; per la ricostruzione sono quindi utilizzate tecniche impiegate in altre metodologie di *imaging*. Un'alternativa è mostrare una sezione di immagine per tutti e tre i piani che passano per un dato punto, e visualizzarle per ottenere l'immagine di una sezione 3D del campione. Oppure utilizzare una qualche altra tecnica di modellazione dei dati tridimensionali, come considerarli un'isosuperficie a profondità regolabile (Fig.7) .

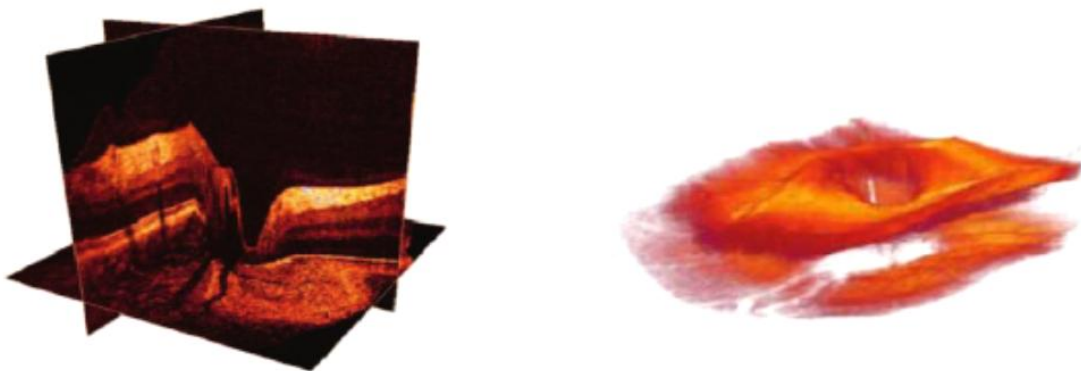


Figura 7: Cross-section 3D-OCT (a sinistra) e isosuperficie di profondità regolabile (a destra)

3 INTERPRETAZIONE DELLA TOMOGRAFIA A COERENZA OTTICA

3.1 Proprietà ottiche del tessuto biologico

La luce incidente sul tessuto biologico, un mezzo otticamente rifrangente e torbido, può essere trasmessa, assorbita e diffusa.

La *luce trasmessa* rimane inalterata ed è libera di interagire con gli strati di tessuto più profondi (oltre i 2 o 3 mm).

L'*assorbimento* si verifica perché i cromofori tissutali, come l'emoglobina o la melanina, hanno uno spettro di assorbimento simile all'energia della radiazione incidente. Alle lunghezze d'onda prossime all'infrarosso usate nella diagnostica OCT (circa 800-1310nm), la maggior parte della radiazione assorbita produce per lo più effetti termici. Tuttavia, poiché la potenza del fascio incidente è molto bassa (mW), diviene trascurabile l'effetto di surriscaldamento del tessuto prodotto.

La *diffusione ottica* è una proprietà dei mezzi non omogenei e si verifica quando sono presenti zone aventi indice di rifrazione differente.

La diffusione comporta che la luce incidente sia proiettata in direzioni multiple. La luce che inverte completamente il suo percorso di andata è detta retrodiffusa.

Nei tessuti che assorbono fortemente o che diffondono, l'intensità del fascio incidente decresce esponenzialmente con lo spessore di penetrazione, ad un tasso che dipende dai relativi coefficienti di assorbimento e diffusione.

Quando un fascio di luce incide su un tessuto biologico, è attenuato per via di assorbimento e diffusione. Mentre si propaga nel tessuto stesso, la radiazione è parzialmente retrodiffusa a livello delle strutture a differenti profondità. In ultimo, la luce è ulteriormente attenuata dall'assorbimento e dallo *scattering* nel percorso di ritorno, prima di essere rivelata dallo strumento OCT.

Al fine di eliminare la luce diffusa non voluta si utilizzano particolari tecniche di focalizzazione del fascio, come risultato, l'immagine OCT si può considerare prodotta da un singolo fascio di luce retrodiffusa.

La potenza di un segnale OCT proveniente da una particolare struttura di tessuto posta ad una certa profondità dipende dalla quantità di radiazione elettromagnetica retrodiffusa che incide sul fotorivelatore; quando si verifica per esempio un forte assorbimento, ad esempio a causa di un'emorragia in un tessuto, gli strati più in profondità tendono ad essere oscurati.

3.2 Parametri chiave per la valutazione della qualità delle immagini OCT

I cinque più importanti parametri per caratterizzare un setup OCT sono: la sensibilità, il range dinamico, la risoluzione assiale, la velocità di *imaging*, e il roll-off di performance (rilevante però solo per FD-OCT).

3.2.1 Sensibilità

La sensibilità determina la profondità di indagine in un tessuto, poiché come già detto in precedenza, la luce incidente è attenuata a causa dell'assorbimento e della dispersione.

Sfruttando tecniche interferometriche è possibile raccogliere dati relativi anche a segnali retrodiffusi molto deboli essendo il segnale ricevuto proporzionale a $E_{sig} \cdot E_{ref}$ (equazione 2) dove E_{sig} può essere debole, ma viene moltiplicato per il campo elettrico di riferimento E_{ref} .

La specifica sulla sensibilità è rappresentata dal rapporto segnale-rumore (SNR). In generale l'SNR per un segnale rilevato, è dato da:

Equazione 3

$$SNR = 10 \log \left(\frac{\eta \cdot P}{2h \cdot v \cdot NEB} \right)$$

Dove η è l'efficienza quantica del rivelatore, $2hv$ è l'energia del singolo fotone essendo h la costante di Planck, P è la potenza del segnale rilevato e NEB è l'ampiezza di banda equivalente del rumore del sistema di rilevamento.

La sensibilità di un OCT è direttamente proporzionale alla potenza ed inversamente proporzionale all'ampiezza di banda del rumore, acquisire immagini più rapidamente o con risoluzione maggiore richiederà una maggiore ampiezza di banda (equazione 1).

Si verifica perciò una relazione inversa tra le prestazioni ed il rapporto segnale rumore, per la quale è necessario trovare un giusto *trade-off*.

Tipici valori dell'SNR di OCT attuali sono 95dB; significa che il sistema è sensibile ad un segnale con intensità riflessa o retrodiffusa fino a 95dB più piccole del segnale incidente.

La sensibilità specifica quindi la più alta attenuazione rilevabile nel campione (ossia la più piccola riflessione di ritorno). Lo *shot noise* nel rivelatore, causato dalla luce proveniente dal percorso ottico del segnale di riferimento, limita fundamentalmente la sensibilità. Specialmente per grandi velocità di *imaging*, sono obbligatori laser con piccola ampiezza relativa al rumore (RIN), perché i fotoricevitori ad alta velocità hanno un guadagno minore rendendo necessari livelli maggiori di energia nel braccio di riferimento per ottenere un guadagno totale sufficiente per il segnale campione. Per evitare rumore eccessivo, sono necessari laser con una buona performance RIN, come i laser FDML, per avere un limitato *shot noise*. Per una buona qualità delle immagini nelle applicazioni biomedicali la sensibilità deve essere, come detto, >95dB.

3.2.2 Range dinamico

Il range dinamico è il rapporto nella potenza del segnale tra la più forte e la più debole riflessione che può essere misurata contemporaneamente con un A-scan. Le immagini biomediche OCT hanno un range dinamico di ~35dB, così un sistema OCT deve fornire 40-50dB.

3.2.3 Risoluzione Spaziale

Per quanto riguarda la risoluzione possiamo distinguere quella *assiale* e quella *trasversale*. La prima rappresenta la precisione con cui può essere misurata una distanza, ed è inversamente proporzionale all'ampiezza di banda della lunghezza d'onda della sorgente luminosa ($\Delta\lambda$), ed è definita come:

$$\Delta z = \left(\frac{2 \ln 2}{\pi} \right) \cdot \left(\frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \right)$$

Risulta evidente che la risoluzione assiale è strettamente collegata alla lunghezza di coerenza della fonte luminosa che, come si è già visto, è in relazione di proporzionalità inversa con l'ampiezza di banda.

Tipicamente per l'OCT si utilizzano radiazioni elettromagnetiche di lunghezza d'onda di 840-880nm o 1310nm e un'ampiezza di banda in lunghezza d'onda a partire da circa 40nm, ottenendo una risoluzione assiale pari circa a 5 μ m.

E' inoltre necessario specificare che esistono due tipologie di *risoluzione assiale*: ottica e digitale. La prima è legata alle prestazioni del sistema ottico di lenti utilizzato per produrre l'immagine, mentre la seconda dipende dal tipo di ricostruzione digitale basata su diverse scansioni laser effettuate sul tessuto in esame e poi sovrapposte, mediando i risultati ottenuti. In prima approssimazione si può assumere la risoluzione digitale numericamente metà di quella ottica.

La risoluzione trasversale, invece, deriva dai principi della microscopia ottica convenzionale e corrisponde all'ampiezza dello spot luminoso (Δx) risultante dalla focalizzazione della radiazione elettromagnetica incidente:

$$\Delta x = \left(\frac{4\lambda}{\pi} \right) \cdot \left(\frac{f}{d} \right)$$

Dove con f/d è indicato il rapporto tra la lunghezza focale della lente e d diametro del raggio ottico incidente.

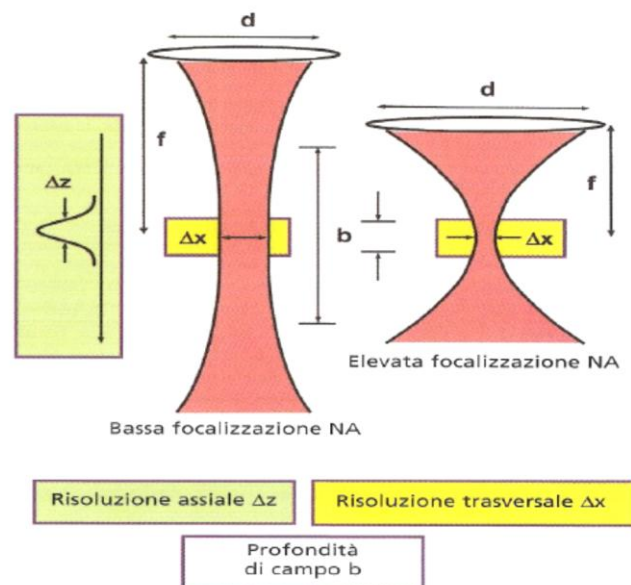


Figura 8: Risoluzione di immagine nella OCT. La risoluzione trasversale Δx è determinata dal diametro trasversale dello spot luminoso. La risoluzione assiale o longitudinale Δz è data dalla lunghezza di coerenza della sorgente luminosa

Quindi la larghezza dello *spot* può essere regolata facendo variare opportunamente il diametro del raggio e la lunghezza focale, come mostra Figura 8.

Esiste inoltre un parametro confocale b , che determina la profondità di campo:

$$b = \pi \cdot \frac{(\Delta x^2)}{2\lambda}$$

Minore è l'ampiezza dello spot luminoso (maggiore risoluzione trasversale), più ridotta risulta la profondità del fuoco.

Generalmente nelle applicazioni OCT è preferibile avere una grande profondità di campo (maggiore della lunghezza di coerenza) a discapito del grado di focalizzazione, garantendo comunque un'elevata risoluzione assiale.

La risoluzione spaziale di uno strumento OCT è differente in base alla grandezza e alla densità dei pixel che costituiscono l'immagine prodotta. L'immagine deve avere una sufficiente densità di pixel al fine di riuscire a visualizzare disomogeneità di dimensioni ridotte con una data risoluzione.

La Figura 9 mostra una descrizione schematica della densità e della grandezza dei pixel nelle direzioni assiale e trasversale.

Il numero di pixel nella direzione trasversale è dato dal numero di scansioni assiali eseguite; dati N_x pixel trasversali ed una lunghezza di scansione L_x ogni pixel avrà una larghezza pari a L_x/N_x . Per sfruttare appieno la risoluzione dello strumento occorre che tale dimensione sia inferiore alla risoluzione trasversale.

La misura in profondità di un pixel è invece legata alla velocità di acquisizione dell'immagine ad opera del sistema di conversione analogico/digitale; dati N_z pixel assiali ed una profondità assiale L_z ogni pixel avrà una profondità pari a L_z/N_z .

Un tempo di indagine rapido in applicazioni cliniche riduce la possibilità di acquisire immagini ricche di artefatti da movimento nonché riduce il tempo di esame per il paziente.

Il tempo di acquisizione è strettamente legato alla sensibilità dello strumento di misura; aumentando la velocità di acquisizione di un'immagine si provoca una forte diminuzione dell'SNR, a causa dell'aumento dell'ampiezza di banda equivalente del rumore (indicata con NEB nell'equazione 3) .

Il rendimento potrebbe essere migliorato aumentando la potenza del segnale rilevato P ; tuttavia esistono norme che fissano dei limiti di potenza ed esposizione del paziente a

radiazione laser. E 'quindi necessario trovare un giusto compromesso tra la qualità dell'immagine ottenuta e l'intensità luminosa incidente sicura per il paziente.

Il tempo di acquisizione aumenta anche all'aumentare del numero dei pixel trasversali. Se uno strumento OCT effettua misure di profondità con N_x scansioni assiali ad una frequenza

R , avremo un tempo di acquisizione $T = \frac{N_x}{R}$.

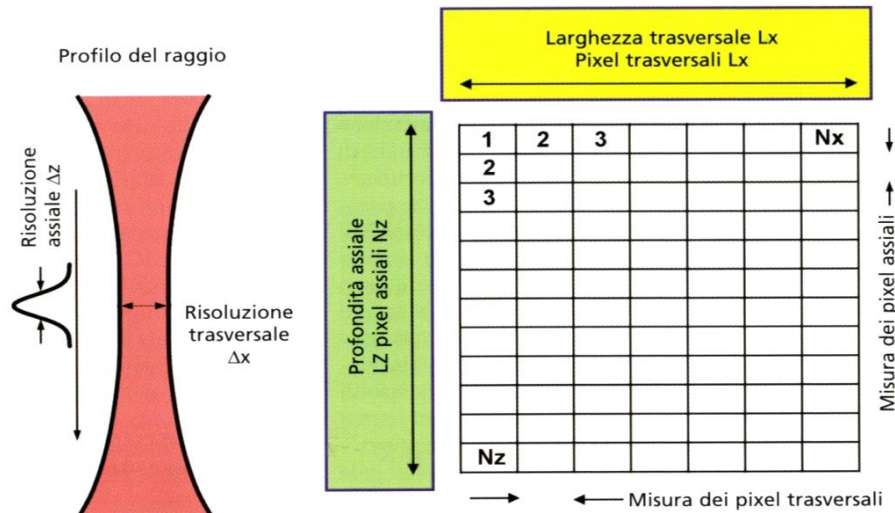


Figura 9: Risoluzione di immagine e densità dei pixel. Il numero e la misura dei pixel in direzione trasversale sono determinati dal numero di scansioni assiali. Il numero dei pixel in direzione assiale è determinato dalla velocità di acquisizione dei dati al computer

I dispositivi OCT commercializzati oggi posseggono una frequenza di decine di migliaia di scansioni assiali per secondo, consentendo l'acquisizione di immagini ad elevata densità di pixel in un tempo brevissimo. Se ad esempio si vuole ricostruire un'immagine di 1024 pixel trasversali, sarà necessario un tempo T di alcune decine di millisecondi.

3.2.4 Velocità di *imaging*

La *velocità di imaging* in OCT può essere definita come il numero di scansioni in profondità (A-scan) al secondo, numero di frame al secondo (B-scan) o il numero di voxel al secondo. Quale di questi valori ha più o meno senso usare in una specifica situazione dipende dal protocollo di scansione e dal setup dell'*imaging*; per esempio, nella microscopia a coerenza ottica (OCM), si usa la velocità di frame *en face* piuttosto che la velocità di A-scan per secondo. In SS-OCT per valutare l'effettiva velocità di acquisizione dei voxel non basta basarsi sulla velocità di campionamento del convertitore Analogico Digitale.

Nella maggior parte dei casi, la velocità OCT è caratterizzata dalla velocità di scansione assiale in profondità (A-scan rate o velocità di linea). Per i sistemi SS-OCT, la velocità di *imaging* è data dalla velocità di ripetizione dello spazzolamento, e per SD-OCT dalla velocità con cui il dispositivo di rivelazione, CCD (*Charge-Coupled Device*), acquisisce i dati. Sebbene la velocità di acquisizione sia indubbiamente importante, da sola non è sufficiente a caratterizzare la velocità di *imaging*: per esempio, la maggior parte dei dispositivi di scansione in linea, come CCD, possono essere usati a maggiori velocità se si impiegano meno pixel, ma questo non significa che l'*imaging* OCT sia diventato più rapido. Significa semplicemente che la risoluzione assiale e/o il range dell'*imaging* è sacrificato per ottenere una velocità di scansione assiale maggiore. La quantità di informazioni estratte nel tempo resta praticamente costante. Lo stesso discorso vale quando raddoppiamo la velocità di spazzolamento in un sistema SS-OCT senza andare ad incrementare anche la larghezza di banda di rilevamento analogo. Poiché l'obiettivo principale dell'*imaging* OCT è quello di estrarre informazioni volumetriche da un campione e rappresentarle come un dataset 2D/3D fatto di pixel/voxel, la misura più significativa per la velocità di *imaging* OCT è la quantità di informazioni nel tempo, cioè la *2D pixel rate* (P) e la *3D voxel rate* (V):

$$P = \frac{N_p}{T_2}, \quad V = \frac{N_v}{T_3}$$

dove T_2 è il tempo richiesto per acquisire un dataset 2D (B-frame) che consiste di N_p pixel e T_3 è il tempo richiesto per acquisire un dataset 3D completo consistente di N_v voxel e che include *duty cycles* e tempi morti ridotti (ad esempio causati dalla agilità limitata dell'ottica del fascio di scansione e il *turning time* degli scanner galvanometri, ecc.). Per un B-frame con N_a scansioni in profondità e per un volume 3D composto da N_b B-frames, è semplice definire:

$$N_p = N_a \cdot Z \quad N_v = N_p \cdot N_b = N_a \cdot N_b \cdot Z$$

con Z numero di elementi di risoluzione per scansione in profondità. Si deve prestare attenzione a quali pixel e voxel infine portino informazione utile: il roll-off di performance del laser e il setup di rivelazione limitano il valore massimo di Z . Per maggiori profondità di *imaging* in SS-OCT, il segnale rilevato diminuisce a causa di vari fattori, tra cui le

limitazioni nella larghezza di banda rilevabile dovute al fotodiodo, all'amplificatore a transimpedenza e al sistema di acquisizione dei dati.

Sebbene i buoni sistemi OCT abbiano un range dinamico di ~50-60dB, le immagini OCT nelle applicazioni biomediche tipicamente hanno un range dinamico di ~30-40dB. Le immagini OCT sono solitamente viste in scala logaritmica perciò per molti campioni biomedici OCT ha senso definire la profondità di roll-off a 20dB (metà del range dinamico in scala logaritmica).

Per i sistemi SS-OCT a scansione continua la *pixel* e *voxel rate* di un sistema si può ottenere in modo particolarmente semplice osservando la frequenza f limite dell'interferometro ad alcuni valori specifici di roll-off. Introducendo la soglia di 20dB di cui sopra, la frequenza corrispondente è assunta essere la più alta frequenza recante informazione in grado di fornire una frequenza di campionamento almeno doppia. La *pixel rate* è quindi uguale a questa frequenza limite e la *voxel rate* è la *pixel rate* moltiplicata con il ciclo di lavoro dell'acquisizione 3D (frazione di tempo spesa per acquisire i dati). Questa semplice relazione non introduce errori significativi perché f_{20dB} è la più alta frequenza che effettivamente porta informazioni ([5])

$$Z = \frac{f_{20dB}}{f_{sweep}} \quad \text{e} \quad f_{sweep} = \frac{N_a}{T_2}$$

In altre parole, poiché f_{20dB} è la maggior frequenza recante informazione, si richiede una velocità di campionamento di $2 \cdot f_{20dB}$ (teorema del campionamento di Nyquist) e dopo la FFT rimangono,

$$Z = \frac{\left(\frac{2 \cdot f_{20dB}}{f_{sweep}} \right)}{2}$$

elementi di risoluzione. Un eventuale *zero padding* (aumentare il numero di campioni aggiungendone di fittizi quanto basta per ottenere una buona descrizione dello spettro) o un campionamento più veloce incrementano il numero di campioni ma non il numero di informazioni che portano gli elementi di risoluzione Z .

Come esempio, un sistema SS-OCT potrebbe raggiungere una velocità bidirezionale di scansione di 2x50kHz e una profondità spettrale di 100nm usando un fotorivelatore a

350MHz connesso con un convertitore Analogico Digitale a 1GS/s. Dopo la trasformata di Fourier, ogni A-scan consisterà di $10\mu\text{s}/1\text{ns}/2=5000$ campioni, suggerendo $Z=5000$, e una *pixel rate* di $2\cdot 50000\text{kHz}\cdot 5000=500\text{MPixels/s}$. Tuttavia, una delle direzioni di spazzolamento delle lunghezze d'onda potrebbe non venire usata e la performance di roll-off della sorgente potrebbe limitare la più alta frequenza limite utilizzabile a 250MHz, riducendo l'effettiva *pixel rate* a 125MPixels/s. La *voxel rate* potrebbe ancora essere minore della pixel rate a causa dei ritardi introdotti dall'ottica di scansione. Così, si deve considerare non solo la velocità di campionamento del ADC, ma anche l'intera performance del setup.

Allo stesso modo, per calcolare la *pixel rate* a 20dB per i sistemi OCT basati su spettrometro (SD-OCT), non si deve usare il numero totale dei pixel della CCD. I pixel rilevanti sono solo quelli che coprono lo spettro della sorgente luminosa, e si deve usare il numero di pixel equivalente richiesto per risolvere la profondità di roll-off a 20dB quando si va a stimare il numero di pixel che portano informazione al secondo, P_{20dB} .

3.2.5 Roll-off di Performance

Il roll-off di performance determina il decremento della potenza del segnale OCT con l'aumentare della profondità, causato sia dalla limitata lunghezza di coerenza istantanea della sorgente di luce applicata in SS-OCT sia dalla risoluzione globale limitata dello spettrometro in SD-OCT. Sebbene dipenda dal campione, come regola empirica, un buon sistema OCT dovrebbe avere valori di roll-off di 20dB o meno oltre una profondità di 2mm.

3.3 Confronto con altre tecnologie di *imaging*

L'*imaging* OCT è simile all'ecografia B-mode a differenza del fatto che utilizza la radiazione luminosa invece del suono. A causa delle analogie tra OCT ed ecografia, è utile cominciare a considerare i fattori che caratterizzano l'*imaging* OCT rispetto all'*imaging* con ultrasuoni. Per ottenere immagini tomografiche o *cross sectional*, è innanzi tutto necessario misurare le strutture interne dei materiali o dei tessuti biologici lungo una unica dimensione assiale o trasversale. In OCT il primo passo per costruire immagini tomografiche è misurare la distanza assiale delle diverse interfacce presenti nel tessuto. Ci sono diversi modi di implementare OCT, ma in sostanza OCT crea immagini misurando il

ritardo temporale di eco e l'intensità della luce retrodiffusa e retroriflessa dalle microstrutture interne di materiali o tessuti.

Le immagini OCT sono data-set bi o tridimensionali che rappresentano le differenze di diffusione o riflessione in piani o volumi trasversali.

L'*imaging* ad ultrasuoni è una pratica ben radicata in clinica e viene utilizzata in un ampio range di applicazioni che vanno dall'*imaging* di sistemi di organi interni, *imaging* transluminale endoscopico, e *imaging* intravascolare basato su catetere. In ecografia, un suono ad alta frequenza viene inviato al tessuto o al materiale da analizzare attraverso una sonda trasduttore a ultrasuoni. L'onda sonora viaggia nel materiale o nel tessuto e viene riflessa o retro diffusa dalle strutture interne che hanno diverse proprietà acustiche. La frequenza dell'onda sonora determina la risoluzione dell'immagine in ecografia, il che vuol dire che a frequenze maggiori corrisponde una migliore risoluzione. Tuttavia, durante la propagazione l'onda sonora viene attenuata e le alte frequenze riducono la profondità di *imaging*. Il comportamento temporale o la struttura dell'eco delle onde sonore riflesse vengono rilevate da una sonda a ultrasuoni e il range e la dimensione delle strutture interne determinata dal ritardo dell'eco.

In OCT, le misure di distanza e di microstrutture sono fatte attraverso radiazioni ad opportuna lunghezza d'onda che vengono riflesse e retrodiffuse da diverse microstrutture specifiche nel materiale o nel tessuto. È importante notare che sebbene OCT possa essere implementato usando brevi impulsi ottici, la maggior parte dei sistemi OCT funziona in continua.

Quando un fascio sonoro o luminoso è diretto a un tessuto, esso viene retroriflesso e retrodiffuso dalle strutture che hanno proprietà acustiche e ottiche diverse. La dimensione delle disomogeneità può essere determinata attraverso la misura del tempo di eco che il suono o la luce impiegano per essere riflesse o retrodiffuse dalle diverse strutture a varie distanze assiali (longitudinali). In ecografia, le misure assiali di distanza o il range vengono chiamate scansioni A-mode.

La principale differenza tra l'ecografia e l'*imaging* ottico è il fatto che la velocità di propagazione della luce è circa un milione maggiore di quella del suono. Poiché le distanze

all'interno del materiale o del tessuto vengono determinate attraverso la misura del ritardo temporale di eco delle radiazioni elettromagnetiche riflesse e retrodiffuse, questo implica che le misure di distanza che utilizzano la luce richiedono una risoluzione temporale molto alta.

Due dei più importanti parametri per caratterizzare la performance dell'*imaging* sono la risoluzione dell'immagine e la profondità di *imaging*.

La risoluzione dell'*imaging* ad ultrasuoni dipende direttamente dalla frequenza delle onde sonore che vengono impiegate, per i tipici sistemi clinici a ultrasuoni, tali frequenze si aggirano attorno ai 10MHz e portano una risoluzione spaziale di 150 μ m. L'*imaging* a ultrasuoni ha il vantaggio che le onde sonore a questa frequenza sono trasmesse rapidamente nella maggior parte dei tessuti biologici e quindi è possibile ottenere immagini di strutture che si trovano fino a decine di centimetri in profondità nel corpo. La frequenza del suono è un parametro importante nell'*imaging* a ultrasuoni perché è possibile ottimizzare la risoluzione dell'immagine per una data applicazione nel momento in cui le immagini in profondità peggiorano. L'ecografia ad alta frequenza è stata sviluppata e ampiamente studiata per applicazioni in laboratorio e anche cliniche. Con frequenze di 100MHz o più, si sono raggiunte risoluzioni dai 15 ai 20 μ m. Tuttavia, l'ecografia ad alta frequenza è fortemente attenuata nei tessuti biologici e l'attenuazione aumenta progressivamente in proporzione alla frequenza. Quindi, l'*imaging* tramite ecografia ad alta frequenza è limitato ad una profondità di pochi millimetri. È anche importante notare che la risoluzione trasversale dell'ecografia è governata dalla capacità di focalizzare le onde sonore e in generale il suono è più difficile da focalizzare rispetto alla luce, e così la risoluzione trasversale dell'ecografia è minore rispetto a quella di OCT.

Infine, è utile specificare che OCT, ecografia e microscopia hanno diversi meccanismi di contrasto nelle immagini. Le immagini ecografiche si basano sulle differenze di impedenza acustica nei diversi tessuti. Questo genera differenze di intensità nelle onde sonore riflesse o retrodiffuse. L'*imaging* OCT usa la luce ed è sensibile alle differenze dell'indice di rifrazione tra i diversi tessuti. Infine, in microscopia, le immagini vengono generate o in base alla riflessione o alla trasmissione ottica attraverso sottili sezioni del campione in esame. In istopatologia, si possono usare una grande quantità di coloranti per aumentare in modo selettivo il contrasto in diverse strutture. Quindi, l'aspetto delle immagini OCT è, in

generale, diverso sia da quelle ecografiche o istopatologiche e sono necessari degli studi per stabilire una base per l'interpretazione delle immagini OCT in termini di patologie clinicamente rilevanti.

4 FUNZIONAMENTO E IMPLEMANTAZIONE DEI SISTEMI OCT

4.1 Principi di funzionamento e tecnologia dei sistemi OCT

Poiché la velocità della luce è estremamente alta, il ritardo di tempo dell'eco non può essere misurato direttamente da sistemi elettronici come avviene, ad esempio, in ecografia. La velocità del suono in acqua è di circa 1500m/s mentre quella della luce in aria è di circa $3 \cdot 10^8$ m/s. Distanze o informazioni spaziali si possono determinare dai ritardi temporali degli echi riflessi secondo la formula $\Delta T = z/v$ dove ΔT è il ritardo di eco, z è la distanza che compie l'eco, e v è la velocità dell'onda sonora o dell'onda luminosa. La misura di distanze con risoluzioni dell'ordine dei 100 μm , che sarebbe tipica per l'ecografia, corrisponde ad una risoluzione temporale di circa 100 ns. I ritardi temporali degli eco associati alla luce sono estremamente rapidi. Per esempio, la misura di una struttura con una risoluzione nella scala dei 10 μm , che è tipica per OCT, corrisponde ad una risoluzione temporale di circa 30 fs. Su questa scala temporale non è possibile una rilevazione elettronica diretta. Invece, è necessario utilizzare tecniche legate alla correlazione o all'interferometria ([21]).

Un metodo per misurare il ritardo temporale dell'eco luminoso è quello di utilizzare l'interferometria a bassa coerenza, la cui prima applicazione fu in oftalmologia per ottenere misure precise della lunghezza assiale dell'occhio e dello spessore della cornea.

L'interferometria a bassa coerenza misura i ritardi temporali dell'eco e l'intensità della radiazione diffusa confrontando questa con la radiazione luminosa che ha viaggiato attraverso un noto percorso di riferimento e un noto ritardo temporale. Le misure sono fatte usando un interferometro di Michelson.

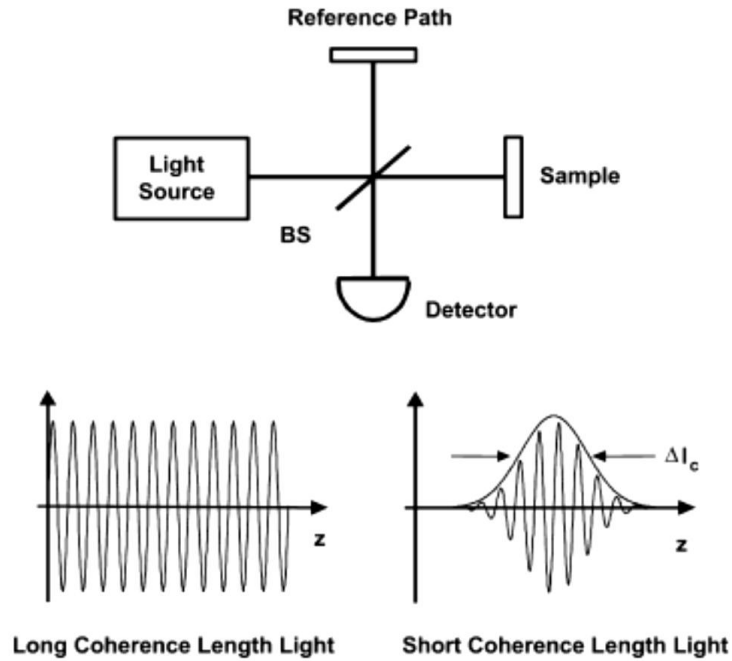


Figura 10: Interferometro di Michelson (in alto) ed esempi di onde a lunghezza di coerenza lunga o breve

La luce proveniente dalla sorgente viene mandata ad un *Beam Splitter* e uno dei fasci va a colpire il campione da esaminare, mentre il secondo fascio viaggia lungo il percorso di riferimento con lunghezza di percorso variabile e variabile ritardo temporale. La luce retrodiffusa dal campione interferisce con la luce riflessa dal braccio di riferimento e rilevata con un fotorivelatore in uscita dall'interferometro. Se la sorgente di luce è coerente, allora si osserveranno delle frange di interferenza nel momento in cui variano le lunghezze di percorso relative. Tuttavia, se si usa luce a bassa coerenza o a brevi impulsi, allora l'interferenza della luce riflessa dal campione e dal riferimento possono avvenire solo quando le due lunghezze di percorso si incontrano all'interno della lunghezza di coerenza della radiazione. Il ritardo temporale di eco e l'intensità della luce retrodiffusa da vari siti all'interno del campione si possono misurare rilevando e demodulando l'interferenza in uscita dall'interferometro mentre si scansiona la lunghezza del percorso di riferimento.

La figura 11 illustra in modo schematico come OCT ottiene immagini in sezione trasversale. Il fascio ottico è focalizzato sul campione da analizzare, e vengono misurati il ritardo temporale dell'eco e l'intensità della luce retrodiffusa per ottenere un profilo di diffusione assiale. Il fascio incidente è poi scansionato nella direzione trasversale, e il profilo di diffusione assiale è misurato in corrispondenza di diverse posizioni trasversali

per ottenere un dataset bidimensionale. Questo dataset rappresenta la diffusione ottica attraverso sezioni trasversali del tessuto. I dati vengono visualizzati in scala logaritmica di grigi o con immagini a colori.

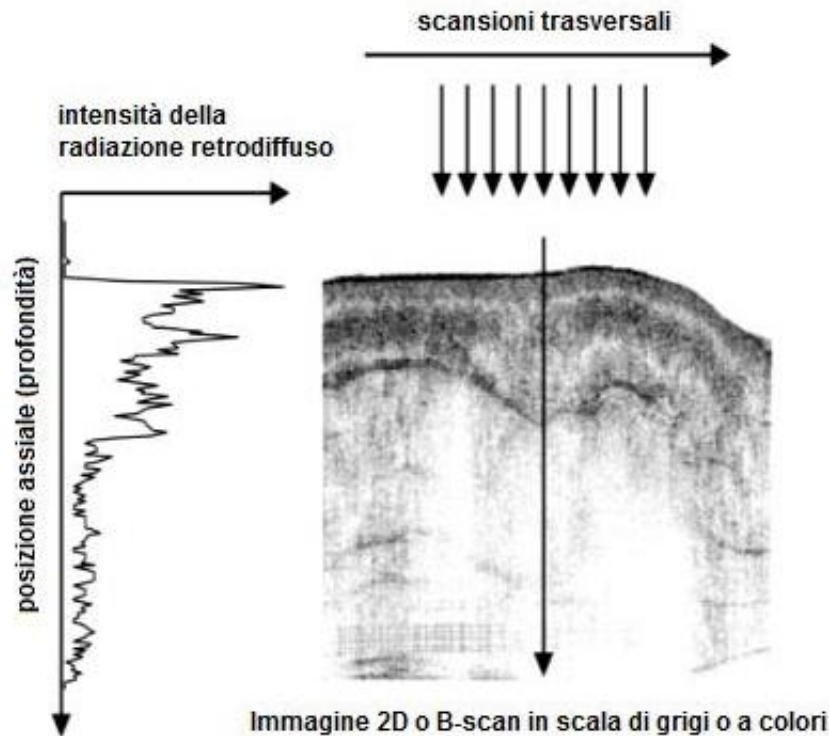


Figura 11: Le immagini tomografiche sono costruite attraverso misure del ritardo temporale dell'eco dell'onda luminosa a diverse posizioni trasversali. I risultati sono dataset bidimensionali che rappresentano la retrodiffusione in piani tomografici del tessuto. Questi dati possono essere mostrati in scala di grigi o con immagini a colori.

In contrasto alla microscopia convenzionale, i meccanismi che regolano la risoluzione assiale e trasversale in OCT sono disaccoppiati. La risoluzione assiale delle immagini OCT è determinata dalla lunghezza di coerenza della sorgente di luce così che si può ottenere un'alta risoluzione indipendentemente dalle condizioni di focalizzazione del fascio. Il segnale di interferenza ricevuto in uscita dall'interferometro rappresenta l'autocorrelazione in campo elettrico della sorgente di luce. La lunghezza di coerenza è la ampiezza spaziale del campo di autocorrelazione. In aggiunta, l'involuppo del campo di autocorrelazione è equivalente alla trasformata di Fourier dello spettro di potenza. Quindi, l'ampiezza della funzione di autocorrelazione, o la risoluzione assiale, è inversamente proporzionale all'ampiezza dello spettro di potenza. Per una sorgente con distribuzione spettrale gaussiana, la risoluzione assiale Δz è:

$$\Delta z = \left(\frac{2 \ln 2}{\pi} \right) \cdot \left(\frac{\lambda^2}{\Delta \lambda} \right)$$

Dove $\Delta \lambda$ rappresenta l'ampiezza in lunghezza d'onda dello spettro della sorgente impiegata e λ è la lunghezza d'onda centrale della sorgente. Si noti da questa formula che spostando la lunghezza d'onda centrale a valori maggiori si perde in risoluzione, e questo è il motivo per cui in OCT non si impiegano lunghezze d'onda superiori ai 1310nm, anche se queste sarebbero in grado di penetrare maggiormente il tessuto.

Uno dei vantaggi di OCT è che può essere implementato usando componenti compatti a fibre ottiche e integrato con un ampio range di strumenti medicali. La figura 12 mostra un sistema schematico di OCT che impiega un interferometro di Michelson a fibre ottiche, una sorgente di luce a bassa coerenza, e un fotodiodo per la rivelazione del segnale utile.

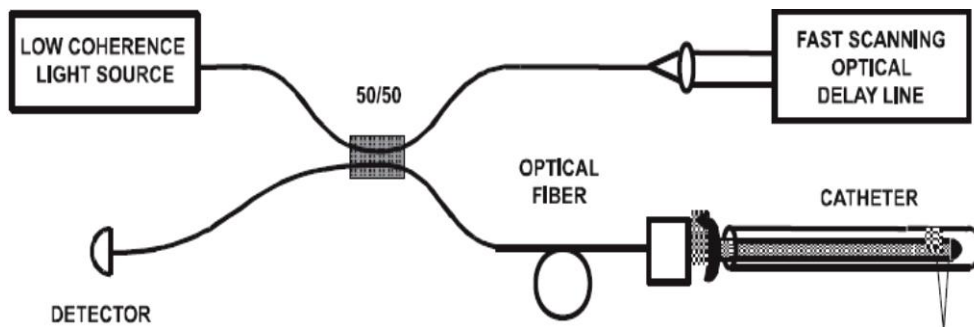


Figura 12: Schema di uno strumento OCT basato su un'implementazione tramite fibra ottica dell'interferometro di Michelson. Un braccio dell'interferometro è interfacciato con lo strumento di misura e l'altro braccio ha uno scanner ottico per linee di ritardo. Il sistema mostrato in figura viene impegnato per *imaging* ad alta velocità basato su cateteri/endoscopi.

Per le applicazioni in campo di ricerca, si sono usati laser a brevi impulsi come sorgente di radiazione per l'*imaging* OCT poiché hanno lunghezza di coerenza estremamente corta e elevate potenze d'uscita, permettendo un *imaging* ad alta risoluzione e molto veloce. Molti studi sono stati effettuati con laser a brevi impulsi a Cr⁴⁺:Forsterite. Questo tipo di laser può avere una potenza in uscita di 100mW, generare impulsi molto brevi a lunghezze d'onda vicine ai 1300nm e produrre una larghezza di banda sufficiente per ottenere una risoluzione assiale dai 5 ai 10 μ m. Usando potenze incidenti nel range di 1-10mW, si ottengono velocità di acquisizione di immagini di vari frames al secondo e SNR di circa 100dB.

Per le applicazioni cliniche, rispetto a laser a brevi impulsi sono convenienti come sorgenti luminose diodi compatti a superluminescenza o basate su semiconduttori. Le sorgenti disponibili in commercio (*AFC Technology*, Hull, Quebec, Canada) operano a 1300nm e possono arrivare ad una risoluzione assiale di $\sim 15\mu\text{m}$ con potenze in uscita di 5-10mW, sufficienti per l'*imaging* OCT in tempo reale.

Diverse caratteristiche fanno di OCT una tecnologia ideale per l'*imaging* biomedico:

1. OCT può ottenere immagini con risoluzioni assiali da 1 a 15 μm , uno o due ordini di grandezza in più rispetto all'ecografia convenzionale. Questi valori si avvicinano a quelli dell'istopatologia, permettendo di risolvere morfologie particolari ed alcune caratteristiche cellulari. Diversamente dagli ultrasuoni, l'*imaging* può essere fatto direttamente attraverso l'aria senza richiedere un contatto diretto con il tessuto o un mezzo di trasduzione.
2. L'*imaging* può essere fatto in tempo reale, senza bisogno di analizzare il campione come nella normale biopsia e istopatologia, monitorando il decorso delle patologie direttamente sullo schermo e immagazzinando video ad alta risoluzione, ciò permette ad esempio che OCT possa essere una guida per interventi chirurgici.

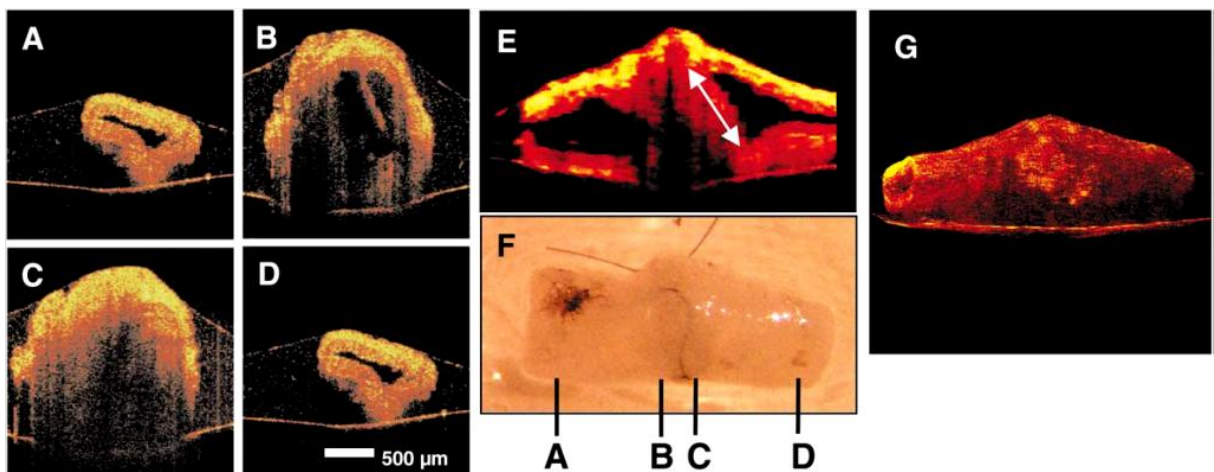


Figura 13: Immagini OCT di anastomosi in arteria di coniglio (1mm) fatta con sutura continua (F). Le linee indicano i piani di *imaging* OCT. (A,D) Estremità opposte dell'anastomosi che mostrano le strutture multi-stratificate dell'arteria con un lumen evidente. (B) Lumen parzialmente ostruito e presenza di lembo trombo genico. (C) Porzione completamente ostruita del sito dell'anastomosi. (G) Proiezione tridimensionale che può essere ricostruita da punti di vista arbitrari.

3. L'*imaging* può essere fatto *in situ*, senza la necessità di sezionare il campione. Questo permette di ottenere immagini di strutture per le quali la biopsia sarebbe azzardata o impossibile, riducendo gli errori di campionamento associati alla biopsia escissionale.

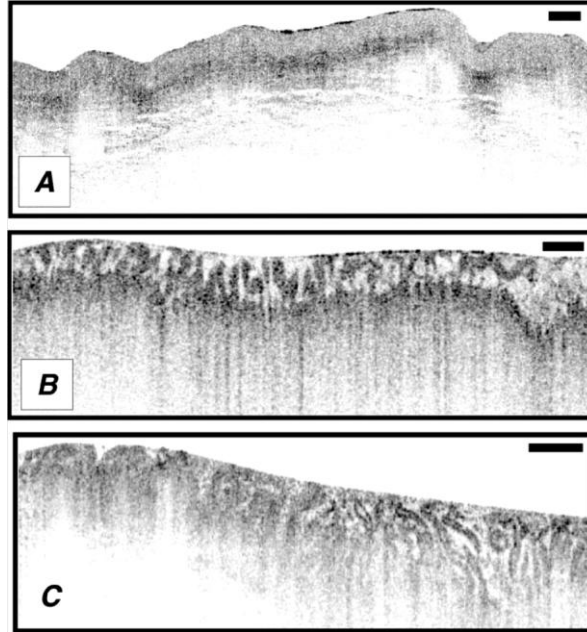


Figura 14: Immagini OCT in vitro del tessuto gastrointestinale umano e patologico. (A) Struttura squamosa del tessuto esofageo normale; (B) Tessuto normale del colon con le caratteristiche cripte; (C) carcinoma ampollare che porta alla distruzione della struttura normale dell'epitelio; il carcinoma è sulla sinistra dell'immagine. Queste immagini mostrano la capacità di OCT di discriminare l'architettura morfologica dei tessuti al fine di rilevare eventuali cambiamenti neoplastici.

4. OCT utilizza fibre ottiche e si può interfacciare ad un ampio range di strumenti come cateteri, endoscopi, laparoscopi, e sonde chirurgiche permettendo un *imaging* di sistemi all'interno del corpo minimamente invasivo.

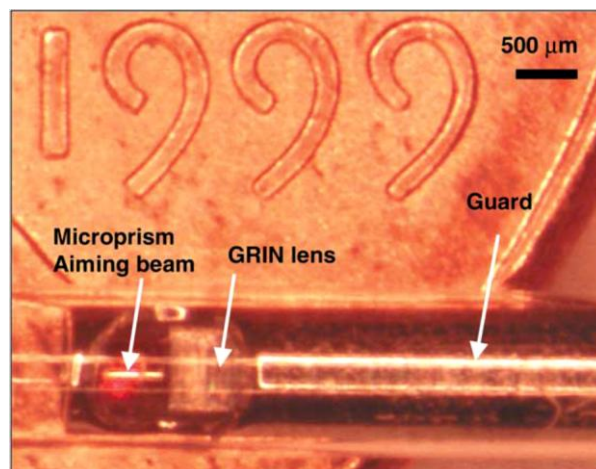


Figura 15: Fotografia di un prototipo di catetere OCT per l'*imaging* trasversale, intraluminale. Il diametro del catetere è di 1mm.

5. OCT è un sistema compatto e portatile, caratteristica importante per i dispositivi clinici.

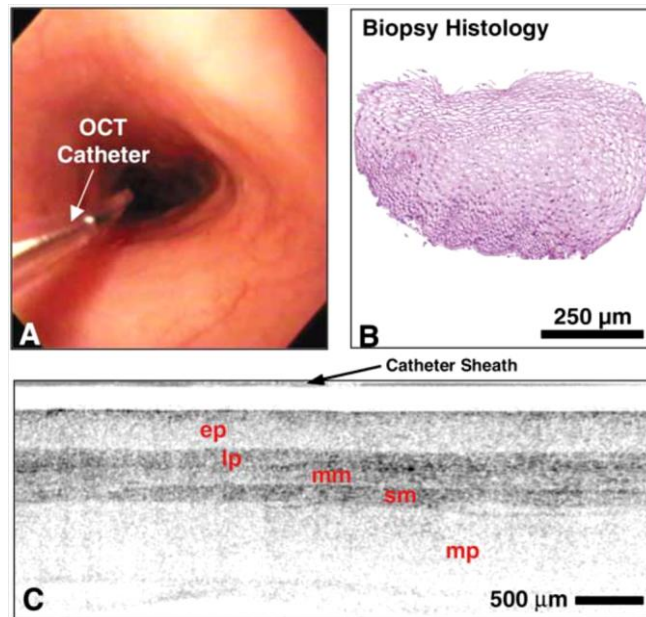


Figura 16: *Imaging* clinico endoscopico OCT dell'esofago normale impiegando scansione lineare. (A) Immagine video endoscopica di una regione normale. (B) Istologia da biopsia del normale epitelio squamoso. (C) Immagine OCT del normale epitelio squamoso con le strutture dei relativi strati uniformi e distinte.

L'*imaging* tramite OCT è applicato ad ampio raggio in oftalmologia da più di 15 anni, grazie alla sua abilità di visualizzare le strutture oculari con un'alta risoluzione. Da allora OCT ha compiuto notevoli passi avanti. All'inizio fu utilizzata per ottenere *in vivo* sezioni ottiche trasversali del segmento anteriore, per analizzare malattie della retina (distacco e perforazione della macula, membrana epiretinale, edema maculare, e corioretinopatia centrale idiopatica seria). Le sezioni OCT furono utilizzate anche per valutare il disco ottico e le strutture della retina, come il fascio nervoso della retina (RNFL).

Il primo sistema clinico era limitato ad una velocità di scansione di 400 scansioni assiali (A-scan)/s a causa di dell'impedimento fisico causato dallo specchio di riferimento mobile impiegato per ottenere segnali A-scan a differenti profondità nel campione del tessuto. Questo primo approccio viene chiamato *time-domain* TD-OCT poiché si ottengono direttamente segnali codificati nel tempo. Diversi miglioramenti nell'hardware OCT sono stati introdotti da quando il primo sistema TD-OCT commerciale fu reso disponibile. I due principali avanzamenti introdotti nei sistemi commerciali sono stati una migliore risoluzione assiale e l'aumento della velocità di scansione.

L'implementazione di una sorgente di luce a larga banda nel OCT ha portato la risoluzione assiale da $\sim 10\mu\text{m}$ a $2\mu\text{m}$ nel tessuto. Anche la velocità di acquisizione è migliorata considerevolmente captando i segnali riflessi nel dominio della frequenza senza la necessità di avere delle parti meccaniche in movimento. Informazioni sulla frequenza sono acquisite con un sistema costituito da una sorgente di luce a larga banda, da un dispositivo a carica accoppiata o *charge-coupled camera* (CCD), e da uno spettrometro, o attraverso lo spazzolamento di una sorgente a banda stretta attraverso un ampio raggio di frequenze con un fotorivelatore. L'utilizzo di una sorgente a larga banda in OCT è noto come *spectral-domain* SD-OCT, mentre l'utilizzo di sorgenti a banda stretta ma in grado di spazzolare un ampio range di lunghezze d'onda, è lo *swept-source* SS-OCT. In entrambi i sistemi, i profili di intensità (A-scan) sono ottenuti utilizzando la trasformata di Fourier delle frequenze collezionate e questo facilita una veloce acquisizione A-scan. In aggiunta al miglioramento della velocità di scansionamento, OCT nel dominio della frequenza offre anche una maggiore sensibilità di ricezione.

Grazie a questi miglioramenti in velocità e sensibilità al giorno d'oggi, è ora possibile collezionare scansioni volumetriche del tessuto (3D), mentre nel passato, il tempo richiesto per fare ciò diveniva proibitivo. Sono state ottenute immagini della retina 3D a larga banda con SD-OCT alla velocità di 312.500 A-scan/s e SS-OCT a 249.000A-scan/s. Ad oggi, la maggior parte dei sistemi utilizzati in clinica operano ad una velocità di acquisizione di ~ 27.000 A-scan/s e con una risoluzione assiale dai 5 ai $6\mu\text{m}$ ([2]).

	Light Source	Ophthalmic System Commercially Available?	Primary Advantages	Primary Disadvantages
TD-OCT	Broadband width	Yes	Intensity information acquired in time domain; no complex conjugate image	Moving reference mirror required limiting acquisition rate
SD-OCT	Broadband width	Yes	No moving reference mirror required; higher sensitivity than TD-OCT; high scanning speed and axial resolution have been attained	Noticeable signal drop-off with depth
SS-OCT	Narrow band, swept through broad range	No	No moving reference mirror required; Higher sensitivity than TD-OCT; very high scanning speeds can be attained; minimal signal drop-off with depth	Most ophthalmic systems operating at longer wavel engths ($\lambda = 1-1.3 \mu\text{m}$), with lower axial resolution

Tabella 1: Confronto di sistemi TD, SD, e SS-OCT [2]

4.2 Sistemi OCT nel dominio del tempo

OCT fu sviluppata per la prima volta dal gruppo di Fujimoto al MIT circa 20 anni fa, ed il metodo si è evoluto divenendo una importante modalità di *imaging* clinico. Esso infatti permette di ottenere immagini ad alta risoluzione, le radiazioni emesse hanno potenze basse tali da poter utilizzare OCT anche in tessuti particolarmente sensibili, quale l'occhio; e l'utilizzo di fibre ottiche permette di operare all'interno del tratto gastrointestinale e nei vasi sanguigni maggiori. In aggiunta alcune strategie di *imaging* OCT più sofisticate possono fornire informazioni funzionali aggiuntive, come il flusso (attraverso l'OCT Doppler), l'organizzazione strutturale del tessuto (con OCT a birifrangenza), e la distribuzione spaziale di specifici agenti di contrasto (con OCT a contrasto molecolare).

Le applicazioni dell'OCT per ottenere immagini di altre parti corpo umano includono l'*imaging* del tratto gastrointestinale per la scoperta di tumori, il monitoraggio e la valutazione dei rischi di placche vulnerabili di grasso nel sistema vascolare, monitorare gli stent intracoronarici, e rintracciare debolezze strutturali connesse con la perdita dei denti. Le applicazioni OCT hanno reso possibile il monitoraggio dello sviluppo cardiaco in embrioni di pulcino, o lo studio dell'embrione di topo allo stadio di gastrula.

Tra il 2005 e il 2007, c'è stato un generale cambiamento nel metodo in cui la comunità dei ricercatori ha implementato l'*imaging* OCT, grazie alle scoperte legate all'incremento nella sensibilità dell'OCT, se questo viene sviluppato nel dominio della frequenza (*spectral domain* OCT) invece che nel dominio del tempo (*time domain* OCT). Questo aumento di sensibilità fornito da SD-OCT può essere sfruttato con una maggiore velocità di acquisizione di scansioni, una maggiore penetrazione in profondità, o per aumentare la sensibilità dei vari metodi di OCT funzionali.

In questa sezione viene descritto il percorso effettuato per passare dalla tecnologia OCT di analisi dell'interferenza nel dominio del tempo a quella nel dominio di Fourier, descrivendo i vantaggi portati dalla nuova tecnologia sulle immagini prodotte.

Come detto in precedenza, il modo con cui si riesce a rilevare l'intensità degli echi luminosi retrodiffusi è quello di utilizzare un interferometro. A partire da una sorgente luminosa a banda larga viene prodotto un raggio, che viene separato in due da uno specchio semiriflettente (BS, *Beam Splitter*). Una parte si dirige verso il tessuto, mentre l'altra va verso uno specchio di riferimento. I tessuti del campione esaminato producono

echi luminosi retrodiffusi che si combinano con il fascio luminoso di riferimento riflesso dallo specchio di riferimento.

L'intensità del segnale in uscita viene rilevata da un fotorivelatore. Questo è il tipico funzionamento di un TD-OCT (Time Domain OCT).

Un tipico sistema TD-OCT è rappresentato in figura 17 A. Per semplicità, assumeremo che la sorgente di luce abbia un profilo spettrale "a cappello" (k_0 è il numero d'onda medio, e Δk è la larghezza di banda spettrale in numero d'onda, si ricorda che il numero d'onda è l'inverso della lunghezza d'onda).

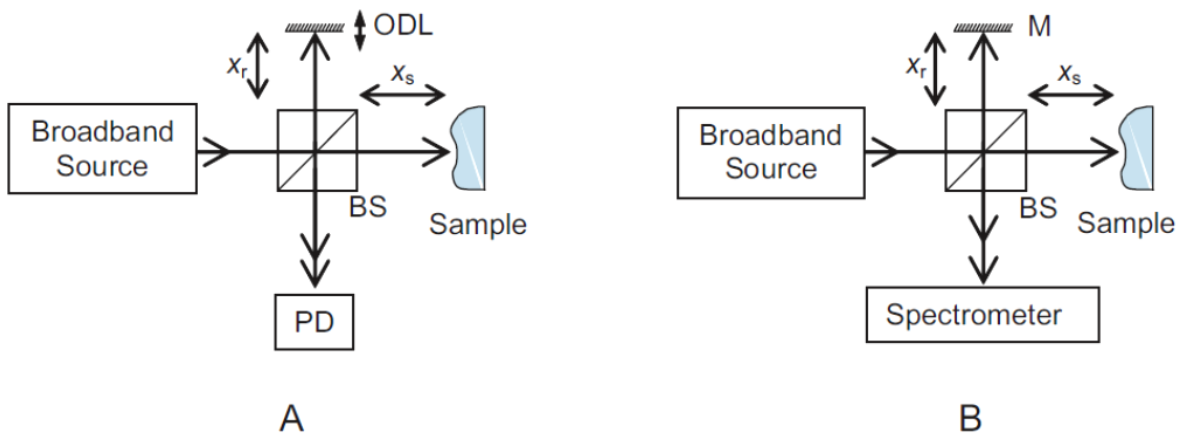


Figura 17: Rappresentazione di (A)TD-OCT e (B) SD-OCT. M, specchio; ODL, linea ottica di ritardo; PD, fotorivelatore; BS, beam splitter.

In tale sistema, il fascio di luce in ingresso viene diviso in due da un *beam splitter*. Una componente è diretta al campione, l'altra è mandata ad uno specchio di riferimento. I segnali riflessi e retrodiffusi sono poi combinati e rilevati da un fotorivelatore. Per ogni interfaccia di *backscattering* (retrodiffusione) data, si può derivare un'espressione per la potenza rilevata, $P_{detector}(k)$ ad un dato numero d'onda, k , che è:

$$P_{detector}(k) = P_{ref}(k) + P_{sig}(k) + 2\sqrt{P_{sig}(k)P_{ref}(k)} \cdot \cos(k2(x_r - x_s))$$

Dove $P_{ref}(k)$ e $P_{sig}(k)$ sono rispettivamente la potenza rilevata dal riferimento e dal campione alla lunghezza d'onda k , $(x_r - x_s)$ è la differenza nella lunghezza del braccio di riferimento e la distanza dell'interfaccia di interesse di *backscattering* del campione dal deviatore del fascio.

Si noti che il termine di interferenza (l'ultimo termine) ha un picco quando la lunghezza del braccio di riferimento combacia con la distanza dell'interfaccia di *backscattering*. La larghezza del picco del segnale di interferenza è data dalla lunghezza di coerenza; per ottenere una determinazione ben definita della posizione dell'interfaccia di *backscattering*, è desiderabile una lunghezza di coerenza breve o una larghezza di banda spettrale ampia dalla sorgente di luce. Rilevando i vari picchi di interferenza durante la scansione, si possono determinare la posizione e la potenza delle interfacce di *backscattering* all'interno del campione.

Immaginando una sorgente di luce pulsata, tutte le conclusioni sopradette diventano fisicamente intuitive. L'interferenza può avvenire solo quando i due bracci combaciano in lunghezza così che gli impulsi di ritorno possono arrivare al detettore nello stesso momento per interferire. Più stretto è l'impulso, e quindi, più larga è la larghezza di banda spettrale, migliore è la nostra capacità di localizzare l'interfaccia di *backscattering* in presenza di interfacce diffuse adiacenti.

Nel sistema TD-OCT, il braccio di riferimento è tipicamente disposto e scansionato ad una distanza uguale al range di profondità, x_{depth} , che si vuole esplorare nel campione.

In un TD-OCT (Figura 18) lo specchio di riferimento oscilla tra un minimo e un massimo per permettere di acquisire tutti gli echi alle varie profondità del tessuto; infatti, come detto in precedenza, si verifica un'interferenza solo se la distanza da cui proviene l'eco retrodiffuso è la stessa alla quale si trova lo specchio di riferimento rispetto al BS (Beam Splitter).

Definendo con l_c la lunghezza di coerenza della sorgente, con x_{depth} la massima escursione dello specchio di riferimento e con T il tempo totale di scansione per ottenere una B-scan, si può definire con

$$durata_acquisizione = \frac{l_c}{x_{depth}} \cdot T$$

la durata dell'acquisizione di un segnale di interferenza.

Una stima della sensibilità del sistema TD-OCT può essere fatta calcolando il numero di fotoni utili del segnale all'interno di quell'intervallo di tempo e confrontandolo col numero di fotoni che danno rumore, che stanno quindi al di fuori del piano a fuoco. Il numero

totale di fotoni utili del segnale di interferenza che sarà raccolto in questo contesto sarà dato da:

$$Signal_{TD-OCT} = 2\sqrt{P_{sig} P_{ref}} \frac{l_c T}{x_{depth}} \frac{\varepsilon}{h\nu}$$

dove ε è l'efficienza quantica (misura della efficienza di conversione) del rivelatore e $h\nu$ è l'energia quantica del fotone, con h costante di Planck.. Una valutazione quantitativa del rumore è dato dalla radice quadrata di tutti i fotoni rilevati dal detettore durante quell'intervallo di tempo. Siccome la potenza di riferimento P_{ref} tipicamente domina sugli altri segnali in TD-OCT, abbiamo:

$$Noise_{TD-OCT} = \sqrt{P_{ref} \frac{l_c T}{x_{depth}} \frac{\varepsilon}{h\nu}}$$

Le cifra di merito per la sensibilità convenzionale impiegata per la misura della prestazione OCT è il rapporto segnale-rumore (SNR), quantità data da:

$$SNR_{TD-OCT} = 10 \log \left(\frac{Signal_{TD-OCT}}{Noise_{TD-OCT}} \right)^2 = 10 \log \left(4P_{sig} \frac{l_c T}{x_{depth}} \frac{\varepsilon}{h\nu} \right)$$

Questa cifra di merito è simile al fattore di sensibilità limitata per lo *shot noise* che si può derivare dalla rilevazione diretta dei fotoni con un rivelatore ideale, ossia privo di fonti di rumore. Nel campo dell'OCT, c'è un'altra interpretazione. Per esempio, un sistema OCT che ha un SNR di 110dB implica che esso è sensibile ad un interfaccia riflettente dal campione che ritorna tutta o più di 1 parte su 10^{11} della luce incidente. Il tipico SNR di un sistema OCT può variare a seconda dei parametri di scansione di interesse, ma un SNR >95dB è il valore richiesto per i fini di un *imaging* biologico.

La forma di questa cifra di merito vale un'analisi più attenta. Benché il rivelatore raccolga i fotoni retrodiffusi dall'interfaccia di interesse per l'intera durata dell'acquisizione, T, lo schema di rilevazione seleziona attivamente solo quei fotoni per la costruzione del segnale OCT su un intervallo di tempo molto più breve, $\frac{l_c T}{x_{depth}}$. Questo comporta necessariamente

la diminuzione della sensibilità al segnale rispetto allo schema che è in grado di utilizzare

per la costruzione del segnale OCT quei fotoni lungo l'intera durata dell'acquisizione. SD-OCT è in grado di sfruttare a pieno tutti quei fotoni.

Nonostante il fotorivelatore collezioni i fotoni retrodiffusi dall'interfaccia di interesse per l'intera durata dell'acquisizione, T , lo schema di rilevazione è selettivamente attivo solamente per quei fotoni che appartengono all'interferenza che sta rilevando. Si ha quindi un'inevitabile perdita di informazione e diminuzione del rapporto segnale-rumore.

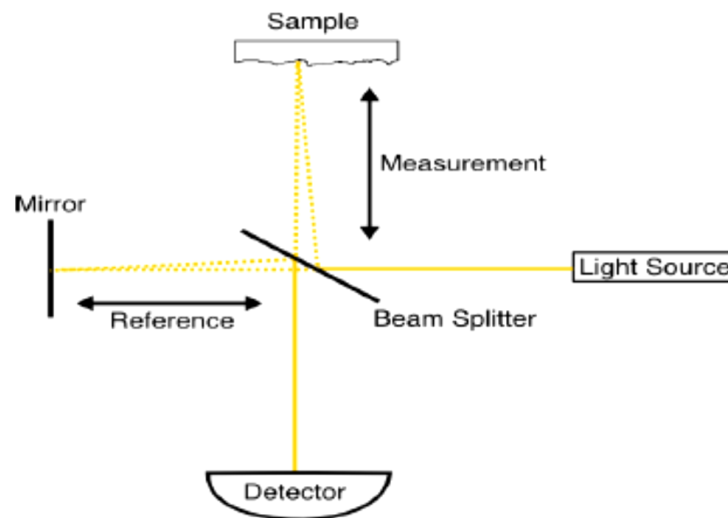


Figura 18: Schema di funzionamento di un TD-OCT. Il fascio di luce sorgente viene diviso in due componenti, di cui una va verso lo specchio di riferimento ed una verso il tessuto. Il fascio ricombinato è rilevato da un fotorivelatore.

4.3 Sistemi OCT nel dominio della frequenza

Un sistema in grado di fare pieno uso dei fotoni relativi al segnale utile durante l'intero tempo di acquisizione, è il *Fourier Domain* OCT (FD-OCT).

Un tipico sistema *Spectral* (SD-OCT) è molto simile a un TD-OCT (Fig. 17-B).

Lo specchio di riferimento che si muoveva è immobilizzato, e il rivelatore è rimpiazzato da uno spettrometro a bassa perdita nello schema SD-OCT. In questo schema, la variazione dello spettro nel segnale rilevato viene registrata dallo spettrometro. Si noti che il periodo dell'oscillazione dello spettro nello spazio k del segnale misurato è proporzionale a $(x_r - x_s)$. Un'interfaccia che dia un valore minore di $(x_r - x_s)$ produrrà un'oscillazione dello spettro sinusoidale più lenta rispetto ad un'interfaccia con valore $(x_r - x_s)$ maggiore. Quindi, la trasformata di Fourier della misura dello spettro produrrà un profilo di scansione lineare

simile a quello ottenuto con TD-OCT. Si noti che in questo caso, il contributo del segnale da due o più interfacce può essere recepito in modo simultaneo poiché queste contribuiscono a differenti componenti di oscillazione dello spettro.

La trasformata di Fourier, applicata allo spettro acquisito, permette di ottenere un profilo di scansione lineare molto simile ad un TD-OCT.

Il numero di fotoni del segnale utile è

$$Signal_{SD-OCT} = 2\sqrt{P_{sig} \cdot P_{ref}} \cdot T \cdot \frac{\epsilon}{h\nu}$$

In questo caso il numero totale di fotoni rumorosi è sempre dato alla radice quadrata dei fotoni totali del segnale retrodiffuso:

$$Noise_{SD-OCT} = \sqrt{P_{ref} T \cdot \frac{\epsilon}{h\nu}}$$

Di conseguenza si ottiene un SNR di:

$$SNR_{SD-OCT} = 10\log\left(\frac{Signal_{SD-OCT}}{Noise_{SD-OCT}}\right)^2 = 10\log\left(4P_{sig} T \cdot \frac{\epsilon}{h\nu}\right) (dB)$$

La profondità di scansione x_{depth} , si traduce per un SD-OCT, nel range delle oscillazioni spettrali, in frequenza, che lo spettrometro è in grado di rilevare. Oltre questo valore, le oscillazioni portano in saturazione lo strumento e generano *aliasing*. Usando questo criterio si può vedere che:

$$\Delta k 2x_{depth} = \left(\frac{N}{2}\right) \cdot 2\pi \rightarrow x_{depth} = \left(\frac{N\pi}{2\Delta k}\right) = \left(\frac{N}{2}\right) \cdot l_c, l_c = \frac{\pi}{\Delta k}$$

con Δk intervallo di numeri d'onda.

Ora è possibile stabilire un confronto tra un SD-OCT ed un TD-OCT. Dato un sistema *Spectral* a N pixel con una profondità di scansione $x_{depth} = \left(\frac{N}{2}\right) \cdot l_c$, una acquisizione tramite TD-OCT della stessa durata temporale avrà un SNR pari a:

$$SNR_{TD-OCT} = 10 \log \left(4 P_{sig} \left(\frac{2}{N} \right) T \frac{\varepsilon}{h\nu} \right) = SNR_{SD-OCT} - 10 \log \left(\frac{N}{2} \right)$$

Da tale equazione si vede chiaramente che un sistema SD-OCT è intrinsecamente più sensibile di un TD-OCT di un fattore N/2. Questo miglioramento è dovuto al fatto che un SD-OCT è capace di collezionare segnali del campione provenienti da tutte le profondità, per l'intera durata del tempo di acquisizione.

I vantaggi principali introdotti dall'utilizzo di questa nuova tecnologia sono stati:

- Un aumento della frequenza di scansioni assiali
- Un aumento della sensibilità di rilevazione
- La riduzione dei tempi di acquisizione delle immagini
- La riduzione di artefatti da movimento ottico a circa 1/30 rispetto ad un TD
- La possibilità di ripetere più volte la stessa scansione, per eseguire la sommatoria dei valori misurati in ogni punto esaminato, ed ottenere delle immagini con miglioramento del rapporto segnale rumore
- La possibilità di eseguire molte scansioni B-scan affiancate per ottenere una ricostruzione tridimensionale dei tessuti (C- scan) ed esaminarli anche diversificandoli in profondità per i vari strati (scansioni *en-face*)

In figura 19 è mostrata la differenza nell'interpretazione diagnostica di un'immagine relativa allo stesso paziente prodotta con un TD-OCT (A) e con un SD-OCT (B). In entrambe le immagini è visibile un accumulo di liquido intraretinico, che nel TD-OCT si miscela al rumore di fondo, mentre nell'SD-OCT è chiaramente distinguibile tra i vari strati. Le frecce bianche indicano le aree di liquido, e gli asterischi neri indicano la membrana neovascolare coroideale.

Spesso la risoluzione assiale risulta il parametro più utilizzato in fase di commercializzazione per esibire le prestazioni di un OCT. L'evoluzione ha portato ad un continuo aumento della larghezza di banda della sorgente, ovvero di una minore lunghezza di coerenza, che significa migliore risoluzione assiale.

In un sistema TD-OCT, aumentare la larghezza di banda della sorgente significa ridurre l'SNR, in quanto viene incrementata anche l'ampiezza della banda relativa al rumore. Per mantenere lo stesso SNR sarebbe necessario diminuire la frequenza delle scansioni assiali o il range di profondità di scansione (peggiorativo dal punto di vista tecnologico), o incrementare l'intensità dell'illuminazione sul campione (una maggiore potenza del fascio incidente significa esporre il paziente a rischio maggiore). Per questi motivi, un recente aumento, attraverso la tecnologia Fourier Domain, della frequenza degli A-scan/s e l'aver ottenuto più ampi range di scansione di profondità, ha reso superati gli OCT *Time Domain*.

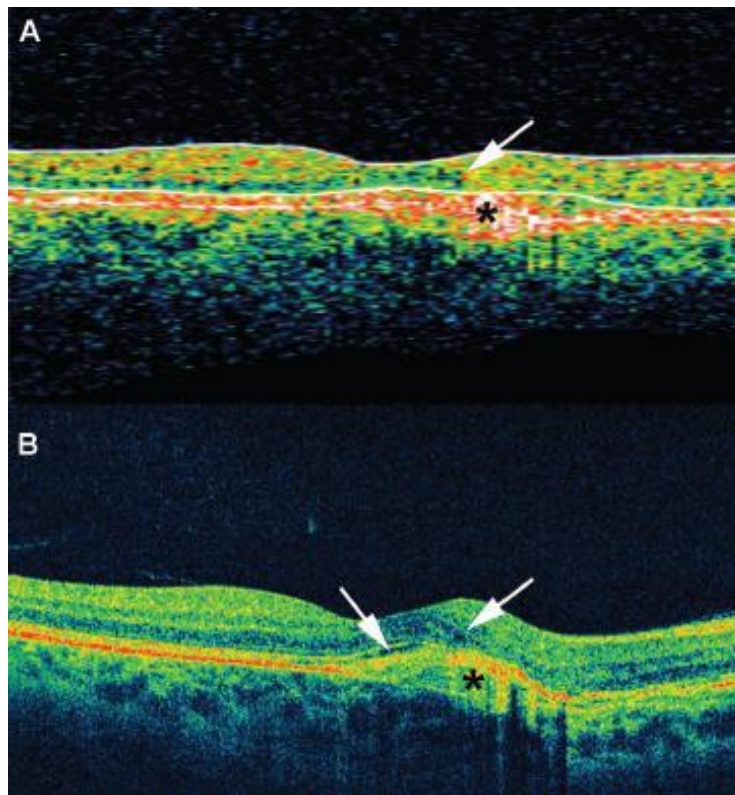


Figura 19: Immagine OCT ottenuta con tecnologia *Time Domain* (in alto) e *Spectral Domain* (in basso)

4.4 Metodi di implementazione dei sistemi SD-OCT

Ci sono due modi differenti per implementare un sistema OCT nel dominio della frequenza: *Spectral Domain OCT* oppure *Swept Source OCT*.

Il primo approccio, un SD-OCT basato su spettrometro, conosciuto come radar spettrale o OCT nel dominio di Fourier, utilizza una sorgente di luce ad ampia banda e uno spettrometro a basse perdite per misurare le oscillazioni spettrali. Il secondo metodo, SD-OCT *swept-source*, che è stato anche chiamato riflettometria ottica nel dominio delle frequenze (OFDR), interferometria a lunghezze d'onda sincronizzate (WTI), e *imaging* ottico nel dominio delle frequenze (OFDI), impiega una sorgente a banda stretta che cambia rapidamente per misurare le oscillazioni spettrali a numeri d'onda equidistanziati. Andiamo ad analizzare i setup sperimentali di questi due metodi.

4.4.1 SD-OCT con spettrometro

Il setup sperimentale di un sistema SD-OCT basato su spettrometro è mostrato in figura. Un SD-OCT (Fig. 20) è molto simile ad un TD-OCT se non altro per l'immobilità dello specchio di riferimento e della presenza di uno spettrometro a bassa perdita al posto del fotorivelatore.

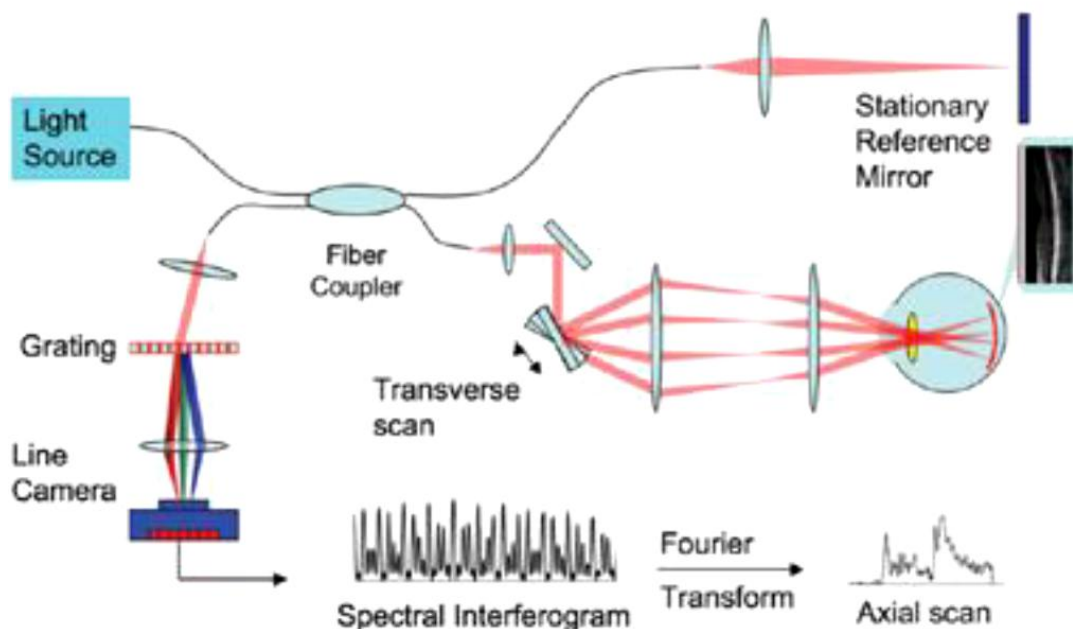


Figura 20: Schema di uno *Spectral OCT*. Si nota l'immobilizzazione dello specchio di riferimento e la presenza di uno spettrometro a bassa perdita per discriminare le varie interferenze in funzione della lunghezza d'onda.

Il setup usa una sorgente di luce a banda larga, di solito un diodo a superluminescenza (SLD) o un laser *mode-locked*, e per la rivelazione del segnale utile, uno spettrometro a basse perdite, che misura lo spettro del pattern di interferenza della radiazione che ritorna dai bracci di riferimento e di campione dell'interferometro.

Lo spettrometro al suo interno è costituito da una schiera lineare di elementi sensibili alla luce (CCD o CMOS); non appena questi vengono investiti dal fascio ricombinato, sono in grado di rilevare le varie interferenze sul segnale luminoso incidente in base alla loro lunghezza d'onda λ . Il segnale in ingresso allo spettrometro è di tipo analogico; all'uscita dell'array il segnale è già stato campionato (e quindi convertito in digitale). I dati spettrali sono messi in scala rispetto al dominio dei numeri d'onda e ricampionati prima dell'esecuzione della trasformata di Fourier, eseguita dal software, che permette di ottenere una rappresentazione in A-mode dell'intensità degli echi retrodiffusi.

Un'alta risoluzione spaziale (una caratteristica desiderabile per un sistema OCT) richiede l'impiego di una sorgente di luce con una ampiezza spettrale più ampia (o una lunghezza di coerenza l_c molto piccola). Questo fatto implica che un range di profondità in scansione maggiore richiederebbe un numero maggiore di pixel, N , per array lineari (CCD camera) dello spettrometro. Ciò si vede anche dal fatto che decrementando la dimensione dei pixel e incrementando il numero di pixel N della CCD camera, si può aumentare la più alta oscillazione spettrale rilevabile che corrisponderà ad un più ampio range di scansione.

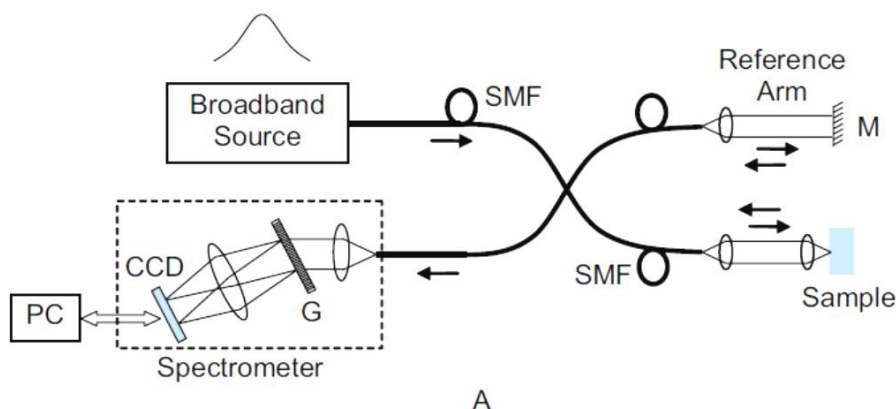


Figura 21: Sistema SD-OCT con spettrometro dove la sorgente laser a banda larga può essere costituita da un diodo superluminescente (SLD) o da una sorgente laser ultra-veloce *mode-locked*. SMF, fibra a modo singolo; G, reticolo di diffrazione; PC, personal computer; CCD, *charged coupled device*.

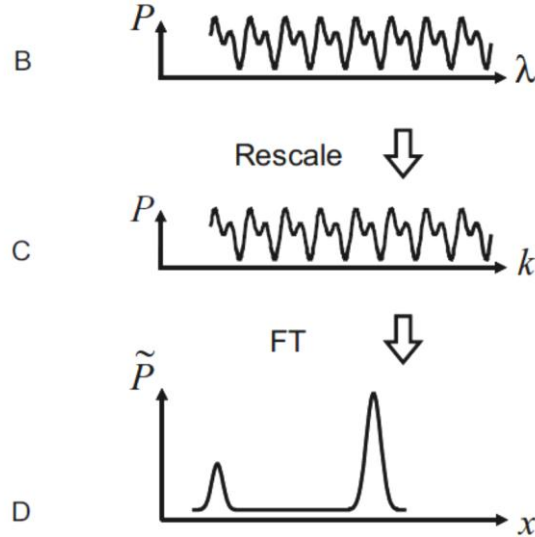


Figura 22: I dati spettrali vengono riscalati e ricampionati ugualmente nello spazio k, prima di essere Fourier-trasformati per ottenere il profilo di scansione in profondità o A-scan (B-D).

4.4.2 SS-OCT System

Nel sistema *swept source* SD-OCT o più comunemente SS-OCT, mostrato in figura 23, la sorgente è un laser a banda stretta che commuta rapidamente. In un SS-OCT (Fig. 23) l'informazione in frequenza non è estratta come in un SD-OCT usando uno spettrometro. Si dispone invece di una sorgente in grado di emettere un fascio laser ad una specifica lunghezza d'onda. L'uscita della sorgente è una funzione del numero d'onda (inverso della lunghezza d'onda) $S[k(t)]$ ed è mantenuta lineare. Essa può essere scritta come

$$k(t) = k_0 + \delta k \times t$$

con $\delta k = \Delta k / \Delta t$. con Δk rappresenta l'ampiezza della banda ottica entro cui può variare il segnale sorgente, mentre Δt è il tempo totale impiegato per fare assumere alla sorgente tutti i valori di lunghezza d'onda nell'intervallo.

Idealmente un sistema SS-OCT richiederebbe M numeri d'onda equispaziati all'interno dell'intervallo di definizione, del tipo $M \times \delta k = \Delta k$.

In questo contesto, un sistema SS SD-OCT avrà un range di scansione in profondità:

$$x_{depth} = \frac{M\pi}{2\Delta k} = \frac{\pi}{2\delta k} = \frac{M}{2} \cdot l_c$$

Il segnale di interferenza $D[k_m]$ può essere rilevato da un rivelatore singolo oppure da due rivelatori bilanciati per compensare le distorsioni eventuali che la radiazione può subire. Poiché il segnale viene acquisito a numeri d'onda equidistanziati, $D[k_m]$ può essere direttamente trasformato con trasformata di Fourier discreta (DFT) per ottenere il profilo lineare della scansione risolta in profondità del campione di tessuto sotto analisi.

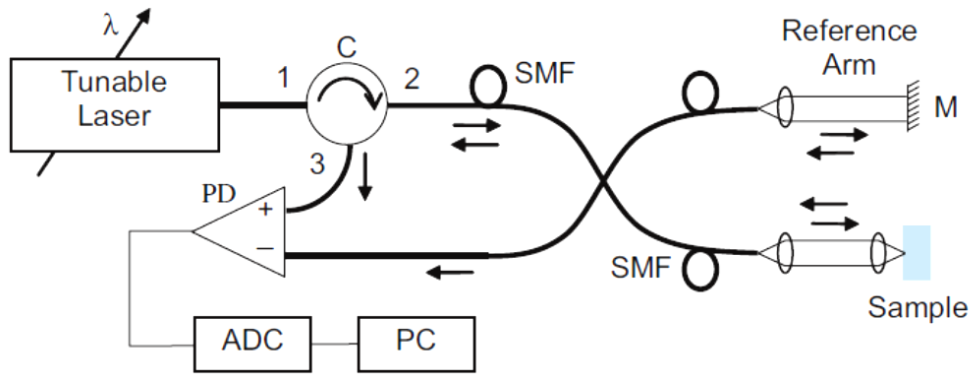


Figura 23: Sistema SS-OCT. SMF, fibra a modo singolo; C, circolatore ottico; M, specchio; PD, fotorivelatore; ADC, convertitore Analogico-Digitale; PC, personal computer. Si nota la presenza di una sorgente laser ad emissione di lunghezza d'onda variabile.

4.5 Confronto tra implementazioni OCT nel dominio della frequenza

La comunità biomedica ha con successo impiegato notevoli sforzi per incrementare la larghezza di banda delle sorgenti ottiche. Una maggiore larghezza di banda a sua volta comporta un decremento della lunghezza di coerenza e permette l'acquisizione di immagini OCT con altissima risoluzione assiale.

In un sistema TD-OCT, l'aumento della larghezza di banda della sorgente decrementa il SNR poiché richiede un aumento della larghezza di banda di rilevazione elettronica. Per mantenere lo stesso SNR si deve o diminuire la velocità di acquisizioni A-scan o il range di scansione in profondità, o aumentare l'intensità di illuminazione del campione. Come dato di fatto, sia una alta velocità di acquisizioni A-scan sia un ampio range di scansione in profondità sono caratteristiche fortemente desiderate nei sistemi OCT. Allo stesso tempo, in molti casi come nell'*imaging* oftalmologico, la potenza ottica incidente non può essere aumentata oltre i limiti previsti dall'*American National Standards Institute* (ANSI). Questo problema può essere risolto utilizzando delle tecniche più sensibili. Fortunatamente, entrambi i sistemi SD-OCT (sia basati su spettrometro sia a *swept source*) mostrano

vantaggi significativi di sensibilità rispetto ai sistemi TD-OCT. Quindi, i sistemi SD-OCT possono essere impiegati per l'*imaging* OCT a velocità maggiori e (o) a maggiori profondità di scansione.

Se si confrontano SS-OCT e SD-OCT, uno dei vantaggi di SS-OCT rispetto ad un SD-OCT sta nella possibilità di impiegare intervalli di lunghezza d'onda di 1000-1300nm; ciò permette la visualizzazione ad alta risoluzione di strutture molto in profondità, altrimenti poco visibili tramite uno *Spectral*. Inoltre la linea di scansione OCT risulta invisibile per il paziente sottoposto ad esame oculistico, consentendogli di non dirottare l'attenzione dalla mira di fissazione interna dello strumento, riducendo la durata dell'esame .

Con un SS-OCT è inoltre possibile raggiungere velocità di scansione molto più elevate (dell'ordine di 80'000-100'000 A-scan/s). Grazie a questa specificità si riesce ad acquisire una B-scan in 0.01s, invece dei 0.02 s necessari ad uno *Spectral*; ma la grossa differenza sta nell'acquisizione di immagini 3D, dove allo SS-OCT sono sufficienti 0.9 s contro gli 1.9 s di uno *Spectral Domain*.

A titolo esplicativo la Figura 25 mostra la differenza tra le immagini di fovea e disco ottico ottenute attraverso la tecnologia *Spectral Domain* (a sinistra) e quella *Swept Source* (a destra). Si nota come l'immagine prodotta dallo SS-OCT permetta una più chiara visione di sclera e coroide, quasi invisibili con lo *Spectral*. Inoltre, nonostante l'immagine SS-OCT sia stata ottenuta con un minor numero di immagini mediate, l'intera struttura retinica risulta apparire molto più nitida rispetto a quella ottenuta con lo *Spectral*.

Come discusso precedentemente, SS-OCT ottiene informazioni spettrali codificate nel tempo spazzolando con un laser a larghezza di banda ridotte un ampio spettro ottico. L'intensità di riflessione è catturata da un fotorivelatore. Questo processo è in contrasto con SD-OCT con spettrometro, che usa una sorgente luminosa a larga banda e capta gli spettri di interferenza tramite un dispositivo CCD ed uno spettrometro. L'impiego dei sistemi basati sullo spettrometro sono impiegati largamente in clinica tuttavia ci sono alcuni vantaggi nei sistemi basati su fotorivelatore. Ambedue mostrano una maggiore sensibilità e velocità sui sistemi TD-OCT, come anche una notevole riduzione degli artefatti da movimento.

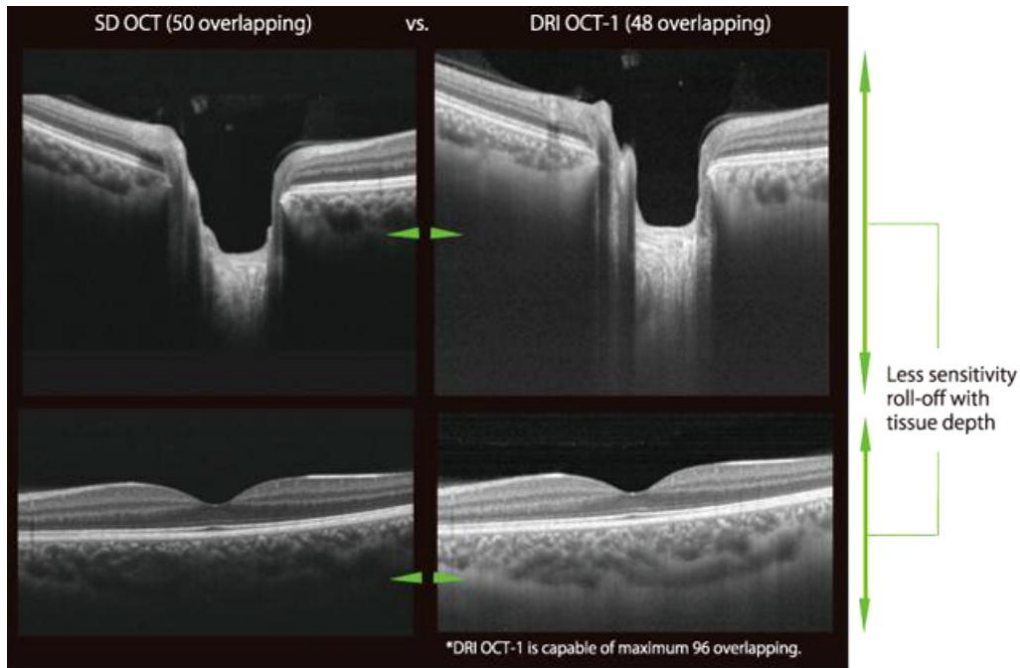


Figura 24: Confronto tra le immagini di fovea e disco ottico ottenute con la tecnologia SS-OCT (a destra) e SD-OCT (a sinistra)

Un vantaggio dei sistemi SS-OCT rispetto ai sistemi SD-OCT è si utilizza un semplice fotorivelatore al posto di un CCD e di uno spettrometro. Un inconveniente della rivelazione basata su CCD è un *drop-off* del segnale all'aumentare della profondità di scansione a causa della dimensione finita dei pixel dal dispositivo CCD. Sebbene si possa rimediare a questo riducendo la dimensione dei pixel del CCD, si aumenta così la complessità e quindi il costo di un array CCD. Questa riduzione del segnale all'aumentare della profondità di indagine non si manifesta nei sistemi SS-OCT, poiché viene utilizzata una sorgente luminosa a banda stretta.

A questo punto uno svantaggio dei sistemi SS-OCT è che la maggior parte di questi operano a lunghezze d'onda maggiori ($\lambda=1-1.3 \mu\text{m}$), con pochissimi studi che trattano SS-OCT nel range di 800nm. L'assorbimento dell'acqua limita la banda utilizzabile a 1 o 1.3 μm e questo limita la risoluzione assiale; la finestra di assorbimento dell'acqua è più ampia a 850nm, e così si possono raggiungere risoluzioni assiali maggiori.

Mentre la risoluzione assiale a lunghezze d'onda maggiori non può essere così fine come a 850nm, ci sono dei vantaggi nell'usare sorgenti a ~ 1 e 1.3 μm . Per esempio, è stato riportato che la luce a 1040nm è più adatta per immagini della retina perché permette una maggiore penetrazione nelle coroidi. L'*imaging* del segmento posteriore utilizzando una

lunghezza d'onda centrale a $\sim 1\mu\text{m}$ (1040-1060nm) ha permesso una penetrazione più profonda nella retina, la testa del nervo ottico, e il coroide, il che è molto utile per la visualizzazione dei vasi coroidali, la lamina cribrosa, e malattie come la neovascolarizzazione coroidale.

In modo simile, alcuni esami angiografici che prevedono l'impiego di ICG (*indocianina verde*) richiedono sistemi in grado di visualizzare lunghezze d'onda hanno nel regime di 800nm, in quanto è proprio a queste lunghezze d'onda che ICG presenta bande di assorbimento. Quindi, per godere a pieno dei vantaggi di SS-OCT, sarebbe fondamentale realizzare swept source ad alta velocità, ampiamente regolabili in altre bande di lunghezze d'onda.

Sebbene i sistemi SS-OCT funzionanti a lunghezza d'onda diverse non siano disponibili ancora per l'utilizzo in clinica, in parte a causa dei costi della sorgente luminosa, essi hanno sono di notevole interesse clinico. La mancanza di *drop-off* del segnale all'aumentare della profondità di indagine, in combinazione alla migliore capacità di penetrazione a lunghezze d'onda maggiori fanno dei sistemi SS-OCT l'implementazione più evoluta tra i sistemi OCT.

Device (Manufacturer)	Description
3D-OCT 2000 (Topcon, Tokyo, Japan)	SD-OCT and high-resolution fundus camera; axial resolution, 5 μm ; A-scan acquisition rate, 27 kHz.
Bioptigen SD-OCT (Bioptigen, Research Triangle Park, NC)	Designed for both clinical and research use and includes a hand-held probe and microscope setup; axial resolution, 4 μm ; A-scan acquisition rate, 20 kHz
Cirrus HD-OCT (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA)	Software includes guided progression analysis for glaucoma progression detection; axial resolution, 5 μm ; A-scan acquisition rate, 27 kHz.
RTVue-100 (Optovue, Fremont, CA)	Offers multiple scanning protocols for glaucoma detection, including ganglion cell complex analysis; axial resolution, 5 μm ; A-scan acquisition rate, 26 kHz.
SOCT Copernicus (Optopol, Zawiercie, Poland)	Software includes progression analysis software that incorporates disk damage likelihood scale, asymmetry between the discs, and RNFL thickness; axial resolution, 6 μm ; A-scan acquisition rate, 27 kHz.
Spectral OCT SLO (Opko, Miami, FL)	Combines SD-OCT, scanning laser ophthalmoscopy, and microperimetry. Axial resolution, 6 μm , A-scan acquisition rate, 27 kHz.
Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany)	High-speed SD-OCT device with eye-tracking, fluorescein angiography, ICG angiography, and autofluorescence. Axial resolution, 4 μm ; A-scan acquisition rate, 40 kHz.

Tabella 2: Descrizione dei sistemi SD-OCT disponibili in commercio[2]

Diversi gruppi di ricerca hanno studiato sistemi SD-OCT ad alta risoluzione in grado di operare a velocità notevolmente alte. Usando un'ampiezza spettrale della sorgente (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) pari a 144nm centrata a 825nm, M. Wojtkowski et al. ([19], 2004) hanno studiato un SD-OCT con spettrometro ad alta risoluzione (2.1 μm di risoluzione assiale nel tessuto) con SNR di 98dB e potenza ottica incidente di 750 μW e un'alta velocità di *imaging* (16000 A-scan rate con 1024 pixel per A-scan).

La Figura 25A mostra un'immagine della retina ad alta risoluzione composta da 300 A-scan acquisite in 150ms con un sistema SD-OCT ad alta velocità. Per confronto, nella Figura 25B, si propone un'immagine della retina a alta risoluzione assiale composta da 300A-scan acquisite in 2s da un sistema TD-OCT. Chiaramente, un aumento della velocità di *imaging* nei sistemi SD-OCT permette di acquisire un numero maggiore di scansioni in profondità per dare una risoluzione maggiore nella direzione trasversale (una caratteristica desiderata per una risoluzione ottima non possibile con i sistemi TD-OCT).

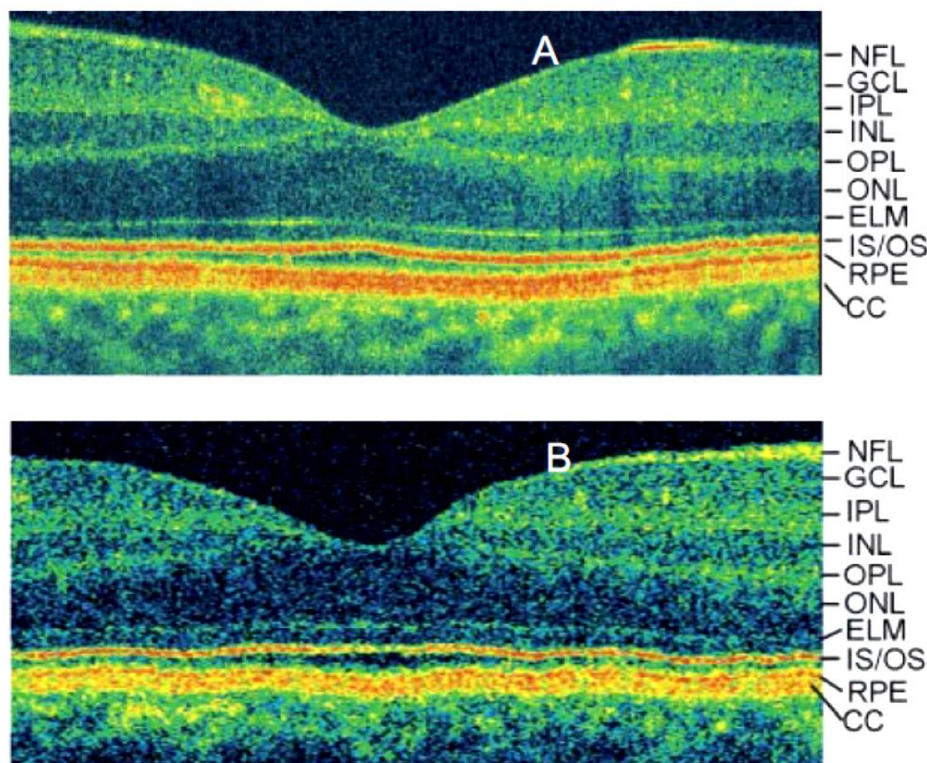


Figura 25: Immagini retiniche umane ottenute con un sistema SD-OCT (A) e con un sistema TD-OCT (B). NFL, strato di fibra nervosa; GCL, strato di gangli; IPL, strato interno plexiforme; INL, strato interno nucleare; OPL, strato plexiforme esterno; ONL, strato nucleare esterno; ELM, membrane sterne di confine; IS/OS, fotorecettore interno e segmento di giunzione esterno; RPE, epitelio retinale pigmentato; CC, corio capillari.

Un altro lavoro, riportato da B. Cense e al. (2004), è considerato come la miglior performance di *imaging* OCT (in termini di velocità) riportata finora in quanto si è raggiunta una velocità di video di *imaging* per un SD-OCT con spettrometro, di 29 frame/s con 1000 A-scan/frame e 1024 pixel/A-scan.

Come detto precedentemente, SS-OCT acquisisce dati interferometrici da un campione attraverso l'impiego di un laser tunabile in grado di spazzolare un ampio range di lunghezze d'onda. Poiché un range di spazzolamento delle lunghezze d'onda più ampio porterà ad una risoluzione in profondità maggiore e un cambio più rapido delle lunghezze d'onda permetterà un'acquisizione più rapida dei dati, il design e le funzionalità della sorgente tunabile giocano un ruolo importante nella performance del sistema SS -OCT.

In anni recenti, sono stati impiegati vari design per sorgenti nella banda prossima ai 1300nm per SS-OCT.

Oh et al. ([10], 2005) hanno riportato una *swept source* con range tunabile di 145nm attorno a 1310nm, e con velocità di spazzolamento di 20kHz. Il picco della potenza ottica e la potenza ottica media erano limitati rispettivamente a 1.8 e 1.35mW.

	Swept Source SDOCT	Spectrometer-Based SDOCT
SNR drop-off	No	Yes
Spectral band (nm)	1300	800
Heterodyne detection	Yes	No
Balanced detection	Yes	No
Speed	Comparable	
MCOCT	No	Yes
OCT system	Simple	Complex
Light source	Complex	Simple
SNR, signal-to-noise; SDOCT, spectral domain optical coherence tomography; MCOCT, molecular contrast optical coherence tomography.		

Tabella 3: Confronto tra SS-OCT e SD-OCT [4]

Un'altra interessante direzione assunta dai ricercatori è scoprire i modi per risolvere il problema del *drop-off* di SNR nei sistemi SD-OCT con spettrometro che limita fortemente il *range* di scansione in profondità a circa 2mm o meno. Finora, non sono stati riportati metodi efficienti per migliorare in modo significativo il *drop-off* di SNR.

Infine, con il forte aumento della quantità dei dati in input che SD-OCT fornisce e l'intenso sforzo computazionale che richiede per effettuare la trasformata di Fourier, è ora importante introdurre moduli di elaborazione del segnale ad altissima velocità, come i *field programmable gate arrays* (FPGAs) per acquisire e processare il segnale OCT in tempo reale per l'*imaging real time e in vivo*.

Come si è detto, la potenza ottica uscente di questi sistemi, relativamente bassa, può rappresentare un limite. Recentemente, R.Huber et al. ([11]) hanno studiato una *swept source* con larghezza di banda di 120nm centrata a 1310nm basata sull'utilizzo di una cavità tunabile Fabry-Perot (2005). Questo sistema SS-OCT è in grado di fornire una potenza ottica di uscita di circa 45mW ad una velocità di spazzolamento di 20kHz. La figura 26 mostra immagini ottenute con SS-OCT e SD-OCT a 20kHz. In conclusione Huber ha dimostrato che i sistemi OCT implementati tramite *swept source* o con spettrometro sono confrontabili in termini di velocità di *imaging*.

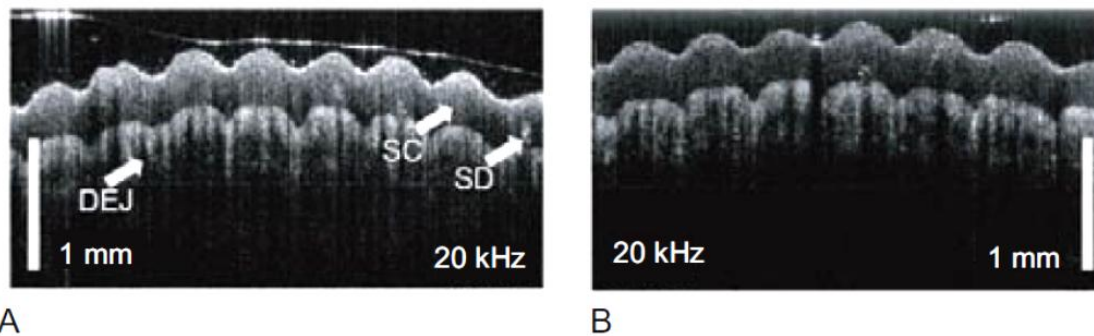


Figura 26: Immagini di pelle umana nell'area della punta delle dita ottenute a 20kHz con SS-OCT (A) e con SD-OCT(B); DEJ, giunzione derma-epiderma; SC, strato corneo; SD, condotti sudoripari.

I sistemi SS-OCT riducono l'eccesso di rumore. Questo perché ad ogni numero d'onda k , l'output della sorgente laser è uno spettro a banda stretta con un rumore molto inferiore rispetto a quello di una sorgente a banda larga. Inoltre, dato il metodo di rilevamento in SS-OCT, non si nota il *drop-off* del SNR che usualmente avviene nei sistemi basati su spettrometro. SS-OCT permette anche una rilevazione eterodina (una caratteristica ulteriore che permette di traslare la frequenza dello spettro del segnale interferometrico lontano dalla frequenza zero permettendo una rilevazione di variazioni sia positive che negative).

4.6 Sistemi OCT per acquisizione di dati tridimensionali

OCT è una modalità di *imaging* che permette di ottenere informazioni 3D basate sulle proprietà di diffusione dei campioni biologici. Tuttavia, la bassa velocità di acquisizione dei primi sistemi TD-OCT nel range di ~1kHz di solito ha limitato l'*imaging* a protocolli di acquisizioni di singoli B-frame e spesso non è stato possibile acquisire nessun data set completo 3D.

L'introduzione di tecniche di cattura nel dominio della frequenza (o dominio di Fourier, FD) con maggiore sensibilità per OCT, ha portato ad un aumento drastico della velocità di acquisizione, rendendo possibili velocità lineari di ~50-400kHz. A queste velocità diviene fattibile acquisire dataset di interi volumi 3D offrendo una maggiore flessibilità di visualizzazione, analisi, quantificazione e processamento delle immagini. Disporre di dati tridimensionali permette la ricostruzione di visuali disposte su piani opposti per la registrazione di scansioni assolute OCT, il sezionamento e l'estrazione di fette arbitrarie curve dal dataset 3D, la quantificazione volumetrica delle caratteristiche morfologiche del tessuto, la riduzione di errori di campionamento causati dalla mancata presenza di un punto nelle immagini 2D, e una pseudo microscopia a coerenza ottica per proiezioni opposte simultanee ad alta risoluzione. Oltre a queste applicazioni, dove l'alta velocità di *imaging* è principalmente utilizzata per acquisire immagini 3D, l'OCT ad alta velocità rende possibile valutare i cambiamenti transitori del campione, la loro dinamica e la loro velocità, che sono semplicemente troppo veloci per sistemi più lenti. La terza maggior applicazione dell'*imaging* ad alta velocità è negoziare la velocità con la qualità dell'immagine o il contrasto funzionale. Mediando diversi frame acquisiti con un sistema ad alta velocità spesso si ottiene una migliore qualità dell'immagine poiché si riduce il contenuto di macchioline (*speckle noise*). Inoltre, grazie agli avanzati algoritmi di processamento delle immagini disponibili ad oggi, i dati 3D acquisiti ad alta velocità possono essere usati per estrarre informazioni da immagini funzionali, come il flusso Doppler (così la velocità può essere impiegata per generare immagini funzionali di contrasto).

Sebbene tutte queste applicazioni abbiano già dimostrato l'enorme potenziale dell'*imaging* OCT 3D, nella maggior parte dei casi i dataset 3D hanno fortemente sbilanciato il numero di campioni in ognuna delle tre dimensioni, oppure il tempo di acquisizione era troppo lungo per l'*imaging* di routine di pazienti non allenati.

Valori tipici dimensionali per dataset di immagini 3D sono circa 500x500x100, cioè 500 pixel per scansione in profondità, 500 scansioni in profondità/linea per frame e 100 frame. Con un sistema che funziona a 50kHz di velocità di scansioni si può ottenere questo dataset in 1 secondo. Tuttavia, specialmente nelle due direzioni trasversali, è necessario effettuare un campionamento isotropico approssimato per molte funzioni di analisi sui dati 3D. Un dataset delle dimensioni di 500x500x500 sarebbe desiderabile per la maggior parte delle proiezioni standard, ~2000x2000x500 per visualizzazioni ad alta definizione *en face*. Mirando ad un tempo di acquisizione di ~0.2 s per una scansione piena 3D, è necessaria una velocità di scansione tra 1MHz e 20MHz.

Questo implica, per la maggior parte delle applicazioni, la necessità di avere velocità di scansione superiori a 1MHz. Tuttavia, il principale problema che impedisce l'aumento della velocità di *imaging* è la richiesta di mantenere una buona qualità delle immagini. Per fornire una qualità sufficiente per la maggior parte delle applicazioni OCT, un sistema OCT multi-MHz dovrebbe avere una risoluzione assiale di ~10 μ m nel tessuto e una sensibilità >95dB.

Choi et al. ([9], 2008) hanno studiato un sistema SD-OCT con una velocità di campionamento di 60MHz. Tuttavia, la loro larghezza di banda per la rivelazione era solo di 12MHz, e si acquisivano solo 256 campioni per scansione prima della trasformazione di Fourier, dunque, la velocità per acquisire una A-scan effettiva era 12MHz e la velocità massima per voxel che ne risultava era 12MHz·128=1.5GVoxel/s. È stato misurato un valore di sensibilità di 88dB non sufficiente quindi per una ottenere immagini di buona qualità.

Moon et al. ([8], 2006) hanno studiato un approccio SS-OCT con velocità di scansione di circa 5MHz. La loro larghezza di banda analogica era di 4GHz per una durata di spazzolamento di 70ns, raggiungendo $2 \cdot 4 \cdot 10^9 \cdot 70 \cdot 10^{-9} = 560$ campioni per spazzolamento. Assumendo che il *roll-off* di performance di fosse abbastanza buono da ottenere frequenze del segnale di interferenza utili, si è ottenuta una velocità di acquisizione pari a di $0.5 \cdot 560 \cdot 5 \cdot 10^6 = 1.4GVoxel/s$. Tuttavia, poiché la sensibilità era di solo 40dB non si sono ottenute immagini OCT.

	P_{20dB} MPixel/s	V_{20dB} MVoxels/s	Scan rate MHz	Sens. dB
Setup B8	1250	4500 (1100 x 4)	10.4 (2.6 x 4)	104
Setup B16	1100	4000 (1000 x 4)	20.8 (5.2 x 4)	98
Setup F (with LPF)	450	900 (230 x 4)	4.0 (1.0 x 4)	105
Huber et al. [10]	350	<350	0.37	98
Potsaid et al. [14] 3D mode (conf. C)	100	80	0.25	91
Potsaid et al. [14] (conf. D)	90	<90	0.31	98
Huber et al. [13]	110	<110	0.24	91
Choi et al. [24]	(1500)	(1500)	12.0	<88
Moon et al. [25]	(1400)	(1400)	5.0	40

Tabella 4: Confronto tra i recenti sistemi OCT ad alta velocità [5]

Wieser et al.([5], 2010) ha dimostrato un *imaging* OCT con una buona qualità delle immagini, ~100dB di sensibilità e ~10 μ m di risoluzione assiale nel tessuto a ~4GVoxel/s, 20MA-scan/s, 4x3650=14600 frame/s e l'acquisizione di un volume in 25ms. Si sono ottenute così immagini 2D e 3D di campioni biologici di buona qualità.

Hanno studiato un sistema OCT ad altissima velocità, con velocità di scansione dell'ordine dei multi-megahertz e hanno analizzato la qualità delle immagini ottenute. Il sistema presentato è un SS-OCT che utilizza un laser FDML (*Fourier Domain Mode Locked*). Sono state paragonate tre diverse sorgenti laser basate su FDML con velocità di spazzolamento di 1, 2.6 e 5.2 MHz.

Per ottenere tali risultati, sono state applicate una serie di strategie: è stato sviluppato un nuovo filtro ottico Fabry Perot ad altissima velocità di carico per avere una velocità di spazzolamento delle lunghezze d'onda prossima a 5MHz, è stata usata una particolare configurazione di laser FDML per aumentare la potenza totale in uscita, si è sviluppato un nuovo sistema di distribuzione del fascio multi spot per ridurre le aberrazioni, è stato usato un protocollo di scansione adattato in modo specifico, per ottenere una ricostruzione affidabile dei dati volumetrici.

La qualità delle immagini nei sistemi multi-MHz può essere migliorata mediando molti B-frame. Non si riduce così solo lo *shot noise* o il rumore dai sistemi di acquisizione ma

solitamente anche lo “*speckle noise*” dovuto a movimento del campione, movimento di diffusione termica ed effetti simili è ridotto, ottenendo così un’immagine migliore. Tuttavia, nei sistemi OCT molto veloci, la media dei B-frame a piena velocità di acquisizione non riduce in modo significativo il contenuto di rumore. Come si può vedere in figura 27, la tipica trama sgranata propria dello *speckle noise* si mantiene abbastanza stabile nella successione dei B-frame ad una velocità di acquisizione di ~2kHz, mentre invece si riduce il rumore di fondo.

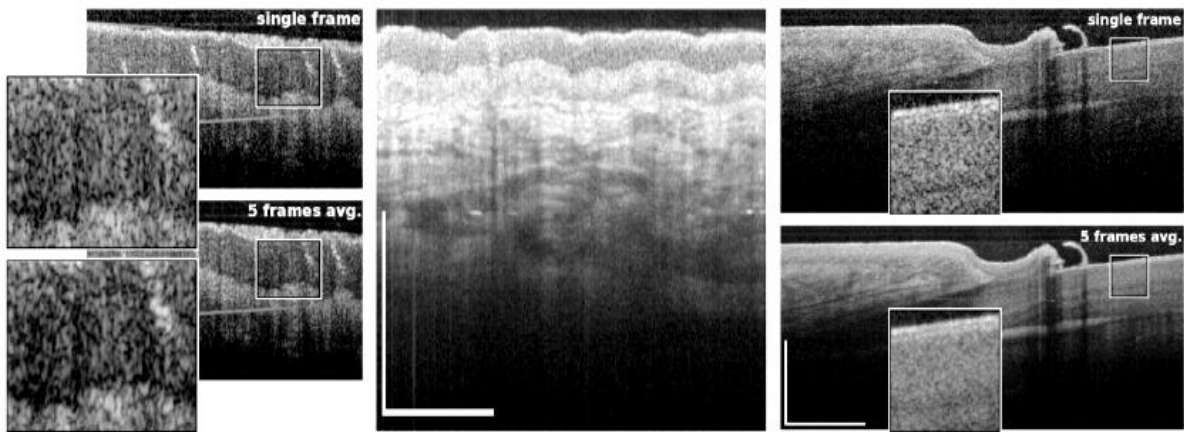


Figura 27: Confronto tra diversi protocolli di media. Sinistra: Singolo B-frame (in alto) con 600 A-scan e una media di 5 B-frame (in basso). Le immagini sono state acquisite a 5.2MHz e mostrano un campione di pelle umana con visibili ghiandole sudoripare. I frame mediate sono stati acquisiti alla velocità di ~2kHz e mostrano un comportamento dello speckle stabile come si può vedere nelle immagini ingrandite. Centro: Immagine *in-vivo* di pelle umana (giunzione del dito) presa con un diverso setup a una velocità di scansione in profondità di 2.6MHz. L’immagine mostrata è una media di 5 B-frame consecutive ognuno costituito da 700 scansioni in profondità e acquisite ad una frame rate ridotta a ~1Hz. L’ immagini, non solo mostra una notevole profondità di penetrazione ma anche rumore e speckle ridotti. Destra: immagini di unghia umana con 1200 A-scan prese con un terzo setup alla velocità di scansione in profondità di 1MHz. L’immagine in alto è un singolo B-frame mentre l’immagine in basso è una media di 5 B-frame equispaziati di 12µm/frame lungo l’asse lento e acquisiti con una frame rate di ~300Hz. L’ingrandimento mostra l’effettivo riduzione dello speckle.

Se, al contrario, si effettua una media dei B-frame acquisiti ad una velocità minore, si riduce il rumore, come si nota in Figura 28 sotto e al centro in Figura 27.

Quindi, l’*imaging* con multi-MHz OCT offre opzioni di media completamente nuove: per la riduzione del rumore si possono acquisire diversi dataset 3D completi in successione e poi mediarli assicurandosi che lo stesso punto nel campione sia campionato ad una velocità di ripetizione sufficientemente bassa. L’effetto è previsto essere simile a quello ottenuto mediando frame presi a *frame rate* minori. Wieser et al.(2010) trova che il numero ottimo di acquisizioni da mediare per ottenere la miglior qualità di immagine sia di 5-8.

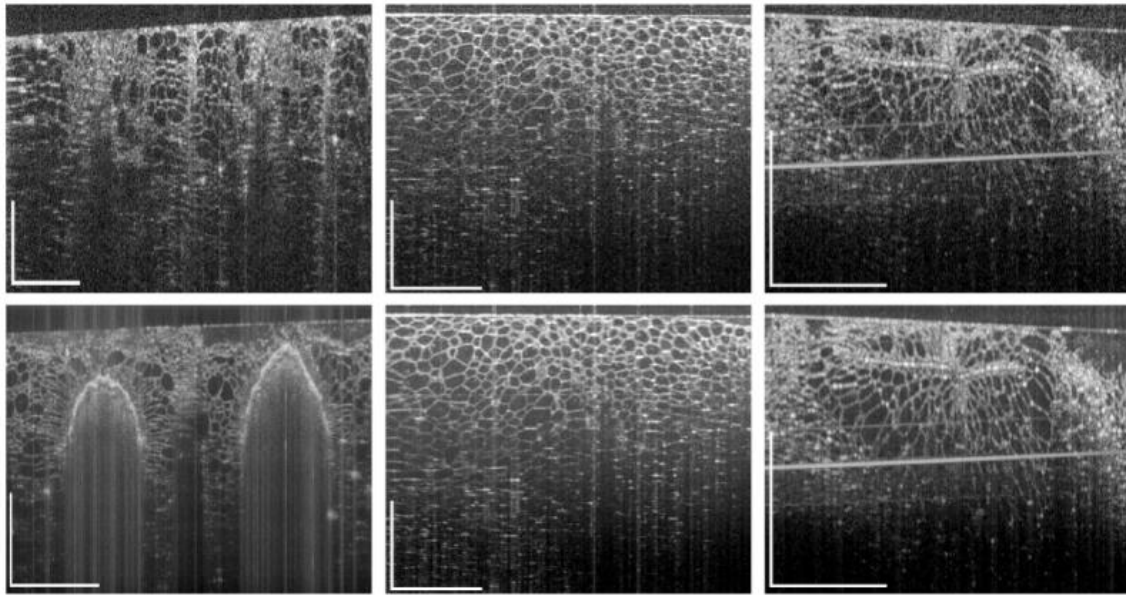


Figura 28: Confronto tra immagini ottenute con tre setup a velocità di scansione in profondità di 1.0, 2.6 e 5.2MHz che mostrano le strutture cellulari di kiwi (sinistra) e cetriolo (centro e destra). La freccia in alto mostra singoli B-frame, ognuno costituito da 800 A-scan e acquisiti in 800 μ s, 310 μ s and 155 μ s, rispettivamente. La freccia in basso mostra le medie dei frame di diversi B-frame (al centro e a destra sono stati mediate 5 B-frame presi con un intervallo di \sim 1s; a sinistra la media ha considerato 10 frame di 1024 A-scans di un diverso luogo nel kiwi mediate a intervalli di \sim 1s. Scala mostra 1mm in acqua.

4.7 Altri tipi di OCT

4.7.1 Adaptive Optics OCT

I sistemi oftalmici che impiegano ottica adattativa (AO) aggiustano le loro caratteristiche ottiche per compensare le aberrazioni monocromatiche che naturalmente avvengono nell'occhio. AO è stata inizialmente proposta e infine usata dagli astronomi per correggere le distorsioni della luce che passa attraverso l'atmosfera. Nel 1997, AO fu impiegata nell'occhio da Liang et al., che impiegò un sensore a fronte d'onda Hartmann-Shack e uno specchio deformabile per correggere la sensibilità al contrasto e migliorare la qualità della visione per i soggetti umani e per ottenere immagini con una risoluzione migliore. Poco dopo, i mosaici dei singoli coni sono stati visualizzati.

AO-OCT è stata riportata nel 2003 da Miller e al. per migliorare la risoluzione trasversale. Non corretti, i fasci OCT convenzionali di 1mm di diametro hanno una risoluzione trasversale limitata che va da \sim 15 a 20 μ m. Questo rende difficile visualizzare le strutture cellulari singole. Un metodo per migliorare la risoluzione trasversale è aumentare l'apertura numerica, che in pratica significa aumentare il diametro del fascio OCT che

entra nell'occhio, poiché questo porterebbe ad una diminuzione della dimensione dello spot sulla retina. Tuttavia, la risoluzione teorica limitata dalla diffrazione non può essere raggiunta a causa di aberrazioni oculari che avvengono quando si dilata la pupilla. AO-OCT misura e corregge queste aberrazioni utilizzando sensori del fronte d'onda e specchi deformabili, e quindi diminuendo la grandezza dello spot e migliorando la risoluzione trasversale. Si potrebbe notare che le aberrazioni possono dipendere dalla larghezza di banda della sorgente luminosa impiegata e questo si può migliorare impiegando delle lenti acromatiche.

AO-OCT a risoluzione assiale ultraveloce è stata introdotta nel 2004, portando la risoluzione trasversale da 15 a 10 μ m nella retina. Uno svantaggio dell'*imaging* AO è che la profondità del fuoco è breve, che significa che è difficile mettere a fuoco in modo simultaneo a differenti profondità. Per esempio, i fotorecettori, posizionati in profondità nella retina, e le cellule dei gangli retinali superficiali non possono essere messe a fuoco nello stesso momento. Si potrebbe pensare di superare questo limite scansionando in profondità e variando il piano focale o mettendo insieme i volumi. Un altro limite di AO è che il campo visivo è ristretto approssimativamente da 1 a 3 gradi; l'impiego di un sistema *eye-tracking* per acquisire una serie di scansioni vicine e gradualmente ricostruire un'immagine che copra un ampio volume potrebbe essere una soluzione a questo problema.

Un potenziale vantaggio dato dal miglioramento della risoluzione laterale con AO-OCT è la miglior comprensione delle funzioni della retina normale o patologica *in vivo*. AO può inoltre aiutare a migliorare la qualità generale delle immagini ottenute dall'occhio che sono affette da aberrazione. Migliorare la risoluzione laterale e la qualità delle immagini permettono una migliore performance degli algoritmi di segmentazione automatici e assistenza nella diagnosi di malattie e nella fase di *follow-up*.

4.7.2 OCT a contrasto molecolare

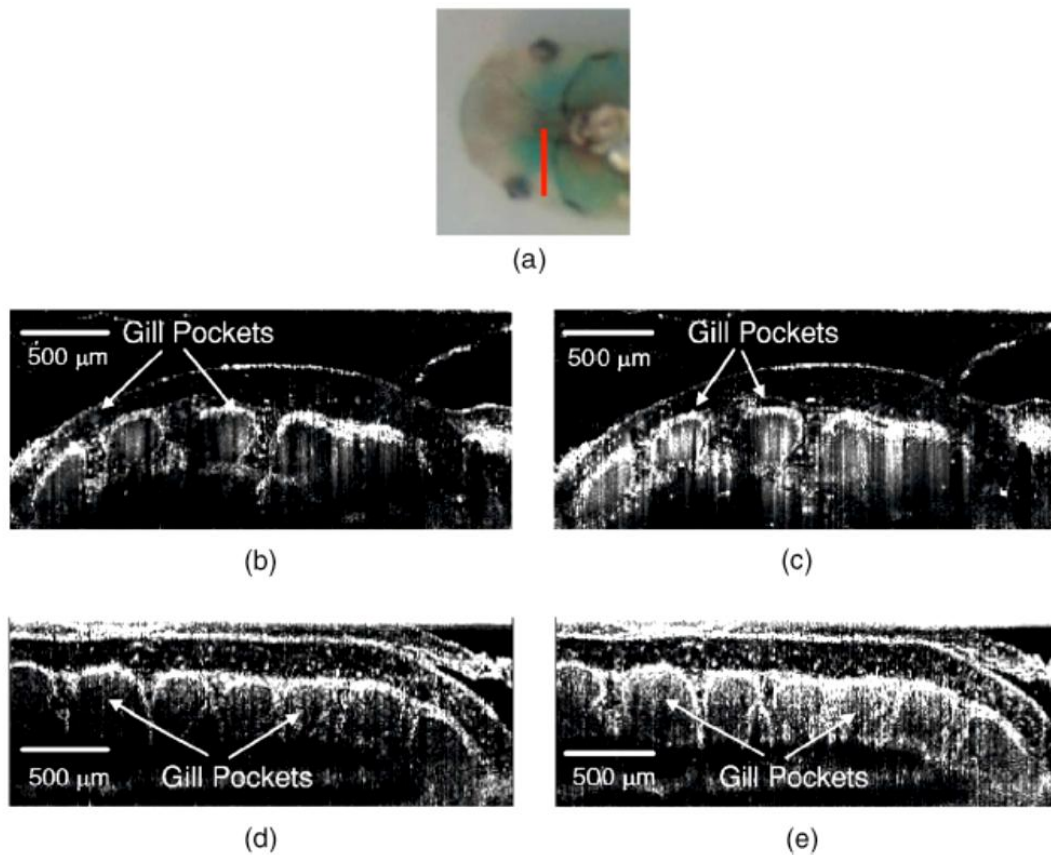


Figura 29: Tomografia a coerenza ottica a contrasto molecolare (MC-OCT) di *Xenopus laevis* allo stadio 54. (a) Vista ventrale dell'animale con infusione di una mistura di 400 μ M ICG (verde), 0.25% 0,1 μ m di microsfele di lattice, e 0.6% di concentrazione di volume di agarosio; la linea rossa indica la regione di acquisizione delle scansioni OCT, (b) e (c) mostrano immagini B-scan della regione illuminata prima e dopo il fotosbiancamento ICG, rispettivamente; (d) e (e) mostrano immagini B-scan delle cavità branchiali di un altro esemplare di *Xenopus laevis* alla stessa età. Si può notare un aumento della diffusione tra le cavità branchiali dell'animale.

L'OCT a contrasto molecolare (MC-OCT) è una tecnica OCT funzionale che combina i principali vantaggi della microscopia a fluorescenza (rilevamento del contrasto chimico) e di OCT (risoluzione spaziale e range in profondità maggiore). Nonostante la maggior parte dei metodi MC-OCT riportati finora siano stati implementati utilizzando TD-OCT, possono essere adattati al formato SD-OCT per avere una migliore sensibilità. Recentemente (2005), è stato implementato uno schema pump-probe per MC-OCT usando un SD-OCT con spettrometro. Lo schema usava indociano verde (ICG), una tinta approvata da FDA con uno spettro di assorbimento con picco a 790nm, come agente di contrasto. Inizialmente si è acquisita una prima scansione, seguita dal fotosbiancamento di

ICG. Poi è stata effettuata una seconda scansione OCT. La differenza delle due scansioni OCT portava informazioni sulla distribuzione dell'agente di contrasto (ICG) nel campione risolte in profondità. Mappando la distribuzione di ICG in una branchia di *Xenopus Laevis* allo stadio 54 attraverso la tecnica di MC-OCT nel dominio dello spettro si ottengono immagini come quella sottostante.

4.7.3 Polarization-Sensitive OCT

I sistemi PS-OCT captano i cambiamenti di polarizzazione nella luce polarizzata circolarmente. È stata inizialmente applicata per caratterizzare la birifrangenza dello smalto dei denti, pelle, e cartilagine. Poiché la birifrangenza potrebbe cambiare con l'avanzare di una malattia, la birifrangenza ottenuta con OCT, può costituire un indicatore addizionale del cambiamento di patologie, quali il glaucoma. Diversi studi indicano che la PS-OCT offre un approccio alternativo per valutare i cambiamenti delle proprietà ottiche dei tessuti. Se si potesse affermare che un cambiamento nella birifrangenza avviene prima che il tessuto si assottigli o si ingrossi, ciò permetterebbe una investigazione precoce e l'opportunità di interventi tempestivi.

4.7.4 Sistemi OCT per la guida chirurgica

OCT è già stato usato per la pianificazione di interventi chirurgici e per il *follow up*. Inoltre, c'è stato un progresso nello sviluppo di sistemi OCT intraoperativi. Questi sistemi sono stati impiegati per la prima volta nella chirurgia del segmento anteriore (oftalmologia), dove un sistema a 1310nm era accoppiato con un microscopio operatorio. L'uso di dispositivi di *imaging* OCT palmari della retina è stato impiegato in pazienti sottoposti a vitrectomia, dopo che era stata rimossa o ILM o la membrana epiretinale, per visualizzare meglio la patologia maculare. È possibile che lo sviluppo di un approccio intraoperativo possa ulteriormente migliorare utilizzando le proiezioni di immagini virtuali da OCT sul sito chirurgico e dentro la linea visiva del chirurgo, ma il significato di implementare tale tecnica in chirurgia deve ancora essere investigato.

4.7.5 Imaging OCT su animali

La natura non invasiva dell'acquisizione delle immagini, assieme alla commercializzazione di sistemi ottimizzati per l'utilizzo in laboratorio hanno portato ad un recente aumento del numero di animali studiati con OCT. Lo scanning bi- o tridimensionale con OCT è allettante poiché gli stessi animali possono essere osservati nel tempo *in vivo*, rendendo possibile ad esempio studi longitudinali delle strutture ottiche senza il bisogno di uccidere

gli animali a diversi intervalli temporali per ottenere sezioni istologiche. Non solo questo metodo riduce il numero di animali necessari per gli esperimenti, ma è anche migliore dei metodi sperimentali per ottenere immagini tomografiche che richiedono diversi animali per diversi periodi temporali.

Si riassumo brevemente di seguito gli studi che recentemente sono stati fatti su animali di piccoli e grandi dimensioni. Gli occhi di piccoli modelli animali usati in biologia dello sviluppo, come le larve di *Xenopus laevis* e gli embrioni di *Zebrafish*, sono stati visualizzati con successo con OCT. Le immagini di roditori sono diventate sempre più popolari, grazie al loro relativo basso costo e la vita breve così che anche il tempo di progressione della malattia è breve. Inoltre, molti modelli transgenici sono facilmente accessibili per i ricercatori. OCT è stato impiegato per studiare le dimensioni oculari e caratterizzare la crescita normale dell'occhio come anche la crescita degli occhi in modelli di topo affetti da miopia. Modelli di topo con degenerazione retinale sono stati investigati usando TD-OCT, altri in salute o meno con SD-OCT.

Recentemente, sono stati presentati metodi per ottenere misure automatiche da immagini OCT di topo. Le immagini prese in un topo anestetizzato, tenuto *in loco* usando un palco con uno strato di vetro per neutralizzare il grande potere rifrattivo della cornea del topo, si sono dimostrati riproducibili. Questo indica che l'*imaging* 3D SD-OCT della retina del topo può essere utile per gli studi longitudinali delle strutture retinali nei topi. Anche i ratti forniscono una interessante piattaforma per studiare i cambiamenti strutturali nella retina e nel nervo ottico a seguito di danno o malattia. Dati i loro grandi occhi, è meno complicato mettere il fuoco sulla retina rispetto che nel topo.

Gli occhi di grandi modelli animali, come il pollo con degenerazione della retina, sono stati analizzati. I ricercatori hanno usato OCT per esaminare uccelli rapaci, maiali, gatti e conigli. Questi animali hanno occhi che per dimensioni si possono paragonare agli occhi umani, che significa che sono necessarie poche modifiche all'impianto OCT.

Modelli di primati non umani sono molto appetibili per studi con OCT, poiché le dimensioni e le strutture oculari sono molto simili a quelle dell'occhio umano.

Infine studi OCT longitudinali di piccoli e grandi animali potrebbe aiutare a valutare l'efficacia di agenti farmacologici, terapie con cellule staminali, interventi chirurgici, e di protesi della retina, riducendo nel frattempo il numero di animali richiesto. OCT ha il

potenziale di fornire un migliore monitoraggio dello sviluppo di patologie e la loro progressione in modelli transgenici o meno, che potrebbe finalmente tradursi in un miglioramento dell'assetto clinico e della comprensione delle patologie.

4.8 Inconvenienti della tecnologia OCT

Nonostante i numerosi vantaggi discussi finora, ci sono alcuni problemi riguardanti l'implementazione di SD-OCT.

4.8.1 Dispersione

La *dispersione* è un fenomeno che degrada la qualità di un'immagine OCT e diventa elevata nel caso di impiego di sorgenti a banda larga. Il fenomeno consiste nella scomposizione di un'onda elettromagnetica in un fascio di onde monocromatiche, nel momento in cui questa attraversa un corpo, avente uno specifico indice di rifrazione. La velocità con cui si propaga l'onda dipende dalla lunghezza d'onda λ . Siccome ciascuna onda monocromatica possiede una λ differente, tenderà a viaggiare nel tessuto ad una velocità differente (alcune componenti spettrali di luce a banda larga rallentano l'una rispetto all'altra mentre la luce passa attraverso il mezzo). Poiché diverse lunghezze del percorso ottico corrispondenti a diverse componenti spettrali nel mezzo possono essere compensate con diverse posizioni dello specchio di riferimento, l'ampiezza effettiva della funzione di coerenza aumenta (compromettendo così la risoluzione assiale).

L'effetto netto è l'allargamento dell'impulso sorgente, con conseguente distorsione del segnale e, talvolta, l'impossibilità di rilevare un segnale di interferenza. Questi fattori nel loro insieme producono una riduzione della risoluzione assiale.

Solitamente la dispersione sulla profondità assiale è trascurabile ed è principalmente causata da uno sbilanciamento ottico nei due bracci dell'interferometro. Nel caso di immagini retiniche, la maggior parte della dispersione nasce dal vitreo, che costituisce gran parte della lunghezza dell'occhio. Il metodo correntemente usato per eliminare tale effetto è la compensazione di dispersione. Tale metodo si serve di specchi chirpati, ricoperti da materiale dielettrico; vengono progettati in modo che a diverse lunghezze d'onda generate per dispersione nel materiale corrispondano differenti lunghezze di penetrazione e di conseguenza diversi ritardi di gruppo. Si possono quindi generare strati di copertura aventi ritardi di gruppo tali da compensare quelli prodotti dal mezzo attraversato. Nel caso di SD-

OCT, esiste un altro approccio per compensare la dispersione: via software. Recentemente, due gruppi di ricerca indipendenti all'*Harvard Medical School* (Boston, MA) e al *Massachusetts Institute of Technology* (MIT; Cambridge, MA) hanno discusso numerosi metodi per compensare la distorsione. Un esempio di immagini ottenute senza correzione di dispersione (A) e con correzione tramite specchio (B) o software (C) sono presentate in Figura 30.

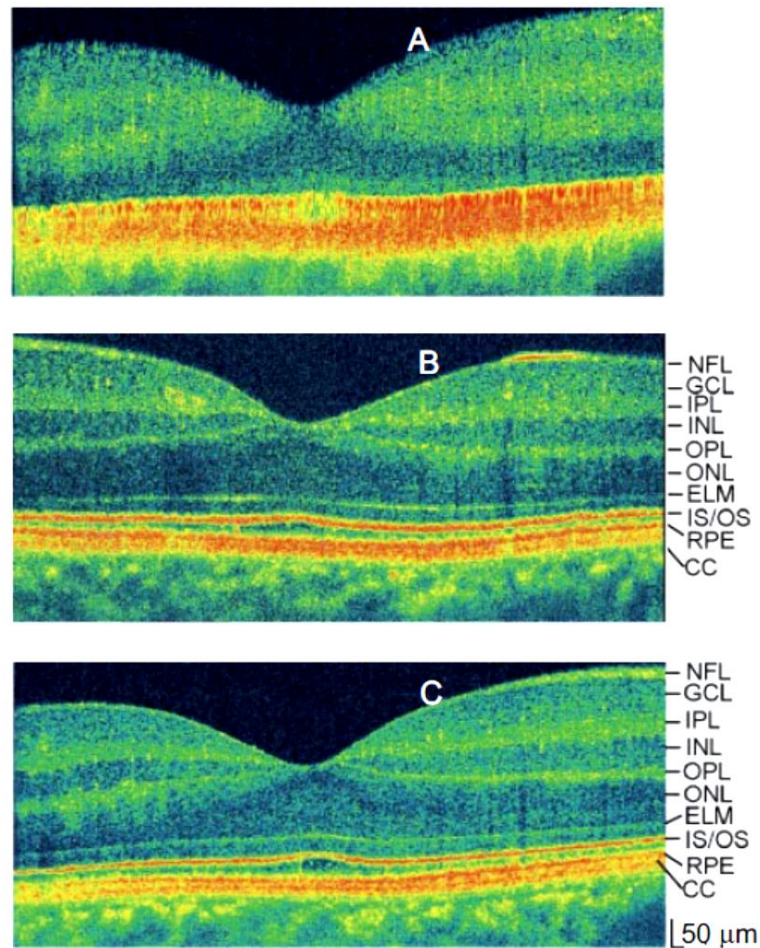


Figura 30: Immagini retiniche con e senza compensazione della distorsione. (A) Immagine della retina senza compensazione della distorsione. (B e C) Immagini della retina con compensazione della distorsione utilizzando una cella d'acqua nel braccio di riferimento e attraverso software, rispettivamente. NFL, strato di fibra nervosa; GCL, strato di gangli; IPL, strato interno plexiforme; INL, strato interno nucleare; OPL, strato plexiforme esterno; ONL, strato nucleare esterno; ELM, membrane sterne di confine; IS/OS, fotorecettore interno e segmento di giunzione esterno; RPE, epitelio retinale pigmentato; CC, corio capillari.

4.8.2 SNR *Drop-Off*

Movimenti del campione o della sonda possono affievolire il segnale, decrementare la risoluzione assiale e (o) trasversale, e ridurre SNR (*SNR Drop-Off*), che si manifestano in una distorsione e in una sfocatura dell'immagine.

L'*SNR Drop-Off* è un fenomeno causato dal non perfetto mantenimento della monocromaticità dell'onda durante l'acquisizione del segnale.

In TD-OCT, il movimento del campione o della sonda influenzano solo i pixel dell'immagine per i quali è stato acquisito il segnale. Se il tempo di acquisizione del segnale per pixel è molto breve, il peggioramento di SNR e della risoluzione spaziale dovuto al movimento può essere trascurato.

Tuttavia, il deterioramento dell'immagine dovuta al movimento nei sistemi SD-OCT, nei quali il segnale è acquisito nel tempo a diverse profondità di interesse nel campione, può essere rilevante.

Il *drop-off* di SNR nei sistemi SD-OCT è dovuto alla risoluzione finita di lunghezza d'onda durante l'acquisizione del segnale. Nei sistemi SS-OCT, la larghezza di linea associata a ciascun numero d'onda è così piccola che questo fattore può essere trascurato. Il *drop-off* di SNR nei sistemi SS-OCT è principalmente dovuto alle non linearità nella scansione dei numeri d'onda. Usualmente queste non linearità non sono cospicue nelle swept source, e così questo problema non è prominente e può essere trascurato oltre il range di scansione in profondità.

Nei sistemi SD-OCT con spettrometro, SNR non è lo stesso lungo tutto il range di scansione in profondità. Infatti, scende a mano a mano che la differenza di percorso tra braccio di riferimento e braccio campione aumenta. Il *drop-off* di SNR può essere descritto come la convoluzione tra la funzione di risoluzione spettrale, che è una funzione reale dell'ampiezza finita dei pixel del dispositivo di foto rivelazione, CCD, e del segnale interferenza nel dominio della frequenza. Nel sistema SD-OCT con spettrometro, il *drop-off* di SNR può essere abbastanza serio vicino ai 20dB oltre il range di scansione. Si può migliorare questo fatto da un lato diminuendo la dimensione dei pixel della camera CCD o muovendo la regione di interesse del campione vicino al punto di uguale lunghezza di percorso. Recentemente, Z. Hu et al.(2005) hanno riportato un miglioramento del *drop-off*

acquisendo due set di spettri; uno prima e uno dopo lo shift del dispositivo CCD di una distanza pari a metà della dimensione di un pixel.

4.8.3 Segnale simmetrico

Poiché lo spettro acquisito in SD-OCT è una funzione reale, la sua trasformata di Fourier (FT) è simmetrica rispetto al punto in cui i cammini si eguagliano. Questo porta a ridurre il contenuto informativo acquisibile sull'intera scansione di dati. Per ovviare a ciò è necessario costruire un segnale complesso, e quindi ricavare informazioni sulla fase del segnale.

La natura simmetrica dell'FT causa quindi una immagine speculare che limita il range di scansione complessivo in SD-OCT. Il modo per evitare l'immagine speculare e quindi raddoppiare il range di scansione è ottenere il segnale complesso a range totale. Per fare questo, l'informazione di fase del segnale di interferenza deve essere recuperato. Sono stati sviluppati diversi metodi per ottenere questo risultato. Un approccio è il *five-frame method*, nel quale si costruisce il segnale complesso acquisendo cinque misure consecutive degli spettri presi con uno *shift* di fase incrementale di $\pi/2$. La figura sottostante mostra un'immagine di occhio porcino acquisita con SD-OCT tradizionale e complessa.

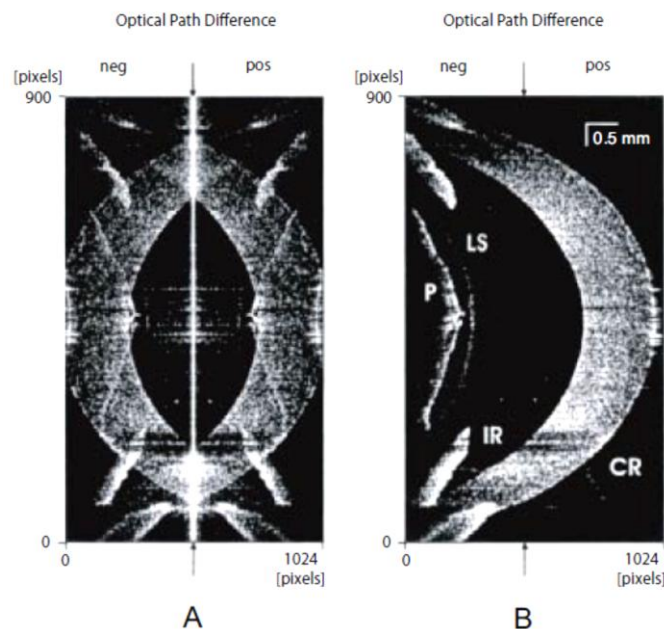


Figura 31: Immagini di occhio porcino. (A) Immagine di occhio porcino ottenuta con SD-OCT standard. L'immagine speculare è causata dalla natura simmetrica della trasformata di Fourier (FT) di una funzione reale. (B) Immagine di occhio porcino priva di wrapping grazie all'acquisizione complessa del segnale (neg: negativo; pos: positivo).

Altri metodi includono l'utilizzo di un accoppiatore a fibre ottiche 3x3 nell'interferometro, la traslazione dello specchio di riferimento per introdurre uno *shift* di fase di 90°, e l'applicazione di un modulatore di fase elettro-ottico per acquisire lo spettro OCT complesso.

5 OPTOELETTRONICA E COMPONENTI OTTICI

In questa sezione ci si soffermerà su alcuni componenti ottici ed elettronici per permettere il confronto delle implementazioni della tecnologia OCT e capire alcuni dei punti di forza o dei limiti di questa. Questi comprendono le sorgenti, le linee di ritardo ottico, l'interferometro, i rivelatori.

5.1 Sorgenti

La sorgente ideale per un OCT, sia *swept* o meno, dovrebbe avere tipicamente una lunghezza d'onda centrale attorno agli 800nm per l'analisi di tessuti trasparenti e ai 1300nm per i tessuti non trasparenti, un ampio spettro, un profilo del fascio gaussiano, un'alta potenza di output, basso rumore, design compatto, essere semplice da integrare in un dispositivo biomedico di *imaging*.

Le sorgenti a semiconduttore sono oggi quelle più largamente impiegate. Sono sorgenti a onda continua che includono i diodi superluminescenti e gli amplificatori ottici a semiconduttore (SOA). Come in un semplice modello di diodo emettitore di luce (LED), in una giunzione p-n polarizzata direttamente, un elettrone cade in una lacuna in un processo chiamato ricombinazione. Contemporaneamente alla transizione dell'elettrone, viene generato un fotone. Se nella giunzione si verifica una forte polarizzazione in avanti, come nei diodi a superluminescenza (SLD), si forma una grande densità di elettroni e lacune, e la potenza in uscita può raggiungere valori dell'ordine di 1mW. Tuttavia, la corrente non può aumentare in modo indefinito o la amplificazione della radiazione superare la perdita: perdite avverranno comunque, e potrebbero distruggere le caratteristiche dello spettro ampio. Queste sorgenti hanno il vantaggio di un costo relativamente basso, una piccola dimensione, un profilo Gaussiano, e un output modulato variando la corrente. Frequentemente vengono combinati assieme due SLD con lunghezze d'onda leggermente diverse per produrre spettri ancora più ampi. Tuttavia, la potenza di queste sorgenti (1 mW) non è sufficiente per l'*imaging in vivo*, e il loro uso è quindi stato limitato generalmente a sistemi più lenti che operano *in vitro*.

Le sorgenti ad amplificatori ottici a semiconduttori (*Semiconductor Optical Amplifiers*, SOA) sono le più ampiamente utilizzate per l'*imaging* ad alta velocità. Gli amplificatori ottici a semiconduttore utilizzano un semiconduttore come mezzo attivo ottenendo anche qui l'effetto di amplificazione o guadagno per effetto dell'emissione stimolata grazie però ad un segnale di pompa elettrico che crea inversione di popolazione.

Questi amplificatori hanno una struttura simile ai diodi laser Fabry-Perot, ma con elementi anti-riflesso sulle facce esterne. Progetti recenti includono strati anti-riflesso e guide d'onda inclinate che garantiscono riflessioni delle facce esterne inferiori allo 0.001%. Esse consentono di creare una perdita di potenza concentrata maggiore del guadagno in cavità, prevenendo il formarsi di un'oscillazione laser. Tali amplificatori lavorano a lunghezze d'onda tra gli 850nm ed i 1600nm e generano guadagni fino a 30dB.

L'amplificatore ottico a semiconduttore ha piccole dimensioni, è poco costoso può essere integrato con laser a semiconduttore, modulatori, ecc., tuttavia il SOA è abbastanza rumoroso, presenta un guadagno inferiore rispetto ad altri tipi di amplificatori (ad esempio, quelli in fibra drogata all'erbio, EDFA), una moderata sensibilità alla polarizzazione ed elevate non-linearità a tempi di risposta molto veloci. Questo origina dal fatto che il tempo medio di vita degli elettroni nello stato eccitato è molto ridotto e questo comporta rapide reazioni del guadagno alle variazioni di potenza del segnale utile e di quello di pompa. A sua volta rapide variazioni di guadagno possono distorcere il segnale. Queste non-linearità costituiscono il problema maggiore per applicazioni nelle comunicazioni ottiche. Tuttavia i SOA garantiscono la possibilità di ottenere guadagno per lunghezze d'onda diverse dagli EDFA.

Due modelli di laser a cristalli a stato solido sono diventati tra le più importanti sorgenti in OCT: il laser a titanio zaffiro ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$) e quello a forsterite cromo ($\text{Cr}^{4+}\text{Mg}_2\text{SiO}_4$), sono in grado di fornire un'alta risoluzione e una grande potenza in uscita. Essi sono sorgenti a luce pulsata con durate nel range dei femtosecondi. Questi laser paramagnetici contengono ioni di lantanite e actinide, che sono usati per drogare il materiale ospite, come il vetro o il cristallo. Le interazioni vibrazionali tra gli ioni ospiti e quelli drogati portano ad uno spettro ampio di assorbimento e di emissione della radiazione. I laser sono otticamente attivati da un'inversione di popolazione tramite un pompa laser. Questi laser permettono grandi potenze e ampie larghezze di banda ma sono generalmente complessi e costosi.

Per il laser $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ il cristallo è generalmente pompato con un laser ad argon. La potenza di picco è di circa 400mW, la lunghezza d'onda centrale è nel range di 800nm e la larghezza di banda si avvicina ai 200nm. Con questa sorgente è stato possibile ottenere una risoluzione in al di sotto dei $2\mu\text{m}$. Tuttavia, poiché la lunghezza d'onda ottima per l'*imaging* nei tessuti non trasparenti è di circa 1300nm questa sorgente è usata soprattutto nei tessuti trasparenti, per esempio l'occhio, o per profondità inferiori ai $500\mu\text{m}$.

Il laser $\text{Cr}^{4+}\text{Mg}_2\text{SiO}_4$ offre una penetrazione di indagine superiore nei tessuti non trasparenti rispetto al laser precedentemente visto, la lunghezza d'onda centrale è di 1280nm con una potenza in uscita di 300mW. Poiché la larghezza di banda è di 200nm si riescono ad ottenere risoluzioni al di sotto dei $4\mu\text{m}$. Inoltre, dal momento che la lunghezza d'onda media è vicina alla finestra ottica per la rivelazione delle radiazioni retrodiffuse nel tessuto biologico, tale sorgente è più pratica per l'*imaging* delle patologie umane. Assieme alla alta potenza che la caratterizza essa è particolarmente utile come sorgente per l'*imaging in vivo*.

Possono essere impiegate come sorgenti anche amplificatori ottici a fibre drogate con terre rare. Gli amplificatori in fibra drogata (DFA) sono amplificatori ottici che usano direttamente un tratto di fibra ottica drogata di lunghezza L come mezzo attivo per l'amplificazione di un segnale ottico. Il segnale utile che si vuole amplificare ed un segnale ottico di pompa vengono multiplati in una fibra drogata ed il segnale ottico utile risulta amplificato per effetto dell'emissione stimolata di fotoni grazie all'interazione del segnale ottico di pompa con gli ioni del drogante.

Il segnale ottico di pompa eccita infatti gli elettroni del drogante e li porta in uno stato a più alta energia (inversione di popolazione) da cui essi possono decadere in uno stato ad energia inferiore mediante l'emissione stimolata di un fotone. Generalmente i livelli di energia coinvolti formano un sistema a tre o quattro livelli e quindi includono transizioni non radiative dal livello a massima a quello a minima energia e viceversa.

La finestra di amplificazione di un amplificatore ottico (o finestra di guadagno) ovvero il range di lunghezze d'onda per cui l'amplificatore mostra un guadagno sfruttabile, dipende dal tipo di ioni di drogante impiegati, dalla struttura vetrosa della fibra ottica e dalla lunghezza d'onda del segnale di pompa impiegato. Il guadagno di un amplificatore ottico dipende anche dalla intensità locale del raggio in ogni punto all'interno dell'amplificatore.

Nonostante le transizioni elettroniche di un singolo ione siano ben definite, quando gli ioni vengono inseriti nel vetro della fibra ottica si verifica un allargamento dei livelli energetici e di conseguenza si allarga anche la finestra di lunghezze d'onda che possono essere amplificate. Questo allargamento ha una componente omogenea ed una eterogenea, il che comporta uno spettro di guadagno non uniforme su tutte le lunghezze d'onda e dunque una possibile fonte di distorsione dell'ampiezza.

La capacità per una sorgente gaussiana a banda ampia di spazzolare le frequenze è importante per SS-OCT. Idealmente, la profondità lineare dello spettro dovrà essere piccola e la velocità di spazzolamento veloce, il *mode-hopping* minimizzato e la velocità di spazzolamento lineare.

5.2 Interferometri

L'interferometro di Michelson con un *beam splitter* 50:50 rappresenta la configurazione originale dei sistemi OCT e questa configurazione probabilmente rimane la più comune. In questa configurazione la potenza del braccio di riferimento è parzialmente attenuata per minimizzare/ottimizzare la performance ma l'attenuazione ottimale rimane controversa. La maggior parte dei design attuali impiegano una detenzione dualmente bilanciata, che dovrebbe essere lo standard, a questo punto, per i sistemi TD-OCT, e possibilmente anche per i sistemi SS-OCT per ridurre l'eccesso di rumore. Alcuni gruppi usano *splitter* di fascio sbilanciati (90:10), dove la maggior parte della potenza è indirizzata al braccio campione. Questo è fatto dal momento che la riflessione del campione è sostanzialmente inferiore a quella del segnale dal braccio di riferimento. Nonostante ciò, molti design sempre più complessi sono stati proposti tuttavia essi costituiscono in pratica delle modifiche alla configurazione originale dell'interferometro di Michelson.

5.3 Linee di ritardo ottico

Esistono molte configurazioni per le linee di ritardo ottico, ma quella basata su reticolo di diffrazione probabilmente è la più comunemente usata per i sistemi di *imaging* ad alta velocità.

Sono presentati qui altre configurazioni comunemente usate negli ultimi 10 anni: riflettore a galvanometro, *piezoelectric fiber stretcher*.

La versione più semplice per l'implementazione di una linea di ritardo ottico è costituita da uno specchio posto su un galvanometro a scansione lineare nel braccio di riferimento. Il galvanometro tipicamente scansiona al di sotto di 30 mm/s. Nei primi sistemi questo corrispondeva alla generazione di una immagine in 30 secondi, con profondità di scansione di circa 3mm, con la dimensione in pixel di 300 x 300. Questo è insufficiente per prevenire artefatti da movimento e per la necessità generale di acquisire un ampio numero di immagini in breve tempo. Il ritardo di gruppo e il ritardo di fase cambiano in parallelo, non c'è instabilità di polarizzazione e non ci sono perdite significative di potenza associate allo specchio o qualsiasi altra riflessione aberrante.

A causa dei limiti di velocità associati al galvanometro, i *piezoelectric fiber stretcher* sono stati introdotti come metodo per aumentare la velocità di acquisizione. Essi permettono velocità di acquisizione dell'ordine di 4 frame/s, 250 x 250 pixel. In questo approccio la fibra a modo singolo nel braccio di riferimento è avvolta attorno a trasduttori piezoelettrici che sono tipicamente ceramiche policristalline.

Un trasduttore piezoelettrico (PZT) è una ceramica multicristallina che subisce una espansione del cristallo quando una carica elettrica viene applicata. I centri degli elementi del cristallo subiscono un riallineamento, che fa sì che l'intero cristallo non si trovi più ad un volume minimo bensì si espanda in funzione della tensione. I PZT si espandono in maniera proporzionale alla tensione applicata, allungando le fibre e aumentando così il gruppo di ritardo ottico. Essi possono essere impilati per aumentare il loro effetto ma ciò può portare a frizione e allo sviluppo di calore, che potrebbero a loro volta portare ad una rottura del cristallo. I PZT hanno frequenze di risonanza che dipendono dalla massa e dalle proprietà elastiche del cristallo, come la suscettibilità elettrica. I problemi più rilevanti associati ai PZT sono: l'isteresi, la coerenza di polarizzazione, la dispersione dei modi di polarizzazione e le alte tensioni.

Gli estensori PZT non si comportano come unità omogenee ma consistono di micro domini; si può vedere che non appena un dominio cambia in risposta al campo, si sviluppa una frizione tra di loro che comporta una degenerazione della risposta (quindi la risposta ad una tensione applicata non è lineare, così che, ad esempio, una forma d'onda triangolare

non comporta una risposta triangolare). Alla velocità di 4 frame/s è possibile attuare una correzione di primo ordine, ma a velocità di acquisizioni maggiori è più difficile operare una correzione per l'isteresi. I PZT sono anche soggetti a rottura a temperature vicino agli 80°C. L'aumento di temperatura è dovuto a dissipazione di potenza e alla frizione, che peggiora se si impiegano onde triangolari o un grande numero di pile. Gli allungatori sono poi soggetti anche a tre diversi problemi di polarizzazione. Il primo è l'incapacità di mantenere una polarizzazione fissa, dovuta all'avvolgimento delle fibre; il secondo problema di polarizzazione è una deriva lenta che risulta dal graduale incremento di temperatura del cristallo; infine, la dispersione dei modi della polarizzazione avviene a causa dell'allungamento attivo delle fibre (diversi stati di polarizzazione corrispondono a diverse espansioni del cristallo).

Le linee di ritardo che ricorrono a reticoli di diffrazione sono state introdotte nei primi anni '90 per modellare impulsi dell'ordine dei femtosecondi. Qualitativamente, la radiazione di riferimento è direzionata su un reticolo; la radiazione dispersa viene poi focalizzata su uno specchio inclinato, come mostra la figura 32.

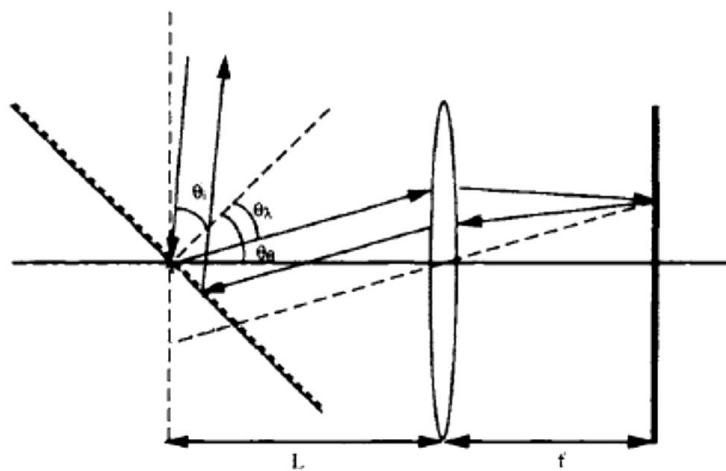


Figura 32: Schema del braccio di riferimento di una linea di ritardo basata su reticolo di diffrazione

In funzione della posizione sullo specchio avviene uno *shift* della fase della radiazione riflessa dallo specchio, e quindi poiché la radiazione è dispersa in funzione della frequenza un aumento della fase nel dominio della frequenza risulta in un ritardo di gruppo ottico nel dominio del tempo.

Questa struttura ha diversi vantaggi oltre alla velocità. Primo, i ritardi di gruppo e di fase possono essere controllati in modo separato; il secondo vantaggio della tecnica basata su reticolo è che la dispersione può essere compensata senza la necessità di componenti ottici aggiuntivi. Se la dispersione avviene nel tessuto essa può essere compensata alterando la posizione dello specchio/lente relativa al reticolo. Queste linee di ritardo possono ottenere immagini a 8 frame/s, a 256 x 256 pixel, 2000 scansioni/s. Gli svantaggi includono una perdita di potenza associata alla griglia e una dispersione cromatica associata all'impiego di una sorgente a banda larga.

5.4 Rivelatori

TD-OCT e SS-OCT usano i singoli diodi PIN (diodo tipo-p, intrinseco, tipo-n) per la rilevazione di segnali ottici, mentre SD-OCT tipicamente impiega un dispositivo CCD (*Charge-Coupled Device*). SD-OCT potrebbe sfruttare un singolo rivelatore e una griglia o dispositivi simili, ma questo si fa raramente.

5.4.1 CCD

Il CCD (acronimo dell'inglese *Charge-Coupled Device*, in italiano DAC, dispositivo ad accoppiamento di carica) consiste in un circuito integrato formato da una riga, o da una griglia, di elementi semiconduttori in grado di accumulare una carica elettrica (*charge*) proporzionale all'intensità della radiazione elettromagnetica che li colpisce. Questi elementi sono accoppiati (*coupled*) in modo che ognuno di essi, sollecitato da un impulso elettrico, possa trasferire la propria carica ad un altro elemento adiacente.

Inviando al dispositivo (*device*) una sequenza temporizzata d'impulsi, si ottiene in uscita un segnale elettrico grazie al quale è possibile ricostruire la matrice dei pixel che compongono l'immagine proiettata sulla superficie del CCD stesso.

Questa informazione può essere utilizzata direttamente nella sua forma analogica, per riprodurre l'immagine su di un monitor o per registrarla su supporti magnetici, oppure può essere convertita in formato digitale per l'immagazzinamento in file che ne garantiscano il riutilizzo futuro.

La radiazione elettromagnetica è focalizzata su un array di rivelatori e l'output di ogni rivelatore deve essere letto in modo sequenziale.

L'unità base della CCD è un condensatore a semiconduttore metallo ossido (MOS). Uno strato di diossido di silicone si forma sul silicone di tipo p. Il *gate* è un elettrodo metallico polarizzato positivamente rispetto al silicone. Le coppie elettrone-lacuna si formano nel momento in cui entrano i fotoni. Gli elettroni sono attratti dal silicone finché si mantiene una tensione positiva mentre le lacune si muovono in direzione opposta. Questi elettroni sono intrappolati sotto il metallo da una barriera di potenziale: gli elettroni si accumulano, quindi, durante il periodo in cui si effettua la misura o il periodo di integrazione.

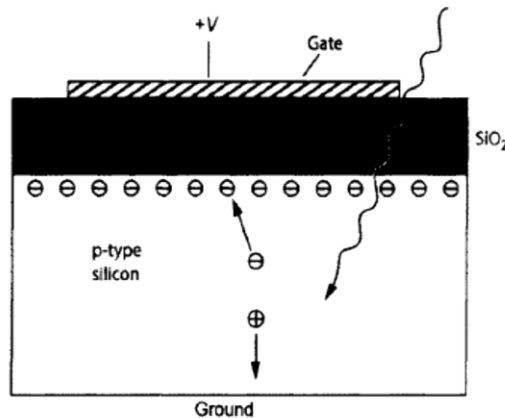


Figura 33: Schema di un elemento componente un CCD

Ora, una serie di condensatori MOS devono essere letti in modo sequenziale. Non appena sia stato raggiunto un tempo di integrazione adatto, la carica può essere rimossa dalla catena di MOS, attraverso una rimozione sequenziale dei potenziali dal *gate*, *shiftando* la barriera quantica effettiva. Non si può fare una nuova integrazione, fino a che le cariche non siano state rimosse per tutta la lunghezza dell'array. Per aumentare, quindi, la velocità di scansione, si pone una seconda CCD schermata, chiamata "registro di trasporto", lungo il campo e schermata per la luce entrante. Quando la carica è trasferita al registro di trasporto può essere letta in modo sequenziale mentre la CCD originale sta accumulando l'immagine successiva. Quando più array sono presenti la lettura degli elettroni viene fatta attraverso la lettura del registro. Un aumento della complessità della CCD può, da un lato, migliorare la performance, dall'altro, portare a significative sorgenti di rumore.

5.5 Elettronica di rilevamento

La maggior parte dell'elettronica di rilevamento non sarà discussa, in modo particolare per quanto riguarda il design del circuito. Tuttavia, comprendere alcuni aspetti dei componenti elettronici e ottici è necessario per comprendere i punti di forza e i limiti delle varie implementazioni OCT.

5.5.1 TD-OCT

Con TD-OCT, dopo che il segnale è stato rivelato, esso passa attraverso un filtro passa banda per rimuovere il rumore a basse frequenze. Dopo il filtraggio, il segnale viene demodulato attraverso una demodulazione sincrona (*mixing*), o una demodulazione asincrona (*envelope detection*). Lo scopo principale della demodulazione è quello di rimuovere la frequenza portante (*shift Doppler*) dovuta al movimento della specchio in movimento. Con TD-OCT il segnale passa attraverso un amplificatore logaritmico di demodulazione che comprime i dati e aumenta SNR. Dopo che la frequenza portante è stata rimossa viene effettuata una conversione analogico-digitale. In entrambi i tipi di demodulazione, la frequenza portante deve essere molto maggiore rispetto alla frequenza di modulazione che porta l'effettiva informazione. Nella demodulazione sincrona il segnale misurato si combina con un segnale ad una frequenza identica a quella della frequenza portante. È essenziale che la fase della portante e del segnale aggiunto siano vincolate. Ciò porta ad uno *shift* dello spettro del segnale modulato nella sua posizione originale sull'asse delle frequenze. Il segnale è poi filtrato con un filtro passa-basso per rimuovere la frequenza portante. Con la demodulazione asincrona, come suggerisce il nome, non è necessaria la sincronizzazione (fase e frequenza) tra i segnali di input e il segnale di demodulazione. Essa si basa sul fatto che la funzione di autocorrelazione è positiva e la sua frequenza angolare (involuppo) varia lentamente se confrontata a quella portante. Tuttavia, c'è un *trade-off* tra il rendimento di potenza di output e la qualità del segnale di demodulazione. Inoltre, la demodulazione asincrona richiede una potenza di trasmissione maggiore rispetto a quella sincrona.

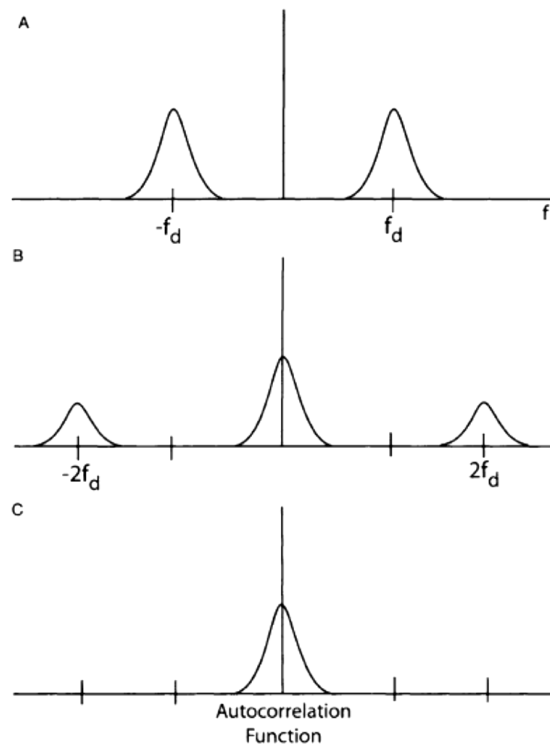


Figura 34: Elettronica di rilevamento della maggior parte dei sistemi TD-OCT. In A, il segnale rivelato passa attraverso un filtro passa-banda per rimuovere il rumore a basse frequenze. In B, si effettua una demodulazione per separare la funzione di autocorrelazione dalla portante. In C, si effettua un filtraggio passa-basso per rimuovere la portante prima della conversione A-D

5.5.2 FD-OCT

Con FD-OCT il segnale è rilevato da un array di fotodiodi, seguito da digitalizzazione tramite un convertitore analogico digitale (*data acquisition board*). I dati sono poi trasferiti ad un elaboratore per estrarne il contenuto informativo. Prima di operare la trasformata di Fourier discreta (DFT), i punti dello spettro dovrebbero essere equi-distribuiti nell'intervallo di numeri d'onda interessato e quindi anche nel corrispondente intervallo di lunghezze d'onda. La DFT viene dunque effettuata sui dati digitalizzati. Viene poi filtrato il segnale ottenuto per rimuovere il rumore di fondo, e successivamente viene attuata una media spettrale per ottenere spettri meno rumorosi. L'immagine subisce un'elaborazione che include una compensazione per la dispersione, una compensazione per le diverse sensibilità proprie dei fotodiodi, e una compressione logaritmica (sebbene questa avvenga dopo DFT).

5.6 Conversione Analogico-Digitale

Una conversione analogico-digitale (AD) è ovviamente richiesta per un monitoraggio digitale dei dati acquisiti e per la loro elaborazione. Il convertitore A-D campiona a 2^n , dove n è il numero di bit nel convertitore A-D e il range dinamico è dato da $10\log(2^n)$.

Le quattro più comuni sorgenti di rumore nel convertitore A-D sono l'errore di offset, l'errore di scala, la non linearità e non monotonia. Errori di quantizzazione o errori ad essa associati, sono particolarmente significanti nelle tecniche OCT nel dominio della frequenza, poiché la trasformata di Fourier viene fatta sul segnale già digitalizzato, non sul segnale analogo analogico.

Tutti i sistemi OCT digitali sono oggi ampiamente studiati poiché permettono il vantaggio di alterare il filtro passa banda attraverso un controllo computerizzato. Questo è particolarmente utile per i sistemi OCT *Doppler*. Per la realizzazione di un sistema OCT interamente digitale, è necessaria una alta frequenza di campionamento, come anche un ampio range dinamico del convertitore analogico-digitale. La frequenza di campionamento della conversione A-D deve essere alta abbastanza per riuscire a digitalizzare la più alta frequenza del segnale di interferenza. Teoricamente, per il teorema di Nyquist, è necessaria una frequenza di campionamento di almeno due volte maggiore della più alta frequenza campionata.

6 ZEBRAFISH

6.1 Introduzione



Figura 35: Zebrafish

Lo scorso decennio un piccolo pesce originario dei fiumi del sud-est asiatico è salito alla ribalta come uno dei sistemi modello più importanti nella biologia dello sviluppo e riconosciuto come tale dal NHI (*National Institute of Health*) americano. Il pesce zebra (*Danio rerio*) noto anche con il nome inglese Zebrafish sta assumendo un ruolo sempre più predominante in ambito scientifico non solo nella ricerca di base, ma anche negli studi comportamentali, nella patogenesi di origine batterica, nelle neurodegenerazioni, nella ricerca farmaceutica ed in particolare nello studio di malattie ereditarie e congenite. Questo piccolo pesce, 2-3 cm di lunghezza in età adulta, ha fatto il proprio ingresso nella storia della biologia grazie alla trasparenza dell'embrione, una grande capacità riproduttiva, la fecondazione esterna, ed un breve ciclo riproduttivo. Oltre quanto menzionato in precedenza, la possibilità di indurre mutazioni puntiformi su singoli geni, isolare mutanti e l'uso di tecnologie proprie della biologia cellulare, quali il trapianto di cellule e l'inattivazione selettiva di attività geniche specifiche, ha permesso il suo utilizzo in uno spettro scientifico sempre più ampio. In via di completamento, sulle orme del progetto

6. Zebrafish

genoma umano, è il sequenziamento dell'intero genoma di Zebrafish da parte del Sanger Centre ([55]). Zebrafish è stato utilizzato in diversi ambiti della biologia che vanno dalla biochimica alla biologia comportamentale.

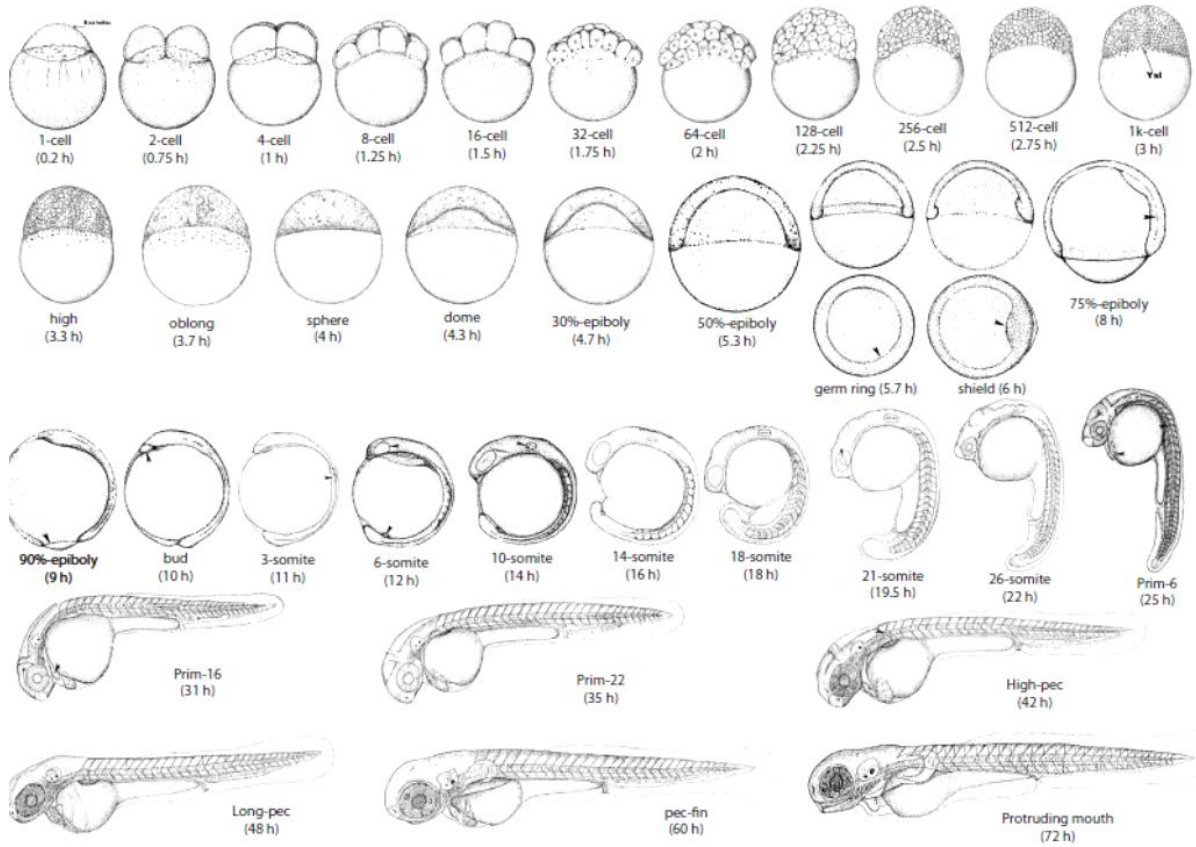


Figura 36: Stadi dello sviluppo embrionale di Zebrafish

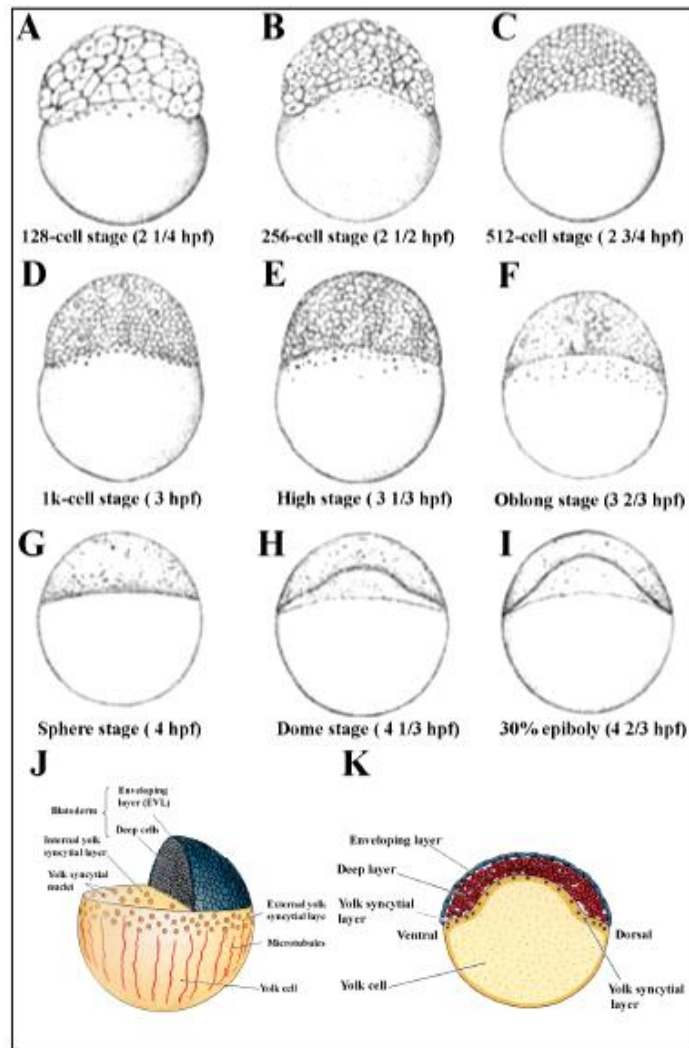


Figura 37: Disegni alla camera lucida di embrioni di Zebrafish nelle prime fasi di sviluppo A-I e schema delle varie componenti cellulari.

6.2 Sviluppo dello Zebrafish: una visione generale

Lo sviluppo dello Zebrafish avviene ad una temperatura tra i 26 e i 30 gradi centigradi. In realtà lo sviluppo può avvenire in un ambito di temperature più ampio che va dai 21 ai 32 gradi centigradi: questo garantisce la possibilità di studi etero cronici (studi sul cambiamento nei tassi di sviluppo di un individuo rispetto all'antenato) durante lo sviluppo utilizzando tecniche di trapianto cellulare.

6. Zebrafish

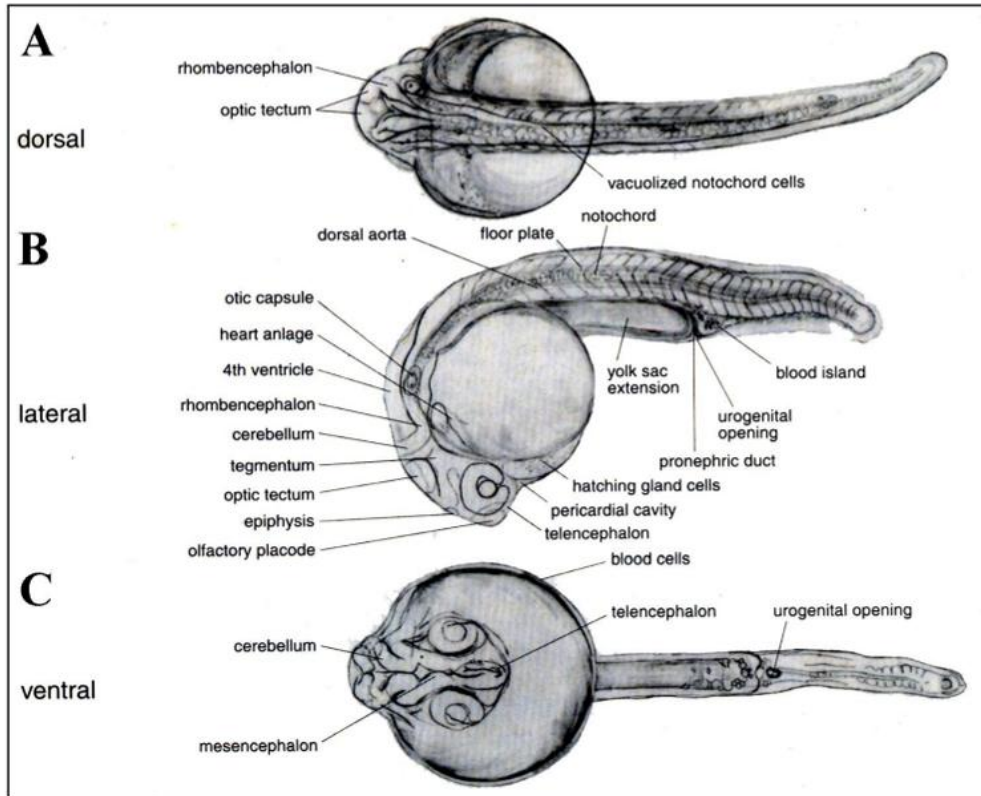


Figura 38: Immagini di embrioni di Zebrafish a 24 ore di sviluppo

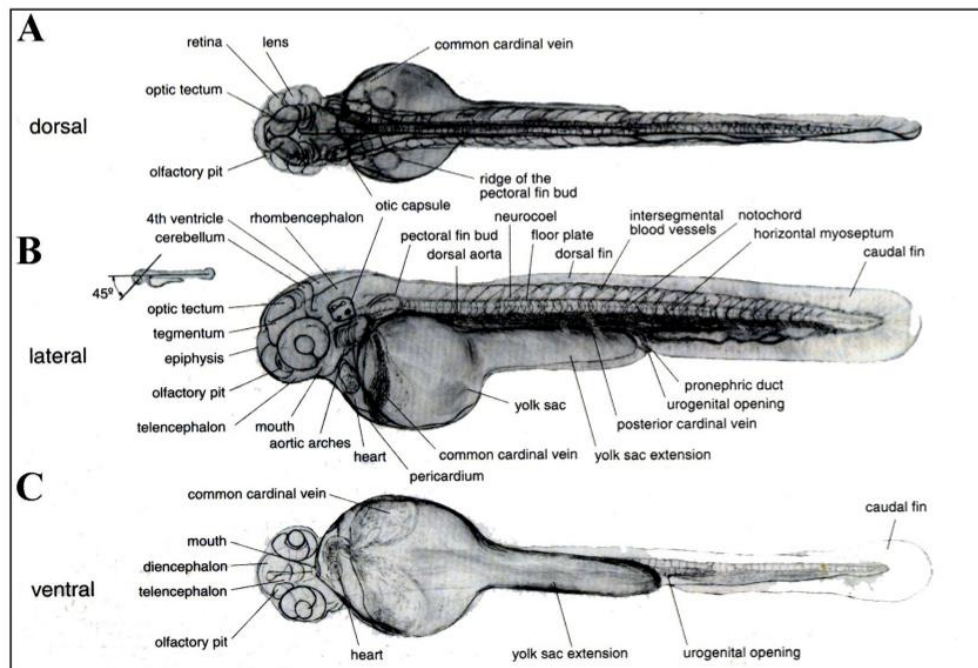


Figura 39: Immagini di embrioni a 48 ore di sviluppo.

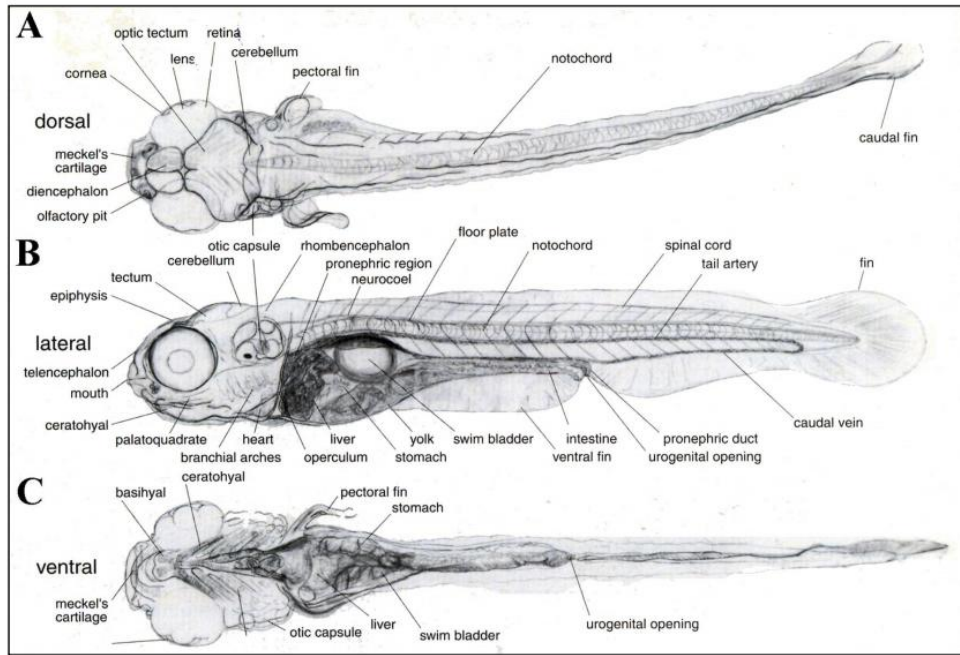


Figura 40: Immagini di embrioni di Zebrafish a 5 giorni.

La prima divisione cellulare avviene dopo tre quarti d'ora e nel giro di 24 ore Zebrafish mostra caratteristiche morfologiche ben distinte. La semplice osservazione al microscopio permette di riconoscere gli occhi, gli otoliti, i somiti, i dotti pronefrici, i precursori delle cellule del sangue, un sistema vascolare di placodi olfattivi e l'epifisi. Inoltre, utilizzando anticorpi o marcatori genetici è possibile evidenziare un sistema nervoso ben organizzato e definito seppur più semplice rispetto a quello dei mammiferi.

Nel giro di altre 48 ore si può osservare una pompa cardiaca e la dinamica delle cellule sangue. Utilizzando marcatori molecolari opportuni si iniziano a distinguere i diversi tipi di neuroni ed un apparato gastrointestinale in formazione che potrà essere osservato morfologicamente al quinto giorno. Si distingue un fegato, istologicamente molto simile a quello dei mammiferi, ed i reni.

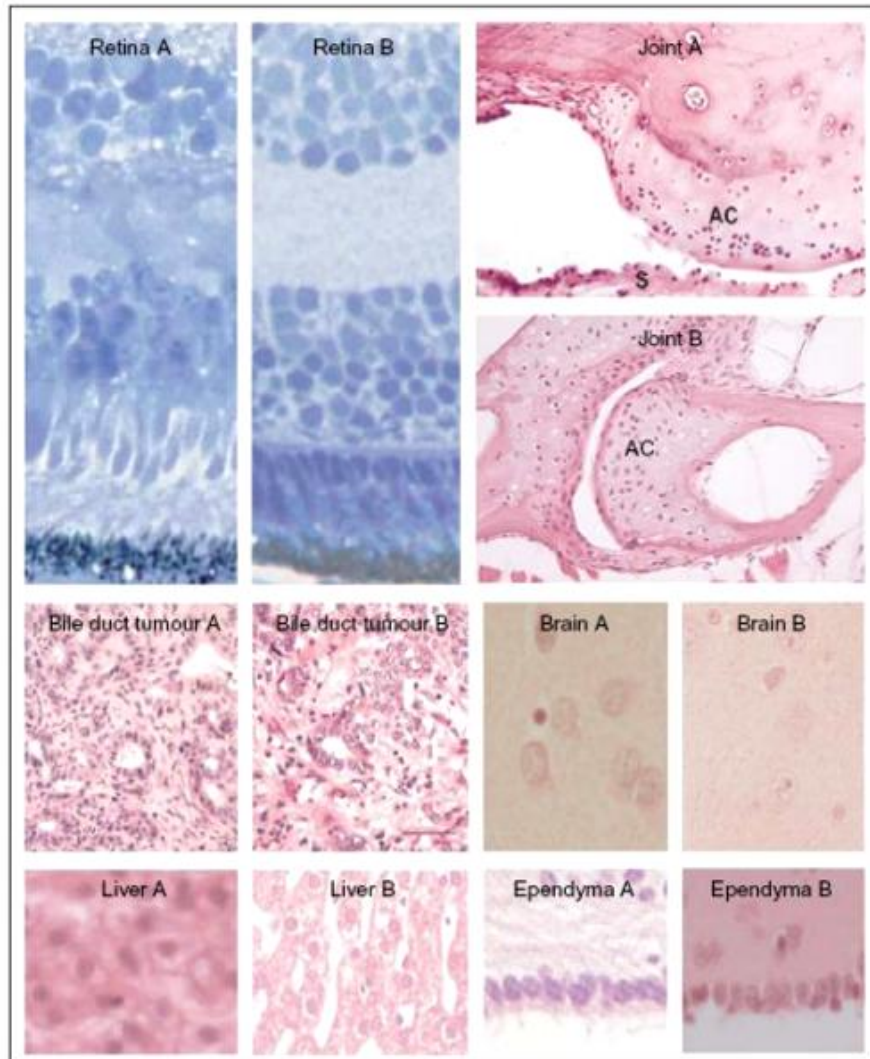


Figura 41: Sezioni di vari organi di Zebrafish e di uomo (le scale di riferimento non sono in proporzione ma si può notare la somiglianza a livello istologico). Le immagini mostrano le seguenti sezioni: retinica, articolare, di un dotto biliare, tumorale, cervello, fegato, ependima (A uomo, B Zebrafish).

Il dato più notevole riguarda il fatto che svariati geni, causati di difetti congeniti nell'uomo, se mutati nello Zebrafish inducono difetti paragonabili, se non del tutto simili, alle mutazioni riscontrate nell'essere umano. Va da sé il fatto che le possibilità di studio sono fortemente amplificate in Zebrafish, sia per le tecniche di manipolazione embrionale, sia per la numerosa progenie.

Un aspetto molto spesso sottovalutato è la somiglianza genetica dei diversi organismi del regno animale. Dei primi 100 farmaci al mondo si conosce in parte il meccanismo d'azione. Tali farmaci lavorano sul prodotto di 62 geni (umani), di questi solo 7 non hanno

corrispondenza nello Zebrafish. Volendo estendere il paragone anche ad invertebrati come il moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) si avranno solo 9 geni non presenti, appena due in più di un vertebrato. Non solo questa somiglianza è numerica ma gli studi sull'evoluzione molecolare hanno dimostrato che i siti attivi delle proteine sono molto spesso identici nei vari organismi, e questi sono in genere i domini in cui i principi attivi dei farmaci agiscono. Chiaramente, non si può attendere una completa somiglianza e probabilmente non tutti i farmaci umani avranno sempre un loro interlocutore molecolare noto o presente nel vertebrato "minore" ma questo si verificherà nella maggior parte dei casi.

6.3 Lo Zebrafish come sistema modello per lo sviluppo e la malattia.

Lo Zebrafish si sviluppa velocemente e permette di osservare la maggioranza dei propri organi nei primi giorni di sviluppo. Le sue dimensioni embrionali (pochi millimetri dopo 5 giorni di sviluppo) permettono di manipolarlo in maniera quasi del tutto automatizzata garantendo così il trattamento e l'analisi di molti embrioni simultaneamente. Inoltre, la numerosa progenie (fino a 200 embrioni la settimana per coppia) e la possibilità di mantenere circa 10 adulti in 5 litri d'acqua, garantisce una quantità di unità sperimentali vastissima nell'arco di un anno. Inoltre, il mantenimento dello Zebrafish è da un centesimo a un millesimo economicamente più vantaggioso rispetto al topo, sistema animale principe delle industrie farmaceutiche.

Non solo i costi di mantenimento spiegano la sua forte crescita nell'utilizzo a scopo di ricerca per sviluppare nuovi farmaci ma anche considerazioni di natura economica sulla quantità di prodotto utilizzato per effettuare l'analisi. Questo rende lo Zebrafish utilizzabile (restando nel campo dell'industria farmaceutica) nelle prime fasi di ricerca, dove si trovano i saggi cellulari. Gli ovvi vantaggi sono che questi potenziali farmaci possono essere analizzati su un organismo o su un mutante anziché su una linea cellulare in pratica nello stesso tempo ed allo stesso costo.

Lo Zebrafish è stato usato storicamente principalmente come modello per comprendere l'embriologia grazie alla alta fecondità, la fecondazione esterna e la trasparenza ottica dell'embrione, che permette sia la visualizzazione diretta dei vari destini cellulari sia la visualizzazione di proteine fluorescenti come la GFP (*Green Fluorescent Protein*).

Recenti sviluppi tecnici usati per lo studio dello sviluppo hanno aperto nuove strade nell'indagine delle diverse funzioni geniche; in particolare, è risultato di grande importanza la possibilità di effettuare “*knock-down*”, ovvero ablazioni genetiche funzionali utilizzando oligo fosforo diammidato morfolino, in grado di bloccare in maniera sequenza specifica la traduzione degli RNA messaggeri.

La possibilità di usufruire di mutanti chimicamente indotti e di effettuare inattivazioni genetiche funzionali ha portato lo Zebrafish ad essere utilizzato come modello per molte malattie umane. Esso è utilizzato per fenocopiare disordini del sistema ematopoietico, cardiovascolare (Steiner et al.1996; Xu et al., 2002), visivo (Goldsmith e Harris, 2003), ed e renale (Drummond et al., 1998). In particolare la ricerca in ambito cardiovascolare ha fornito informazioni importanti sullo sviluppo in generale del cuore grazie alla capacità dello Zebrafish di non dipendere nelle prime fasi dello sviluppo della circolazione sanguigna. Lo Zebrafish è stato utilizzato anche in studi sull'angiogenesi (Lawson e Weinstein, 2002), sull'udito (Whitfield, 2002), e come modello per la sordità genetica umana (Whitfield, 2002). Lo Zebrafish sta inoltre risultando un modello emergente per lo studio dei modelli neurodegenerativi e neuromuscolari come l'Alzheimer (Tomasiewicz et al., 2002), la distrofia muscolare Duchenne e diverse miopatie (Basset e Curriet, 2003).[15]

6.4 OCT su Zebrafish

Durante lo sviluppo embrionale, l'organizzazione della struttura del corpo e la formazione degli organi funzionali richiede cambiamenti dinamici nell'architettura cellulare. La capacità di monitorare direttamente questi complessi movimenti morfogenetici ha ampiamente aiutato la comprensione dello sviluppo normale così come l'analisi di anomalie congenite e mutazioni nei sistemi modello.

L'*imaging in vivo* è molto importante ma anche molto impegnativo. Gli embrioni dei vertebrati sono spesso molto piccoli, richiedendo quindi una risoluzione spaziale alta (<10 μ m) per seguire i movimenti cellulari e distinguere gli strati di tessuto. Inoltre, sebbene alcuni embrioni siano trasparenti come quello di Zebrafish, altri, come l'embrione di topo, sono abbastanza opachi, e quindi è difficile ottenere immagini in profondità attraverso molti strati di tessuto. In più, la velocità alla quale processi come il battito

cardiaco avvengono, può essere difficile da raggiungere per la risoluzione temporale a cui lavorano molti sistemi.

Sebbene esistano queste limitazioni, i recenti avanzamenti nelle metodologie di *imaging* hanno aumentati il livello e il numero di analisi che possono essere fatte in diverse specie di embrioni. Tali avanzamenti hanno avuto un impatto fondamentale nel comprendere molti aspetti dello sviluppo, tra i quali, in particolare, quello cardiovascolare.

Sono stati impiegati diversi metodi per ottenere immagini dello sviluppo cardiovascolare. Metodi come l'*imaging* episcopico e la Tomografia a Proiezione Ottica permettono un'analisi eccellente della struttura 3D degli embrioni poiché permettono di identificare strutture specifiche con marcatori fluorescenti. Tuttavia, il tessuto deve essere fissato per entrambi i metodi e sezionato nel caso di tecniche episcopiche. Altri metodi come la biomicroscopia ad ultrasuoni ad alta frequenza e MRI (Risonanza Magnetica Nucleare) sono non-distruittive e possono essere usate per l'*imaging* di volumi completi di interi embrioni o di specifiche regioni all'interno degli stessi, ma soffrono di una bassa risoluzione spaziale ($\sim 30\text{-}50\mu\text{m}$), che rende difficile l'analisi di cellule singole e strati sottili di tessuto. La MRI è inoltre limitata per la sua bassa risoluzione temporale poiché impiega dai minuti alle ore per collezionare interi volumi 3D, in particolare se è necessaria un'alta risoluzione spaziale. Al contrario, le tecniche ottiche di *imaging* offrono una risoluzione spaziale eccellente (ordine dei *micron* laterale e assiale) e i sistemi confocali a scansione lineare permettono una risoluzione spaziale molto alta che preserva l'alta risoluzione assiale. Questo ha permesso, per esempio, l'acquisizione di volumi 3D del cuore pulsante negli embrioni di Zebrafish ([25]).

Modality	Optoacoustic	Ultrasound	X-ray CT	MRI
Contrast mechanisms	Anatomical, functional, molecular	Anatomical, functional	Anatomical	Anatomical
Safety	Good	Good	Fair	Good
Soft tissue contrast	Good	Fair	Poor	Good
Spatial resolution	0.2–200 μm	50 μm –3 mm	1 μm –1 mm	20 μm –1 mm
Imaging depth	0.5–5 cm	1–25 cm	Whole body	Whole body
Speckle noise	None	Strong	None	None
Cost	Medium	Low	Medium	High

Tabella 5: Confronto di performance tra diverse modalità di *imaging* adatta per la visualizzazione di tutto il corpo di Zebrafish, (R. Ma, [22] 2012)

La microscopia a piano di illuminazione selettivo (SPIM) è stata impiegata per l'*imaging* del cuore pulsante nell'embrione di Zebrafish. Sebbene questa tecnica estenda la profondità di *imaging*, richiede che l'embrione sia incorporato in agarosio per l'acquisizione di immagini simil-tomografiche da molteplici angolature. Questi metodi di *imaging* a fluorescenza hanno il vantaggio che possono essere impiegati embrioni transgenici vivi che in particolari tessuti esprimono proteine fluorescenti. In alcune specie, tuttavia, come nel topo, può essere costoso introdurre tali marcatori in ogni linea mutante che si vuole analizzare.

Recentemente si è visto che l'OCT si adatta a molte di queste richieste ed è prossima ad offrire il miglior compromesso tra risoluzione spaziale e penetrazione in profondità rispetto ad ogni altro metodo disponibile per l'*imaging* di embrioni di molte specie animali, tra cui Zebrafish.

I recenti sviluppi in SS-OCT hanno portato la velocità di acquisizione a 370 kHz rendendo possibili acquisizioni delle dinamiche del cuore di alcune specie di uccello con sistemi OCT, mentre i sistemi OCT con acquisizioni meno rapide possono venire interfacciati con tecniche di cardiografia embrionica per compensare velocità di acquisizione del segnale.

Gli embrioni di Zebrafish hanno raggiunto grande popolarità come modello per lo studio degli effetti di mutazioni genetiche nello sviluppo di strutture come quella dell'occhio, o del cervello, del cuore, del midollo spinale, e dell'intestino. Studi dettagliati delle strutture interne all'embrione in fase di sviluppo richiedono spesso il sacrificio dell'animale, o l'introduzione di molecole fluorescenti. La microscopia confocale è utile per visualizzare piccole strutture, tuttavia le immagini acquisite con un sistema di microscopia richiedono una calibrazione spaziale, e l'elaborazione dei frame acquisiti è computazionalmente oneroso. La microscopia a fluorescenza multifotonica permette un *imaging* 3D delle strutture cellulari, ma richiede la trascrizione del cDNA per inserire le proteine fluorescenti all'interno dell'animale, alterando in modo potenziale il modello.

Studi precedenti hanno anche dimostrato la capacità di OCT di creare immagini di sezioni di embrioni di *Xenopus laevis*, *Rana pipiens*, e di *Danio rerio*. Nello studio condotto da Kagemann et al. ([23] 2008) è stata utilizzata SD-OCT ad alta risoluzione, utilizzando un dominio spettrale/di Fourier di rivelazione che raggiunge i 3,5 μm di risoluzione assiale con lunghezza d'onda centrale a 800nm e 24000 scansioni assiali (A-Scan) al secondo.

Lo scopo dello studio era:

-Dimostrare la capacità di SD-OCT di creare e visualizzare dataset virtuali 3D per riconoscere le strutture negli embrioni di Zebrafish a 24, 28, 72 e 120 ore dopo la fecondazione (*hpf* = *hours post fertilization*) e confrontare i dati con quelli ottenuti tramite sezioni istologiche;

-Dimostrare l'abilità di SD-OCT di visualizzare e misurare i cambiamenti che avvengono durante lo sviluppo dei gruppi embrionali a 24, 28, 72 ore dopo la fecondazione, e l'abilità di fare osservazioni longitudinali per un periodo prolungato (più giorni) in un singolo embrione.

-Dimostrare la capacità di SD-OCT di identificare patologie tessuto-specifiche associate e mutazioni genetiche.

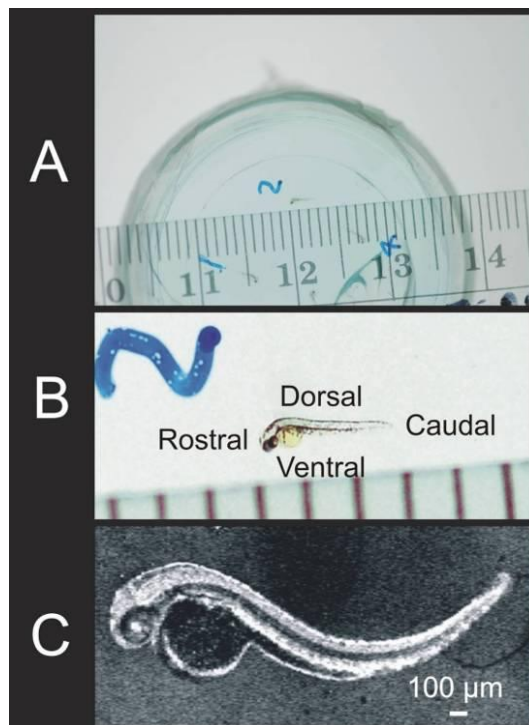


Figura 42: Immagine di uno Zebrafish a 72hpf con un righello, un suo ingrandimento, e come appare se osservato tramite SD-OCT. Gli embrioni di Zebrafish sono stati fissati in 1% di Agarosio in un vetrino per microscopia (A, B: A mostra un ingrandimento di una regione di A). Le immagini degli embrioni sono state acquisite in 3D e quantificata la riflettanza delle strutture interne. Sezioni C-mode dei dati 3D possono essere isolate e si può mostrare la riflettanza del tessuto in una singola fetta (C)

Gli embrioni sono stati raccolti subito dopo la deposizione in modo da documentare l'esatto tempo di fecondazione. Per esempio, se un embrione è stato deposto alle 10.00,

alle 10.00 del giorno seguente sarà considerato un embrione di 24 hpf. Gli embrioni sono stati incubati alla temperatura di 28,5 °C in una soluzione salina apposta per colture di embrioni Zebrafish fino allo stato di sviluppo desiderato. Quindi, il corion è stato rimosso con pinze e l'embrione incluso in una soluzione 1% di agarosio a basso punto di fusione per l'*imaging*.

La rilevazione nel dominio delle frequenze permette una elevata velocità di scansione, normalmente tra i 20000 e 25000Hz, rendendo possibile ottenere dati tridimensionali. Il sistema SD-OCT impiegato nello studio di cui sopra, è un prototipo che fornisce una risoluzione assiale di 3,5µm (ca. 2-3 volte superiore a quella ottenibile con strumenti convenzionali nel dominio del tempo impiegati in oftalmologia, e ca. il doppio di risoluzione dei dispositivi FT-OCT disponibili in commercio).

Si descriverà ora brevemente come è stato effettuato l'esperimento, con lo scopo di illustrare i vari passi del protocollo seguito.

I vetrini sono stati posti verticalmente allo scopo di effettuare l'*imaging* SD-OCT. Successivamente, sono stati ottenuti volumi 3D centrati sul corpo di dimensioni pari a 1.5x1.5x1.4 mm ad una densità di scansioni di 501x180x1024 pixel in 3.8s. Nei pesci di 120hpf, è stato necessario aumentare la dimensione del volume di scansione a 3x3x1.4mm per visualizzare il campione intero. Ripetute scansioni lineari piane sono state ottenute a 47 frame al secondo. Per ogni scansione si sono ottenuti 180 frame. Ogni frame conteneva 501 pixel trasversali lungo la lunghezza di 750µm, con 1024 pixel per la profondità di 1400µm. Le linee di scansione sono state poste in corrispondenza di siti particolarmente interessanti per la visualizzazione (cuore, cervello, ecc.). Dopo l'*imaging* SD-OCT, gli embrioni sono stati fissati per le procedure istologiche e per il sezionamento allo scopo di confrontare la coerenza tra le strutture osservate con OCT e quelle visibili tramite sezioni istologiche.

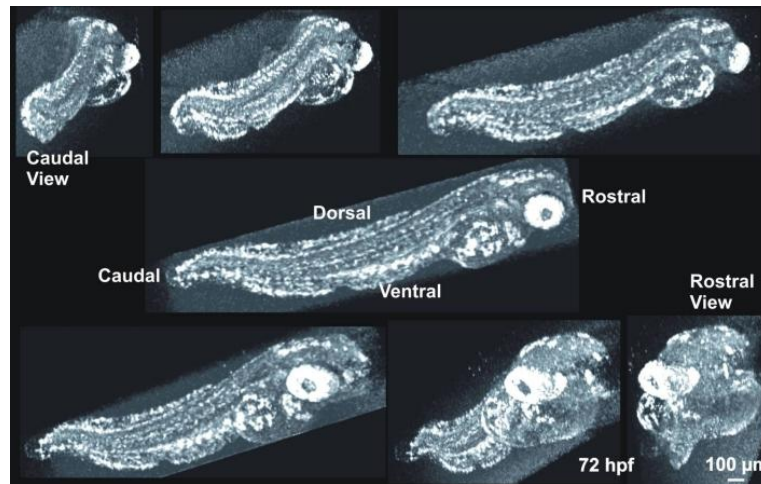


Figura 43: Rotazioni di un dataset di immagini 3D di un embrione di 120hpf. SD-OCT può acquisire una descrizione quantitativa tridimensionale dei tessuti interni degli embrioni di Zebrafish. Questi dati permettono una visualizzazione non-invasiva dell'intero animale, come le sezioni trasversali dell'animale in ogni orientamento ad ogni stadio dello sviluppo, tutte senza la necessità di sacrificare l'animale o interferire in modo sensibile nello sviluppo.

Per migliorare la visualizzazione delle varie strutture si sono messe in atto tre diverse strategie di *avaraging*:

- avaraging* dei frame che contenevano tessuti diversi ma molto vicini tra di loro attraverso un filtro *smoothing*;
- avaraging* di un gran numero di frame contenenti lo stesso tessuto per scansioni lineari ripetute di un tessuto 'stazionario';
- avaraging* dei frame che contenevano tessuti 'mobili' in un breve lasso temporale (ad esempio il cuore pulsante).

Dopo aver quindi elaborato le immagini nel modo opportuno i campioni sono stati immersi in resina per il sezionamento e la successiva osservazione. Le strutture tessutali in ambedue le immagini (SD-OCT e istologica) sono state misurate tramite calibro: le distanze sono state misurate in pixel e poi convertite in numeri reali basandosi sulle dimensioni note delle immagini. L'aderenza tra i due tipi di immagini ottenute è stata poi valutata statisticamente ($p=0.05$).

Quattro degli embrioni sono stati analizzati a quattro *step* di sviluppo (24, 48, 72, e 120hpf). I dataset sono stati assemblati in modo tale da poter permettere una visualizzazione dettagliata e arbitraria dell'embrione da qualsiasi angolo.

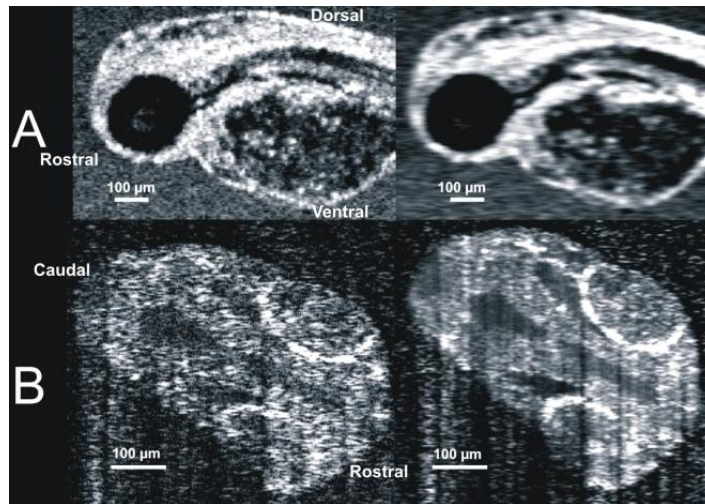


Figura 44: Mediare i dati permette di ridurre il rumore e aumentare il contrasto tra le strutture. A: Una media mobile su 3 frame di un embrione di 120hpf migliora la visualizzazione delle strutture dei tessuti molli nell'intestino mentre sfuma i contorni netti dell'occhio e dell'orecchio. B: Un confronto fianco a fianco tra un singolo frame e 120 frame mediati dell'encefalo di un embrione di 24hpf dimostra che una media aggressiva di scansioni lineari ripetute migliora la visualizzazione dei tessuti molli e riduce il rumore

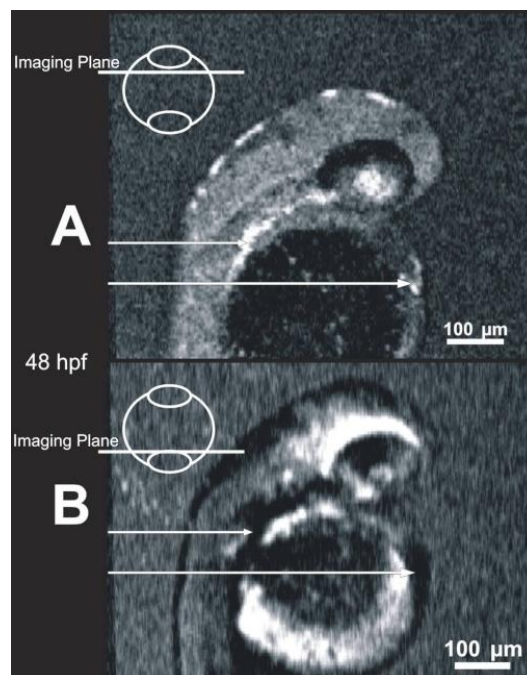


Figura 45: Il sangue all'interno dei vasi sanguigni crea artefatti da ombra in fette C-mode al di sotto dei vasi. Le immagini dello stesso embrione di 48hpf ottenute in un piano poco profondo (A) e in uno profondo (B), che è fortemente affetto da scattering (A, punti luminosi, frecce), e le strutture risultanti dalla maschera per le ombre in piani più profondi (B, punti scuri, frecce).

Numerose strutture interne sono state visualizzate e misurate per ogni *step* temporale. Il confronto con i dati relativi a sezioni anatomiche ha permesso di identificare numerosi

organi e tessuti (ad esempio le strutture neurali: cervelletto, mesencefalo, rombencefalo, otoliti, midollo spinale e notocorda). Per quanto riguarda le strutture oculari si è riusciti a distinguere la cornea, la camera anteriore, l'iride, le lenti, il vitreo, la retina e RPE/CC, oltre alle strutture laminari del tessuto oculare. Dalle 72hpf, l'epitelio pigmentato dell'iride, il RPE/CC e la sclera avevano raggiunto una maturazione tale da oscurare le strutture sottostanti. In questi embrioni la retina era visualizzabile solamente attraverso la pupilla. A 24hpf, il sangue all'interno del cuore appariva come una struttura molto riflettente. Da 48, 72, e 120hpf, il tessuto cardiaco porta un segnale particolarmente potente per la visualizzazione delle pareti cardiache. Il cuore appare come una singola camera a 24 e 48hpf, e si divide in due camere distinte a 72 e 120hpf. Quando le sezioni C-mode provenivano da strati distali (rispetto alla localizzazione del fascio di scansione), le parti oscurate dal sangue nei tessuti più prossimi potevano essere erroneamente interpretate come spazi nei tessuti più profondi. (Figura 45).

È stato possibile visualizzare il movimento del cuore utilizzando un formato video. L'*imaging* M-mode (scansioni A-scan acquisite in modo ripetuto per diversi secondi) attraverso il cuore ha permesso la visualizzazione e il calcolo del battito cardiaco. A mano a mano che il volume aumentava, il sangue all'interno forniva sorgenti di riflessione sempre più brillanti.

Le misure fornite da SD-OCT hanno dimostrato come lo spessore della retina e la dimensione del cuore aumentino in modo significativo con l'età ($p < 0.0001$). Confronti individuali hanno dimostrato un livello di significatività minore di 0.0001 eccetto che per la dimensione del cuore tra le 72hpf e 120hpf ($p = 0.048$) e per lo spessore della retina tra le 24hpf e le 48hpf ($p = 0.0002$). Gli sviluppi giornalieri erano prontamente visibili negli embrioni virtuali 3D e nelle lastre C-mode.

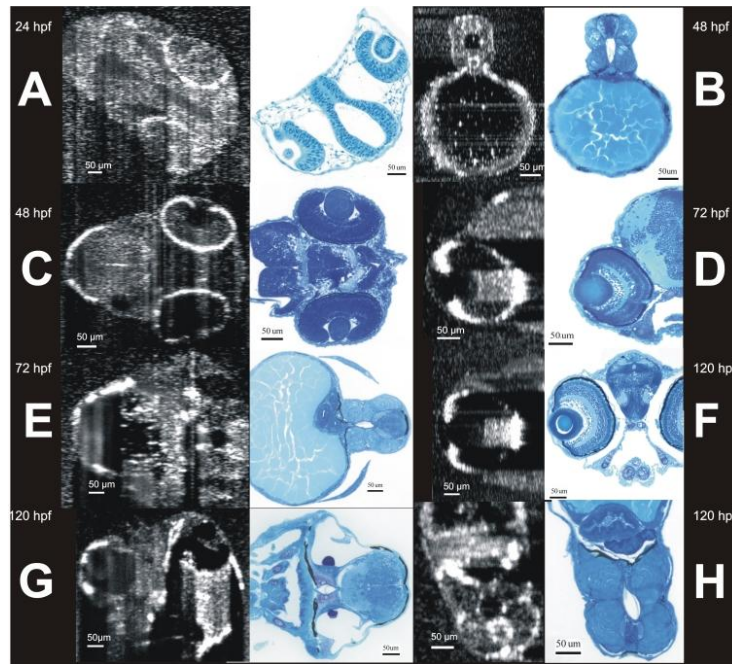


Figura 46: Confronto fianco a fianco delle strutture della testa e del corpo visualizzate tramite SD-OCT e istologia. Le immagini SD-OCT (a sinistra) sono state ottenute in modo non invasivo da embrioni viventi, lasciandoli in salute e in grado di continuare la crescita. Dati simili delle stesse strutture sono stati ottenuti istologicamente, richiedendo quindi il sacrificio e il sezionamento dell'animale prima di ottenere qualsiasi informazione, e impedendo di poter osservare le stesse strutture interne in modo longitudinale. A: Sviluppo di occhio e ventricolo di un embrione di 24hpf. B e C: Sviluppo dorsale del midollo spinale e degli occhi di un embrione di 48hpf, rispettivamente. D e E: Sviluppo di occhio, midollo spinale, e fegato di 72 hpf. F,G e H: Sviluppo di occhio, orecchio, cuore, e midollo spinale di un embrione di 120hpf

Si è riscontrata una eccellente corrispondenza tra le sezioni SD-OCT e le sezioni istologiche (Figura 46). Le misure sono riportate in tabella.

Comparison of optical and histological structural measurements.

Hours post fertilization	SD-OCT retina (μm)	Histology retina (μm)	p
Mean	85.81 \pm 27.18	66.06 \pm 19.17	<0.0001
24	51.78 \pm 8.74	38.95 \pm 2.45	0.0055
48	73.30 \pm 5.64	50.23 \pm 2.69	ns
72	108.86 \pm 8.07	79.26 \pm 9.70	ns
120	114.23 \pm 7.78	84.91 \pm 8.00*	0.0015

Tabella 6: Misure dello spessore della retina (media \pm SD) ottenute da SD-OCT e da sezioni istologiche e confrontate tramite t-test. I valori significativi sono riportati in grassetto, per tenere conto di 5 confronti, è stata impiegata una correzione di Bonferroni per aggiustare il p-value a 0.01 per le differenze considerate statisticamente significative. Le misure dello spessore della retina da SD-OCT in vivo sono consistentemente più spesse di quelle ottenute da sezioni istologiche in vitro. “nd”: non significativo. “*”: le sezioni di retina istologiche a 120hpf potrebbero aver subito un certo appiattimento [23]

Si nota dalla tabella che nei valori riportati in media, le misure SD-OCT dello spessore della retina sono sensibilmente maggiori rispetto alle misure istologiche. Considerando invece i vari stadi separati, le misure medie SD-OCT sono tutte maggiori rispetto alle misure istologiche.

L'esperimento prevedeva anche di analizzare lo sviluppo di difetti dovuti alla mutazione dell'allele m520 sul *gene nok*, il quale regola lo sviluppo del cuore e dell'occhio, e la cui mutazione porta alla disorganizzazione e sottosviluppo dei tessuti della retina e della sclera, e a un allargamento della cavità pericardica e a un sottosviluppo del cuore. Tutte queste caratteristiche sono state prontamente visualizzate tramite SD-OCT. Se si pongono a confronto l'embrione mutante con quello normale, si vede come la retina normale a 72hpf sia caratterizzata da strati di vitreo, retina, e RPE/CC ben distinti e da una capacità di assorbire la luce e di diffonderla sempre maggiore in corrispondenza dello sviluppo delle strutture del segmento anteriore (Fig. 49). Tutto ciò dimostra che la tecnologia SD-OCT è sufficientemente sensibile per il rilevamento di difetti dello sviluppo a livello microstrutturali all'interno dei tessuti.

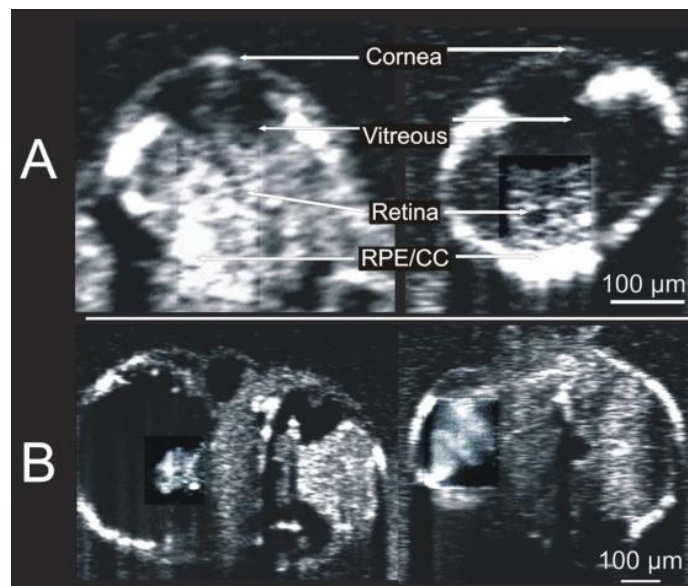


Figura 47: Visualizzazione delle mutazioni associate alla mutazione del gene *nok* m520. Confronto parallelo in un embrione di 72hpf delle strutture dell'occhio (A) e del cuore (B), con embrione mutato a sinistra, e embrione della stessa età non mutato a destra. Il contrasto è stato aumentato nella retina e nel cuore.

Dunque attraverso questo esperimento Kagemann ha potuto dimostrare come SD-OCT fornisca un valido strumento per la visualizzazione di numerose strutture negli embrioni di

Zebrafish durante il loro sviluppo. Diversamente dalla microscopia a fluorescenza o il sezionamento istologico, questa tecnologia è non invasiva, priva di contatto, e non richiede modifiche genetiche o esogene dell'animale. Come si è visto, SD-OCT permette un *imaging* ripetuto multisessione degli embrioni singoli senza alterarne lo sviluppo. Si è in grado quindi di documentare in modo qualitativo e quantitativo lo sviluppo di embrioni viventi. Lo sviluppo di tessuti altamente diffusivi o assorbenti, come l'epitelio pigmentato dell'iride, RPE/CC, e il sangue rappresenta però una sfida per l'*imaging* dei tessuti più profondi con SD-OCT a lunghezze d'onda vicino all'infrarosso. Questo è particolarmente evidente per il sangue nel cuore o per le striature sulla schiena del pesce. L'impiego di lunghezze d'onda maggiori migliorerebbe la penetrazione e l'*imaging* dei tessuti retrostanti a quelli fortemente diffusivi, ma peggiorerebbe la risoluzione assiale.

Ci sono però anche diverse limitazioni associate all'*imaging* tramite SD-OCT. Come nel caso di OCT nel dominio del tempo, lo *speckle noise* può oscurare l'immagine. L'operazione di media effettuata sul segnale può migliorare il rapporto segnale rumore (SNR) e ridurre lo *speckle noise*, tuttavia l'acquisizione di un numero sufficientemente ampio di immagini ridondanti per l'operazione di media aumenta il tempo di scansione, rispetto a un singolo tomogramma. Tempi lunghi di scansione aumentano a loro volta la probabilità di artefatti da movimento quando si opera su tessuti viventi. Questo limite ha limitato fortemente l'impiego di TD-OCT per le acquisizioni 3D. Nello studio di cui sopra, la maggior parte degli embrioni a ogni età mostrava movimenti della coda durante i 4s del tempo di scansione.

Un approccio potenzialmente valido per la riduzione dello *speckle noise* e il miglioramento di SNR è collezionare in modo sequenziale dati da mediare. Per esempio, se 3 scansioni devono essere mediate per l'immagine finale, è possibile collezionare 3 A-scans prima che il fascio si sposti su un punto successivo. A 24000Hz di velocità di scansione assiale, questo richiede solo 0.000125s per A-scan. Questo aumenterebbe il tempo di scansione completo A-scan da 3.8 a 11.4s. La velocità nel collezionare A-scan sequenziali rende possibile un'operazione di media senza artefatti da movimento negli A-scan mediati; tuttavia, si presenterebbero numerosi artefatti da movimento nel dataset della scansione totale, come ci si aspetta per qualsiasi immagine acquisita oltre gli 11s in un tessuto vivente.

Si è visto come lo spessore della retina fornito da immagini SD-OCT fosse sempre superiore a quello dato dalle sezioni istologiche corrispondenti, è probabile che, nel dataset presentato, le differenze nelle misure fossero dovute, almeno in parte, al ritiro del tessuto dovuto a deidratazione e fissaggio. Tipicamente, viene aggiunto un fattore di correzione del 15% alle misure di sezioni istologiche; tuttavia, si è documentato un ritiro pari al 47%. La differenza media tra misure dello spessore della retina con SD-OCT e misure da campione istologico era del 37.7%.

In conclusione, SD-OCT è una tecnologia promettente in grado di permettere un *imaging* completamente non invasivo degli embrioni di Zebrafish, modello importante per lo studio dell'espressione genetica. L'acquisizione di dataset tridimensionali permette di sezionare anatomicamente in modo virtuale l'embrione in qualsivoglia orientazione. Data la sua natura non invasiva, OCT può fornire immagini ripetute dello stesso embrione da un giorno al successivo, senza effetti osservabili sullo sviluppo. Inoltre, se non vengono impiegati agenti anestetizzanti, i quali potrebbero avere effetti avversi sugli embrioni, si riduce il numero di campioni da sacrificare e sono necessari molti meno campioni per ottenere informazioni sui cambiamenti. In più, l'impiego di un dato animale lungo un periodo di tempo può fornire dati longitudinali più accurati e utili rispetto all'analisi di una popolazione di animali a differenti stadi di sviluppo.

Le strutture anatomiche di Zebrafish sono state studiate in vivo da Kabli et al. ([26], 2005) attraverso risonanza magnetica microscopica ad alta risoluzione. Tuttavia, la risoluzione di questa tecnica era di $\sim 78\mu\text{m}$ e richiedeva un tempo di *imaging* relativamente lungo, circa 8 minuti. OCT può fornire immagini di sezioni non invasivamente in tempo reale con una risoluzione spaziale che arriva a pochi micrometri. Gli sviluppi recenti, come visto, di questa tecnica permettono inoltre di acquisire velocemente le immagini e di ottenere anche informazioni 3D. La profondità dell'*imaging* OCT è limitata dallo *scattering* del mezzo che distrugge la coerenza del fascio sonda. Quindi, diversamente dalle strutture oculari prive di scattering, dove OCT può fornire immagini dell'intera struttura, l'*imaging* dei tessuti affetti da *scattering* come il cervello è solitamente limitato a pochi mm. OCT è stato usato però su tessuto cerebrale escisso o esposto, mentre un'analisi OCT *in vivo* in profondità è stata fatta nel cervello di ratto. Usare OCT per ottenere immagini *in vivo* non invasive del cervello umano non è ancora possibile, ma è possibile usarlo su Zebrafish. Rao et al. (2009 [7]) ha utilizzato a questo scopo (*imaging* di Zebrafish) uno schema come

quello di figura 48 che mostra un sistema OCT con sorgente ottica con diodo superluminescente a larga banda ad alta potenza. La sorgente presenta lunghezza d'onda centrale a 1310nm con FWHM di 43nm e 18mW di potenza ottica.

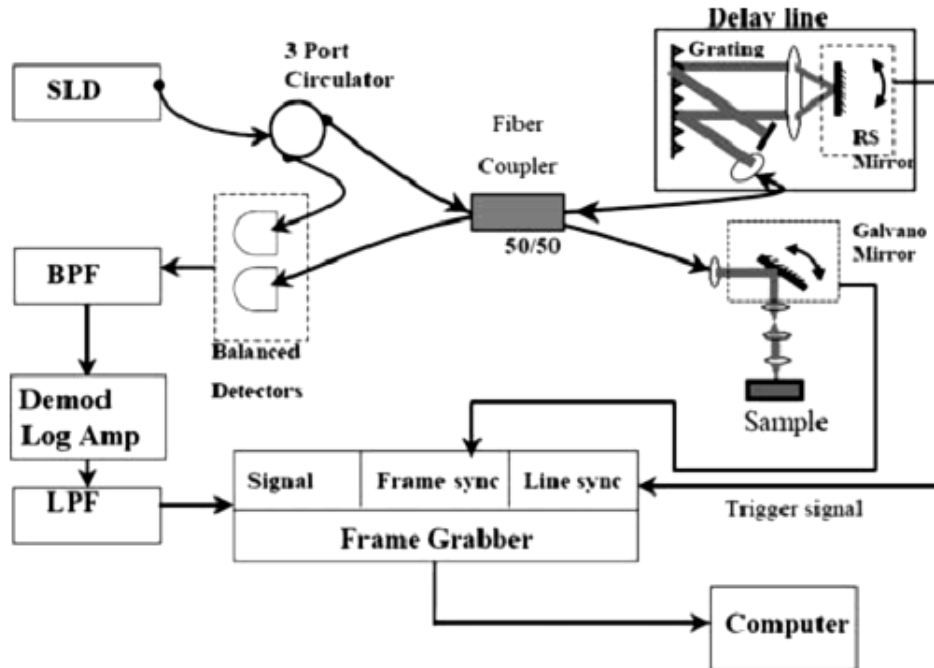


Figura 48: Schema del setup TD-OCT impiegato. SLD: diodo superluminescente; BPF: filtro passa banda; LPF: filtro passa basso; RD: scanner di risonanza

La luce proveniente dalla sorgente viene inviata alla porta di input di un circolatore ottico a tre porte. L'output della seconda porta è connesso a un accoppiatore 50:50 a fibre ottiche per la suddivisione della luce nel braccio di riferimento e in quello del campione. La terza porta è impiegata per reindirizzare la luce di ritorno verso la sorgente al rivelatore. La frequenza della scansione laterale è stata fissata a 8Hz. La luce retroriflessa da ambedue i bracci interferiva a livello del rivelatore.

L'output differenziale del rivelatore bilanciato è mandato a un filtro passa banda e amplificato impiegando un amplificatore logaritmico. A sua volta, l'output dell'amplificatore logaritmico viene filtrato con un filtro passa basso e mandato a un *frame grabber board*. Il software di acquisizione dell'immagine rileva l'involuppo del segnale interferometrico e mostra l'immagine della sezione trasversale sullo schermo. L'acquisizione dell'immagine è fatta alla velocità di 125 A-scan per frame a 8 frame al

secondo. Si stima che la risoluzione assiale e laterale del setup sia di $\sim 20\mu\text{m}$ e il SNR del setup misurato è di 96dB.

Il setup OCT in tempo reale è stato impiegato per acquisire immagini trasversali bidimensionali (piano XZ, come in figura) del cervello di Zebrafish anestetizzato. Sono state acquisite circa 90 immagini trasversali del cervello muovendo il campione nella direzione Y con un passo di 0.05mm.



Figura 49: Immagine di Zebrafish adulto e geometria dell'*imaging*

In Figura 50 è presentata una sequenza di 20 immagini (con una separazione di 0.15mm). In queste immagini sono chiaramente distinguibili i lobi maggiori dell'encefalo, come il bulbo olfattivo, il telencefalo, il tetto ottico, il cervelletto, l'osso frontale e l'*eminencia granularis*. Alle immagini grezze è stata posta una soglia per minimizzare lo *speckle noise*.

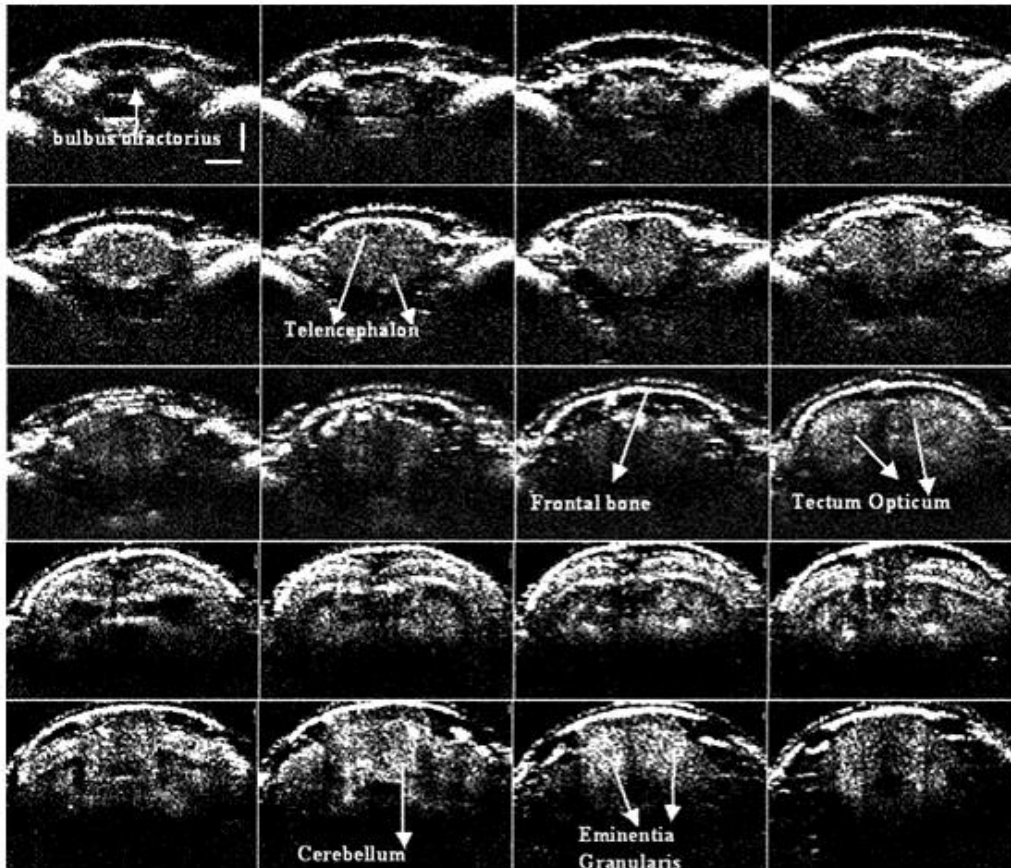


Figura 50: Sequenza di sezioni trasversali OCT del cervello di Zebrafish adulto. Scala: 0.5mm (per tutte le immagini)

Utilizzando queste immagini si è costruito un modello tridimensionale dell'encefalo di Zebrafish con il software AMIRA sia sul piano assiale che su quello sagittale.

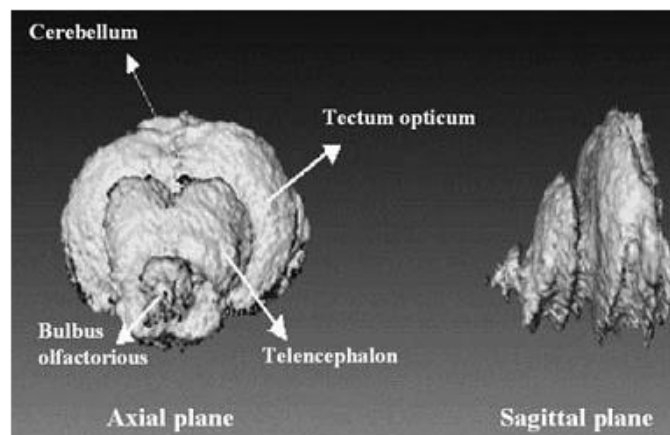


Figura 51: Ricostruzione di una visuale 3D dell'encefalo di Zebrafish nei piani assiale e sagittale

Gli studi sulla superficie dell'encefalo utilizzando modalità di *imaging* non invasive *in vivo* aiutano a monitorare i processi dinamici che avvengono durante la maturazione del cervello con l'età e possono essere impiegati per rilevare cambiamenti anormali. Inoltre, una misura della curvatura media della superficie dell'encefalo può servire come indice di uno sviluppo cerebrale normale piuttosto che anormale. È pertinente confrontare le immagini ottenute tramite OCT con le immagini trasversali 2D ottenute tramite tomografia a proiezione ottica di un pesce adulto lungo 17mm ([53]). Queste immagini non mostrano in modo chiaro la struttura del bulbo olfattorio e dell'*eminencia granularis*, e anche le altre strutture appaiono risolte in modo nettamente superiore nelle immagini OCT, nelle quali si può visualizzare in modo chiaro la cavità all'interno del tetto ottico.

Data la presenza di uno strato a forte diffusione nella parte posteriore dell'encefalo di Zebrafish, non si possono distinguere in modo chiaro nelle immagini OCT le strutture dietro il cervelletto, come la cresta del cervelletto, il midollo spinale, parasfenoide, palato quadrato, ecc.. Per distinguere le strutture anatomiche in modo più chiaro potrebbe essere impiegato un setup OCT con una maggiore sensibilità (~110dB) e una migliore risoluzione (~1-3 μ m).

Dati quindi lo sviluppo esterno e la trasparenza degli embrioni, Zebrafish è un modello ideale di organismo per approcci ottici di *imaging*, offrendo così la possibilità di osservare i processi di sviluppo degli organismi viventi con un'alta risoluzione. Per esempio, usando Zebrafish transgenici viventi, si è dimostrato che le cellule staminali ematopoietiche derivano direttamente dall'endotelio dell'aorta dorsale ([37] Bertrand et al. 2010). Sebbene sia stata ottenuta una linea mutante di Zebrafish, che rimane trasparente durante tutta la sua vita ([38] White et al.2008), le altre linee comuni di Zebrafish perdono la loro caratteristica trasparenza a partire approssimativamente dai 14dpf e non sono quindi ancora accessibili ai metodi di *imaging* ottici ad alta risoluzione in età adulta.

7 CARATTERIZZAZIONE OTTICA DEI MEZZI DI INCLUSIONE

7.1 Fasi di preparazione dei campioni biologici

L'allestimento di preparati microscopici implica una serie di operazioni che consistono in:

- Prelievo di campioni biologici
- Fissaggio
- Inclusione
- Colorazione

Il *prelievo di campioni* va condotto al più presto sul materiale fresco. Se, in teoria, i metodi di osservazione delle cellule allo stato vitale sarebbero da preferirsi in quanto consentono uno studio dinamico della cellula, in assenza di artefatti di immagine prodotti dalle fasi successive di allestimento del campione, in realtà il loro impiego è limitato perché le cellule ed i tessuti isolati dall'organismo non sopravvivono che per tempi brevi (a meno che non siano coltivati in vitro) in quanto gli enzimi litici intracellulari si attivano rapidamente e distruggono la cellula (autolisi) provocando gravi alterazioni di struttura.

In secondo luogo, frammenti spessi di tessuto non permettono un'analisi citologica fine e quindi diventa necessario lavorare con tessuti uccisi chimicamente, prima che intervengano gli enzimi autolitici, e tagliarli in sezioni sottili che possano essere osservate al microscopio, eventualmente previa colorazione.

Il *fissaggio* consiste nel trattamento del frammento d'organo con procedimenti chimici o fisici capaci di preservare e stabilizzare i costituenti dei tessuti, inattivando nel contempo gli enzimi autolitici. Il fissaggio di organi interi non è in genere buona norma, in quanto, a parte l'impossibilità di alcune situazioni, la penetrazione lenta del liquido ha l'inconveniente di permettere l'autolisi delle parti che tardivamente vengono a contatto col fissativo.

La fissazione dura da pochi minuti fino a 24-48 ore a seconda della grandezza del frammento. Il rapporto fissativo/campione deve essere di 20:1. Ogni fissativo all'atto di provvedere alla stabilizzazione delle strutture provoca degli artefatti di struttura, ossia immagini inesistenti prima della fissazione. Ciò comporta che il metodo venga di volta in

volta scelto opportunamente in rapporto al tipo di strutture che si desiderano studiare e, di conseguenza, alla colorazione da adottare. Nella scelta di un fissativo va anche tenuto presente che esso non deve svolgere azione estrattiva sui componenti che si desiderano identificare. Così, ad esempio, i fissativi in soluzione acquosa sono controindicati quando si debba studiare la distribuzione del glicogeno, in quanto tale sostanza è solubile in acqua. In questa evenienza è indispensabile l'uso dell'alcool etilico assoluto che precipita il glicogeno. I fissativi maggiormente usati sono la formaldeide (o formalina) al 10% e l'alcool etilico a 90°. Soprattutto la prima viene particolarmente raccomandata in quanto consente la realizzazione dei più comuni metodi di colorazione per uso diagnostico. È maggiormente usata la formalina tamponata per evitare variazioni di pH che possano alterare le proprietà antigeniche di alcuni antigeni.

L'aldeide formica ha un forte odore e per evitare danni all'apparato respiratorio conseguenti alla sua inalazione, si devono usare cappe o almeno tenere aperte le finestre. È cancerogena per le vie respiratorie e teratogena, cioè danneggia il feto nel 1° trimestre di gravidanza. Non bisogna mai usare la soluzione fisiologica in quanto l'acqua entrerebbe nelle cellule per osmosi facendole scoppiare.

Altri fissativi sono: glutealdeide, cloruro di mercurio, acido picrico. I migliori fissativi sono quelli che determinano una precipitazione dei componenti cellulari in minutissimi granuli. I fissativi contenenti acidi (come l'acido picrico) sono molto penetranti e molto rapidi, ma determinano l'addensamento della struttura nucleare. Bisogna considerare che nel caso si vogliano effettuare studi immunoistochimici, la formalina richiede successive tecniche di smascheramento antigenico in quanto questo fissativo crea ponti metilenici con le proteine alterandone la struttura.

La formaldeide non permette di scendere all'individuazione di fini dettagli citologici, dato che le cellule vanno incontro a raggrinzamenti e retrazioni. Ne consegue che per indagini analitiche si consigliano altri fissativi o, meglio, miscele di fissativi. Alcuni fissativi fungono anche da coloranti come nel caso dell'acido osmico, usato per la dimostrazione dei lipidi.

Una tecnica di fissaggio molto utilizzata è il congelamento-essiccamento: si ricopre il materiale da fissare con una resina e lo si espone a vapori di azoto liquido alla temperatura di -170/-190°C, completando l'operazione a -30/-40°C. Questa tecnica ha il vantaggio di

un rapido fissaggio e non necessita di una successiva fase di smascheramento antigenico se si vogliono usare tecniche immunohistochimiche.

Per fissare il tessuto, infine, spesso si usano miscele di varie sostanze; le più note sono: miscela di Bouin, di Zenker, di Susa, di Carnoy e di Orth.

L'*inclusione* consiste nel lasciar permeare il tessuto da una sostanza che solidifica a temperatura ambiente atta a consentire il taglio in sezioni sottili dello spessore di pochi micron.

L'Inclusione consta di due fasi:

-Infiltrazione del mezzo di inclusione

-Indurimento del mezzo di inclusione

La fase di Infiltrazione consiste nell'immersione del pezzo disidratato nel mezzo d'inclusione allo stato liquido per un periodo sufficientemente lungo da consentirne la penetrazione nei più profondi interstizi del campione.

Lo scopo dell'inclusione è quello di infiltrare la sezione con una soluzione di polimeri ad alto peso molecolare che, essiccandosi, formi uno scheletro di sostegno evitando il collasso delle strutture cellulari ed in particolare delle membrane, fenomeno altrimenti inevitabile. L'inclusione può essere effettuata con sostanze idrofile come la metilcellulosa, il Polivinilalcol, la gelatina, il destrano, il Ficoll, e la Piroxilina (Parlodion), che un composto idrofobico della cellulosa. Nei lavori di routine il composto più usato è la metilcellulosa che è disponibile in una vasta gamma di pesi molecolari e quindi di viscosità.

L'Indurimento (polimerizzazione) permette di intrappolare, ossia includere, il campione in un materiale abbastanza duro e omogeneo tale da poter essere tagliato in sezioni di spessore solitamente non superiore a 10µm. I mezzi d'inclusione fungono dunque da sostegno evitando che durante la fase di taglio, le sezioni perdano la consistenza necessaria per il loro mantenimento e per la successiva osservazione microscopica.

I mezzi d'inclusione maggiormente usati sono:

-Paraffina: è una miscela di cere a vari punti di fusione, usata nell'allestimento di preparati istologici per la microscopia ottica; l'inclusione in paraffina permette generalmente di ricavare sezioni aventi spessore minimo pari a 1-2 μm ; inoltre è insolubile sia in acqua che in etanolo (per questo occorre inserire, dopo la disidratazione, la fase di chiarificazione con xilolo) e garantisce migliori dettagli morfologici. La paraffina, prima dell'uso, deve essere sciolta alla temperatura di circa 57-59 °C, e poi filtrata per eliminare eventuali impurità. Dopo la fase di infiltrazione, i campioni vengono alloggiati in contenitori sagomati in cui è fatta colare paraffina liquida ed il tutto è lasciato solidificare a temperatura ambiente. A completa solidificazione avvenuta, il blocchetto solido viene estratto dal contenitore e processato per la successiva fase di sezionamento. I tempi minimi d'infiltrazione sono di tre ore; non esistono tempi massimi, perché il campione, una volta infiltrato dalla paraffina, non si deteriora. Trattandosi di una sostanza idrofoba, la sua penetrazione richiede che dal tessuto venga allontanata l'acqua a mezzo di un disidratante. Si usa all'uopo una serie di soluzioni di alcool etilico a gradazione crescente fino a portare il pezzo in alcool assoluto. Da qui il tessuto viene trasferito in un solvente della paraffina che di solito è lo xilolo. Esso ha la funzione di consentire la penetrazione del mezzo includente. La paraffina, il cui punto di fusione varia tra 52 e 60 °C, è usata allo stato liquido, quindi l'operazione viene praticata in termostato. Una volta che la compenetrazione è avvenuta, il pezzo viene rapidamente raffreddato, così da acquistare la consistenza della paraffina solida.

Del tessuto incluso si ottengono fette di 3-10 μm , usando un microtomo a lama d'acciaio. Data la sottigliezza, queste risultano difficilmente maneggevoli, quindi vengono montate su un vetrino porta-oggetto. Per provvedere alla loro colorazione si suole allontanare la paraffina e riportare il tessuto al suo primitivo stato d'idratazione. Così le sezioni vengono dapprima immerse in xilolo, quindi in una serie di soluzioni di alcool a gradazione decrescente fino all'acqua. A questo punto si può procedere alla colorazione e al montaggio, ossia all'applicazione di un vetrino coprioggetto che viene fatto aderire al primo mediante una resina naturale o sintetica.

- resine idrofile : valide per tessuti decalcificati o naturalmente non calcificati, richiedono un tempo di polimerizzazione variabile da 1 a 20 ore a seconda della temperatura ;

- resine Epossidiche : consentono il taglio di sezioni più sottili di quanto non sia possibile con l'inclusione in paraffina, dunque vengono utilizzate per la microscopia elettronica. Esse polimerizzano in modo omogeneo producendo un'eccellente conservazione dei

dettagli strutturali; ma, a causa della loro elevata reattività, possono interagire con le strutture tissutali durante i processi di polimerizzazione;

- metacrilati, utilizzati sovente per sezioni calcificate come ossa e denti, tendono a polimerizzare in modo non uniforme e non copolimerizzano con i componenti tissutali; quindi possono causare contrazione del tessuto a scapito della morfologia.

L'inclusione in un materiale più duro può essere ottenuta utilizzando plastiche quali le resine epossidiche. L'infiltrazione del frammento da includere viene fatta con plastica fluida allo stato monomero; viene quindi indotta la solidificazione del frammento infiltrato facendo polimerizzare la plastica mediante calore o raggi ultravioletti. Trattandosi di un materiale di inclusione molto duro, la plastica consente di ottenere sezioni sottili dello spessore di poche centinaia di nanometri che possono essere osservate al microscopio elettronico.

Nel caso di organi i cui componenti abbiano consistenza disomogenea, come il nevrasso e l'osso, si preferisce l'inclusione in celloidina o in resina. Solo nel caso di tessuti calcificati all'inclusione viene fatta precedere la decalcificazione, per la quale si ricorre all'uso di acidi diluiti ovvero di chelanti, come l'acido tetracetico dell'etilendiamina (EDTA).

La *colorazione* viene praticata principalmente per mettere in risalto singoli componenti strutturali. In altri casi viene eseguita al fine di identificare costituenti chimici particolari del tessuto.

Se il tessuto da esaminare consiste in un monostato di cellule (per esempio cellule coltivate *in vitro*, preparati per striscio di sangue circolante o preparati per schiacciamento), esso viene di solito osservato direttamente al microscopio. Negli altri casi, invece, si procede con la colorazione.

I coloranti sono di due tipi: naturali e sintetici. I primi possono essere di origine tanto animale che vegetale. I secondi, prodotti in laboratorio, sono derivati dall'anilina. I coloranti, ancora, si distinguono in vitali e sopravitali.

I coloranti vitali hanno la proprietà di essere assunti attivamente da alcune cellule viventi permettendo così la loro identificazione o lo studio di funzioni particolari. Esempi di coloranti vitali sono:

-Alizarina, incorporata elettivamente nella sostanza fondamentale dell'osso in corso di calcificazione, colorandola di rosso.

-Blu Triptan, litio carminio, blu pirrolo, che sono fagocitati dai macrofagi permettendo così la loro individuazione.

-Verde Janus, che colora elettivamente i mitocondri in virtù delle proprietà ossido-riduttive di questi organuli.

-Rosso neutro, che colora i granuli specifici dei leucociti (in rosa quelli dei granulociti neutrofili, in giallo quelli degli eosinofili e in rosso mattone quelli dei basofili).

-Blu di metilene, che colora l'assone dei neuroni.

I coloranti sopravitali, invece, sono somministrati a cellule o a tessuti isolati dall'organismo. I coloranti si legano ai tessuti mediante legami chimici con le proteine, gli acidi nucleici, le glicoproteine e le lipoproteine. Da un punto di vista chimico, quindi, i coloranti sono classificati in due categorie: coloranti acidi, nei quali il gruppo cromoforo è acido (anionico) e coloranti basici, nei quali il gruppo cromoforo è basico (cationico).

I coloranti acidi più comuni sono: eosina, arancio G, verde luce.

I coloranti basici più comuni sono: blu di metilene, blu di toluidina, tionina, verde di metile, pironina, azzurro B, fucisina basica.

I componenti dei tessuti che hanno affinità per i coloranti acidi sono detti acidofili; quelli che mostrano affinità per i coloranti basici sono detti basofili. Bisogna considerare, però, che l'acidofilia e la basofilia dei vari costituenti cellulari dipendono dal pH della soluzione colorante. Ai valori di pH comunemente impiegati per una determinata colorazione istologica (pH=6), la cromatina del nucleo, l'ergastoplasma, le mucoproteine e i glicosaminoglicani assumono i coloranti basici, mentre gli eritrociti, i granuli dei granulociti eosinofili ed alcune parti del citoplasma legano coloranti acidi.

I coloranti sono di regola indiretti in quanto la loro fissazione al tessuto necessita l'impiego di mordenzatori, ossia degli ossidanti (acido fosfomolibdico, acido picrico, acido fosfowolframico, acido cromico, permanganato di potassio, ecc.) che fungono da mezzo intermedio di collegamento tra struttura tissutale e colorante, fra i quali non esiste una particolare affinità.

I metodi di colorazione prevedono spesso l'uso di più coloranti, ciascuno capace di mettere in evidenza un particolare componente strutturale. In tal senso i singoli coloranti possono essere applicati successivamente ovvero contemporaneamente sotto forma di miscele bilanciate.

7.2 I mezzi di inclusione

Lo scopo principale dei mezzi di inclusione utilizzati per il montaggio dei campioni biologici è quello di proteggere fisicamente il campione, incluso l'impiego di componenti anti-sbiadimento per i coloranti fluorescenti. I mezzi devono quindi impedire fenomeni quali ossidazione, formazione di sali, e devono garantire la stabilità del campione nei confronti della luce e del tipo di conservazione scelta (raffreddamento o congelamento). Un impiego scorretto dei mezzi di montaggio potrebbe causare perdite di segnale e aberrazioni ottiche, mentre l'uso corretto di tali mezzi impedisce tali aberrazioni e preserva i segnali di fluorescenza grazie alle proprietà anti-sbiadimento dei mezzi ([42]).

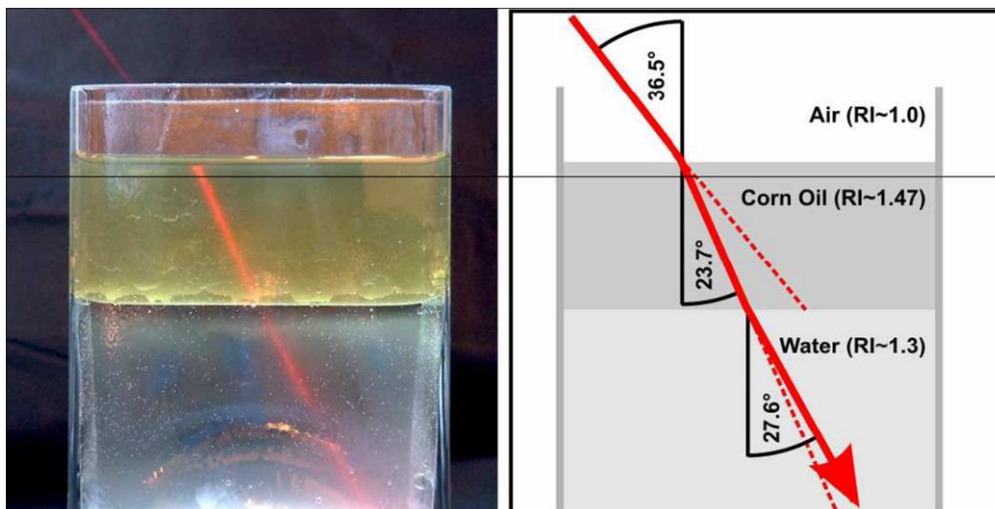


Figura 52: Esempio di variazione dell'indice di rifrazione (RI)

L'assorbimento di luce laser ad alta intensità porta ad uno stato eccitato il colorante (solitamente un singolo stato) che emana una fluorescenza. Lo stato eccitato può comportare reazioni chimiche che a sua volta può causare la fine stessa della fluorescenza, uno sbiadimento o una decolorazione. Questo porta alla necessità di minimizzare tali reazioni per prolungare le loro caratteristiche di fluorescenza.

Un'altra caratteristica fondamentale per scegliere il mezzo di montaggio più appropriato è il suo *indice di rifrazione (RI)*. Conoscendo RI si può scegliere il campo e le lenti per ottenere una qualità ottima di immagine. La maggior parte dei mezzi tendono avere un RI vicino a quello del vetro ($RI_{\text{glass}}=1.515$).

Mountant	RI
Air	1
Water	1.34
Glycerine	1.41
Glycerol	1.47
Glass	1.515
Mowiol	variable
PVA	variable
Ziess Oil	1.515
DABCO	1.47
Immersion Oil	1.515
FluoGuard	1.47
FluorSave	1.46
Fluoromount-G	1.393
Gel/Mount	1.353
Vectashield Hard	1.44
Vectashield	1.458
Prolong	1.455
DPX	1.525
DAKO fluorescence mounting medium	1.47-1.50
Entellan	1.5
Permount	1.54

Tabella 7: Mezzi e indice di rifrazione (RI) [42]

7.2.1 Agarosio

L'agarosio è un polisaccaride purificato dall'agar-agar (costituito da agarosio e agaropectina), una sostanza gelatinosa isolata a sua volta dalle alghe rosse (*Rhodophyceae*, soprattutto *Gracilaria* e *Gelidium*). È un polimero lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici. L'agarosio è uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda formando un gel tramite formazione di una matrice tridimensionale costituitasi attraverso dei legami a idrogeno tra le catene lineari.

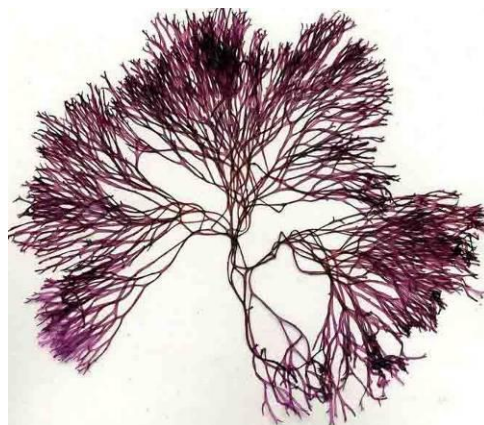
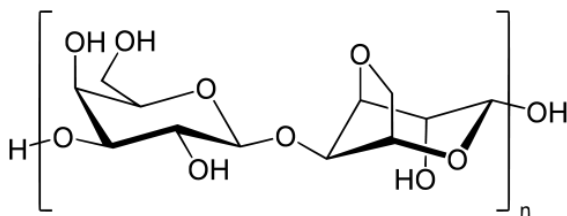


Figura 53: Unità fondamentale dell'Agarosio e alghe agarofite

Il gel di agarosio è largamente utilizzato per la separazione elettroforetica di frammenti di DNA.

Le proprietà dei prodotti di Agarosio varia tra i campioni disponibili in commercio, a seconda delle alghe impiegate per la sua estrazione, delle diverse stagioni di raccolta, dei diversi processi di produzione applicati. I costituenti principali dell'agarosio sono i gruppi solfati (<0.35%), metossi (0.4-2.5%), e piruvati (<0.10%), ma a volte sono presenti anche zuccheri neutri come L-galattosio, metilpentosio, xilosio, e 4-O-metil-L-galattosio.

Le caratteristiche più importanti di agar sono i seguenti.

1. Il suo grande potere gelificante in un ambiente acquoso permette di formare gel più resistenti di quelli di qualsiasi altro agente gelificante, assumendo l'uso di concentrazioni uguali.
2. La soluzione in semplice acqua ha potere gelificante. Non c'è bisogno di aggiungere reagenti per produrre gelificazione, come potassio (o proteine come è necessario con carragenine), calcio (o altri cationi bivalenti come è necessario con alginati). Non sono necessarie elevate concentrazioni di zucchero o di un ambiente acido (come è necessario con pectine).
3. Esso può essere utilizzato in un ampio intervallo di pH da 5 a 8, e in alcuni casi anche oltre questi limiti.
4. Resiste molto bene ai trattamenti termici, anche oltre i 100°C e ciò permette una buona sterilizzazione.

5. Il gel 1,5% si forma in soluzione acquosa tra 32°C-43°C e non si scioglie sotto gli 85°C. Questa è una proprietà unica di agar, rispetto ad altri agenti gelificanti.
6. Agar dà gel senza sapore e non richiede aggiunte di cationi con sapori forti (potassio o calcio), può essere usato senza problemi per prodotti alimentari.
7. Si assimila e valorizza sapori dei prodotti mescolati con esso e agisce come un fissatore a lungo termine.
8. Il gel ha una reversibilità eccellente permettendo così di essere ripetutamente gelificato e fuso senza perdere le proprietà originali.
9. Gel trasparenti possono essere facilmente colorati e l'indice di rifrazione può essere facilmente aumentato aggiungendo zucchero, glucosio, glicerina, ecc., dando loro una diversa luminosità.
10. Il gel è molto stabile, non provocando precipitazioni in presenza di cationi come accade con alginati di calcio.

L'Agarosio forma un gel termoreversibile quando la soluzione calda di agarosio viene raffreddata al di sotto di 40°C. È stato ampiamente utilizzato in campo biomedico, come ad esempio nella somministrazione di farmaci (Mehrotra et al., 2012), la terapia cellulare (Vinerean, Gazda, Hall, e Smith, 2011), biologia molecolare (Novak et al., 2011) e l'ingegneria dei tessuti (Khanarian, Haney, Burga, e Lu, 2012) a causa delle sue particolari proprietà meccaniche, di biocompatibilità e la natura bioinerte. Tuttavia, l'agarosio, come la maggior parte degli idrogel comuni, non è favorevole per l'adesione delle cellule e la crescita di queste a causa della sua elevata idrofilia. Inoltre, agarosio non assorbe proteine adesive delle cellule, con conseguente proprietà anti-adesive. Al fine di migliorare la bioattività di agarosio, Yixue et al. ([30] 2013) hanno modificato l'agarosio attraverso carbosilazione e innesto di dopamina.

Studi di diffrazione a raggi X mostrano che l'agarosio esiste a stato solido nella forma di doppia elica coassiale, nella quale le due catene sono sfalsate una rispetto all'altra con una periodicità assiale di 0.95nm. Tutte le altre frazioni di agar che possono essere indotte a

formare film o fibre orientate mostrano pattern di diffrazione che corrispondono alla stessa geometria fondamentale elicoidale.

La gelificazione dell'agarosio porta a un cambiamento radicale della rotazione ottica, che si crede sia originato dal passaggio da una conformazione della disordinata (*random-coil*) alle alte temperature (stato liquido-soluzione) alla conformazione ordinata a doppia elica nel gel. La transizione mostra un'isteresi termica marcata tra la fusione e la stabilizzazione, attribuita alla stabilizzazione della struttura a doppia elica, una volta che è stata formata, dà estese aggregazioni elica-elica.

Passando da temperatura ambiente ad una temperatura più alta (26, 33, e 38°C), gli spettri osservati presentano una regione iniziale che rimane pressoché costante come è presente una regione di plateau ad alte temperature (82, 91, e 79°C) dove l'agarosio si presenta in stato liquido. Lo spettro dell'agarosio in gel, e quindi a temperature comprese tra quelle precedentemente descritte, presenta una intensità doppia rispetto allo spettro dell'agarosio in soluzione, ed è shiftato di ~9nm, con larghezza di banda cambiata (Morris et al., [47] 1986).

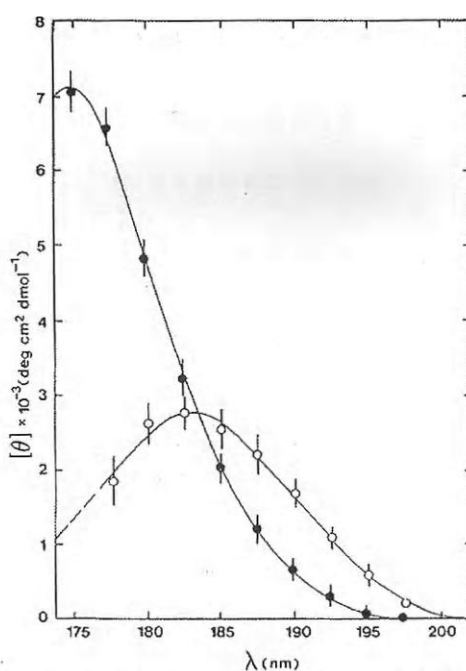


Figura 54: Agarosio in soluzione (pallino vuoto) e in gel (pallino pieno), in entrambi i casi i dati ottenuti sono stati interpolati tramite un'unica Gaussiana

Lo studio condotto da Wood et al. [48] nel 1993 ha dimostrato come l'agarosio (4% e 6%) sia un mezzo adatto per l'incapsulamento dei campioni biologici. Esso infatti è facilmente manipolabile, preserva l'integrità della cellula (forma infatti una soluzione uniforme e solidifica lentamente a 32°C, senza arrecare danni da eccesso di calore), non presenta un forte *background* nelle immagini acquisite. In tabella 8 si riportano le caratteristiche di alcuni mezzi analizzati da Wood.

	Agar	Gelatin	Agarose
Melting point °C	100	28–30	65
Gel point °C	55	23	30–37
Encapsulation characteristics	Must work quickly Heat-damage prone Not sticky	Non-uniform solution Need high concentration Gelled slowly Sticky when solid	Uniform solution No heat damage Not sticky
Post-fixation characteristics of medium	Brown post-fixation	Black post-fixation	Color/texture unchanged
Dehydration effect on medium	Firm	Brittle	Firm
Sectioning characteristics	Easy to trim Days to harden	Shredded when sectioned Not well infiltrated Shattered during trimming	Easy to trim and section
TEM	High background No separation of specimen from resin Clear zone around cells Cells appeared normal	Very high background Gel separated from specimen Many holes in sections Cells small, shrunken not well fixed	Low background No separation of specimen from resin No holes in sections Cells normal, well fixed

Tabella 8: Confronto tra i mezzi di incapsulamento [48]

L'agarosio è ideale per l'elaborazione di un gran numero di campioni particolati, specialmente per la preparazione di singole cellule in cui sia importante l'orientazione o i campioni siano pochi e si debba minimizzare il danno da calore. L'elaborazione di campioni singoli e delicati (come gli ovociti, Hyttel e Madsen, 1987) può essere facilitato con l'impiego di agarosio, poiché l'orientazione può essere stabilita in modo lento e preciso prima che il gel si raffreddi, e con scarse possibilità di distorsioni da calore (come invece avviene se si impiega agar). L'agarosio mantiene il colore e la struttura inalterati anche a seguito di osmotizzazione. A seguito di deidratazione esso diventa leggermente marrone e solido, ma non fragile.

7. Caratterizzazione ottica dei mezzi di inclusione

1° fixation	
Pre-encapsulation	Blocks somewhat soft, especially if no post-fixation. More difficult to section, but still obtained acceptable results
Post-encapsulation	Preferred; blocks firm and easy to trim, with or without osmication
Post-fixation with osmium	Little or no background to interfere with observation of specimen
En bloc UA staining	No increased background with en bloc staining; en bloc staining appeared to provide more contrast than staining after sectioning
Resin	
ERL	Little or no background, regardless of whether or not osmication performed
Epon-Araldite	Slightly higher background if osmication performed; no background without osmication
LR White	No background, with and without osmication
Quetol	Little or no background, increased contrast of specimen image
Specimen type	High quality results observed with all specimen types; membranes intact, no distortion of contents of cells

Tabella 9: Caratteristiche dell'Agarosio come mezzo di incapsulamento: Effetti dei vari protocolli di fissazione e incapsulamento [48]

L'agarosio è stato analizzato otticamente per lunghezza d'onda proprie dello spettro Ultravioletto e dello spettro Infrarosso. Si riportano di seguito alcuni studi effettuati tramite diverse tecniche per l'analisi spettrale dell'agarosio.

La Spettroscopia infrarossa è il metodo più accessibile per analizzare dal punto di vista ottico i materiali. La Tabella 10 mostra le diverse bande di assorbimento che sono state caratterizzate per lo spettro di agar (precursore dell'agarosio). Le bande a 1540 e 1640 cm^{-1} sono particolarmente degne di nota. Esse provengono da proteine esistenti in agar e di cui solo un paio di osservazioni sono state fatte prima. Il picco a 890 cm^{-1} non è stato identificato fino ad oggi.

Numeri d'onda	Strutture che causano assorbimento	
730	Carbon-sulfur links vibration.	(Cross, 1964).
750	Carbon-sulfur links vibration.	(Torres-Pombo, 1972).
820	Ester-sulfate in C-6 link vibration. (Stancioff and Stanley, 1969).	
850	C-O-S in C-4 link vibration. (De Lestang and Lloyd, 1961; Alkahane and Izumi, 1976).	
890	<u>Typical Agar peak with unknown meaning.</u>	
930	3,6-Anhydro-galactose bridge vibration. <u>Typical Agar peak.</u> (Stanley, 1963)	
1060	Ester-sulfate link vibrations. (Cross, 1964). (1)	
1070	3,6-Anhydro-galactose bridge vibration. <u>Typical Agar peak.</u> (Stanley, 1963)	
1180	Ester-sulfate link vibrations (Cross, 1964). (1)	
1250	Ester-sulfate link vibrations, (Alkahane and Izumi, 1976). (1)	
1370	Ester-sulfate link vibrations. (Cross, 1964). (1)	
1410	Peak with unknown meaning.	
1540	CO-NH peptide link vibrations. (Cristiaen, 1983).	

7. Caratterizzazione ottica dei mezzi di inclusione

1640	Amine function deformations vibrations. (Cristiaen, 1983).
1750	Possibly a methyl group vibration. (2)
2815	O-CH ₃ link vibrations.
2830	O-CH ₃ link vibrations.

Tabella 10: Spettroscopia a Infrarossi su film di agar [28]

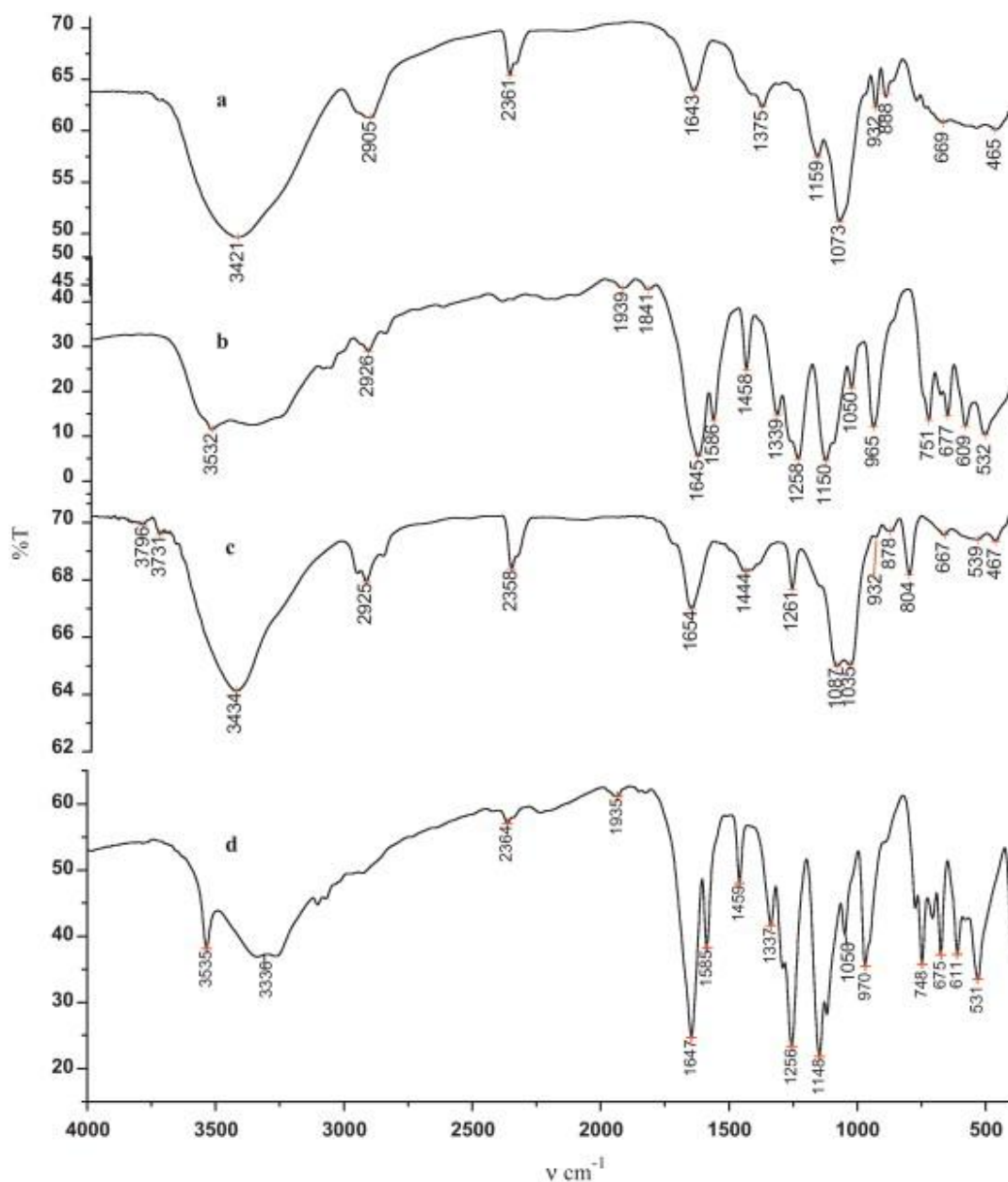


Figura 55: Spettro FT-IR di Agarosio (AG) (a), *sodium saccharate* (SA) (b), AGS (c) e mistura fisica di AG e SA. (d)

Attraverso analisi spettroscopica nell'Infrarosso a trasformata di Fourier (FT-IR) Oza ([45], 2010) ha rilevato i seguenti picchi di assorbimento per agarosio: $3417(\text{cm}^{-1})$ (OH-stretching); 1642 (legame H-O-H), 1376 (-CH₂-OSO₃-2 legame a C-6); 1074 (C-O-C legame glicosidico), 932 (3,6- legame anidrogallattosio), 778 e 741cm^{-1} .

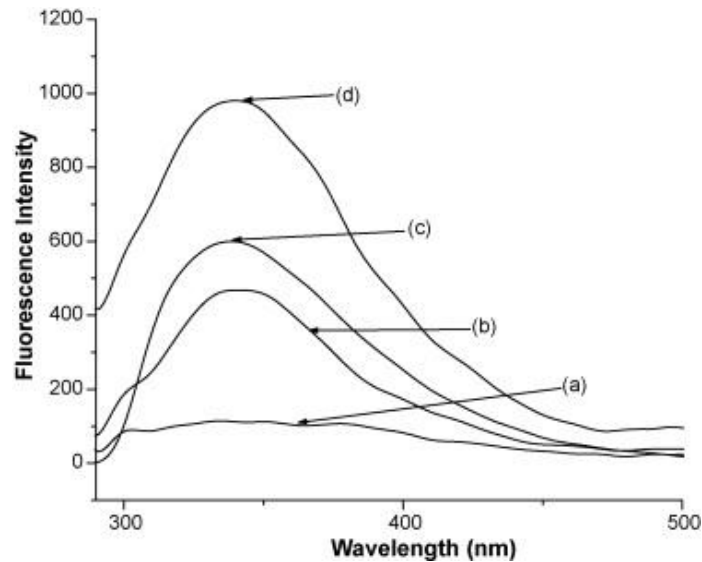


Figura 56: Emissioni di fluorescenza (a) agarosio, 5×10^{-5} M, (b) guanina, $3,63 \times 10^{-5}$ M, contenente 0.037mM guanina, (c) guanina, 5×10^{-5} M, contenente guanina 0.051mM , (d) agarosio -guanina, 5×10^{-5} M, contenente guanina 0.037mM .

Analizzando invece lo il comportamento nelle lunghezze d'onda proprie dello spettro Ultravioletto (UV) dell'agarosio Oza et al. ([45] 2010) hanno constatato che questo non presenta bande di assorbimento nel UV o nel visibile né particolare fluorescenza.

Podešva et al. ([31] 1995) hanno studiato la diffusione della luce in agarosio, basandosi su l'incremento (dn/dc) di indice di rifrazione n di questo polisaccaride in funzione della sua concentrazione c . Altri studi condotti da Rochas e Lahaye (1989) riportavano solo una stima rozza del RI ad una specifica lunghezza d'onda usata ($\lambda=633\text{nm}$). La loro stima ($RI=0.14$) fu ottenuta attraverso un'estrapolazione da misure sperimentali di dn/dc a $\lambda=940\text{nm}$ assumendo che la pendenza della dipendenza di dn/dc da λ^{-2} per l'agarosio fosse la stessa di quella del destrano. Nello studio condotto da Podešva RI è stato accuratamente calcolato per tre campioni di agarosio, a diverse lunghezze d'onda (λ) e temperatura (T), in due solventi, acqua e dimetil solfossido (DMSO). L'acqua, infatti, è il solvente più comune per l'agarosio in ricerca e in pratica, mentre DMSO è stato scelto a causa della sua capacità

di sciogliere l'agarosio anche a temperatura ambiente (la sua temperatura di gelificazione è al di sotto di 0°C) e per la capacità di rompere i legami a idrogeno propri della struttura dell'agarosio.

Per una soluzione del polimero (avente una massa molare M abbastanza alta) in un singolo solvente, la variazione dell'indice di rifrazione in funzione della concentrazione dipende solo dalla temperatura T e dalla lunghezza d'onda λ , a cui questo è stato misurato. È noto, infatti, che l'indice di rifrazione in funzione della concentrazione di un certo materiale è una funzione lineare di T e di λ^{-2} . Tuttavia, al di sotto di certi limiti ($<10^3\text{g mol}^{-1}$ o, in alcuni casi, $<10^4\text{g mol}^{-1}$), specifici per ogni sistema polimero/solvente, la massa molare del polimero può influenzare l'indice di rifrazione, costituendo così una terza variabile indipendente. La M per l'agarosio è di 10^5g mol^{-1} e quindi, non influenza il calcolo dell'indice di rifrazione. In questo studio sono stati confrontati tre campioni di prodotti di agarosio.

Per sciogliere l'agarosio in acqua, le ampole contenenti le soluzioni sono state scaldate per 30 minuti alla temperatura di 100°C, fino a raggiungere l'omogeneità del sistema. Le concentrazioni di agarosio sono state calcolate prendendo in considerazione sia il contenuto di umidità nel campione sia la densità del solvente ad una data temperatura.

Le misure sono state effettuate tramite un riflettometro differenziale a $\lambda=436, 546, \text{ e } 633\text{nm}$, a temperature di 50°, 60°, e 70°C per i sistemi acquosi. La temperatura minima è stata scelta in modo tale da evitare la gelificazione della soluzione di agarosio, che avviene a ~45°C o meno.

In tutti i casi, con λ costante, dn/dc incrementa all'aumentare della temperatura T , mentre a T costante, all'aumentare di λ^{-2} dn/dc in acqua aumenta (avviene il contrario in DMSO), e i valori di dn/dc variano da 0.148 a 0.164 cm^3g^{-1} (con un valore medio di 0.157 cm^3g^{-1}).

Si può concludere quindi che l'agarosio ben si presta ad essere un mezzo adatto al montaggio dei campioni biologici, in quanto è stabile, facilmente maneggiabile e il suo indice di rifrazione è prossimo a quello del vetro (su cui solitamente si montano i campioni), non interferendo così con l'*imaging* ottico.

7.2.2 Metilcellulosa

La Metilcellulosa è un composto chimico derivato dalla cellulosa. Si tratta di una polvere bianca idrofila in forma pura, e dissolve in acqua fredda (ma non in acqua calda), formando una soluzione chiara o un gel viscoso. È venduta con una varietà di nomi commerciali e viene utilizzata come addensante ed emulsionante in vari alimenti e prodotti cosmetici, e viene impiegata anche nell'industria farmaceutica. Come la cellulosa, non è digeribile, non è tossica, e non è un allergene.

La Metilcellulosa non si trova naturalmente e viene prodotta sinteticamente riscaldando cellulosa con una soluzione caustica (ad esempio una soluzione di idrossido di sodio) e trattandola con cloruro di metile. Nella reazione di sostituzione che segue, i residui ossidrilici (gruppi funzionali -OH) sono sostituiti da metossido (gruppi -OCH₃).

Diversi tipi di metilcellulosa possono essere preparati a seconda del numero di gruppi ossidrilici sostituiti. La cellulosa è un polimero costituito da numerose molecole di glucosio legate, ciascuna delle quali espone tre gruppi ossidrilici. Il grado di sostituzione (DS) di una data forma di metilcellulosa è definito come il numero medio di gruppi ossidrilici sostituiti per glucosio. Il massimo teorico è quindi un DS di 3.0, valori comunque più tipici sono 1.3-2.6. Diverse preparazioni di metilcellulosa possono anche differire nella lunghezza media delle loro catene polimeriche.

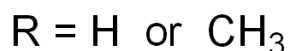
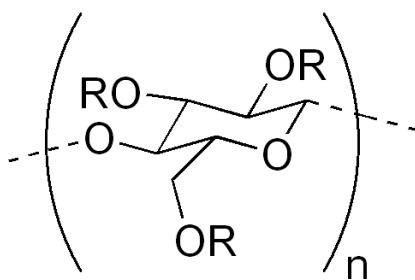


Figura 57: Unità chimica di base della Metilcellulosa

La Metilcellulosa ha una temperatura di soluzione critica inferiore (LCST) tra 40°C e 50°C. A temperature inferiori alla LCST, è facilmente solubile in acqua, sopra la LCST, non è solubile, si ha cioè un effetto paradossale poiché il riscaldamento di una soluzione

satura di metilcellulosa la trasforma in solido, perché la metilcellulosa precipita. La temperatura alla quale si verifica ciò dipende dal valore DS.

La preparazione di una soluzione di metilcellulosa in acqua fredda è però difficile: come la polvere viene a contatto con l'acqua, si forma attorno ad essa uno strato coloso, e l'interno non riesce ad idratarsi. Un modo migliore è miscelare prima la polvere con acqua calda, in modo che le particelle di metilcellulosa sono ben disperse nell'acqua, e raffreddare la dispersione miscelando continuamente, portando alla dissoluzione di tali particelle.

Si è voluto quindi verificare se il processo di gelificazione della metilcellulosa sia causato da interazioni idrofobiche. Le porzioni idrofobe della metilcellulosa, che sono formate dai sostituenti metilici, sono isolate tra loro a basse temperature ($<50^{\circ}\text{C}$) da cluster di molecole d'acqua. I cluster d'acqua vengono distrutti riscaldando il materiale sopra i 50°C . Questo rende possibile alle porzioni idrofobe di formare intercatene associate. Di conseguenza, si forma una rete tridimensionale di legami fisici incrociati tra le catene e la soluzione si trasforma in un gel.

Buslov et al. ([49] 2008) hanno analizzato otticamente una soluzione acquosa al 3% di metilcellulosa nel range di temperatura che andava da un minimo di 20 a un massimo di 70°C . L'uso della spettroscopia ATR (*Attenuated Total Reflectance spectroscopy*) ha permesso di comprendere quale fosse l'influenza dell'aumento di temperatura sulla forma e sul posizionamento delle eventuali bande di assorbimento. La forma della curva spettrale esaminata cambia drasticamente se la temperatura della soluzione di metilcellulosa aumenta. Questo è particolarmente evidente nell'aumento di assorbimento a 1070 e 1115cm^{-1} e nel cambiamento nella posizione del massimo principale da 1054 a 1066cm^{-1} . Questi cambiamenti sono più evidenti nel range di temperatura $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$. È noto infatti che la transizione sol-gel di questo sistema si verifica in particolare in questo intervallo di temperatura.

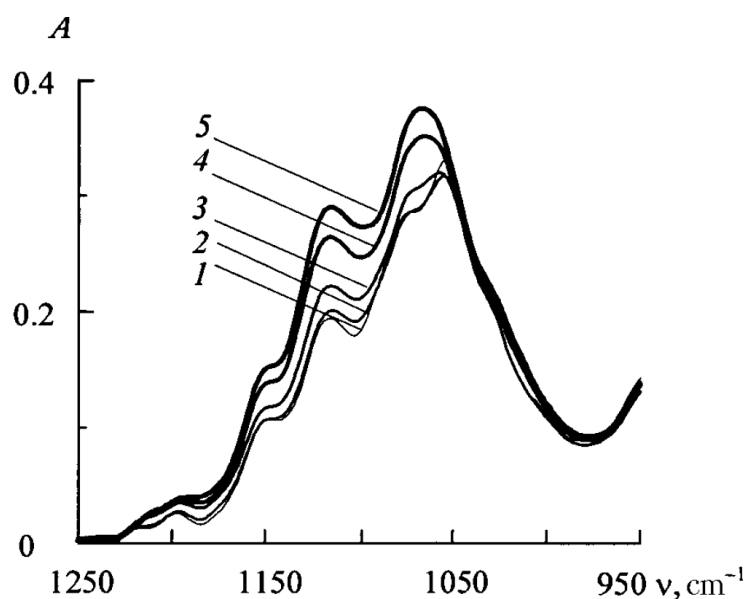


Figura 58: Spettri IR-ATR di una soluzione acquosa di metilcellulosa a 20 (1), 40 (2), 50 (3), 60 (4), e 70°C (5) nella gamma di frequenze 950-1250cm⁻¹.

La distribuzione di metile e altri sostituenti all'interno di una unità di anidroglicosio nonché lungo la catena molecolare, è considerato un fattore importante che determina le proprietà fisico-chimiche dei derivati della cellulosa. Tali reazioni eterogenee possono basarsi su una varietà dei sostituenti all'interno di una unità di anidro glucosio, come anche lungo la catena molecolare nei derivati della cellulosa, che causano anche proprietà fisiche variabili per i prodotti. Quando i derivati della cellulosa sono costituiti da una struttura chimica omogenea, le loro proprietà fisiche possono essere direttamente previste (Takaragi, Fujimoto, Miyamoto, e Inagaki, 1987). La distribuzione dei sostituenti influenza la formazione dei legami ad idrogeno inter- e intramolecolari, e ciò contribuisce alla solubilità (Kondo, 1997a), alla gelificazione (Itagaki, Takahashi, Natsume, e Kondo, 1994; Itagaki, Tokai, e Kondo, 1997), alla cristallizzazione del liquido (Kondo & Miyamoto, 1998), e alle reazioni chimiche di gruppi ossidrilici (Kondo, 1997a) in derivati della cellulosa. La distribuzione dei sostituenti influenza anche la suscettibilità dei derivati della cellulosa alla degradazione enzimatica (Kondo & Nojiri, 1994; Nojiri & Kondo, 1996).[33]

Per meglio comprendere come la formazione dei legami possa influenzare le caratteristiche proprie del materiale Sekiguchi et al. ([33] 2003) ha analizzato tramite FT-IR (analisi spettrale nel lontano Infrarosso) e NIR (analisi spettrale nel vicino Infrarosso) la caratteristiche di due tipi di metilcellulosa. I due tipi di O-metilcellulosa utilizzati sono i seguenti: uno era O-metilcellulosa (con DS=1.0-1.8 e solubile in acqua) selettivamente

metilata e l'altro tipo era la metilcellulosa 'R-MC' (O-metilcellulosa commercialmente disponibile e casualmente metilata). I campioni di cui sopra sono stati sciolti in acqua, e centrifugati a 15.000rpm per rimuovere le impurità insolubili. Il supernatante è stato isolato ed essiccato a 50°C. I campioni secchi sono stati nuovamente disciolti in acqua a temperatura ambiente, e poi mantenuti alle stesse condizioni per 24h, miscelando continuamente, per assicurare una completa dissoluzione.

La Fig. 60 mostra gli spettri IR di 2,3 MC-n e R-MC sottoforma di film essiccati. Questi spettri IR sono stati normalizzati di 1110cm^{-1} . Aumentando il grado di sostituzione DS, la regione delle vibrazioni dovute allo stiramento del legame C-H ($3000\text{-}2800\text{cm}^{-1}$) è maggiore, e minore è la regione delle vibrazioni dovute allo stiramento del gruppo OH ($3700\text{-}3000\text{cm}^{-1}$). La forma della banda di stiramento OH in R-MC è diversa da quella in 2,3-MC-n. La differenza può dipendere dalla formazione di legami a idrogeno nei derivati della cellulosa. Le bande di stretching OH nei derivati della cellulosa sono assunte essere una combinazione di bande che includono non solo gruppi idrossilici legati con legami a idrogeno inter- e intramolecolari, ma anche un piccolo numero gruppi ossidrilici 'liberi' o legati non con legami a idrogeno (Kondo, 1997b).

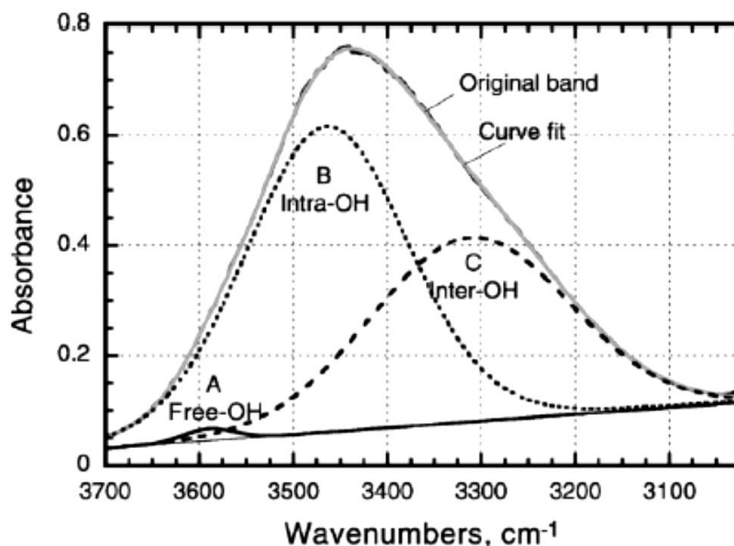


Figura 59: Spettro IR di film di 2,3MC-1b per legami OH

La banda B in Fig.60 può essere attribuita alla formazione intramolecolare di legami idrogeno. In generale le bande di assorbimento nell'Infrarosso che dipendono dalla formazione di legami a idrogeno intermolecolari appaiono a numeri d'onda inferiori

(lunghezze d'onda maggiori) con forma più ampia rispetto a quelle causate dalla formazione di legami a idrogeno intramolecolari. Così, la banda C può essere dovuta ai legami a idrogeno intermolecolari mentre la banda A può essere dovuta a gruppi idrossilici liberi in posizione, sfuggiti alla metilazione, o a gruppi idrossilici liberi che non sono stati coinvolti nel legame a idrogeno intermolecolare.

Soluzioni acquose di film 2,3 MC-n e R-MC divengono opache se riscaldate, e si trasformano in un gel se ulteriormente riscaldate. I fenomeni di gelificazione sono dipendenti dal tempo e termicamente reversibile con isteresi. Si sono analizzati entrambi i comportamenti dei gruppi OH in acqua e derivati della cellulosa usando gli spettri nel vicino e medio Infrarosso, rispettivamente. Nel medio Infrarosso, non è facile rilevare la banda caratteristica dei gruppi OH per l'acqua, perché il contributo della banda OH nei derivati della cellulosa si sovrappone alla prima non rendendola visibile. Così, in misurazioni nel medio Infrarosso si sono utilizzati campioni disidratati per riuscire a vedere il contributo dei legami a idrogeno caratteristico dei derivati della cellulosa. La struttura dell'acqua in un materiale allo stato di gel può essere studiata però tramite tecniche spettroscopiche nel vicino Infrarosso a trasformata di Fourier (FT-NIR).

Gli spettri FT-NIR di soluzioni di metilcellulosa (2,3 MC-1b e R-MC) sono stati analizzati per studiare la formazione di legami a idrogeno con le molecole di acqua della soluzione in cui i materiali vengono disciolti, per comprendere come questi legami contribuiscano al processo di gelificazione. La Fig. 61 mostra la banda OH nella regione NIR tra 6000 e 7400 cm^{-1} (1351-1667nm) dovuta ai legami OH. La banda di assorbimento OH è stata risolta in tre fasce di componenti con picchi a 7060, 6900, e 6660 cm^{-1} (1416, 1449, 1502nm).

Queste bande sono state assegnate alle molecole di acqua libere (S0), alle molecole d'acqua con un gruppo OH impegnato in legami a idrogeno (S1), e quelle con due gruppi OH impegnati in legami idrogeno (S2), rispettivamente.

A 30°C dove non si verifica gelazione, le aree di S1 di acqua in soluzioni 2,3MC-1b e R-MC erano più grande rispetto a quelle nel solo solvente (acqua pura), mentre le aree di S2 in entrambe le soluzioni erano più piccole di quelle del solvente puro (acqua pura). Ciò significa che le molecole d'acqua hanno interagito con i campioni in modo da portare alla formazione di S1 a 30°C.

A 90°C dove è avvenuta la gelificazione di R-MC e 2,3 MC-1b l'area di S0, mentre la superficie di S2 dell'acqua è diminuita.

A causa della rottura di alcuni legami idrogeno nella struttura dell'acqua a temperatura più alta, le molecole d'acqua possono passare agli stati liberi (S0). Le aree di S1 sia 2,3 in MC-1b e R-MC sono più grandi a 90°C che nel solo solvente (acqua pura). Questo indica che sono presenti legami a idrogeno intermolecolari tra le molecole d'acqua ed i campioni a temperature elevate.

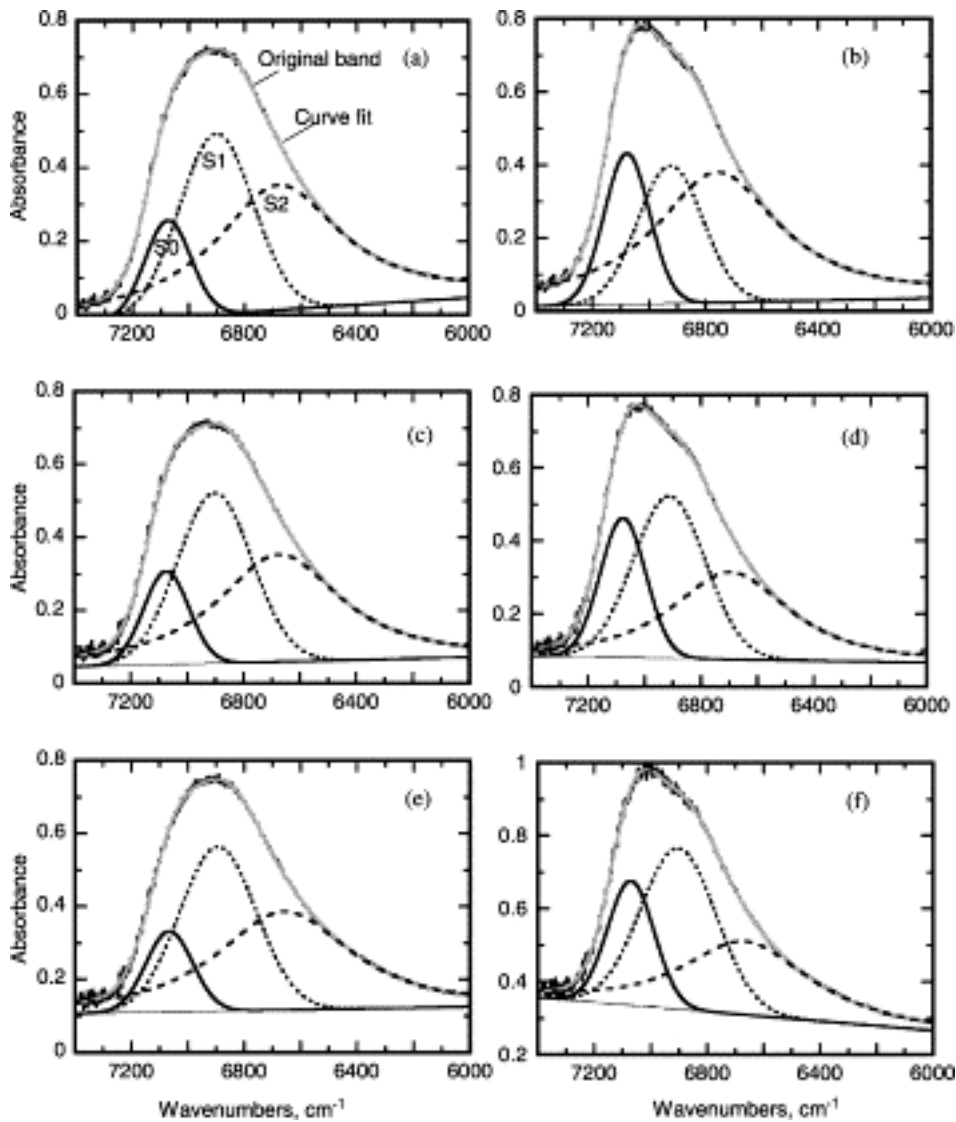


Figura 60: Banda OH dell'acqua in spettri NIR di (a) acqua a 30°C, (b) acqua a 90°C, (c) R-MC a 30°C, (d) R-MC a 90°C, (e) 2,3 MC-1b a 30°C, e (f) 2,3 MC-1b a 90°C.

Lo studio degli spettri IR di acqua e soluzioni acquose di metilcellulosa nell'intervallo di bande di assorbimento ($6000-7500\text{cm}^{-1}$) ha portato alla conclusione che il legame a idrogeno di molecole d'acqua tra loro e con gruppi polari di metilcellulosa svolge un ruolo importante nell'associazione idrofoba durante la gelificazione della metilcellulosa e che anche la formazione di legami idrogeno intermolecolari è coinvolta nel processo di gelificazione. L'organizzazione strutturale degli idrogel di metilcellulosa è però ancora poco studiato. Ad esempio, non è noto se la gelificazione modifica la struttura delle macromolecole di metilcellulosa o fissa semplicemente la struttura adottata da macromolecole isolate in soluzione acquosa.

Mirando a diversificare la gamma dei prodotti addensanti utilizzati nella stampa tessile, alcuni eteri cellulósici (metilcellulosa, metilidrossipropilcellulosa e idrossietilcellulosa) sono stati testati da Balan et al. ([34] 2009) che tramite spettroscopia IR ha confermato la struttura chimica e il grado di sostituzione dei prodotti delle imprese Benecel, BenecelM e Tubicoat HEC. I prodotti testati sono presentati in tabella 12 (di nostro interesse sarà solo la metilcellulosa).

No.	Commercial product	Chemical compound (prospectus)	Manufacturing company	Application fields
1	Benecel 324	methylhydroxypropylcellulose	Aqualon, USA	thickening agent (cosmetics, pharmaceuticals, food industry)
2	Benecel 363	methylhydroxypropylcellulose		
3	Benecel 424	methylhydroxypropylcellulose		
4	Benecel M 011	methylcellulose		
5	Benecel M 021	methylcellulose		
6	Tubicoat HEC	hydroxyethylcellulose	Tubingen, Germany	thickening agent (textile industry)

Tabella 11: Materiali studiati [34]

Per una migliore identificazione, caratterizzazione e confronto, gli spettri d'assorbimento delle sostanze studiate sono stati sovrapposti nello stesso grafico. Tutti i campioni hanno bande caratteristiche dei polisaccaridi. Le bande specifiche della cellulosa sono: $3450-3225$, 1620 , 1160 , $1065-980$, 900 , $670-665$ e 610cm^{-1} . Per i derivati della cellulosa, le bande caratteristiche sono: 1320 , 1160 , 1125 , 1075 e 945cm^{-1} per la metilcellulosa.

I prodotti a base di metilcellulosa (Benecel M 011 e M Benecel 021) hanno spettri simili. La Figura 61 presenta lo spettro dei prodotti basati su metilcellulosa. Rispetto alle caratteristiche proprie della cellulosa sono evidenti diversi *shift* di bande rispetto alla

cellulosa, come ad esempio per i gruppi OH (da 3415cm^{-1} per la cellulosa a 3466cm^{-1} per la metilcellulosa), o quello relativo alla banda dell'acqua assorbita (da 1620cm^{-1} per la cellulosa a 1645cm^{-1} per il prodotto).

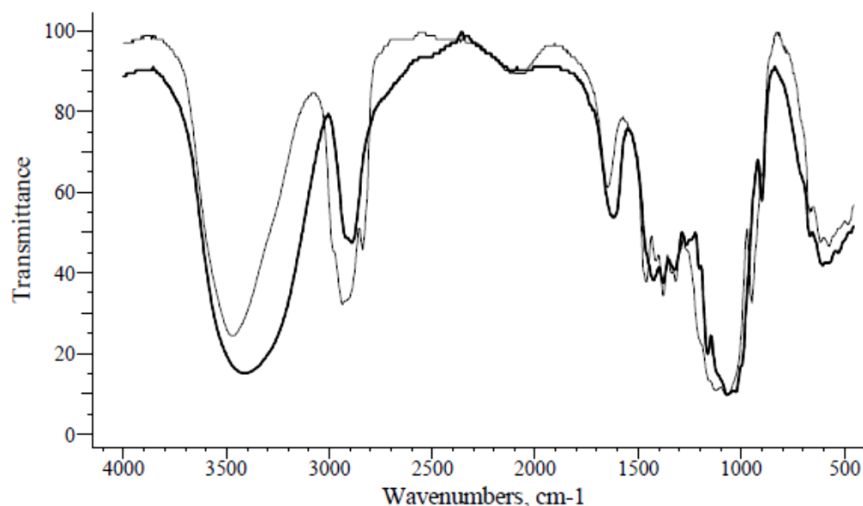


Figura 61: Spettro FT-IR di Benacel M 021 (linea sottile) e cellulosa (linea spessa)

Maity et al. ([35] 2012) hanno studiato i nanocomposti dimetilcellulosa-argento tramite spettroscopia FT-IR. I nanocomposti ibridi metallo-polimeri hanno recentemente attirato attenzione grazie al loro potenziale di offrire le caratteristiche sinergiche dei materiali polimerici con quelli dei materiali inorganici. I polimeri sono materiali ospiti eccellenti per nanoparticelle di metallo e di semiconduttori offrendo insieme diverse eccezionali proprietà ottiche ed elettriche. I polimeri si comportano come superfici in grado di intrappolare nanoparticelle.

Considerando solo le caratteristiche proprie dello spettro della metilcellulosa i picchi di assorbimento si ritrovano a 3469cm^{-1} (attribuito alla vibrazione di stiramento del gruppo idrossile) a 2921cm^{-1} (attribuito alla vibrazione asimmetrica di stiramento CH nell'anello piranosico). La banda a 1641cm^{-1} dipende dalla modalità di legame CH; la banda di assorbimento a 1081cm^{-1} è attribuita alle vibrazioni proprie dello stiramento del legame C-O-C. Il picco a 951cm^{-1} è relativo al gruppo $-\text{OCH}_3$. Non si riporta in questa sede un'analisi per il nanocomposto.

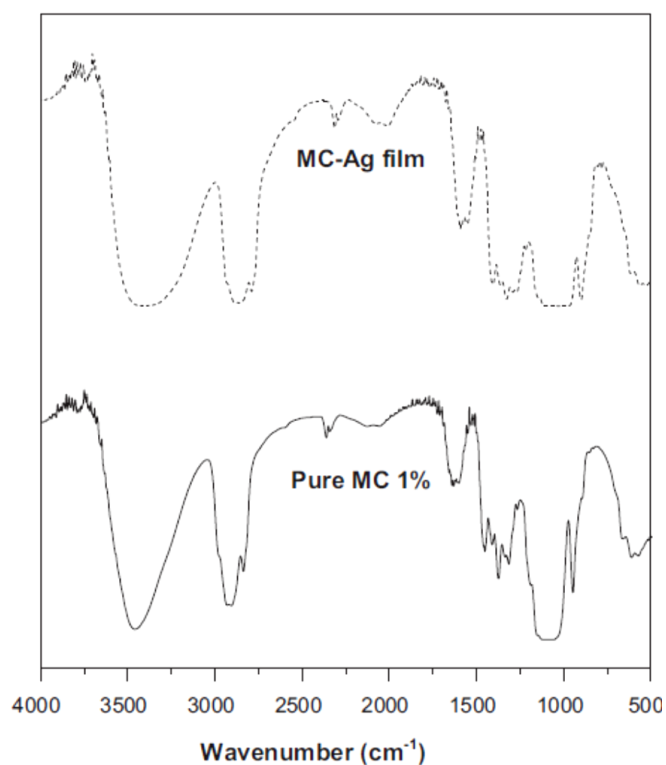


Figura 62: Spettro FT-IR per nanocomposto MC-Ag e per metilcellulosa pura

7.2.3 Glicerolo

Il Glicerolo (o glicerina) è un composto poliolicco semplice. È un liquido viscoso incolore, inodore, che è ampiamente usato in formulazioni farmaceutiche. Il glicerolo ha tre gruppi ossidrilici che sono responsabili della sua solubilità in acqua e della sua natura igroscopica. La spina dorsale del glicerolo è centrale per tutti i lipidi noti come trigliceridi. Il glicerolo è di sapore dolce e di bassa tossicità.

Molecular formula	C ₃ H ₈ O ₃
Molar mass	92.09 g mol ⁻¹
Appearance	Colorless, liquid, hygroscopic
Odor	odorless
Density	1.261 g/cm ³
Melting point	17.8 °C, 291 K, 64 °F
Boiling point	290 °C, 563 K, 554 °F
Refractive index (<i>n_D</i>)	1.4746
Viscosity	1.412 Pa·s

Tabella 12: Proprietà del glicerolo

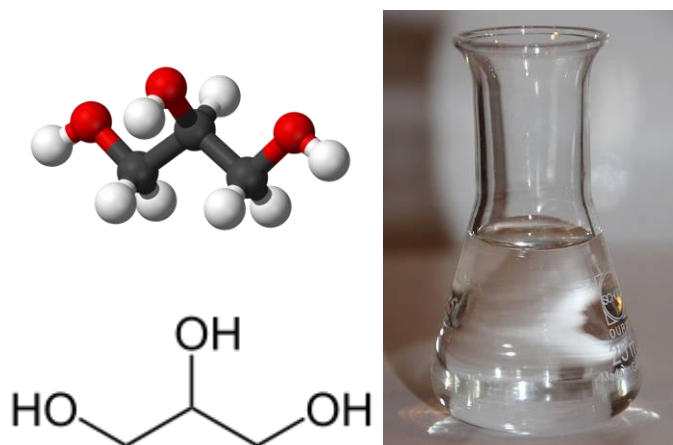


Figura 63: Struttura tridimensionale del glicerolo, composizione chimica e campione di glicerolo

Per descrivere otticamente il glicerolo nel più ampio intervallo di lunghezze d'onda possibile si presentano di seguito studi spettroscopici effettuati nel vicino Infrarosso (NIR), nell'Infrarosso (FT-IR) e nel lontano Infrarosso.

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR), come visto, è un metodo analitico che fornisce varie informazioni sulle proprietà chimiche e fisiche dei materiali, tra struttura molecolare, cristallinità, cristalli polimorfi, contenuto di acqua residua, miscibilità componente, struttura secondaria della proteine, e le interazioni molecolari. L'assorbanza relativamente bassa che consente misure di riflessione diffusa e i recenti progressi nella chemiometria, hanno reso la spettroscopia NIR un potente strumento analitico non distruttivo per il controllo di qualità. La possibilità di inserire i campioni sottovuoto in fiale di vetro è uno dei vantaggi per l'analisi NIR dei solidi amorfi fisicamente instabili. L'uso corretto di spettroscopia NIR, in combinazione con altre tecniche di analisi sofisticate, migliora il prodotto e la comprensione del processo richiesto per avere una migliore qualità di formulazione e quindi del prodotto finale.

Lo scopo dello studio condotto da Izutsu et al. ([46] 2009) era quello di caratterizzare i profili del legame a idrogeno in solidi amorfi allo stato gommoso e vitreo tramite spettroscopia NIR. La configurazione casuale delle molecole e la variazione di interazioni molecolari in polioli amorfi e solidi saccaridici fornisce ampie bande di assorbimento nello spettro NIR. Alcune delle bande più larghe (ad esempio, dovuto a stiramento dei gruppi OH) indicano diversi stati di legame a idrogeno (ad esempio, intermolecolare, intramolecolare, libero) nei solidi. I profili del legame a idrogeno in acqua e alcool di

alcuni liquidi dipendono in gran parte dalla temperatura. Recenti studi nel medio infrarosso su film saccaridici amorfi indicano differenti shift dei picchi di stiramento OH dipendenti dalla temperatura ($3300\text{-}3400\text{cm}^{-1}$) e di legame ($1000\text{-}1100\text{cm}^{-1}$) tra lo stato vetroso e gommoso.

L'analisi NIR di solidi amorfi raffreddati (ad es. sorbitolo, glucosio) e di un liquido (glicerolo) in una cella di quarzo (1mm di lunghezza del percorso della luce, 30°C) ha mostrato spettri simili con alcune bande larghe. Le bande più ampie sono presenti a $6200\text{-}6500\text{cm}^{-1}$ (rappresentano stiramento del legame OH prima del legame a idrogeno con gruppi intermolecolari) e a $6600\text{-}7100\text{cm}^{-1}$ (legami con gruppi intramolecolari o non a idrogeno). L'aggiunta di H_2O aumenta l'assorbanza di glicerolo a circa 4110 , 5152 e 6925cm^{-1} nello spettro NIR (dati non mostrati).

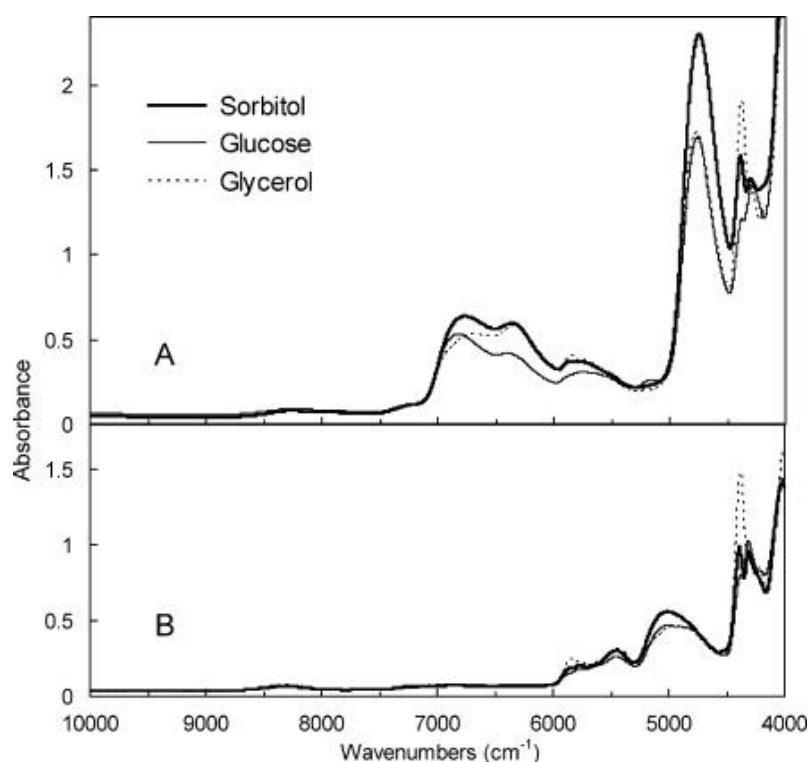


Figura 64: Spettri NIR di glicerolo e altri solidi (sorbitolo, glucosio) in una cella di quarzo (1mm lunghezza del percorso della luce) preparato con A senza, e B con scambio idrogeno / deuterio (30°C)

L'effetto del riscaldamento sugli spettri NIR di trasmissione del glicerolo è mostrato come spettro di differenza (Fig. 65). Il cambiamento porta allo spostamento delle bande principali presenti a $6000\text{-}7000\text{cm}^{-1}$ ($1429\text{-}1670\text{nm}$) (stiramento OH) e a circa 4750cm^{-1}

(2105nm) (stiramento OH / cambiamento dell'angolo di legame) negli spettri originali a numeri d'onda superiori alle temperature elevate (40°C, 60°C e 80°C).

L'apparente diminuzione dell'assorbanza nella banda 6000-6500 cm^{-1} e il concomitante aumento di assorbanza in quella corrispondente a 6700-7100 cm^{-1} sono dovute ai cambiamenti nei profili dei legami a idrogeno a causa dell'aumento della temperatura che comporta il passaggio da legami a idrogeno intermolecolari a legami intramolecolari o liberi.

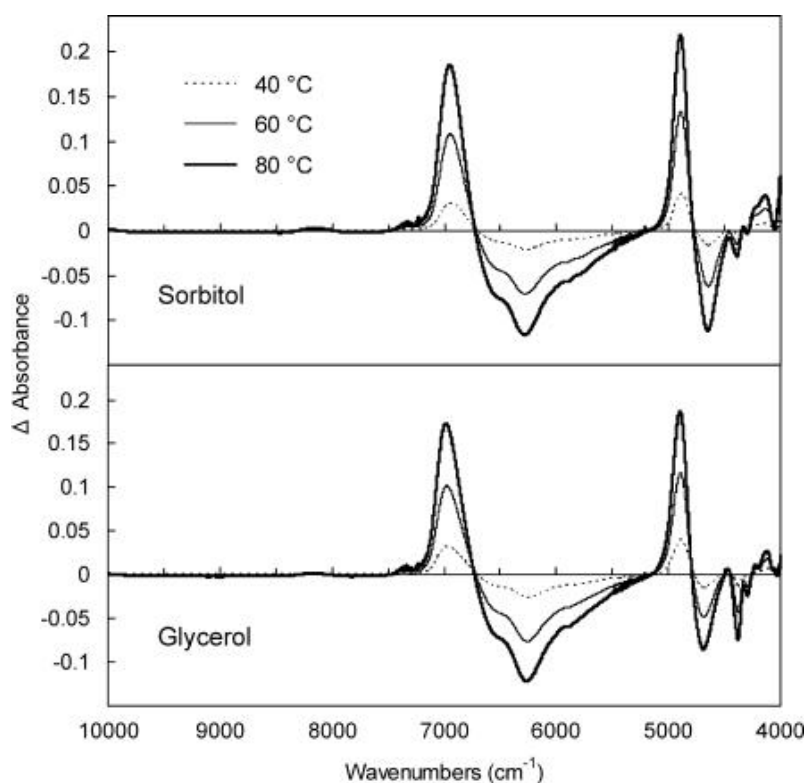


Figura 65: Effetto del riscaldamento sugli spettri NIR di trasmissione di glicerolo liquido raffreddato e sorbitolo solido (1 mm di lunghezza del percorso della luce). Le differenze degli spettri sono state ottenute sottraendo l'assorbanza dei campioni a 30°C

La comprensione dei processi dinamici nel glicerolo, ha attirato molta attenzione per molti decenni. Sono state effettuate misure sia statiche che dinamiche. La maggior parte delle dinamiche atomiche nello stato disordinato può essere compresa in termini di vibrazioni nel lontano infrarosso poiché questi spettri possono fornire una informazione diretta sulle modalità vibrazionali e possono essere utilizzati come un'informazione supplementare ai risultati ottenuti con altre tecniche. Un altro motivo per una tale indagine è quello di ottenere ulteriori informazioni a bassa frequenza al fine di avere una migliore

comprensione del cosiddetto 'boson peak' (il picco a bassa frequenza tipico degli spettri degli liquidi altamente viscosi e dei polimeri).

Per comprendere il comportamento ottico del glicerolo nell'Infrarosso si presenta di seguito lo spettro FT-IR del glicerolo ottenuto da Barone et al. ([39] 2007) durante uno studio su composti formati da un polisaccaride, il levan, e altri prodotti polimerici, tra cui il glicerolo.

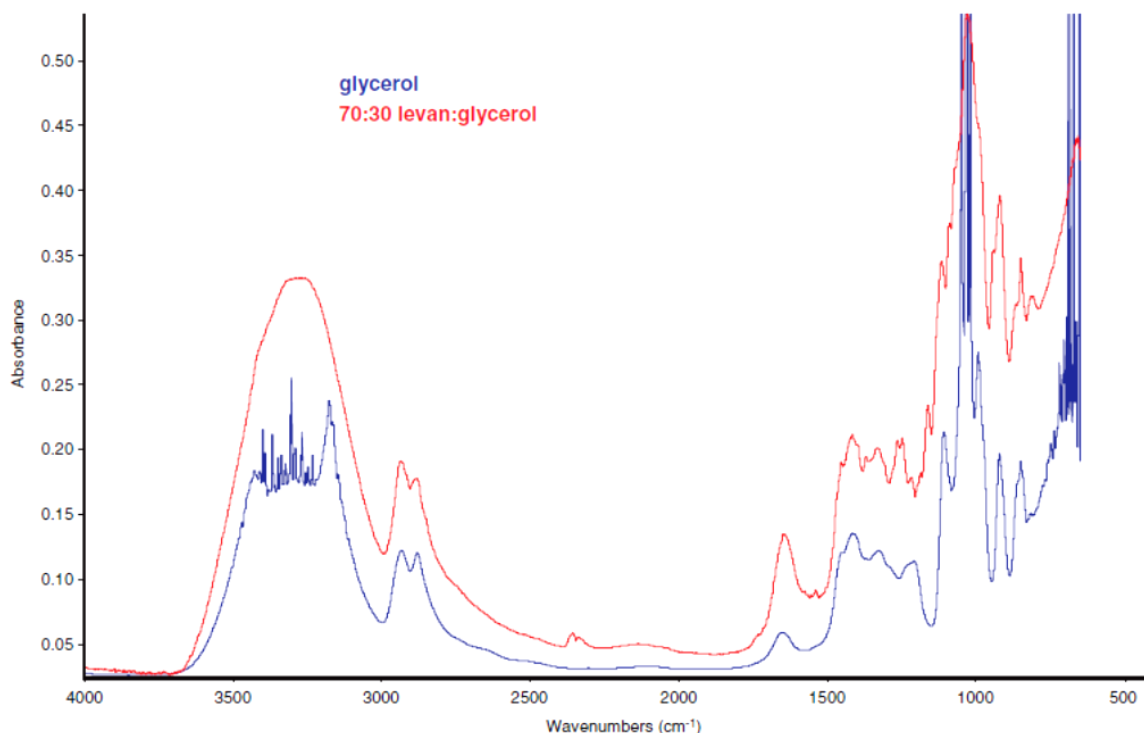


Figura 66: Spettro FT-IR per glicerolo e 70:30: miscela levan:glycerolo stampati a compressione a 90°C. L'asse y non è una scala comune a causa dell'elevato assorbimento del glicerolo.

Per valutare le caratteristiche proprie dei materiali in esame nel vicino Infrarosso si può utilizzare la spettroscopia ATR (*Attenuated Total Reflectance*), tecnica di campionamento della spettroscopia infrarossa che sfrutta la riflessione della radiazione elettromagnetica che incide e che attraversa il campione in esame. Queste tecniche spettroscopiche vengono, infatti impiegate per valutare l'eventuale presenza di impurità all'interno di un materiale.

Per analizzare un campione attraverso questa tecnica (Higgin et al. (2011) [40]), una goccia del liquido viene posta su una finestra trasparente montata sulla superficie superiore dell'analizzatore, e poi una seconda finestra è ruotata nella posizione di apertura, in modo che il campione si trovi tra le due finestre. Questo crea un percorso ottico fisso altamente

riproducibile tra le due finestre. Per campioni a bassa concentrazione, è selezionato uno dei più lunghi cammini ottici, per campioni che sono più concentrati, viene usata una combinazione a percorso ottico breve.

Questo studio riporta dati relativi a vari materiali tra cui il Glicol propilene liquido, il glicerolo, la triacetina, e il glicole dipropilenico, che sono utilizzati come additivi alimentari, farmaci e cosmetici per verificarne l'identità e la purezza globale. Gli spettri ottenuti sono costituiti da 64 interferogrammi messi assieme a 4cm^{-1} di risoluzione.

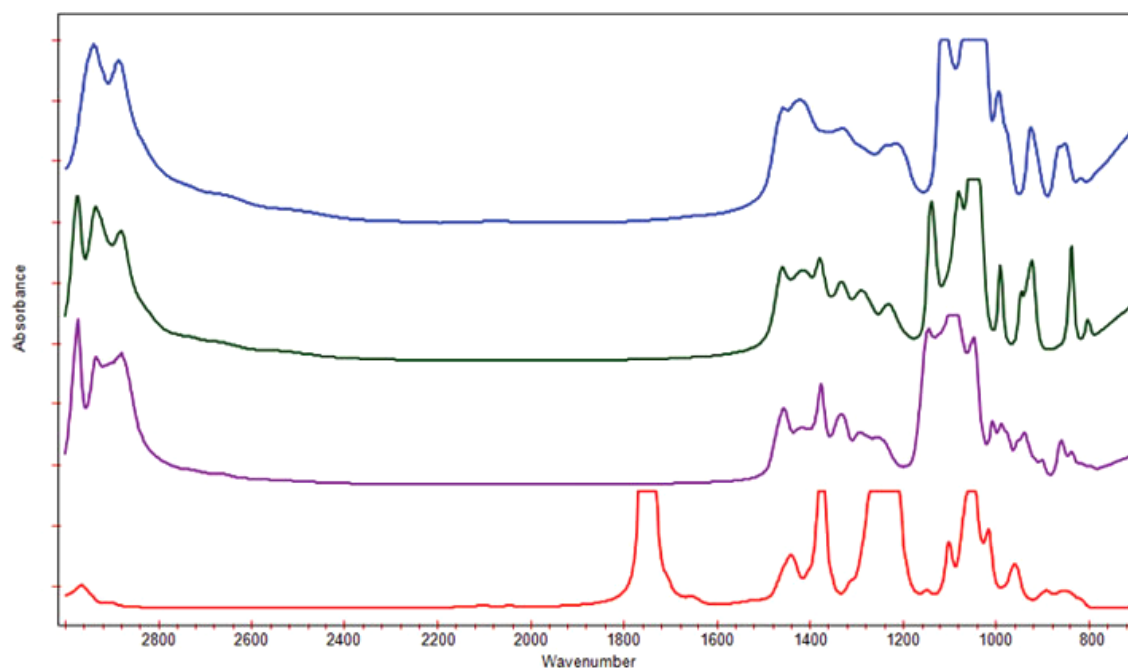


Figura 67: Spettro acquisiti tramite ATR: Blu = glicerolo, rosso = triacetina, verde=glicole propilenico, e viola = dipropilenglicole.

Poiché le bande spettrali caratteristiche delle impurezze e sono molto simili a quelle proprie dei materiali in esame, per la misurazione sono state selezionate regioni spettrali specifiche al fine di riuscire a discriminare le caratteristiche di uno o dell'altro. Ad esempio, nel caso del glicerolo, le regioni spettrali $875\text{-}905\text{cm}^{-1}$ e $1130\text{-}1200\text{cm}^{-1}$ sono efficaci per misurare le bande di assorbimento dovute alla presenza di impurità.

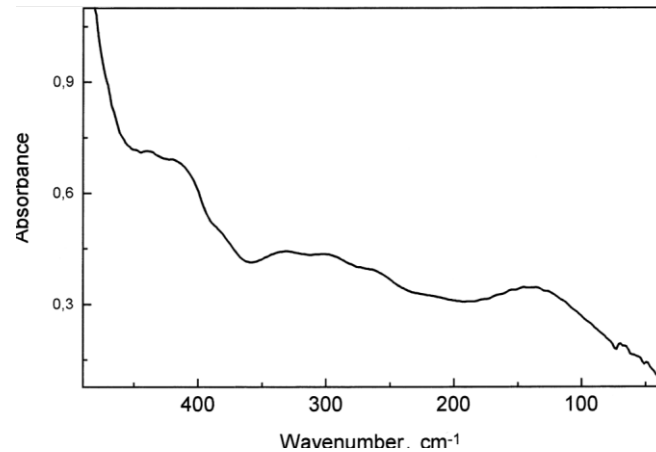


Figura 68: Spettro nel lontano IR di glicerolo a temperatura ambiente nella regione 50-500cm⁻¹

Gli spettri nel lontano infrarosso (25-500cm⁻¹) di due liquidi altamente viscosi, glicerolo e triacetina, sono stati studiati nel range di temperatura da 253K a 323K da Perova et al. ([50] 1998). La presenza di legami a idrogeno nel glicerolo porta ad una grande differenza nella forma dello spettro di queste due molecole. Lo spettro di glicerolo mostra bande molto ampie, che probabilmente sono dovute a un gran numero di bande vibrazionali con differenti intensità relative sovrapposte (quattro componenti in questo caso). Tuttavia, la frequenza dei massimi di queste bande per glicerolo e triacetina è diversa a causa del contributo vibrazionale diverso.

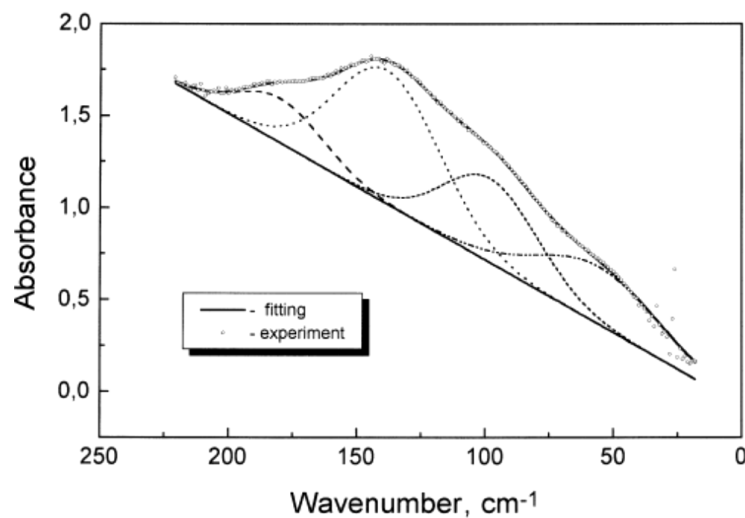


Figura 69: Fitting dello spettro nel lontano IR del Glicerolo attraverso 4 Gaussiane

Il glicerolo, dunque, come anche gli altri materiali di cui si è riportata l'analisi spettrale non dimostra bande di assorbimento in corrispondenza delle lunghezze d'onde utilizzate in

OCT (800-1310nm) dimostrandosi un buon materiale per l'inclusione dei campioni da analizzare otticamente.

Il glicerolo, inoltre, può agire come un agente di 'clearing' per l'impiego di tecnologia OCT. Uno studio condotto da Larina et al. ([17] 2009) dimostra che il glicerolo può migliorare significativamente il segnale in strati di tessuto profondi a causa della diminuzione della diffusione della luce in strati superiori e, quindi, ha un potenziale per diventare un utile strumento per la valorizzazione del contrasto ottico e la profondità di *imaging*. OCT, infatti, può essere utilizzato per la valutazione quantitativa risolta in profondità delle proprietà ottiche del tessuto, ma mano a mano che si procede in profondità in tessuti morfologicamente complessi, come i primi embrioni di topo, il segnale viene attenuato.

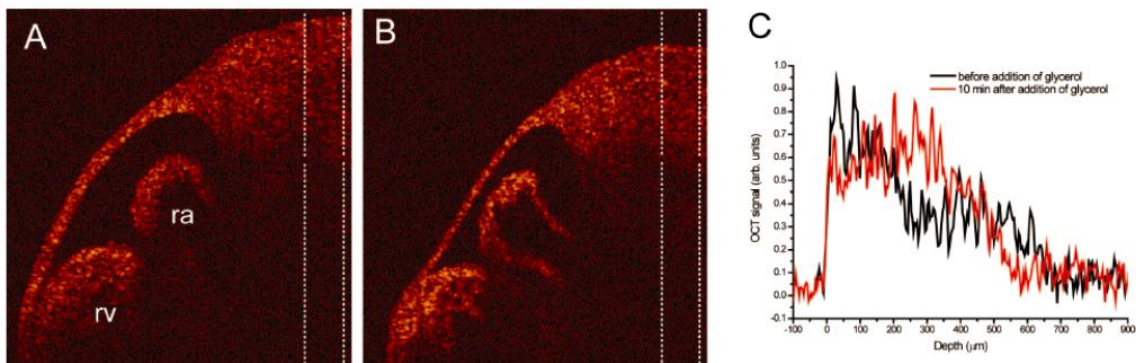


Figura 70: Immagini OCT *in vitro* (A-B) e segnali corrispondenti 1-D (C) su un embrione di topo 12.5dpc acquisite prima (A) e dopo 10 minuti (B) dell'aggiunta di glicerolo 50%. Il grafico (C) rappresenta l'intensità del segnale OCT in corrispondenza della stessa regione di tessuto, marcata nelle immagini con linee verticali (ra-atrio destro; rv-ventrиво destro).

L'agente di 'clearing' penetra nei tessuti diminuendo la diffusione della luce negli strati superiori e quindi eliminando la differenza di indice di rifrazione nell'interfaccia tessuto-fluido. Esso infatti aumenta l'indice di rifrazione del liquido interstiziale portandolo prossimo a quello delle fibre di collagene. Di conseguenza, un numero maggiore di fotoni può raggiungere gli strati tessutali più profondi, migliorando il segnale OCT.

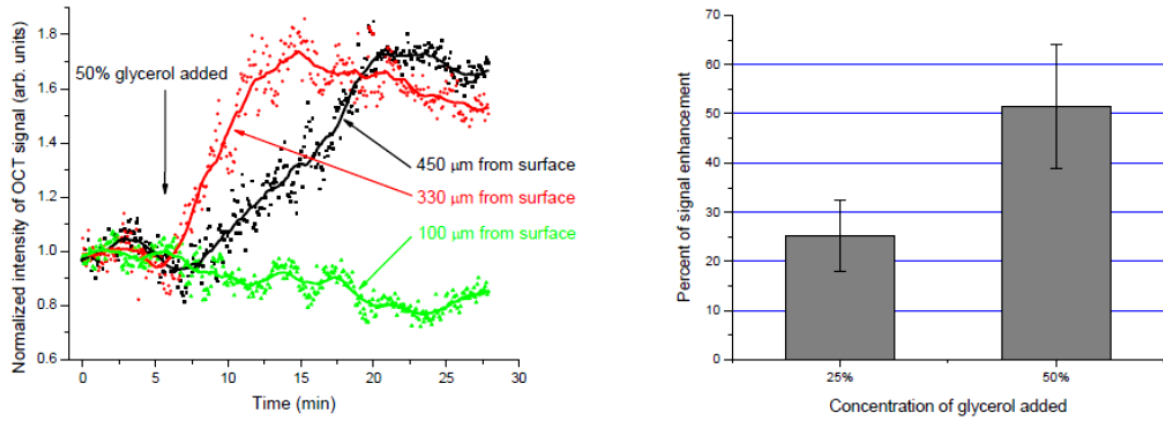


Figura 71: Intensità normalizzata del segnale OCT a diverse profondità in funzione del tempo durante l'aggiunta di Glicerolo (sinistra), e aumento del segnale OCT per differenti concentrazioni di Glicerolo (destra)

8 PROVE SPERIMENTALI

8.1 Preparazione dei campioni biologici di Zebrafish

Alcune osservazioni sullo sviluppo di zebrafish possono essere effettuate direttamente tramite il corion (membrana più esterna dell'uovo fecondato), tuttavia per la maggior parte delle procedure è meglio rimuoverlo. Dopo essersi sviluppati a 28.5°C, i pesci zebra si sviluppano normalmente fuori del loro corion. Il Corion può essere rimosso facilmente con una pinza tagliente facendo delicatamente uno strappo nel corion e girando a testa in giù questo in modo che l'embrione cada. Per rimuovere i corion da embrioni giovani (fino a 15 ore) è necessario prestare attenzione quando questo viene intagliato perché questi embrioni possono essere facilmente danneggiati.

Pretrattamento con una soluzione diluita di pronasi (enzima proteolitico, 2mg/ml in liquido embrionale, 1min, 28.5°C) il corion diventa fragile e facile da rimuovere. Embrioni anziani richiedono più tempo nella pronasi. Ci si deve assicurare di risciacquare gli embrioni trattati con pronasi a fondo almeno 3 o 4 volte per rimuovere tutto l'enzima.

Gli embrioni rimossi possono essere trasferiti da un contenitore all'altro aspirandoli delicatamente con una pipetta Pasteur o versandoli delicatamente. Piccole piastre di Petri (35mm di diametro) sono sufficienti per contenere fino a 25 embrioni durante i primi giorni di sviluppo. Gli embrioni possono essere portati al centro della piastra per la visualizzazione ruotando delicatamente il mezzo con un movimento circolare.

Per una visualizzazione con il più alto ingrandimento, con un microscopio composto, si devono montare gli embrioni tra due vetrini. Un semplice camera di osservazione monouso può essere fatto da due vetrini grandi (25x60 mm) distanziate con 2 vetrini piccole (22x22 mm).

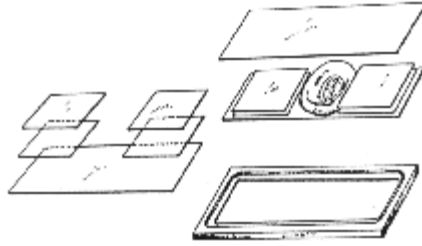


Figura 72: Camera per la visualizzazione

Per avere un più preciso orientamento degli embrioni di Zebrafish e per permettere loro di mantenere la loro posizione durante le osservazioni di lungo termine, è necessario che siano incorporati in agarosio o in altri materiali simili. Per preparare una soluzione di agarosio in *fishwater* si riscalda in un bagno di acqua bollente o in un forno a microonde la soluzione. La soluzione si mantiene liquida a 37-40 ° C, ma consolida rapidamente una volta raffreddata. Finché risulta liquida si inserisce l'embrione da analizzare in una goccia di soluzione posta sulla camera di osservazione e si aspetta che si consolidi.

Se si vuole un mezzo di montaggio meno rigido si può pensare di utilizzare agarosio a concentrazioni basse (0.1%) oppure la metilcellulosa (2-3%) che si rivela adatta specialmente per montare gli embrioni più giovani (minori di 10hpf).

La metilcellulosa si gonfia e ammorbidisce a causa dell'assorbimento della *fishwater*, ma infine l'embrione si staccherà dal gel in 15-30 minuti. In alternativa, gli embrioni possono stare immersi durante la notte in metilcellulosa. Tuttavia, se si esegue questa operazione, è necessario aggiungere gli antibiotici al mezzo (concentrazione finale di 2% penicillina/streptomicina in *fishwater*).

La trasparenza dello Zebrafish ben si presta ai sistemi ottici di analisi. Uno dei più grandi ostacoli per i ricercatori è stato quello di catturare e rappresentare in modo significativo i dati visivi. Molti aspetti riguardanti la biologia dello Zebrafish sono espressi meglio nelle immagini che in descrizioni scritte. Gli esempi includono la valutazione di fenotipi morfologici mutanti, profili di espressione di proteine o acidi nucleici, e studio degli stadi evolutivi.

Ottenere immagini di alta qualità dello Zebrafish significa riuscire a collezionare immagini statiche, bidimensionali di un campione dinamico, tridimensionale. Ulteriore difficoltà deriva dallo sviluppo di un embrione che si presenta sferico nelle fasi precoci del suo sviluppo (0 a 24hpf) per assumere successivamente una forma cilindrica propria delle larve e dei pesci adulti. Tradizionalmente, questo problema è stato affrontato sezionando il pesce fisicamente sia otticamente. Tuttavia la preparazione del campione è laboriosa e la profondità di campo può essere persa. Inoltre, da 72hpf le larve zebrafish gonfiano la loro vescica natatoria, per la galleggiabilità, fatto che aggiunge difficoltà nel manipolare e immobilizzare i campioni in un piano puramente sagittale o coronale. Tali questioni hanno ispirato molti metodi che tentano di porre rimedio a questi problemi e fornire un'immagine coerente e di alta qualità.

Petzold et al. ([27] 2010) hanno sviluppato un metodo semplice ed efficace per la tenuta e la fotografia di zebrafish allo stadio embrionale e larvale, che hanno definito *Specimen in a Corrected Optical Rotational Enclosure (SCORE) Imaging*. Il metodo sfrutta la natura cilindrica di un embrione e permette al campione di essere liberamente ruotato intorno al suo asse longitudinale. Questa rotazione, a sua volta, facilita l'*imaging* di piani sagittali, coronali o orizzontali variamente angolati. Per realizzare la rotazione, le larve vengono poste in un capillare polimerico o borosilicato, e sono immobilizzate con un liquido viscoso o di agarosio a basso punto di fusione o di metilcellulosa per le larve viventi o di glicerolo per embrioni fissati. Se gli embrioni fissati sono posti in una soluzione di montaggio permanente, è possibile che questi embrioni siano conservati indefinitamente. Il metodo SCORE utilizza un tubo capillare per consentire la rotazione attorno all'asse longitudinale e lo combina con una soluzione che abbia lo stesso indice di rifrazione del capillare per eliminare la distorsione della radiazione incidente. Questo processo permette di ottenere rapidamente immagini di qualità.

Al fine di garantire un'*imaging* accurato la larva di zebrafish deve prima essere anestetizzata. Per questa procedura, si è usato l'anestetico tricaina (MS-222) a normali concentrazioni. I pesci sono stati ulteriormente immobilizzati utilizzando una soluzione di metilcellulosa al 2% o agarosio a basso punto di fusione (LMP) in soluzione (circa 0,5% in *fishwater*). Se l'*imaging* doveva essere fatto su larve fissate, è stato utilizzata una soluzione di glicerolo 75% poiché la sua viscosità e indice di rifrazione sono simili a quelli del vetro borosilicato.

Dopo che i pesci sono stati immobilizzati, un adattatore capillare è stato posto in una micropipetta e utilizzato per porre un embrione in un capillare borosilicato di dimensione adeguata. Quando si utilizza agarosio LMP, il capillare viene poi lasciato riposare per 2 minuti, per permettere all'agarosio LMP di solidificare. Più pesci possono essere inseriti in un unico capillare, consentendo una maggiore varietà nella scelta del campione e per l'analisi dei dati. Si noti che il liquido interno deve quasi riempire il capillare intero per ridurre il rischio di mescolare soluzioni potenzialmente differenti.

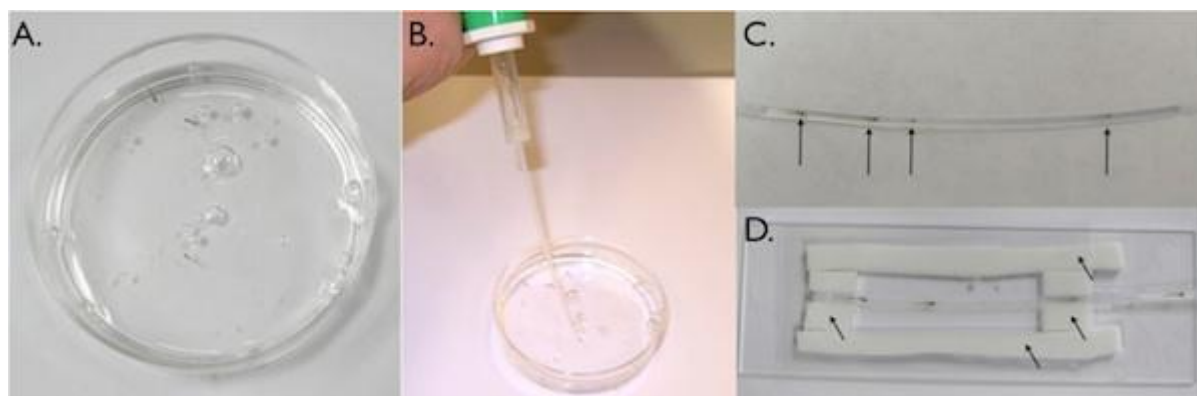


Figura 73: A) Zebrafish larvali anestetizzati inseriti in metilcellulosa (nella foto) o in soluzione di agarosio LMP prima di essere caricati nella custodia capillare. B) Una pompa pipetta capillare con adattatore viene utilizzato per facilitare il caricamento dello Zebrafish nell'alloggiamento capillare. C) Larve multiple (freccie) possono essere esposte in un unico capillare, consentendo lo screening rapido di mutanti. D) Una soluzione correttiva (acqua nella foto) è posta sopra il capillare per ridurre la distorsione. Delle barriere, frecce, sono posizionate sopra il vetrino per contenere le soluzione correttive e per fornire una superficie di attrito per facilità di rotazione.

Gli embrioni inizialmente hanno una forma a bulbo e si raddrizzano man mano che si sviluppano. Di conseguenza, la dimensione dell'apertura capillare dipende inversamente dall'età delle larve. Capillari con un diametro interno di 0,60mm vanno bene per embrioni di 48hpf o più. Per i più piccoli embrioni (0 - 48hpf), è stato usato un diametro interno di almeno 1,12 millimetri. Il diametro esterno del capillare non sembra essere un fattore che comprometta la forma dell'embrione, tuttavia la larghezza della parete del capillare potrebbe interferire otticamente con il segnale che si vuole misurare. Pertanto si raccomanda di usare capillari con pareti sottili quando possibile.

Il propilene etilene fluorato è un elemento della famiglia dei fluorocarburi ed è un copolimero di tetrafluoroetilene e esafluoropropilene fusibile e dunque processabile nei comuni estrusori e nelle attrezzature di stampaggio a iniezione. Si trova in commercio sottoforma di granuli e in dispersione per spruzzatura e verniciatura a immersione. ([52])

SOLUTION	REFRACTIVE INDEX	COMMENTS ABOUT USE
Water (surrounding fluid)	1.34	Used to cover tubing. Matched for tubing
FEP	1.338	Recommended for live embryos
PFA	1.35	Works well for live embryos
PTFE	1.35-1.38	Not recommended

Tabella 13: Indici di rifrazione dei tubi polimerici impiegati [27]

L'idea di mettere un campione in un tubo capillare non è unica, con i primi esperimenti alla fine del 1920. Tale metodo permette un *imaging* a 360 gradi del campione. Tuttavia, questo approccio se privo di modifiche spesso comporta una distorsione del fascio luminoso incedente, soprattutto in prossimità della periferia tanto da renderlo inidoneo per l'analisi dei dati o la pubblicazione. Utilizzando i principi dell'ottica come guida, la principale causa di distorsione è stata determinata essere la differenza nell'indice di rifrazione tra la superficie curva esterna del capillare e l'aria circostante. Normalizzare l'indice di rifrazione dell'alloggiamento capillare al liquido che circonda il contenitore e il pesce ha notevolmente ridotto questo effetto. Per realizzare una quasi completa correzione dell'indice di rifrazione, si è testato una varietà di tubi polimerici con un indice di rifrazione simile a quella dell'acqua ($n = 1,33$). Si sono valutati questi materiali a base di quattro criteri: 1) distorsioni presenti, 2) auto-fluorescenza a lunghezze d'onda comunemente impiegate in microscopia a fluorescenza 3) biocompatibilità e 4) facilità di utilizzo.

Per determinare l'alloggiamento migliore di *imaging* per zebrafish larvale, si è testato un tubo in etilene propilene fluorato (FEP; $n = 1,338$), tubi perfluoroalcoosi (PFA, $n = 1,34$) e un tubo in politetrafluoroetilene (PTFE, $n = 1,35$). Mentre questi tubi si comportano in maniera otticamente simile tendono a differenziarsi pr quanto riguarda la loro capacità di emettere fluorescenza. Si è notato che il tubo FEP produce poco auto-fluorescenza sia nei canali per la proteina verde fluorescente o la proteina rosso fluorescente. Al contrario, PFA e PTFE mostrano un alto livello di autofluorescenza specialmente con linee transgeniche di Zebrafish. Oltre al tubo polimerico, si è provato anche un comune capillare di vetro borosilicato ($n = 1,48$) impiegato in laboratorio. Per embrioni vivi, il capillare di vetro è stato otticamente abbinato ad una soluzione circostante di 50%

di saccarosio. Questa combinazione ha fornito un'immagine chiara e nitida ma ha anche prodotto un'ombra scura in corrispondenza del bordo del capillare. In applicazioni fluorescenti non c'era, tuttavia, auto-fluorescenza. In generale, quando si fotografa un embrione vivo, si consiglia l'uso di tubi FEP a causa del suo basso costo, la mancanza di auto-fluorescenza e chiaro *imaging* ottico.

Si sono testati una varietà di tubi in plastica, per meglio adattare l'indice di rifrazione del tubo a quello dell'acqua per la massima facilità d'uso e chiarezza dell'immagine. Si è determinato che il tubo in etilene propilene fluorato (FEP) è ottimale per l'*imaging* ottico che preveda l'impiego di soluzioni acquose di agarosio LMP o di metilcellulosa come supporti di immobilizzazione.

L'*imaging* SCORE è anche un ottimo metodo di *imaging* per gli embrioni fissati. Una soluzione di 75% glicerolo viene comunemente utilizzata per embrioni fissati ed è una soluzione adatta all'*imaging* ottico SCORE tramite capillari in vetro borosilicato. L'uso del metodo SCORE su campioni fissati è ideale per ottenere immagini sia sagittali (Figura 4B e 74C) e sia su piani coronali (Figura 74D) o in piani alternativi. L'uso del metodo SCORE consente anche una rotazione completa di un singolo embrione per catturare immagini con una videocamera collegata al microscopio. Se necessario, un preciso angolo di rotazione può essere raggiunto con l'uso di un attrezzo meccanico di garantirne la riproducibilità.

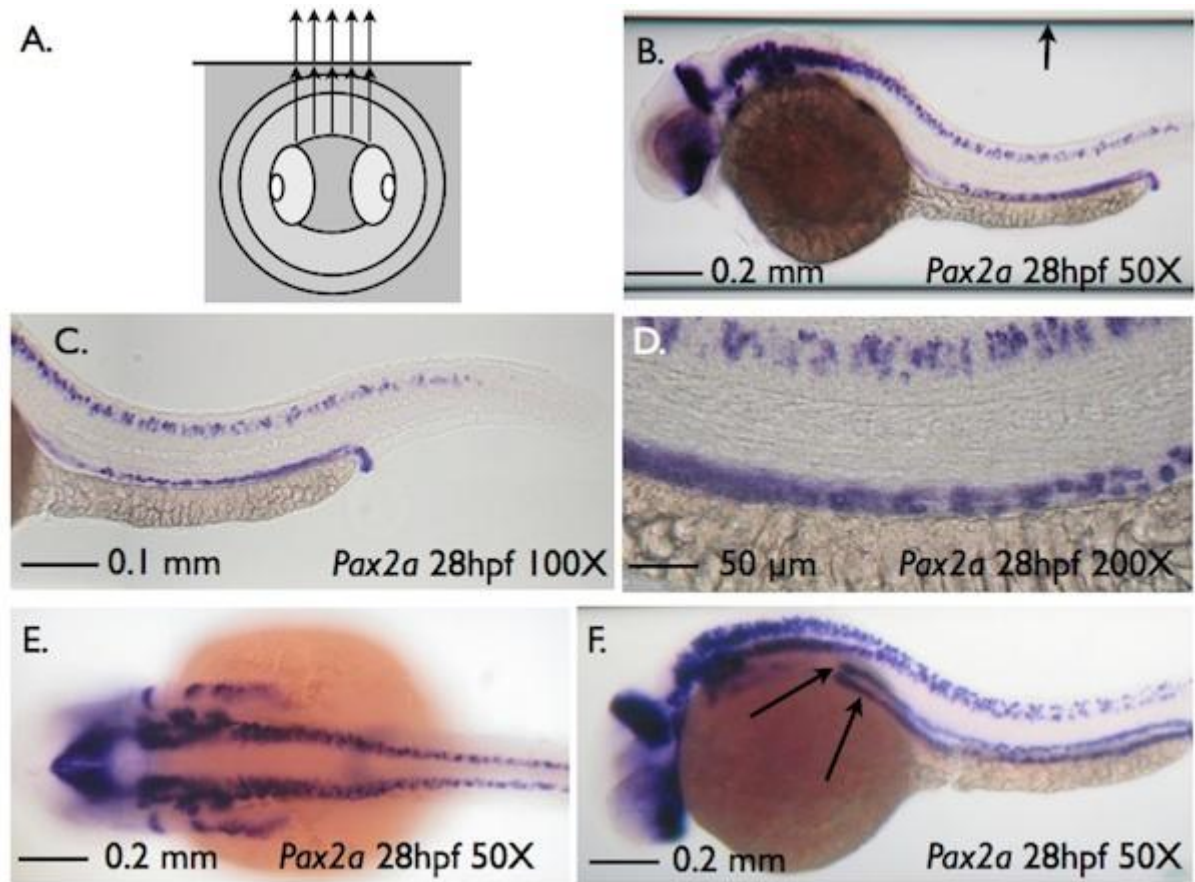


Figura 74: *Imaging* di un intero embrione fisso in capillare di vetro con soluzione al 75% glicerolo. A) Disegno raffigurante l'uso del glicerolo sia all'interno che all'esterno del tubo di vetro per produrre un'immagine non distorta di un embrione fisso. B) Immagine sagittale di embrione con colorazione con ingrandimento 50X che non mostra alcuna distorsione. Notare i bordi del capillare che possono essere facilmente tagliati per la pubblicazione. Immagine sagittale di embrione con ingrandimento 100X (C) o 200X (D) che non mostra alcuna distorsione. E) Immagine coronale di embrione con ingrandimento 50X. F) Immagine angolata con ingrandimento 50X. La rotazione è leggermente inclinata ($\sim 30^\circ$) per una visualizzazione più dettagliata del tubulo renale (freccia).

Il metodo SCORE è anche un sistema semplice ed efficace per la creazione di immagini ad alta qualità a grande campo che utilizzano microscopi standard con ingrandimenti 50X e 100X. Con la facilità e rapidità di preparazione dei campioni, questa procedura, per esempio, consente all'utente di ottenere rapidamente proiezioni di massima intensità nei piani principali utilizzando un singolo Zebrafish e un Microscopio. Il limite maggiore alla distribuzione del metodo SCORE di *imaging* per l'*imaging* dell'intero animale a ingrandimento maggiore di 100X è la distanza di lavoro a disposizione della maggior parte degli obiettivi comuni. L'applicazione del metodo SCORE a maggiore ingrandimento è in gran parte limitato, quindi, da due questioni - la distorsione per via aerea tra i coprioggetto dei campioni e la lente, e la moderata distanza di lavoro di lenti ottiche tradizionali. Una

possibile opzione potrebbe essere l'uso di soluzioni compatibili con le lenti ottiche per l'*imaging* in immersione, come quelle che lavorano con glicerolo e quelle che funzionano con acqua. La limitazione principale sarà lo spessore del campione in relazione alla distanza di lavoro dell'obiettivo.

L'*imaging* di un organismo in via di sviluppo per molte ore o pochi giorni richiede un'attenta ottimizzazione della tecnica di montaggio. L'immersione di un campione orientato verticalmente in una soluzione acquosa facilita la rotazione del campione fragile senza comportarne deformazioni e offre viste non ostruite da ogni angolazioni.

Il montaggio ottimale per l' *imaging* di processi di sviluppo dovrebbe fornire spazio sufficiente per la crescita del campione, mantenendolo in una posizione fissa.

Per *imaging in vivo* i campioni sono comunemente incorporati in un cilindro di agarosio a basso punto di fusione. L'indice di rifrazione dell'Agarosio trasparente corrisponde all'indice di rifrazione di acqua (1,33) e dei tessuti biologici, e concentrazioni di 1,0-1,5% forniscono sufficiente stabilità meccanica per spostare il campione in modo riproducibile.

Tuttavia, tale montaggio in Agarosio è adatto solo per i campioni che non alterano la loro forma o la loro dimensione durante l'esperimento, come ad esempio gli embrioni di *Drosophila*.

L'embrione trasparente di zebrafish è l'ideale per l'*imaging* dello sviluppo dei vertebrati. Poiché la lunghezza di un embrione aumenta di quattro volte entro 3 giorni, l'*imaging* in continuo degli embrioni montati in un mezzo rigido, come Agarosio, comporta una limitazione della crescita e gravi difetti di sviluppo (Fig. 75A, A).

Kaufmann et al. ([51], 2012) hanno valutato lo sviluppo di embrioni di zebrafish in diversi mezzi di montaggio e testato la loro idoneità per SPIM (Microscopia ad illuminazione di piano selettivo) fornendo così protocolli di montaggio per i primi giorni di sviluppo di zebrafish.

Come si è riscontrato tramite analisi con metodo SCORE il montaggio del campione in basse concentrazioni di agarosio o di metilcellulosa in tubi in propilene etilene fluorato (FEP), con adeguato indice di rifrazione, garantisce sia l'immobilità che la crescita dell'embrione come anche una qualità ottimale dell'immagine da tutti i lati.

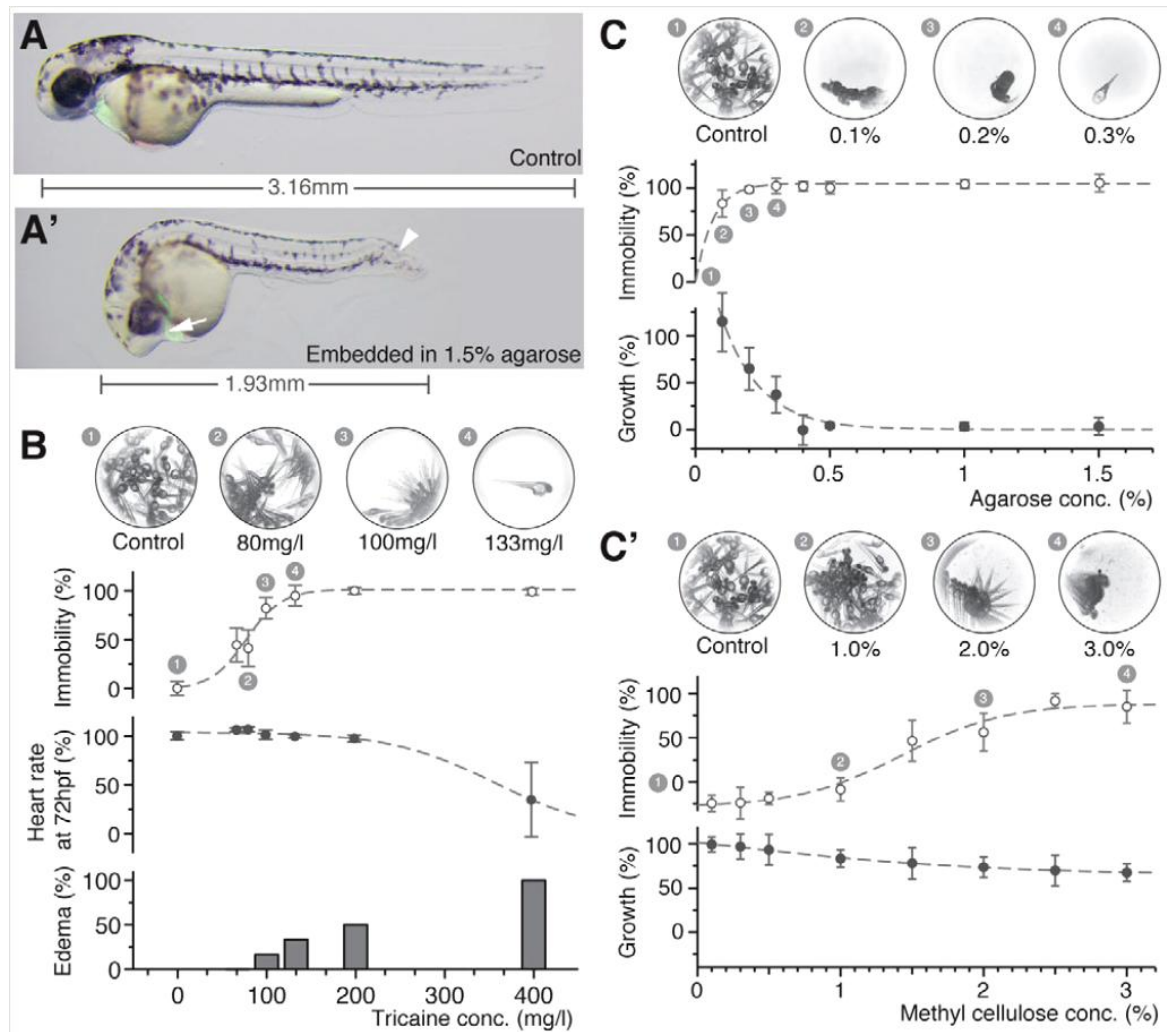


Figura 75: Influenza di diversi mezzi di montaggio sulla crescita e l'immobilità. (A, A') Embrione di Zebrafish incluso in 1,5% di agarosio a 24-48hpf presenta una breve coda storta (punta di freccia) e la morfologia del cuore è disturbata (freccia). (B) Immobilità, frequenza cardiaca ed edema dopo l'incubazione a 24-72hpf in differenti concentrazioni di Tricaina. (C) L'immobilità e la crescita in diverse concentrazioni di agarosio dopo inclusione degli embrioni a 24-72hpf. Con 0,1% di agarosio, sono stati raggiunti sia l'immobilità e una normale crescita. (C') L'immobilità e la crescita in diverse concentrazioni di metilcellulosa dopo l'inclusione di embrioni a 24-72hpf. Con Metilcellulosa a 2,5-3,0%, sono stati soddisfacenti sia l'immobilità che la crescita.

I tubi FEP impiegati nell'esperimento avevano indice di rifrazione 1.338, diametro interno 0.8 mm e diametro esterno di 1.6 mm.

Gli embrioni sono stati montati in differenti concentrazioni di Agarosio, Metilcellulosa e Tricaina a 24 hpf e il loro sviluppo è stato monitorato fino alle 72 hpf. I criteri utilizzati per confrontare i tre mezzi sono stati la capacità di garantire la crescita e l'immobilità dei campioni per un *imaging* ripetibile.

Gli embrioni di zebrafish sono stati esaminati in soluzioni con 0-1.5% di Agarosio e con 0-3% di Metilcellulosa dalle 24 hpf alle 72 hpf per determinare la concentrazione del

materiale in grado di garantire da un lato la possibilità di crescita al campione, dall'altro assicurarne l'immobilità. Tali mezzi di montaggio sono già stati utilizzati in varie tecniche di microscopia (Renaud et al., 2011), e sono disponibili nella maggior parte dei laboratori, non espongono il campione a calore o a stress meccanico nella fase di montaggio, e il loro indice di rifrazione è paragonabile a quella dell'acqua. L'Agarosio permette la crescita libera degli embrioni ad una concentrazione a partire da 0.1% (Fig. 75 C) con una immobilità dell' 80%. Concentrazioni di Agarosio superiori allo 0.4% inibiscono completamente la crescita dell'embrione.

Questi risultati indicano che le concentrazioni di Agarosio comunemente impiegate (1-4%) sono non fisiologiche. Nel caso della Metilcellulosa si sono ottenuti valori di immobilità pari al 85% e di crescita del 68% ad una concentrazione del 3%.

Tuttavia, a differenza dell' Agarosio solido all'1.5%, quello viscoso allo 0.1% e la Metilcellulosa al 3.0% richiedono un supporto per contenere il campione.

In microscopia convenzionale, i vetrini forniscono una piattaforma per l' *imaging* da un singolo lato. Per la microscopia a foglio di luce è necessario un supporto per il montaggio verticale e l'*imaging* da più lati. I tubi FEP sono adatti per l'*imaging* di campioni acquosi da tutti i lati a causa del loro indice di rifrazione di 1.338 (similare all'acqua).

Gli embrioni montati in un tubo riempito con lo 0,1% di Agarosio sono cresciuti l'8% in meno dei loro simili liberi, forse a causa di una fornitura ridotta di ossigeno o la mancanza di movimento. Quando è stato utilizzato Metilcellulosa al 3% come mezzo di montaggio, il tubo di supporto non aveva alcun effetto significativo sulla crescita. La morfologia degli embrioni suggerisce che sviluppo è stato ritardato, ma non altrimenti compromesso. Gli embrioni sono stati recuperati e non si è osservata alcuna differenza nel tasso di sopravvivenza. Si può concludere che i tubi FEP sono supporti fisiologici per mezzi di montaggio non rigidi.

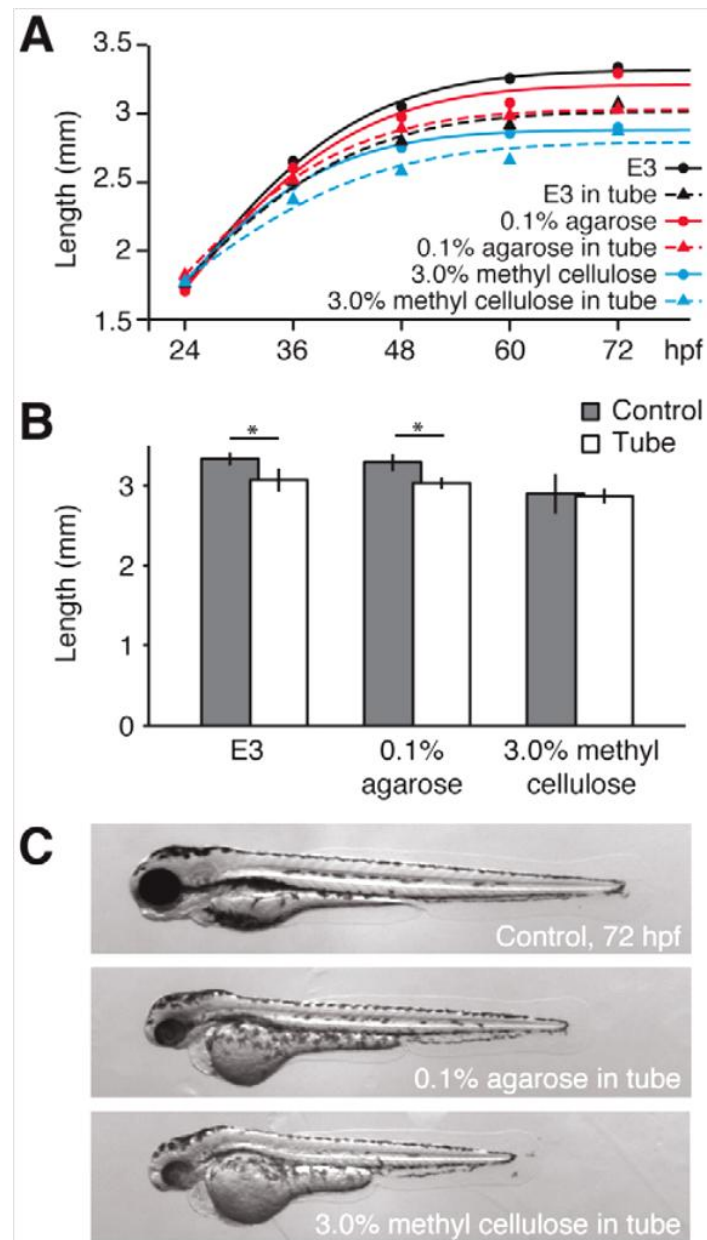


Figura 76: Influenza del tubo contenitore sulla crescita. (A) Cinetica di crescita embrionale durante i 2 giorni in E3, 0.1% di agarosio, 3,0% metilcellulosa, con e senza tubi FEP. (B, C) Lunghezza (B) e morfologia (C) di embrioni di zebrafish a 72hpf da A

Per quantificare le prestazioni ottiche dei tubi FEP, sono state incorporate perle fluorescenti all'interno dell'Agarosio all'1,5% in un tubo e ripreso in SPIM. Per confronto, le perle sono state riprese anche in un capillare di vetro e senza un supporto. Per ogni condizione i profili di intensità delle perle sono stati tracciati. Essi hanno mostrato una piccola varianza e sono stati mediati per quantificare le aberrazioni causate dal materiale circostante. FEP non distorce l'immagine della perla rispetto alla condizione senza supporto, mentre un capillare di vetro provoca gravi aberrazioni.

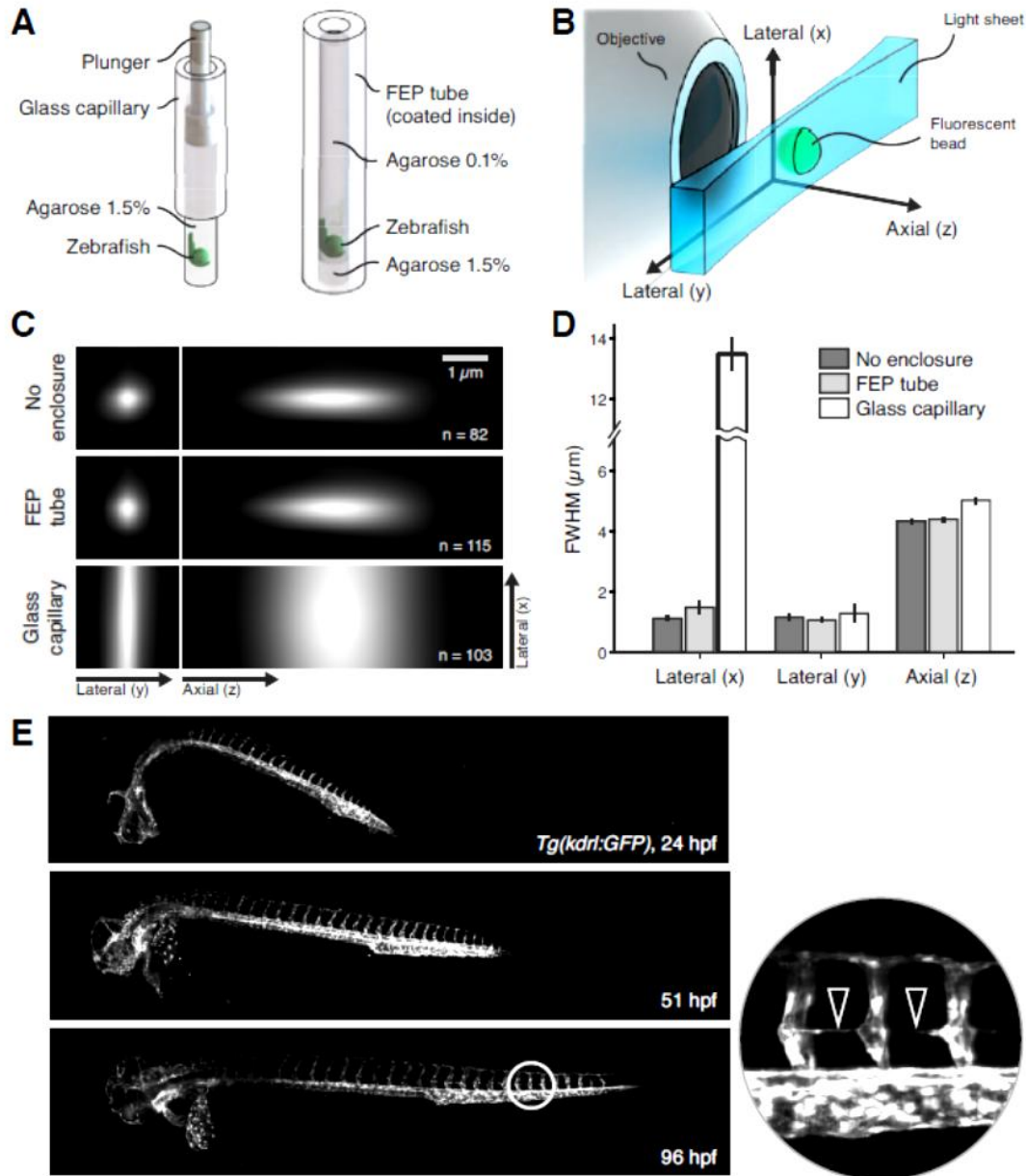


Figura 77: Qualità ottica del montaggio in FEP: (A) Schemi di montaggio in capillare di vetro (sinistra) e in un tubo FEP (destra); (B) Principi di SPIM e direzione degli assi per l'analisi ottica della qualità; (C) Proiezioni delle immagini mediate delle biglie (n, numero delle biglie) in agarosio senza supporto, in un tubo FEP e in un capillare di vetro; (D) FWHM; (E) Sviluppo dell'embrione di Zebrafish in agarosio 0.1% in tubo FEP durante la SPIM *time-lapse*. Si noti come le immagini riescano a risolvere le strutture anche più particolari, come le estensioni delle cellule che formano le strutture della paracorda (freccette)


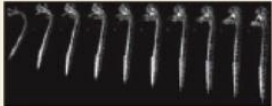
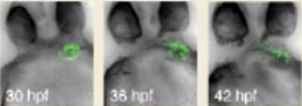
	snapshot	time lapse	cardiac time lapse
time window	< 2 hours	several days	< 24 hours
growth	-	+++	++
immobility	+++	+	++
optical quality	+++	+++	+++
embedding	1.5% agarose (optionally in FEP tube)	FEP tube coated with 3% methyl cellulose and filled with 0.1% agarose	FEP tube filled with 3% methyl cellulose
Tricaine	200 mg/l	200 mg/l	100 mg/l
advantages	<ul style="list-style-type: none"> high spatial confinement fiducial markers 	<ul style="list-style-type: none"> complete growth 	<ul style="list-style-type: none"> low drug exposure
limitations	<ul style="list-style-type: none"> no growth 	<ul style="list-style-type: none"> Tricaine required over long time periods 	<ul style="list-style-type: none"> growth restricted
potential applications	<ul style="list-style-type: none"> general SPIM imaging bead-based multi-view registration 	<ul style="list-style-type: none"> long time lapse recordings 	<ul style="list-style-type: none"> valve development cardiac looping
	 <p>3D-reconstructed vasculature 48 hpf, <i>Tg(kdrl:GFP)</i></p>	 <p>24 hpf → 96 hpf <i>Tg(kdrl:GFP)</i></p>	 <p>30 hpf 36 hpf 42 hpf cardiac looping <i>Tg(myh7:GFP)</i>, <i>tnnt2</i> morpholino</p>

Figura 78: Protocolli di montaggio per microscopia a foglio di luce [51]

8.2 Setup sperimentale e materiali impiegati

8.2.1 Fase 1: Materiali

Il lavoro condotto in laboratorio durante il periodo di tesi aveva lo scopo di analizzare dal punto di vista ottico tre diversi mezzi di montaggio per embrioni di Zebrafish (forniti dai laboratori di Biologia dell'Università di Padova).

I tre diversi mezzi erano:

- Agarosio Low Melting all'1% in fishwater;
- Metilcellulosa al 2% in fishwater;
- Glicerolo 100%.

I tre mezzi sono stati montati in vetrini secondo una procedura che verrà successivamente spiegata e in cuvette di plastica, per poterne acquisire lo spettro di assorbimento.

Comprendere infatti le caratteristiche ottiche di questi mezzi è fondamentale per la successiva analisi ottica di embrioni di Zebrafish montati sugli stessi mezzi. La fase successiva prevede infatti l'analisi ottica degli embrioni in vitro di Zebrafish montati negli

stessi mezzi, a 3dpf e a 7dpf. Gli embrioni conservati in alcool etilico (100%) sono stati reidratati attraverso vari step, che prevedevano la sostituzione progressiva di una certa percentuale di alcool etilico (25%, 50%, 75%, 100%) con fishwater. Successivamente sono stati montati sui vetrini con i tre mezzi.



Figura 79: Materiali a disposizione

Per analizzare i tre mezzi si è ricavata una ‘celletta di contenimento’ con 10 strati di scotch su un vetrino porta-oggetti dello spessore di 1mm, si sono iniettati i mezzi tramite una pipetta nella celletta e si è ricoperto il tutto con un vetrino coprioggetto dello spessore di circa 150 μ m.

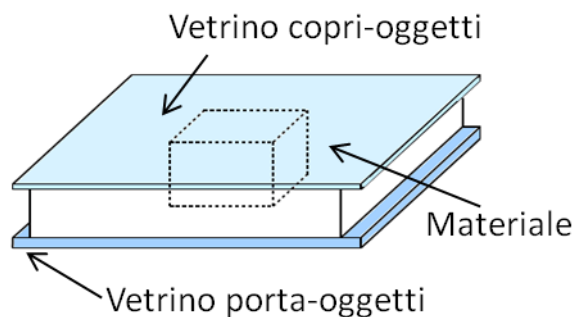


Figura 80: Schema di preparazione dei vetrini



Figura 81: Cuvette con i mezzi

Per le prove fatte in Cuvette di plastica si sono semplicemente iniettati i tre mezzi nelle cuvette di plastica a sezione quadrata con lato esterno di 8.5mm e interno di 6.5mm (spessore del campione pari a 6.5mm).

I vetrini contenenti embrioni di Zebrafish a 3dpf sono stati montati allo stesso modo ma con 3strati di scotch a formare la celletta di contenimento e 7 strati di scotch per quelli di 7dpf. Dall'analisi al microscopio dei mezzi si è riscontrato come, però, lo spessore debba essere maggiore rispetto ai 3 o 7 strati di scotch, in quanto si è verificata la rottura del

tuorlo in alcuni casi (vedi Fig. 85). Inoltre, nel momento in cui si è cercato di condurre un'analisi spettrale su tali vetrini il calore della lampada ha causato la liquefazione dei mezzi e ciò non ha permesso uno studio attendibile dei vetrini con Zebrafish.



Figura 82: Immagini al microscopio ottico di Zebrafish a 7dpf montato su vetrino con glicerolo (a sinistra 10X, a destra 5X)

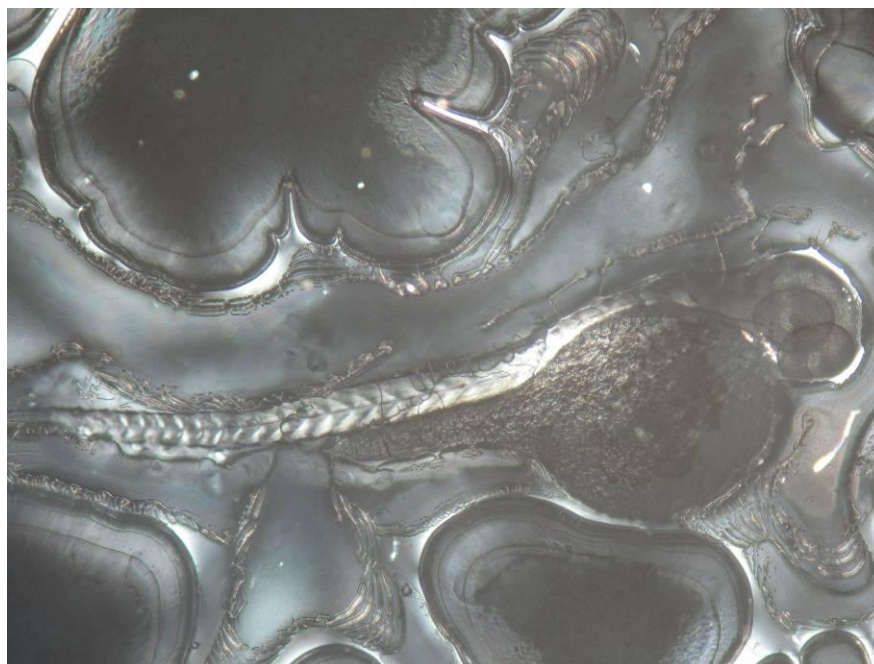


Figura 83: Immagini al microscopio ottico di Zebrafish a 3dpf su vetrino con Metilcellulosa



Figura 84: Immagine di Zebrafish a 3dpf in Agarosio (si nota la rottura del tuorlo a causa delle ridotte dimensioni dei supporti)

8.2.2 Fase 2: Setup sperimentale

Il setup sperimentale impiegato per fare l'analisi ottica dei mezzi in questione ha subito varie modifiche nel corso dei lavori al fine di ottenere un setup stabile che potesse garantire la riproducibilità dei dati ottenuti.

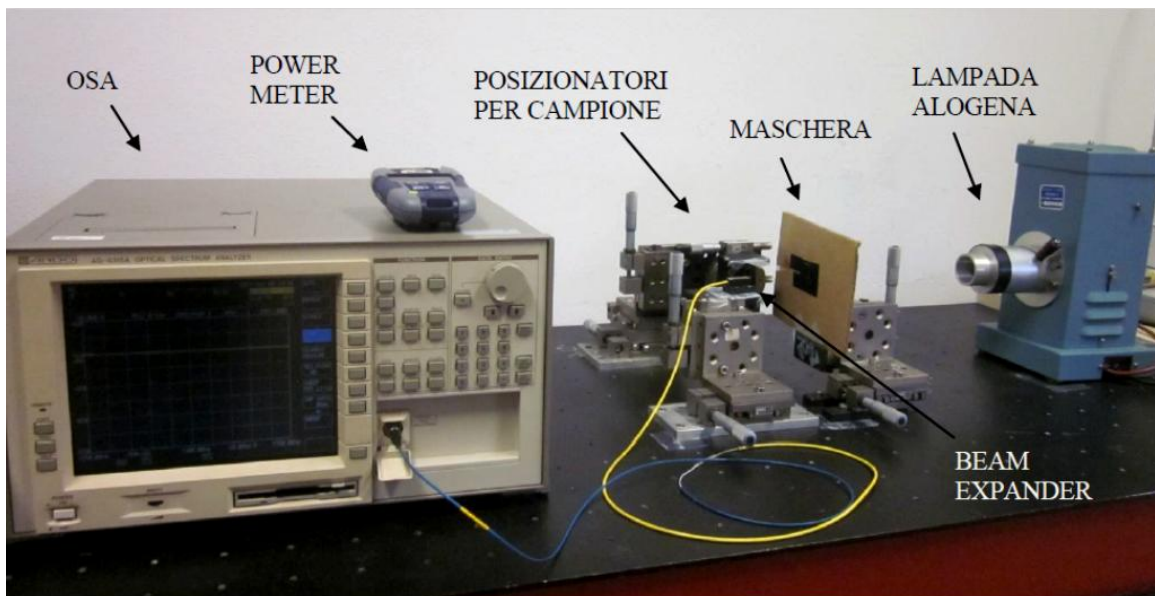
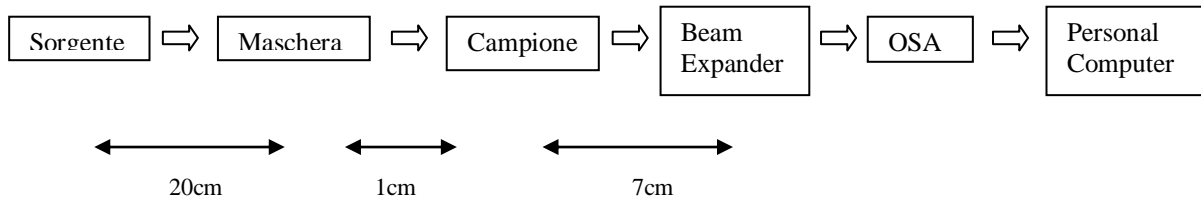


Figura 85: Setup sperimentale

La sorgente impiegata è una lampada alogena (10.5A, 24V) caratterizzata da ampia larghezza di banda. La lampada alogena è una particolare lampada ad incandescenza, ma ci sono alcune fondamentali caratteristiche che la differenziano da quelle comuni. Al gas contenuto nel bulbo viene aggiunto iodio, kripton e, a volte, xeno per permettere il riscaldamento del filamento fino a oltre 3000 K, in modo da aumentare l'efficienza luminosa.

Nelle alogene il tungsteno che evapora a causa della temperatura elevata reagisce con il gas formando un alogenuro di tungsteno. Successivamente il composto, entrando in contatto con il filamento incandescente si decompone e ri-deposita il tungsteno sul filamento stesso

realizzando un ciclo, il ciclo alogeno. Poiché il bulbo, per permettere la reazione chimica tra iodio e tungsteno, deve avere una temperatura non inferiore a 250°C , viene utilizzato un vetro speciale, il quarzo, ad alta resistenza.

Si è scelto questo tipo di sorgente (potenza di uscita di circa 110nW) perché si voleva analizzare il comportamento ottico del mezzo in un ampio range di lunghezze d'onda ($800\text{-}1700\text{nm}$) in modo tale da valutare eventuali bande di assorbimento del mezzo in esame. Inoltre, essendo l'analisi OCT di embrioni di Zebrafish lo scopo finale del progetto, è noto che OCT impiega sorgenti caratterizzate da ampia larghezza di banda.

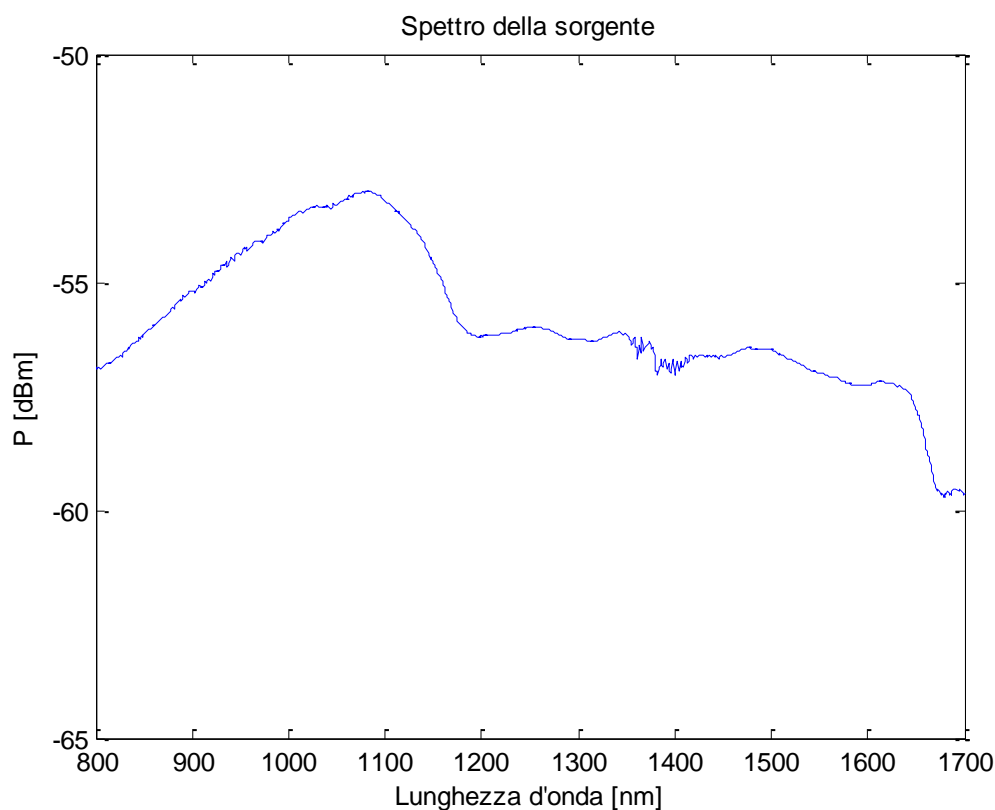
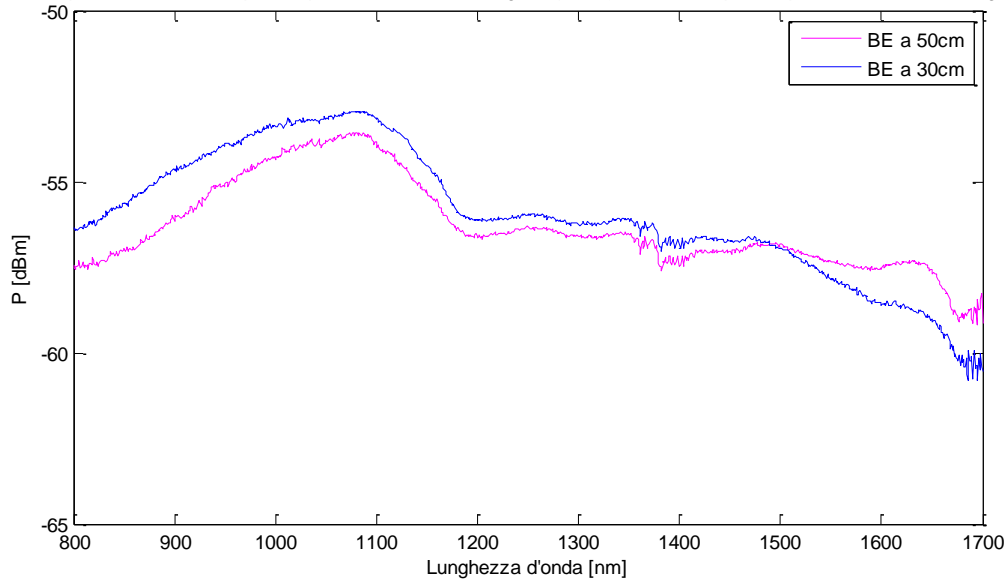


Figura 86: Spettro della sorgente

La distanza tra sorgente e campione è stata variata da un massimo di 50cm ad un minimo di 30cm per ottimizzare la potenza in uscita dalla sorgente incidente sul campione. Tuttavia tale distanza non poteva essere ulteriormente ridotta a causa degli inconvenienti dati dal calore prodotto dalla lampada alogena.

Spettro acquisito con Beam Expander posto a 50cm dalla sorgente(rosso), e Beam Expander posto a 30cm dalla sorgente (blu)



Differenza di potenza tra Beam Expander posto a 50cm dalla sorgente e Beam Expander posto a 40cm dalla sorgente

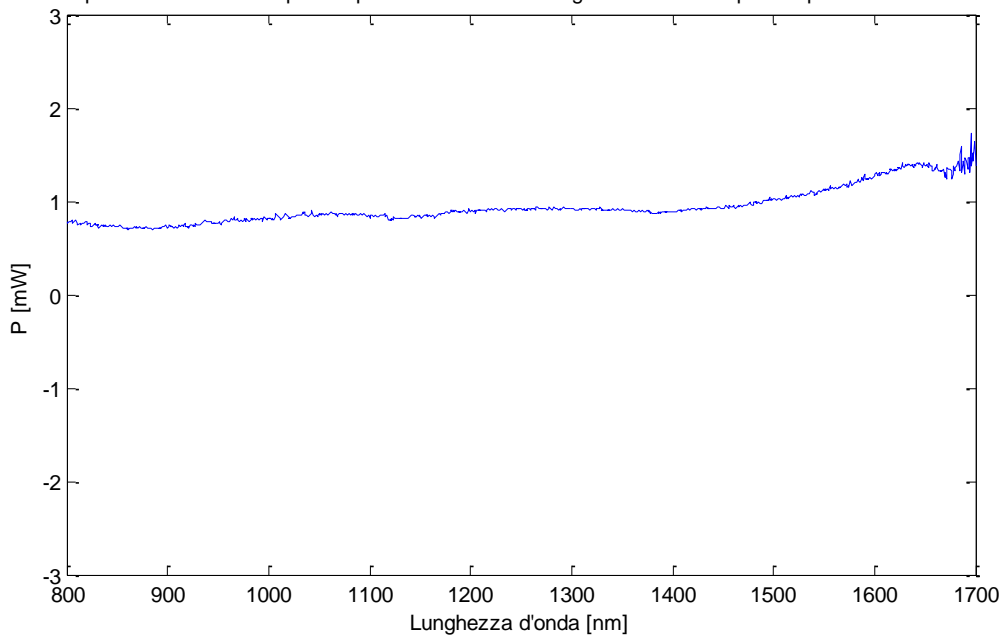


Figura 87: Confronto tra due setup; variazione della posizione del Beam Expander in ricezione

Sono stati messi a punto alcuni accorgimenti per schermare opportunamente il fascio uscente dalla lampada; come si nota in Figura 89 è stata posta davanti al campione da analizzare una maschera con una apertura di circa 12mm^2 . Sono state fatte alcune prove anche isolando l'intero setup sperimentale per verificare se l'ambiente circostante potesse in qualche modo interferire, ma non sono state trovate differenze significative e quindi si è scelto di procedere senza la schermatura dell'intero setup per garantire una maggiore facilità di manipolazione dei posizionatori.



Figura 88: Vetrino posizionato davanti alla maschera

I vetrini o le cuvette da analizzare sono stati posti su posizionatori che permettessero la traslazione lungo tutti e tre gli assi e garantissero anche la rotazione del campione rispetto all'asse verticale (Figura 90).

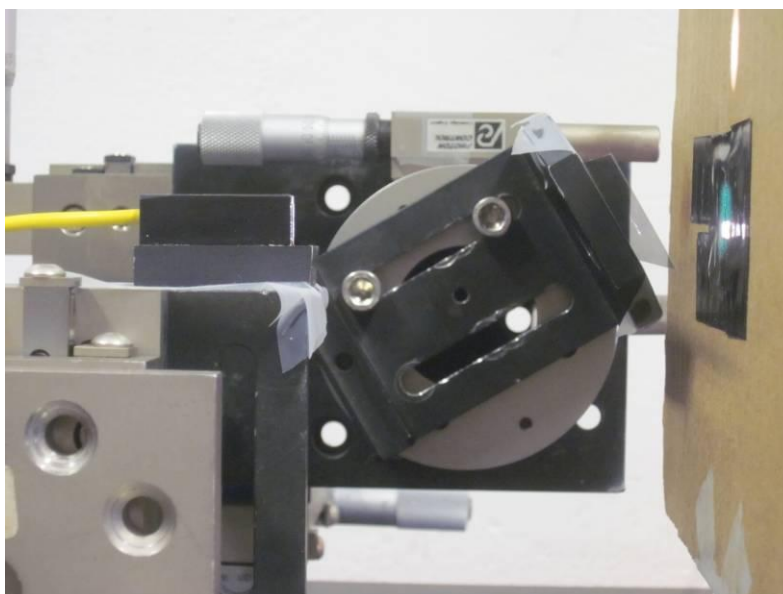


Figura 89: Posizionatore che permette la rotazione del campione

Un *Beam Expander* con uscita in fibra ottica (posto a circa 7cm dal campione), allineato in maniera ottimale con la sorgente, riceveva il fascio luminoso e collegato all'Analizzatore Ottico di Spettro (OSA) permetteva l'acquisizione degli spettri. Per determinare

l'allineamento ottimale il Beam Expander veniva collegato ad un Power Meter, e si modificava la sua posizione fino a giungere al valore massimo di potenza ricevuta letto dal Power Meter.

L'OSA (*Optical Specrum Analyzer* o spettrometro) è uno strumento per la misura della potenza ottica in funzione della lunghezza d'onda (λ) che sfrutta uno o più reticoli di diffrazione per scomporre ed analizzare lo spettro di un segnale ottico. La luce incidente è convogliata sul reticolo di diffrazione mediante uno specchio concavo. Il campo diffratto dal reticolo è focalizzato su una fessura d'uscita, al di là della quale è posto il fotorivelatore. Il reticolo di diffrazione può essere rotato così da cambiare l'angolo di incidenza e quindi quello di riflessione. In questa maniera si riesce a convogliare sulla fessura una particolare componente spettrale. Muovendo con continuità il reticolo, si riesce a far "vedere" al fotorivelatore lo spettro del segnale in analisi ([44]). I parametri caratteristici di uno spettrometro sono la risoluzione e la *video bandwidth*. La risoluzione è determinata dal reticolo usato, dalla qualità delle altre componenti e dalla larghezza della fessura d'uscita. Infatti, minore è questa larghezza, minore è la porzione di spettro che raggiunge il fotorivelatore e quindi maggiore è la risoluzione. Tuttavia, minore è la fessura, minore è la potenza che passa. Al contrario, allargando la fessura si aumenta la potenza (e quindi il rapporto segnale/rumore) a scapito, però, della risoluzione. La *video bandwidth* descrive la velocità con cui si muove il reticolo. Quando questa è bassa, il reticolo si muove lentamente, e quindi il fotorivelatore può misurare più a lungo la stessa porzione di spettro, migliorando il rapporto/segnale rumore. La misura è però lenta. Al contrario, quando la *video bandwidth* è alta, la misura è veloce, ma il rapporto segnale/rumore è inferiore (a parità di potenza di ingresso). L'OSA utilizzato è un ANDOAQ-6315A con le seguenti caratteristiche tecniche:

Max input power:	+ 20dBm
Optical Input:	~ 350 : 1750nm
Minimum λ resolution:	0.05nm
Maximun λ resolution:	10.0nm

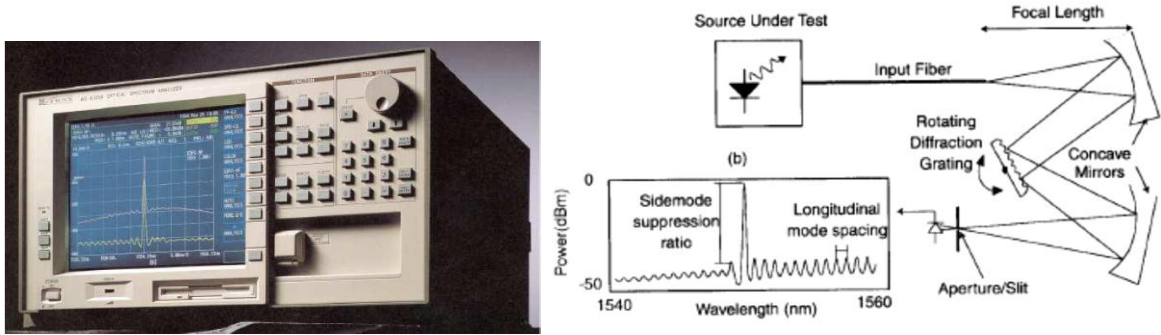


Figura 90: OSA e suo schema di funzionamento

I dati acquisiti sono stati successivamente analizzati in Matlab.

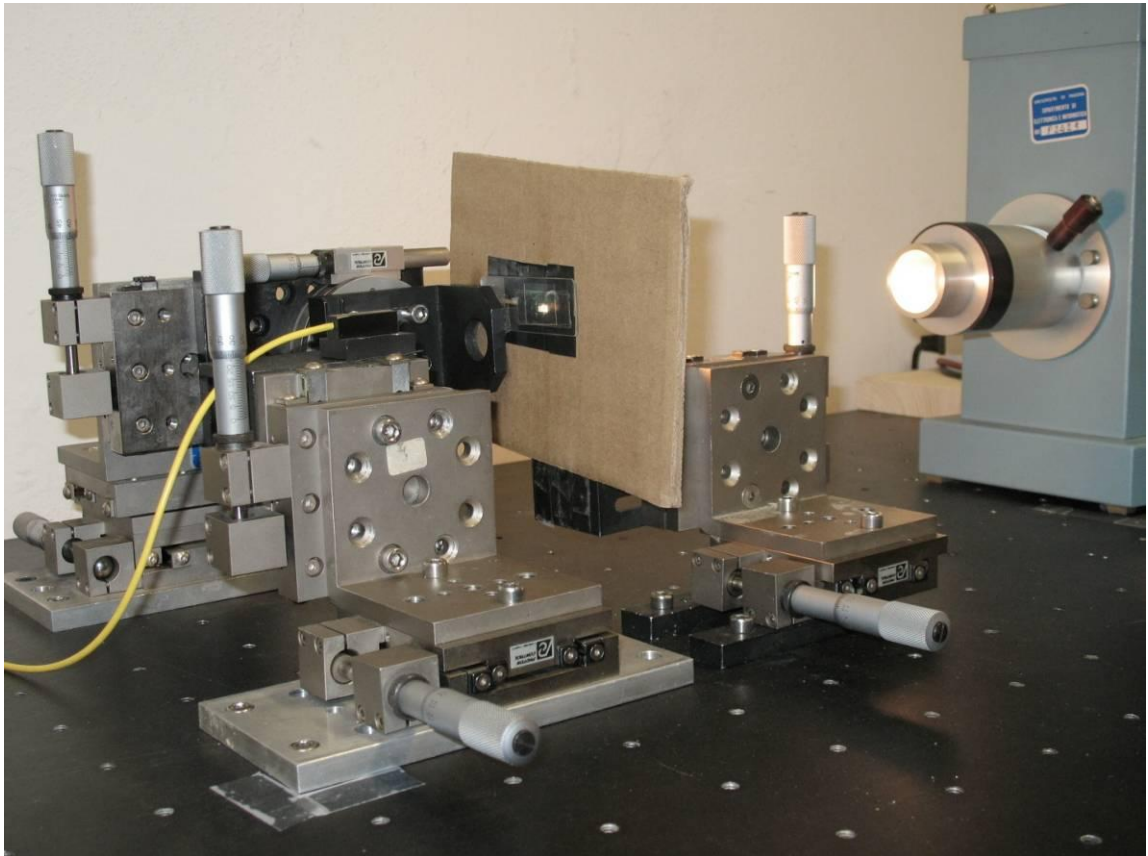


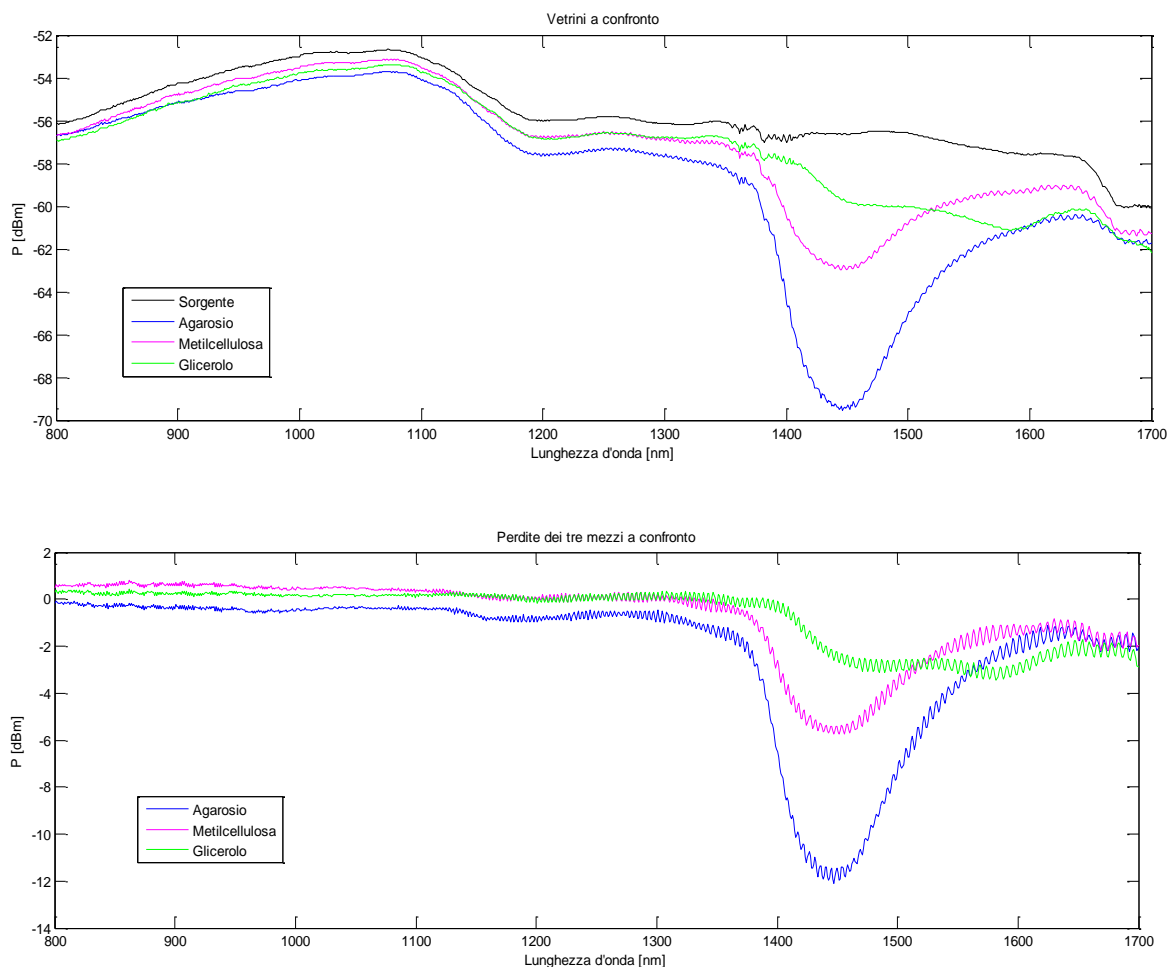
Figura 91: Setup completo

8.2.3 Fase 3: Risultati

Gli spettri sono stati acquisiti rispettivamente nel range di 800-1700nm con risoluzione 2nm e nel range 1250-1350nm, con risoluzione 0.5nm.

Prima di ogni set di misure si è allineata la sorgente con il Beam Expander, per garantire la minima perdita di potenza possibile, come descritto nel paragrafo precedente e si è acquisito lo spettro della sorgente con lo stesso setup. Si è misurato anche lo spettro dei supporti privi di mezzo, quindi dei vetrini (vetrino porta-oggetti, vetrino copri-oggetti e vetrini sovrapposti) e delle cuvette per poter successivamente sottrarre questi agli spettri acquisiti per gli stessi supporti ma con all'interno i mezzi. In tal modo si possono valutare le attenuazioni assolute causate dai mezzi.

Si presentano di seguito i risultati ottenuti per i tre mezzi montati su vetrino.



8. Prove sperimentali

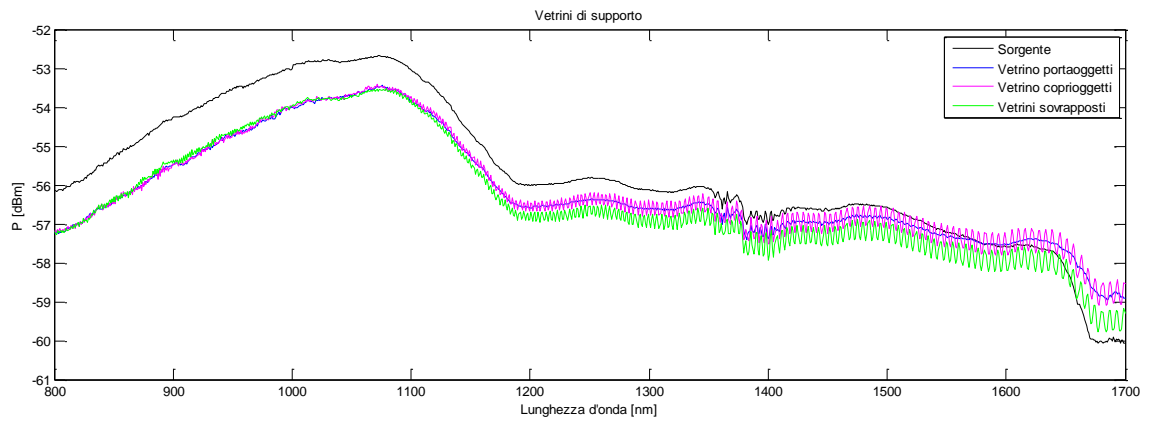


Figura 92: Spettri dei mezzi su vetrino, Perdite associate ai mezzi, spettri dei vetrino privi di mezzi

Di seguito i risultati ottenuti per le prove in cuvette:

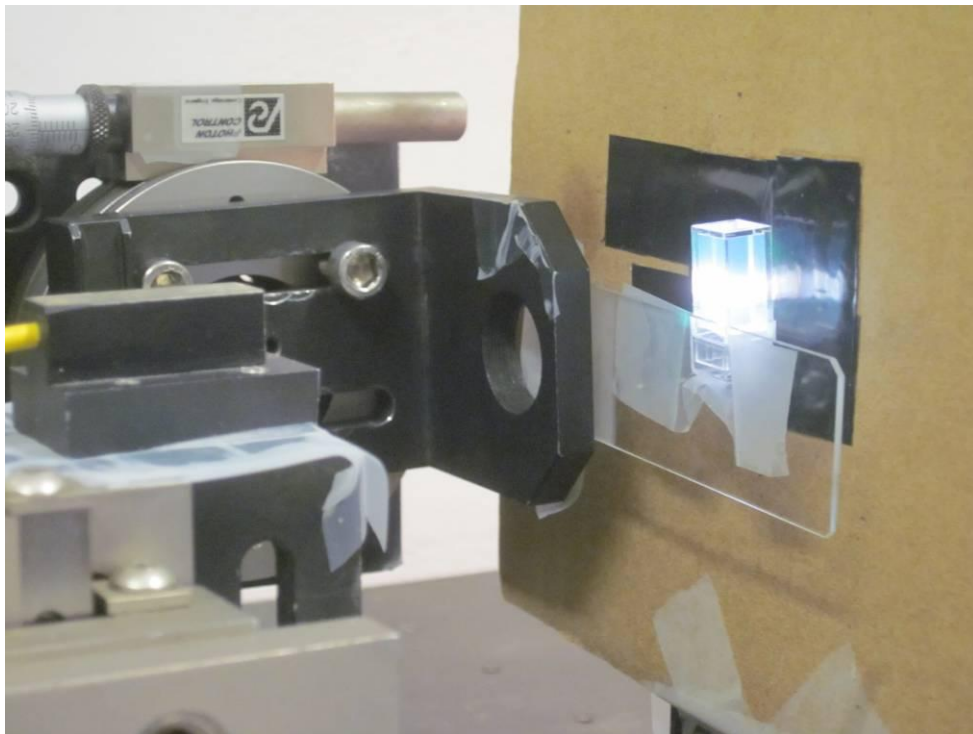


Figura 93: Analisi delle cuvette

8. Prove sperimentali

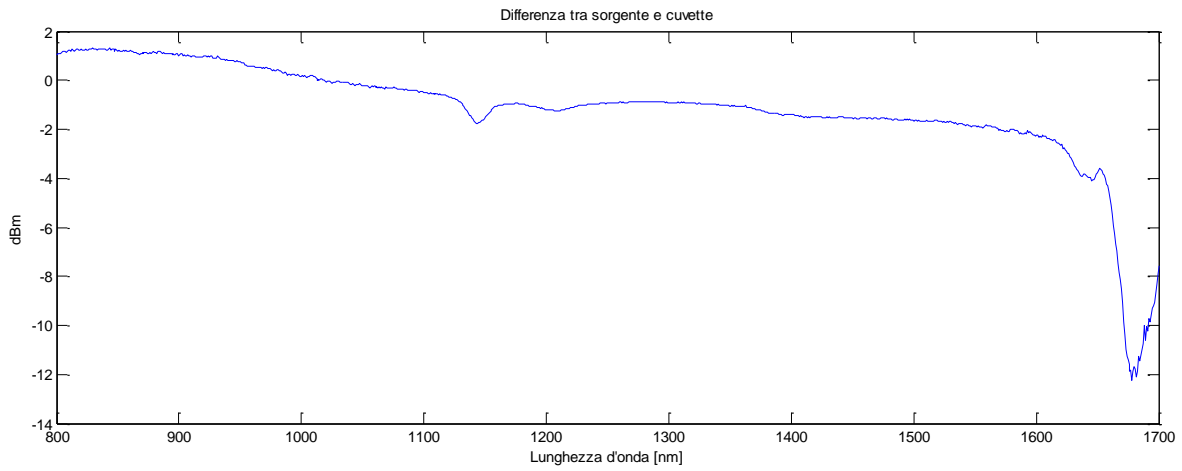
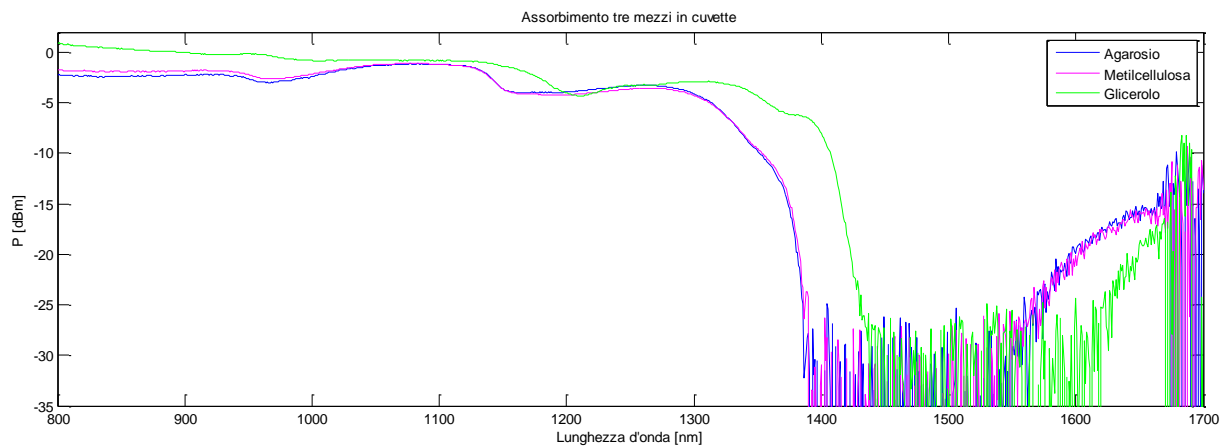
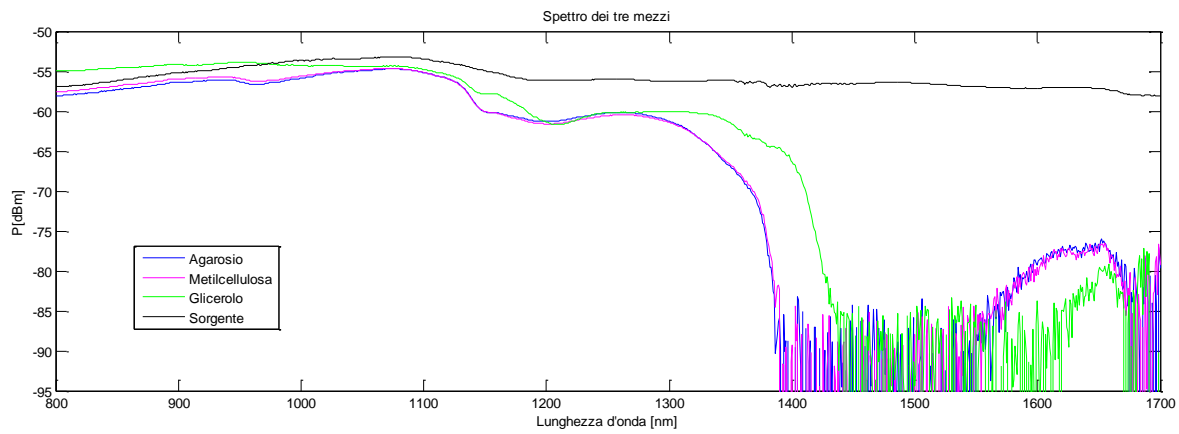


Figura 94: Perdite associate alla cuvette vuota



8. Prove sperimentali

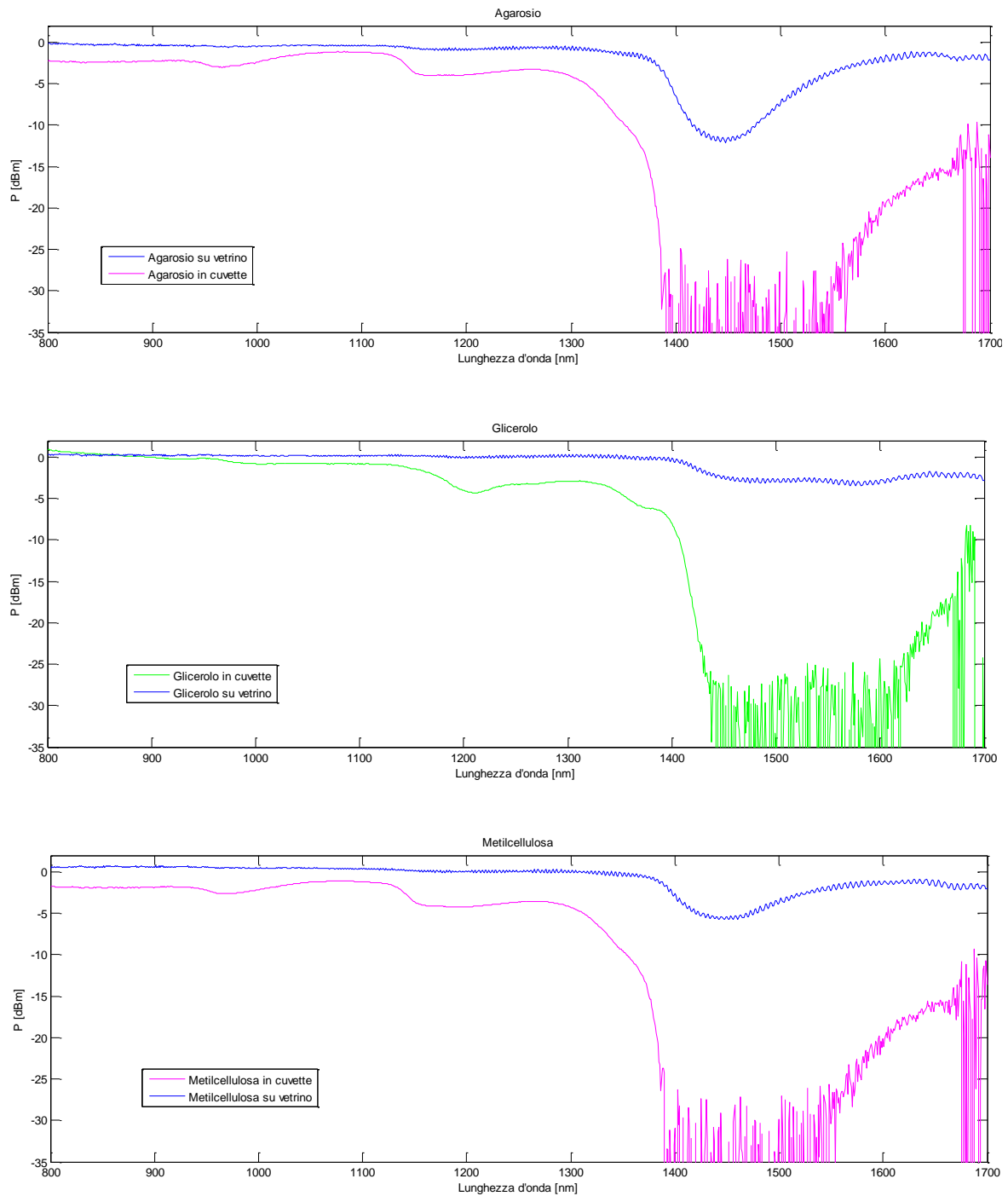


Figura 95: Perdite dei tre mezzi su vetrino e in cuvette a confronto

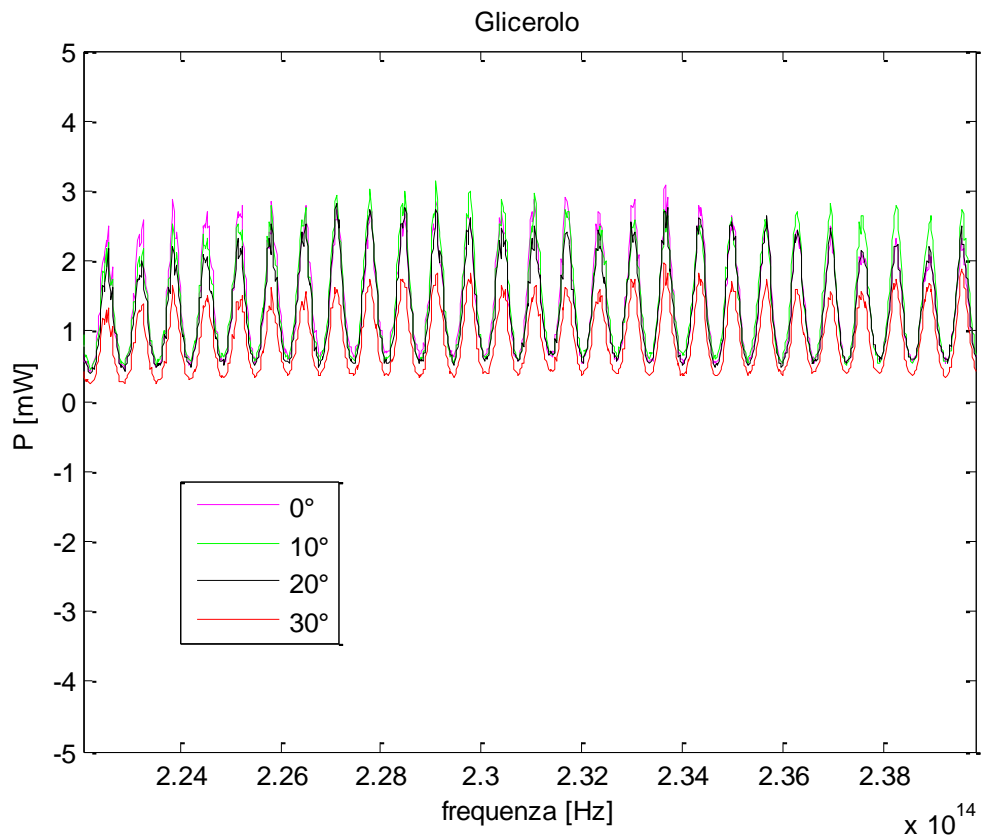
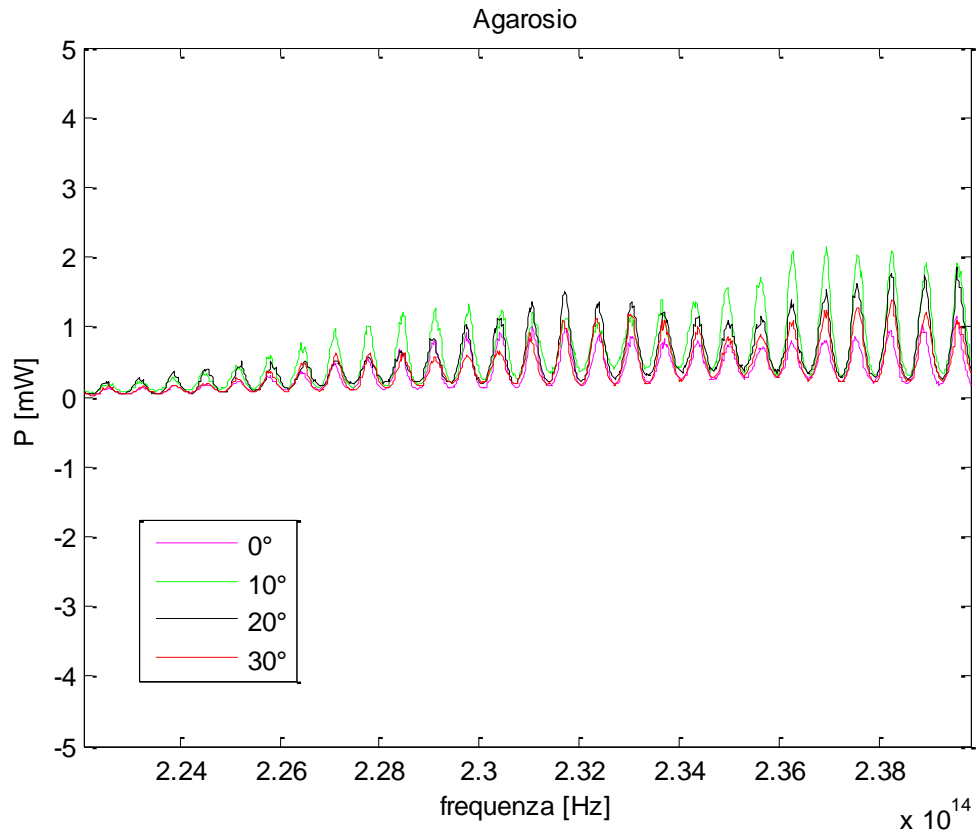
Le prove condotte su cuvette mostrano come le bande di assorbimento dei mezzi siano coerenti con quelle ritrovate per i vetri e soprattutto con i dati precedentemente presentati da altri autori per il glicerolo e per la metilcellulosa, che riportavano bande di assorbimento per entrambi i mezzi relativo range di lunghezze d'onda che va da 1429nm a 1670nm

(Izutsu et al., 2009; Sekiguchi et al. , 2003 [46][33]). L'attenuazione è maggiore rispetto a quella dei vetrini poiché lo spessore del mezzo passa da circa 0.5mm nei vetrini a 4mm nelle cuvette, tanto da non poter essere visualizzata dallo spettrometro.

8.3 Analisi Spettrale sui supporti

Poiché si è notato che negli spettri dei vetrini era presente un'oscillazione in corrispondenza di alcune bande di lunghezza d'onda, si è cercato di capire quali ne fossero le cause. Analizzando lo spettro del singolo vetrino copri-oggetti si è notato essere questo la causa dell'andamento ondulatorio misurato e si è ipotizzato che esso agisse come filtro di Fabry-Perot. Conducendo un'analisi spettrale sui valori misurati tra 1250nm e 1350nm (banda in cui le oscillazioni risultavano periodiche e ben definite) con risoluzione 0.5nm, si è verificato infatti che il periodo in frequenza dell'oscillazione era coerente per tutti e tre i mezzi, e dunque non era una caratteristica di questi bensì del vetrino in sé.

I dati sono stati privati del loro valore medio, riportati nell'asse delle frequenze e trasformati da dBm a mW.



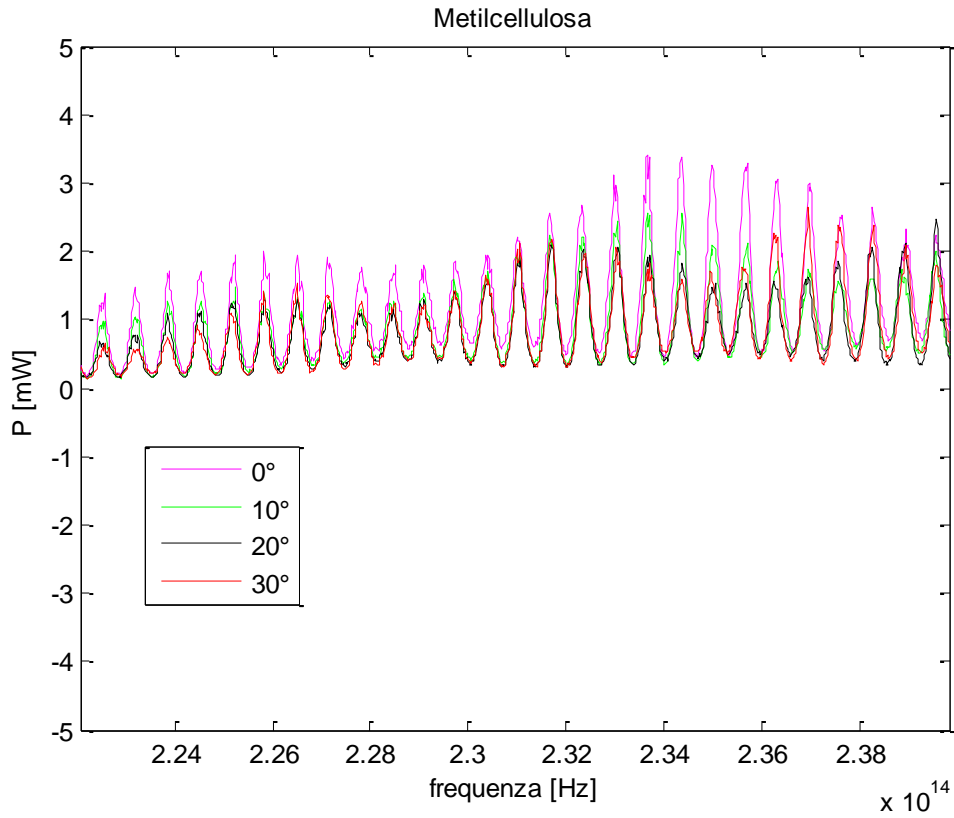
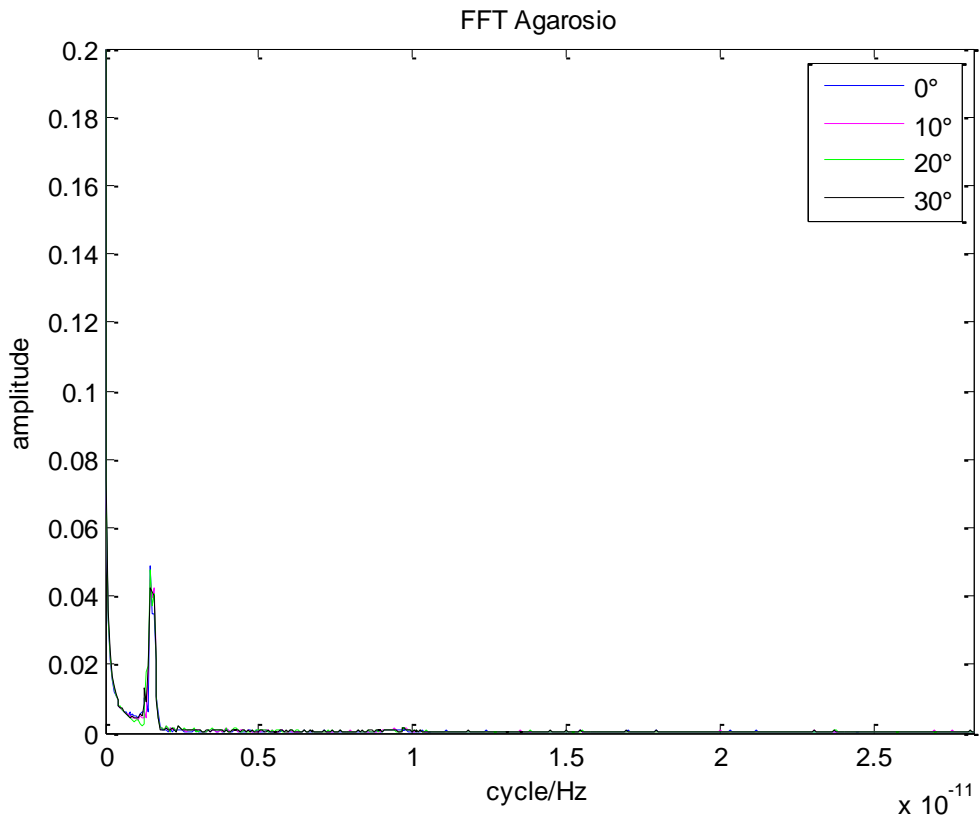


Figura 96: Spettro dei tre mezzi (in mW) tra 1250nm e 1350nm



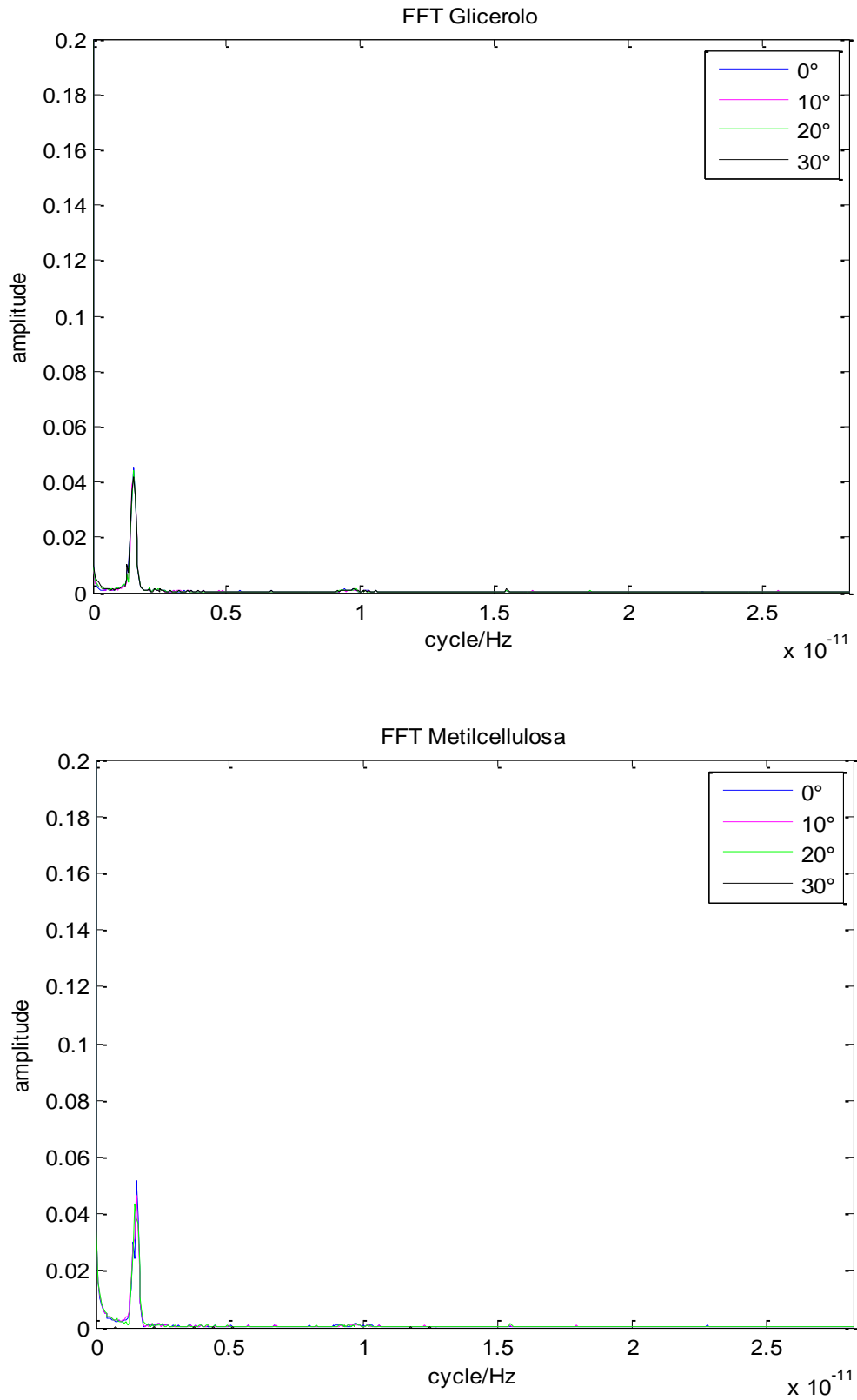


Figura 97: FFT condotta sugli spettri acquisiti (1250-1350nm) dei tre materiali

Andando a fare lo stesso tipo di analisi sul vetrino copri-oggetti si ritrova lo stesso picco.

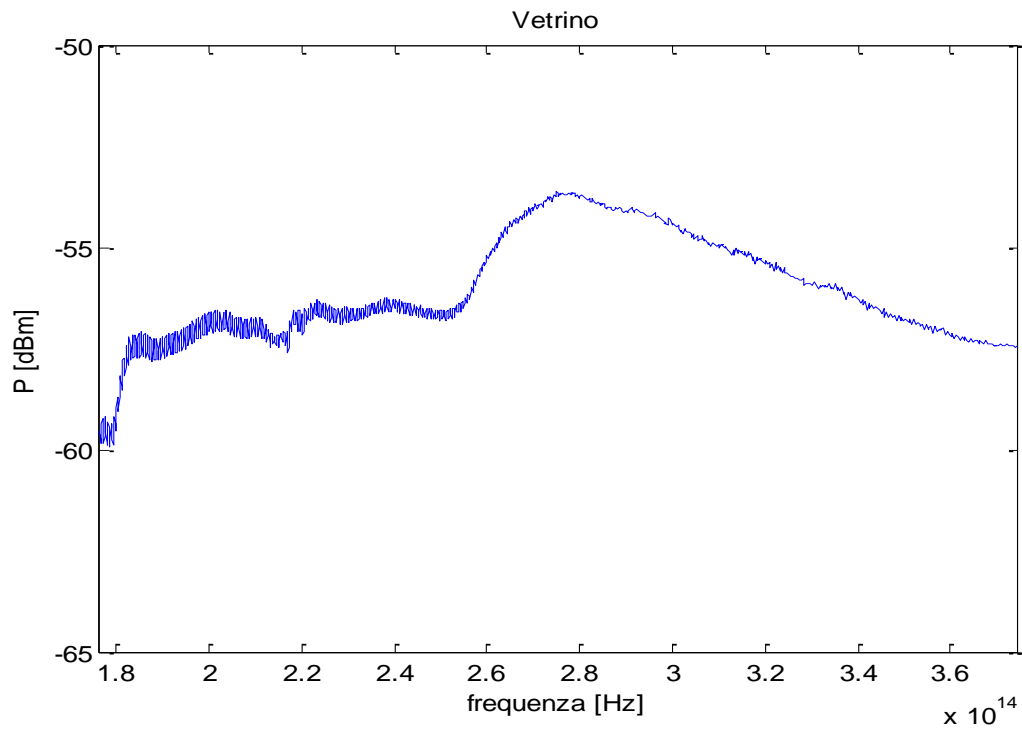


Figura 98: Spettro del vetrino copri-oggetti (spettro intero)

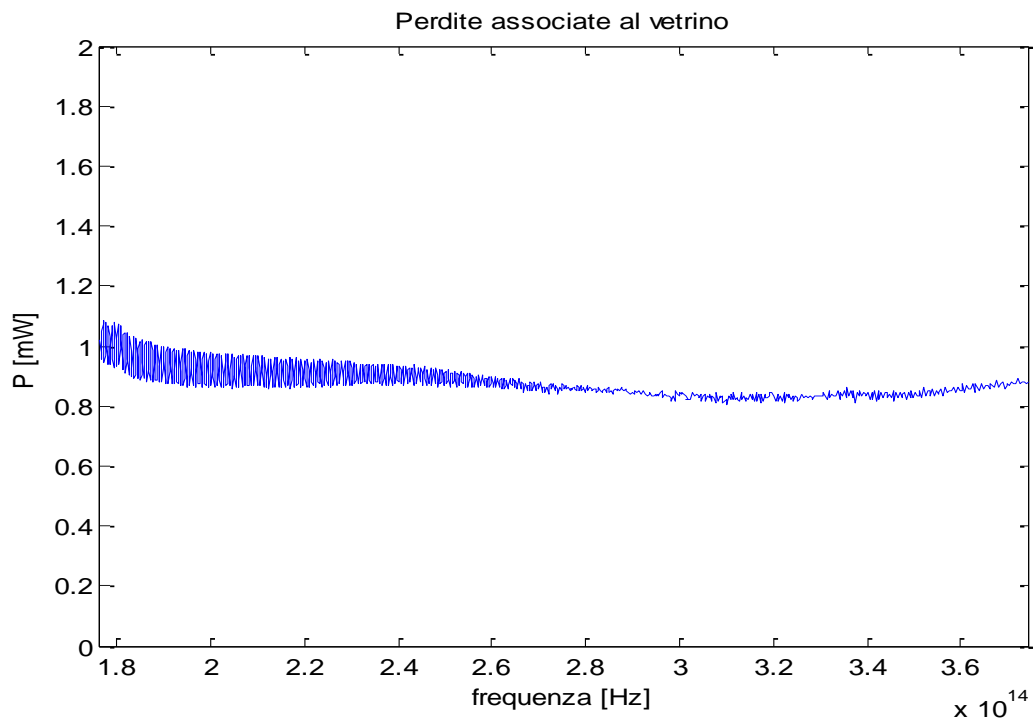


Figura 99: Perdite associate al vetrino

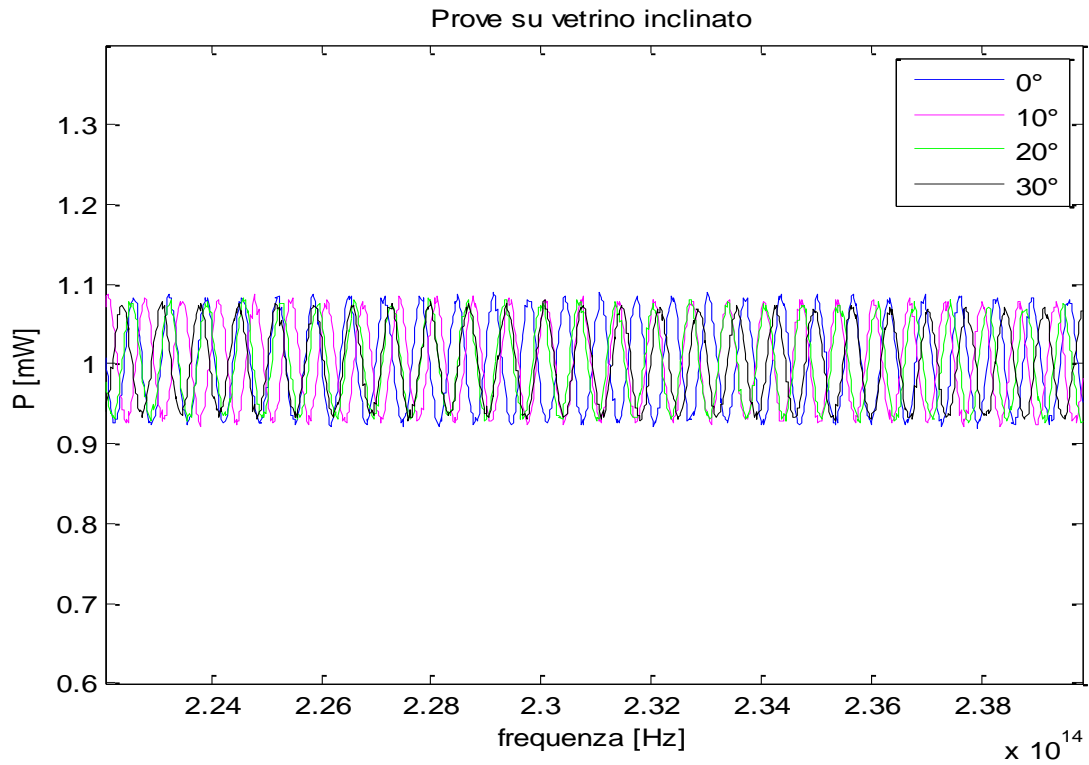


Figura 100: Particolare dello spettro del vetrino (1250-1350nm) a 0° e variamente inclinato

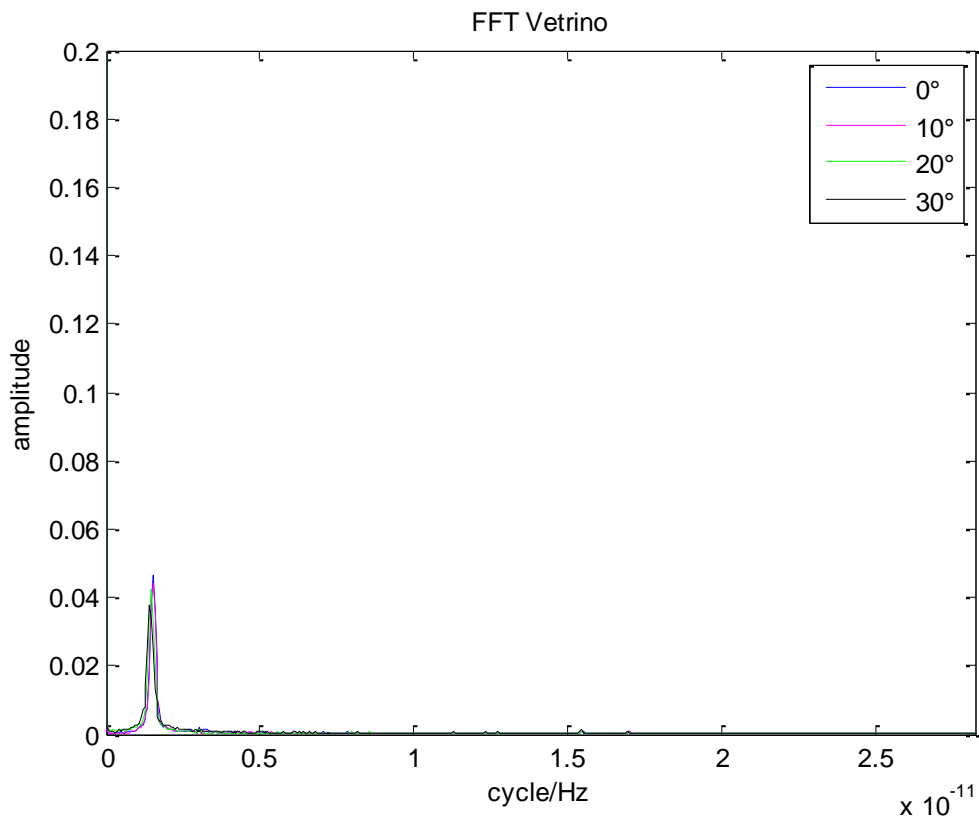


Figura 101: FFT su vetrino (si noti come il picco corrisponda a quelli trovati per i vetri con i mezzi)

Le prove sono state effettuate anche inclinando il vetrino, tuttavia non si notano variazioni significative sulle oscillazioni.

Sulla base dei risultati ottenuti per il vetrino copri-oggetti si è analizzato anche il vetrino porta-oggetti, il quale si è rivelato agire da filtro di Fabry-Perot anch'esso. Tuttavia poiché lo spessore di questo è maggiore di circa 10 volte rispetto a quello del vetrino precedentemente analizzato i picchi di oscillazione risultavano molto più fitti in frequenza (Δf) ed è stato necessario aumentare la risoluzione a 0.2nm per riuscire a visualizzarli (si è presa in considerazione la banda tra 1300nm e 1350nm).

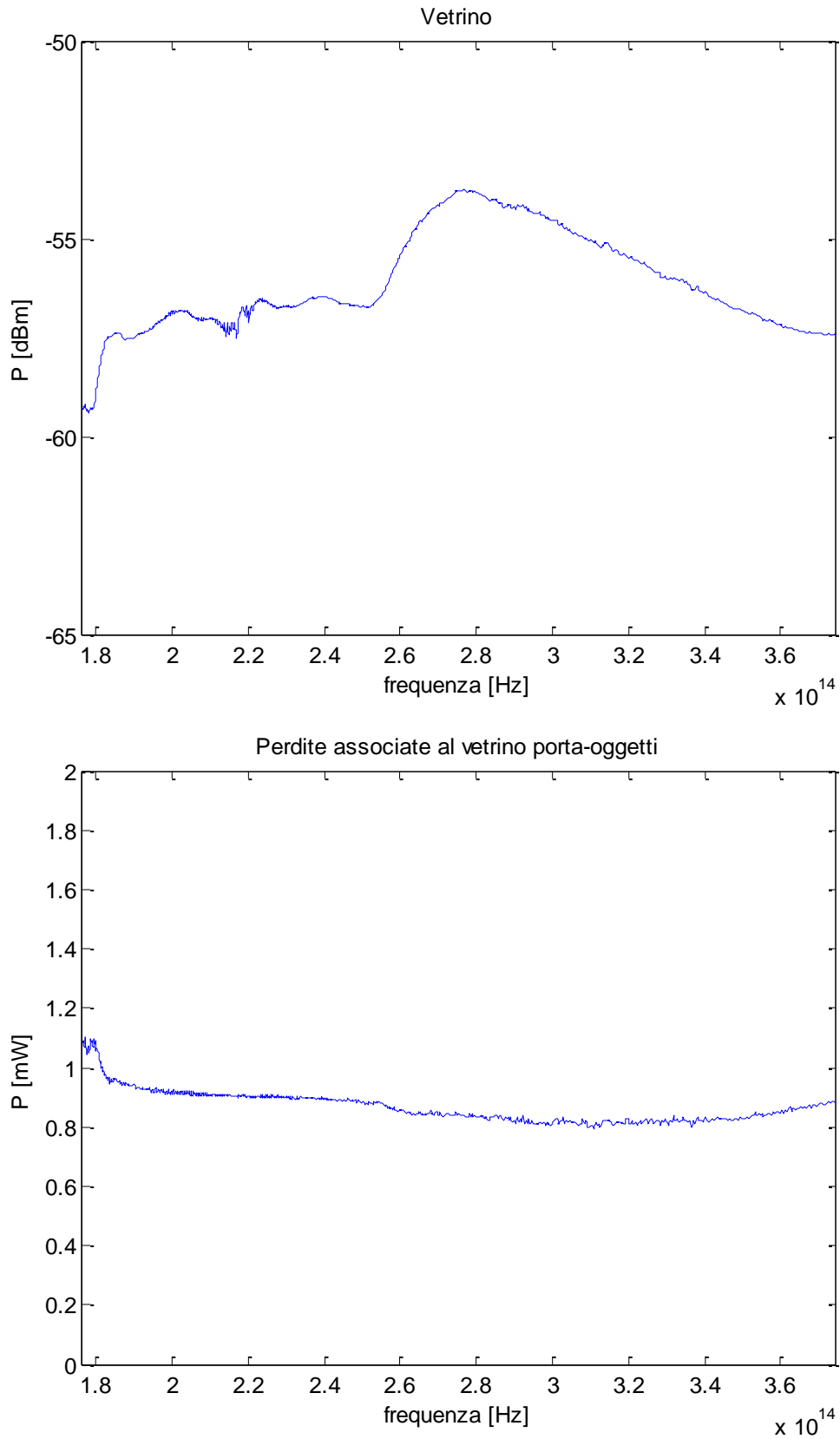


Figura 102: Spettro e perdita relativa del vetrino porta-oggetti

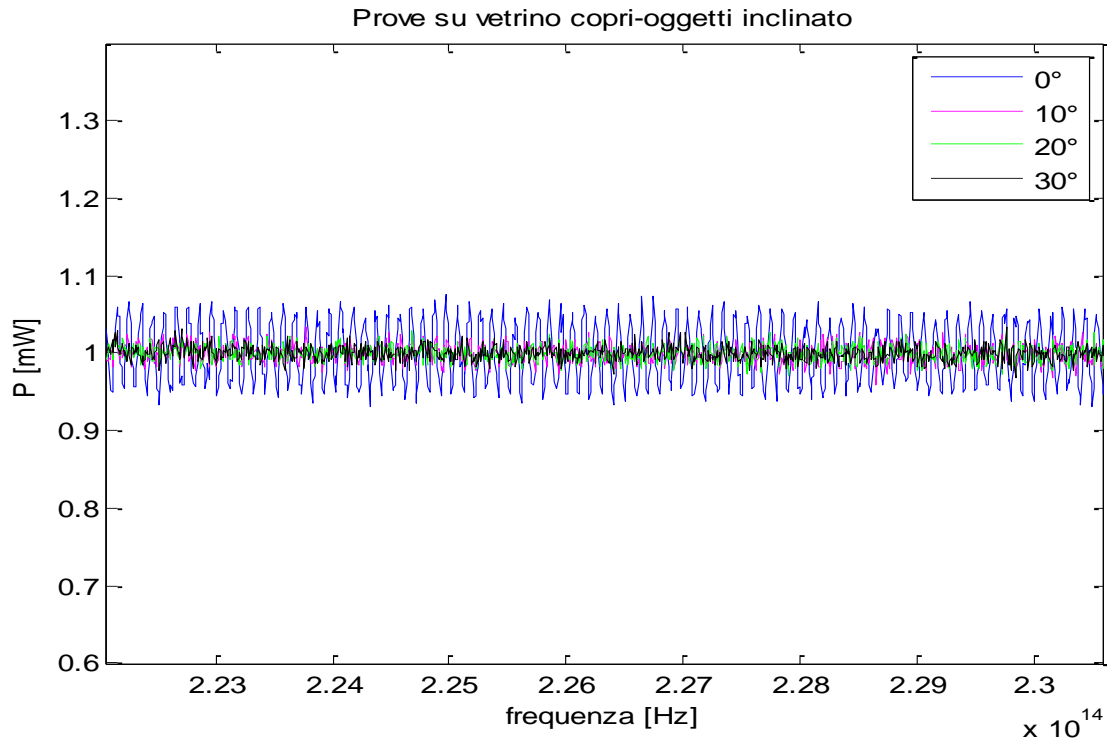


Figura 103: Oscillazioni caratteristiche del vetrino porta-oggetti

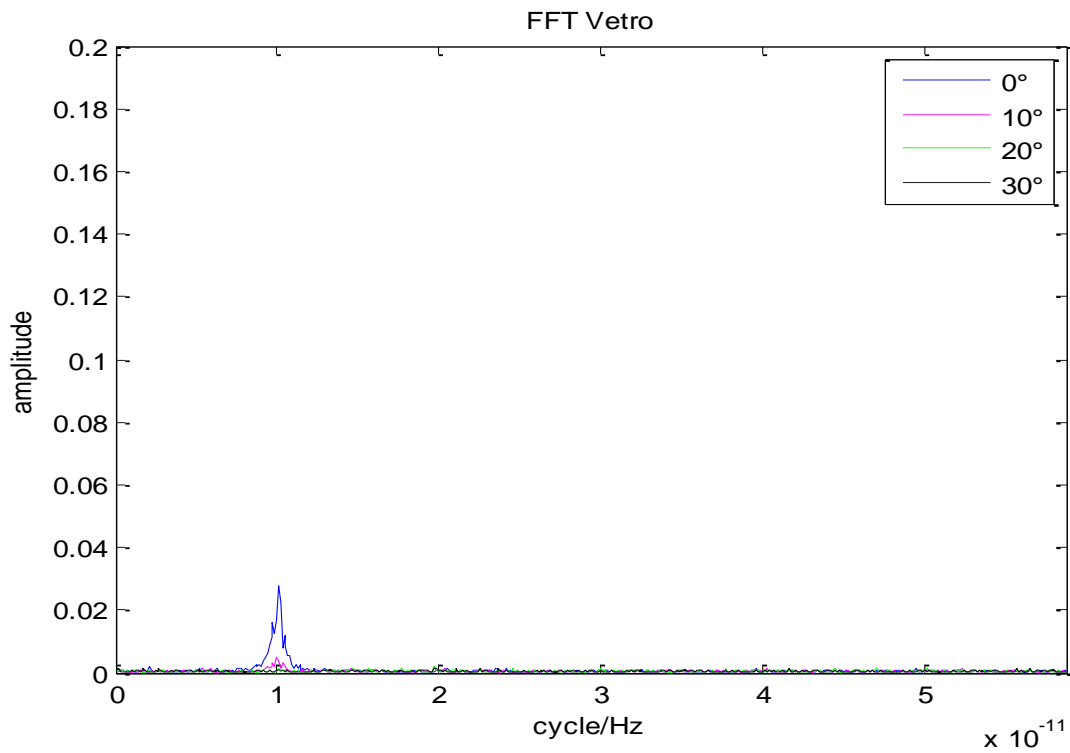


Figura 104: FFT dei dati relativi al vetrino porta-oggetti

Dall'analisi spettrale sui mezzi in vetrino è evidente la presenza di un picco a $1.52 \cdot 10^{-12}$ cycle/Hz. Andando ad effettuare l'analisi spettrale sul singolo vetrino copri-oggetti si ritrova lo stesso picco a $1.52 \cdot 10^{-12}$ cycle/Hz. Da ciò si deduce che le oscillazioni presenti negli spettri dei tre mezzi in vetrino siano riconducibili alle caratteristiche proprie del vetrino copri-oggetti.

Si può a questo punto calcolare ora il periodo di queste oscillazioni, ossia Δf , facendo l'inverso del valore di cycle/Hz trovato.

$$\Delta f = \frac{1}{\text{cycle / Hz}} = \frac{1}{1.52 \cdot 10^{-12}} = 6.5789 \cdot 10^{11}$$

Ed utilizzando la formula propria dei filtri Fabry-Perot che lega il passo del reticolo (L) alla frequenza (Δf) ([43]):

$$\Delta f = \frac{c_0}{2nL}$$

Essendo nel nostro caso L la distanza che il fascio luminoso percorre e quindi lo spessore del vetro copri-oggetti (150 μ m), c_0 è la velocità della luce nel vuoto, n è il coefficiente di rifrazione del vetro si è verificato che il coefficiente di rifrazione del vetrino è

$$n = \frac{c_0}{2L \cdot \Delta f} \cong 1.5190$$

E si ritrova il valore dell'indice di rifrazione proprio del vetrino (dato fornito come caratteristica del vetrino stesso).

Conducendo lo stesso tipo di analisi per il vetrino porta-oggetti si è dovuta aumentare la risoluzione a 0.2nm per riuscire a distinguere le oscillazioni (qui presentate tra 1300-1350nm).

Con l'analisi spettrale si è visto che anche il vetrino porta-oggetti presenta una componente sinusoidale a $1.007 \cdot 10^{11}$ cycle/Hz, che tuttavia viene oscurata negli spettri acquisiti per i vetrini con i mezzi essendo al di sotto della risoluzione impiegata per acquisire quegli spettri.

Infatti calcolando il periodo in questo caso si ottiene:

$$\Delta f = \frac{1}{\text{cycle / Hz}} \cong 9.9305 \cdot 10^{10}$$

$$n = \frac{c_0}{2L \cdot \Delta f} \cong 1.5095$$

Si è così concluso che il vetrino agisce come Filtro Fabry-Perot. Per confermare ulteriormente ciò si sono condotte prove anche sul vetrino inclinato di 10°, 20°, e 30° per vedere se aumentando il percorso ottico ($L' = L/\cos\alpha$) la distanza dei picchi diminuisse. Tuttavia conducendo l'analisi spettrale sui vetri inclinati (con mezzo) e sul singolo vetrino non si è notato una variazione della distanza tra i picchi, ma ciò potrebbe essere dovuto al fatto che l'inclinazione del fascio rispetto alle superfici del vetrino crea delle interferenze che si compensano e non risultano evidenti, inoltre, nel caso del vetro più spesso, l'inclinazione porta alla diminuzione progressiva dell'ampiezza delle oscillazioni, probabilmente perché il rumore della sorgente le sovrasta non rendendole più visibili.

Le acquisizioni con cuvette non presentano oscillazioni poiché la distanza che percorre il fascio luminoso L (8.5 mm) è tale da non poter visualizzare picchi distinti, Δf .

8.4 Conclusioni

Il setup messo a punto si è rivelato essere adatto all'analisi spettrale dei mezzi in questione nel visibile e vicino infrarosso. Sono queste infatti le lunghezze d'onda interessanti per la successiva fase di *imaging* tramite OCT. I tre mezzi sono molto simili tra loro, presentando bande di assorbimento a lunghezza d'onda corrispondenti a 1450-1600nm. Il glicerolo, pur presentando la stessa banda di assorbimento, ha un'attenuazione minore.

Un inconveniente riscontrato è stato quello dovuto al calore prodotto dalla lampada alogena. I campioni infatti nel tempo si scaldavano e tendevano a passare dallo stato di gel a quello liquido rendendo difficile la riproducibilità dei risultati soprattutto sui vetri. Si è quindi cercato nella fase di messa a punto del setup un buon compromesso tra vicinanza alla sorgente (e quindi maggior potenza) e allontanamento da essa (minore calore). Questo problema può essere ovviato impiegando una sorgente alternativa, per esempio un laser ad opportuna lunghezza d'onda, in modo da minimizzare il calore.

I tre mezzi si dimostrano sostanzialmente simili ed adatti al montaggio degli embrioni di Zebrafish per l'analisi OCT, in quanto le bande di assorbimento si collocano al di fuori delle lunghezze d'onda centrali impiegate in OCT (800 e 1310nm), dove essi presentano sostanzialmente una bassa attenuazione.

Lo studio sui supporti ha evidenziato come le cuvette in plastica siano ben adatte all'analisi spettrale, in quanto non interferiscono minimamente con il mezzo, inoltre, garantiscono spazio sufficiente per l'inserimento di embrioni e larve di Zebrafish senza comportarne lo schiacciamento come invece potrebbe essere se la celletta di contenimento dei vetrini non fosse sufficientemente spessa. Anche questi risultati sono in linea con i risultati ottenuti tramite i tubi FEP precedentemente riportati ([27][51]), i quali ponevano l'attenzione sulla necessità di avere supporti abbastanza ampi da non compromettere i campioni biologici, e che otticamente non interferissero con i campioni stessi.

9 CONCLUSIONI

La Tomografia a Coerenza Ottica si è dimostrata negli anni una potente e promettente tecnica per l'analisi di campioni biologici, sia *in vitro* che *in vivo*. A supporto di ciò in questo lavoro si è riportata una ricca bibliografia su questa nuova tecnica di *imaging*.

La corretta preparazione dei campioni biologici è una fase cruciale per la successiva analisi tramite OCT, in quanto deve garantire la minima interferenza con quelle che sono le caratteristiche peculiari dei campioni stessi in modo da non rendere vano il lavoro di ricerca.

Si sono riportati numerosi studi riguardanti le caratteristiche di tre diversi mezzi di inclusione per campioni biologici: l'agarosio, la metilcellulosa, e il glicerolo. Questi sono stati a loro volta analizzati otticamente per valutarne le proprietà nella banda di lunghezze d'onda interessata per l'*imaging* OCT. Pochi studi, infatti, sono stati fatti a questo scopo, e tal lavoro si può ritenere una valida base per il proseguimento di questo progetto.

Gli embrioni e le larve di Zebrafish sono ottimi modelli per gli studi tramite OCT, e dall'analisi sui supporti condotta in questo lavoro si è concluso che le cuvette, date le dimensioni, sono in grado sia di garantire la crescita (per gli studi *in vivo*) di questi campioni biologici sia di non comprometterne la fisiologia (per gli studi *in vitro*). Inoltre questo tipo di supporto non interferisce otticamente col campione in esame.

Dall'analisi spettrale sui mezzi di inclusione si è osservato che essi sono sostanzialmente paragonabili dal punto di vista ottico, esibendo bande di assorbimento simili nel vicino Infrarosso.

In futuro sarà possibile implementare un vero e proprio sistema OCT per l'analisi di campioni biologici opportunamente preparati secondo quanto riportato nel presente lavoro

10 BIBLIOGRAFIA

- [1] James G. Fujimoto, C. R. Acad, “*Optical coherence tomography*”, Sci. Paris, Série IV, p.1099–1111, 2001, Physique appliquée/Applied physics, (Biophysique/Biophysics)
- [2] Gabriele M. L., Wollstein G., Ishikawa H., Kagemann L., Xu J., Folio L. S., Schuman J. S., “*Optical coherence tomography: history, current status, and laboratory work*”, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Apr 14; 52(5): 2425-36
- [3] M. Brezinski, “*Optical Coherence Tomography: Principles and Applications*”, AP
- [4] Zahid Yaqoob, Jigang Wu, and Changhuei Yang, “*Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy*”, California Institute of Technology, Pasadena CA, USA BioTechniques 39:S6-S13 (December 2005)
- [5] Wieser W., Biedermann B. R., Klein T., Eigenwillig C. M., Huber R., “*Multi-megahertz OCT: High quality 3D imaging at 20 million A-scans and 4.5 GVoxels per second*”, Opt Express. 2010 Jul 5;18(14):14685-704
- [6] F. Giovannini, “*Tomografia A Coerenza Ottica: Principi Di Funzionamento, Studio Della Tecnologia Ed Applicazioni Nel Settore Clinico*”, , Alma Mater Studiorum-Universita’ di Bologna, Sede Di Cesena
- [7] K. Divakar Rao, Aneesh Alex, Yogesh Verma, Sreeja Thampi, Pradeep K. Gupta “*Real-time in vivo imaging of adult zebrafish brain using optical coherence tomography*”, J Biophotonics. 2009 May;2(5):288-91
- [8] Moon S, Kim DY, “*Ultra-high-speed optical coherence tomography with a stretched pulse supercontinuum source*”, Opt. Express, 14(24), 2006
- [9] Donghak Choi, Hideaki Hiro-Oka, Hiroyuki Furukawa, Reiko Yoshimura, Motoi Nakanishi, Kimiya Shimizu, and Kohji Ohbayashi, “*Fourier domain optical coherence tomography using optical demultiplexers imaging at 60,000,000 lines/s*”, Opt. Lett. 33 (12), 2008
- [10] W. Y. Oh, S. H. Yun, G. J. Tearney, and B. E. Bouma, “*Wide Tuning Range Wavelength-Swept Laser With Two Semiconductor Optical Amplifiers*”, Ieee Photonics Technology Letters, 17 2005

- [11] Huber R., Wojtkowski M., Fujimoto J. G., “*Fourier Domain Mode Locking (FDML): A new laser operating regime and applications for optical coherence tomography*”, , Opt Express. 2006 Apr 17;14(8):3225-37
- [12] Barry Cense, Nader A. Nassif, et al., “*Ultra-high-resolution high-speed retinal imaging using spectral-domain optical coherence*”, Opt. Express 12, 2004 Tomography
- [13] S. G. Megason, “*Current challenges in image analysis for in toto imaging of Zebrafish*”, Department of System Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115
- [14] F. Castellano “*Tomografia a coerenza ottica: applicazioni alla microscopia in campo biologico*”, Università degli studi di Padova
- [15] L. Caneparo PhD., “*Il pesce Zebra e i suoi usi nella ricerca*”, King’College, London
- [16] Matteo Campana, Benoit Maury, Marie Dutreix, Nadine Peyri ras, Alessandro Sarti, “*Methods toward in vivo measurement of zebrafish epithelial and deep cell proliferation*”, Department of Electronics, Computer Sciences and Systems (DEIS), Bologna University, Bologna, Italy
- [17] Irina V. Larina, Esteban F. Carbajal, Valery V. Tuchin, Mary E. Dickinson, and Kirill V. Larin, “*Enhanced OCT imaging of embryonic tissue with optical clearing*”, Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XIII, edited by James G. Fujimoto, Joseph A. Izatt, Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE Vol. 7168, 2009
- [18] Choma, Michael A. and Sarunic, Marinko V. and Yang, Changhuei and Izatt, Joseph A., “*Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography*”, Optics Express, (2003), 11(18), pp. 2183-2189
- [19] Maciej Wojtkowski, Vivek Srinivasan, Tony Ko, James Fujimoto, Andrzej Kowalczyk, and Jay Duker, “*Ultra-high-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation*”, Opt. Express 12, 2004
- [20] Johannes F de Boer, Barry Cense, B Hyle Park, Mark C Pierce, Guillermo J Tearney, Brett E Bouma, “*Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography*”, Optics Letters, 12/2003; 28(21):2067-9

- [21] James G Fujimoto et al., “*Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy*”, Neoplasia, 2000 January; 2(1-2): 9–25
- [22] Rui Ma, Martin Distel, X Lu’is De’an-Ben, Vasilis Ntziachristos and Daniel Razansky, “*Non-invasive whole-body imaging of adult zebrafish with optoacoustic tomography*”, 2012 Phys. Med. Biol. 57 7227,
- [23] Larry Kagemann et al., “*Repeated, noninvasive, high resolution spectral domain optical coherence tomography imaging of zebrafish embryos*”, Molecular Vision 2008; 14:2157-2170, 2008
- [24] Wasterfield M., “*The Zebrafish book. A guide for the laboratorista of Zebrafish (Danio rerio)*”, Univ. Of Oregon Press, Eugene, OR, 4 Ed. (2000)
- [25] Jungho Ohn, Liebling, M., “*In vivo, high-throughput imaging for functional characterization of the embryonic zebrafish heart*”, Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE
- [26] S. Kabli et al., “*Magnetic resonance microscopy of the adult zebrafish*”, Zebrafish 3, 2006
- [27] Petzold M., Bedell V. et al. “*SCORE Imaging: Specimen in a Corrected Optical Rotational Enclosure*”, (2010)
- [28] Rafael Armisen and Fernando Galatas, Hispanagar “*Chapter 1 - Production, properties and uses of agar*”, S.A., Poligono Industrial de Villalonguejar Calle López Bravo "A", 09080 Burgos, Spain
- [29] A. Stoch, W. Jastrzebski, E. Długoń, W. Lejda, B. Trybalska, G. J. Stoch, A. Adamczyk, “*Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V*”, Journal of Molecular Structure, Volumes 744–747, 3 June 2005
- [30] Su Yixue, Chu Bin, Gao Yuan, Wu Chaoxi, Zhang Lingmin, Chen Peng, Wang Xiaoying, Tang Shunqing, “*Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness*”, Carbohydrate Polymers, Volume 92, Issue 2, 15 February 2013, Pages 2245–2251,
- [31] Jiii Podešva and Ondiej Prochtbka, “*Studies on agaroses: 1. Specific refractive index increments in dimethyl sulfoxide and in water at various wavelengths and temperatures*”, Polymer, Vol. 36 No. 26. pp. 4967 4970. 1995

- [32] S. Paradisi, G. Arancia, G. Donelli, “*Principi e possibilità applicative della crioultramicrotomia*”, Annale Istituto superiore Sanità, Vol.27, Issue 2, 1991
- [33] Yuka Sekiguchi, Chie Sawataria, Tetsuo Kondob, “*A gelation mechanism depending on hydrogen bond formation in regioselectively substituted O-methylcelluloses*”, Carbohydrate Polymers 53 (2003) 145–153
- [34] Anca Balan, Anca Moise and Aurelia Grigoriu, “*A comparative rheological study of several colloidal systems based on cellulose derivatives*”, Cellulose chemistry and technology, 2009
- [35] Dipanwita Maity, Md. Masud Rahaman Mollicka et al., “*Synthesis of methylcellulose–silver nanocomposite and investigation of mechanical and antimicrobial properties*”, Carbohydrate Polymers 90 (2012) 1818– 1825
- [36] Aparna V.Deshpande , Jayraj R. Rane, Laxman V. Jathar, “*Effect of glycerol on the optical and physical properties of sol–gel glass matrices*”, J Sol-Gel Sci Technol (2009) 49:268–276
- [37] Julien Y. Bertrand, Neil C. Chi et al., “*Hematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development*”, Nature 2010 March 4
- [38] Richard Mark White, Anna Sessa et al., “*Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis*”, Cell Stem Cell. 2008 February 7; 2(2)
- [39] Justin R. Barone, Maria Medynets, “*Thermally processed levan polymers*”, Carbohydrate Polymers 69 (2007) 554–561
- [40] Frank Higgins, Alan Rein, “*Quality Verification of Incoming Liquid Raw Materials by FTIR Spectroscopy*”, friday, january 28, 2011
- [41] Mahesh U. Chatbar, Chirag B. Godiya, A.K. Siddhanta, “*Functional modification of agarose: A facile synthesis of an agarose saccharate derivative*”, Carbohydrate Polymers 88, 3, (2012)
- [42] R. Patterson, “*Mounting Media Information*”
- [43] L. Palmieri, “*Sistemi in fibra ottica e laboratorio-Filtri*”, 2010
- [44] L. Palmieri, “*Sistemi in fibra ottica e laboratorio-Strumentazione ottica B*”, 2012

- [45] Mihir D. Oza, Ramavatar Meena, Kamalesh Prasad, P. Paul, A.K. Siddhanta, “*Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose–guanine derivative*”, Carbohydrate Polymers 81 (2010)
- [46] Ken-ichi Izutsu et al., “*Near-Infrared Analysis of Hydrogen-Bonding in Glass- and Rubber-State Amorphous Saccharide Solids*”, AAPS PharmSciTech. 2009 June; 10(2)
- [47] Morris E.R. Stevens E.S., Frangou S.A., Rees D.A., “*Total optical activity of agarose: relation to observable transitions in the vacuum ultraviolet*”, Biopolymers, 1986, 25(5)
- [48] Wood J.I., Klomprens K.L., “*Characterization of agarose as an encapsulation medium for particulate specimens for transmission electron microscopy*”, Microscopy Research and Technique, 1993, 25(4)
- [49] D. K. Buslov, N. I. Sushko, O. N. Tretinnikov, “*Study on thermal gelation of methylcellulose in water using FTIR-ATR spectroscopy*”, Journal of Applied Spectroscopy, Vol. 75 (4), 2008
- [50] T.S. Perova, D.H. Christensen, U. Rasmussen, J.K. Vij, O.F. Nielsen, “*Far-infrared spectra of highly viscous liquids: glycerol and triacetin (glycerol triacetate)*”, Vibrational Spectroscopy 1998(18)
- [51] Anna Kaufmann, Michaela Mickoleit, Michael Weber and Jan Huisken “*Multilayer mounting enables long-term imaging of zebrafish development in a light sheet microscope*”, Published by The Company of Biologists Ltd, 2012
- [52] G. Bertolotti, V. Capitelli, “*Dizionario delle materie plastiche*”, Tecniche Nuove, 2007

10.1 Sitografia:

- [53] www.zebrafish.org
- [54] www.fishnet.org.au
- [55] http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio

Ringrazio il mio relatore Enrico Grisan e il mio correlatore Luca Palmieri per la disponibilità accordatami durante il periodo di tesi; in particolar modo volevo ringraziare la Dott.sa Natascia Tiso del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova per la sorridente collaborazione e la Dott.sa Elena Autizi del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Padova per il prezioso supporto. Infine grazie a Fabio Calzavara e a Fabrizio Chiarello per il supporto offertomi durante la mia permanenza nel laboratorio di Fotonica e Campi Elettromagnetici.