



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di laurea triennale in Ingegneria Biomedica

TESI DI LAUREA

**TOMOGRAFIA A COERENZA OTTICA:
APPLICAZIONI ALLA MICROSCOPIA IN CAMPO
BIOLOGICO**

RELATORE
PROF. ENRICO GRISAN

LAUREANDO
FILIPPO CASTELLANO

*Ai miei genitori, che mi hanno concesso
questa splendida opportunità*

INDICE

INTRODUZIONE	4
1. PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO	6
1.1 LUCE: INTERFERENZA E COERENZA	6
1.2 L'INTERFEROMETRO DI MICHELSON	8
1.3 SENSIBILITÀ.....	10
1.4 RISOLUZIONE.....	11
2. APPLICAZIONI.....	14
2.1 OCT NELLA MEDICINA CARDIOVASCOLARE.....	14
2.1.1 Sviluppi storici	14
2.1.2 <i>In vivo imaging</i>	17
2.1.3 Limiti	18
2.1.4 Potenzialità.....	19
2.2 OCT NEI SISTEMI MUSCOLO-SCHELETRICI	21
2.2.1 Osteoartriti	21
2.2.2 Attuali modalità di <i>imaging</i>	21
2.2.3 <i>Imaging in vitro e in vivo</i>	23
2.2.4 Altre potenziali applicazioni	28
2.3 OCT IN ONCOLOGIA	28
2.3.1 Cancro esofageo	29
2.3.2 Cancro gastrico	30
2.3.3 Cancro alla vescica.....	31
2.3.4 Cancro ai polmoni.....	31
2.3.5 Cancro cervicale	33
3. CONCLUSIONI.....	35
BIBLIOGRAFIA - SITOGRAFIA.....	37

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 invece di quelli acustici, garantendo una risoluzione assiale molto maggiore rispetto a quella tipica dell'ultrasuonografia standard utilizzato in clinica (nell'ordine di 10-20 μm contro i 150-200 μm 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 e 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 della compagnia di partenza Advanced Ophthalmic Diagnostics assieme alla Dottoressa Carmen Puliafito.

La sua nascita fu di estrema importanza per il campo diagnostico e terapeutico delle patologie oculari, specialmente nella diagnosi del glaucoma. Tuttavia la sua utilità si è poi estesa anche a patologie di una vasta gamma di tessuti.

L' OCT introduce un notevole vantaggio nella diagnostica per immagini poiché consente la visualizzazione in tempo reale, *in situ*, delle microstrutture tissutali.

Per questo può essere sfruttata:

- nei casi in cui la biopsia escissionale risulti pericolosa o impossibile, come ad esempio per l'occhio, le arterie coronarie o il tessuto nervoso;
- nella diagnosi tumorale, in cooperazione con la biopsia ed esame istopatologico, al fine di evitare errori di campionamento che inducano alla rilevazione di falsi negativi;
- come guida a procedure microchirurgiche, grazie alla capacità di vedere al di sotto della superficie dei tessuti in modo non invasivo.

In questa tesina si analizzeranno i principi di funzionamento, le principali applicazioni nella microscopia e le potenzialità dell' OCT.

1. Principi di Funzionamento

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 delle immagini ma introduce anche un problema, cioè l'impossibilità di rilevare in maniera diretta gli echi ottici a causa della velocità della luce ($c = 3 \cdot 10^8 m/s$) molto più elevata di quella del suono.

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

1.1 Luce: interferenza e coerenza

La luce è un'onda. Un raggio di luce è composto da campi elettrici e magnetici che oscillano nel tempo e nello spazio ed è caratterizzato da un'ampiezza e da una lunghezza d'onda. A seconda del mezzo in cui si propaga la sua velocità si riduce di un fattore detto indice di rifrazione del mezzo.

Quando due raggi sono combinati tra loro i due campi elettromagnetici interagiscono e si verifica un fenomeno chiamato interferenza. Se i raggi che si incontrano hanno i campi in 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.

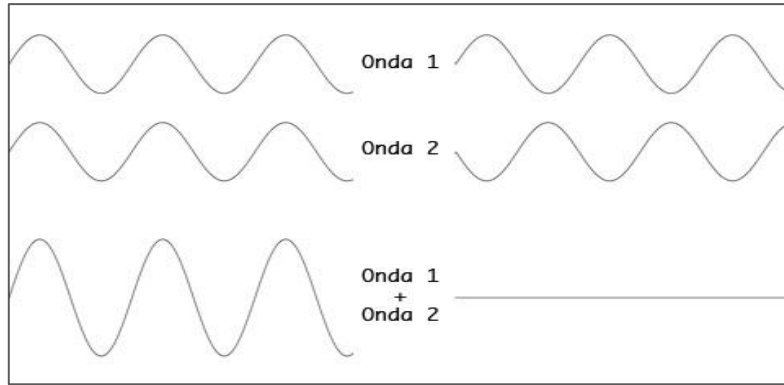


Figura 1.1: Interferenza costruttiva (a sinistra) e interferenza distruttiva (a destra).

Nei casi reali le onde sono soggette a fluttuazioni attorno ad un certo valore medio f_0 , cioè hanno una propria *larghezza di banda* Δf .

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

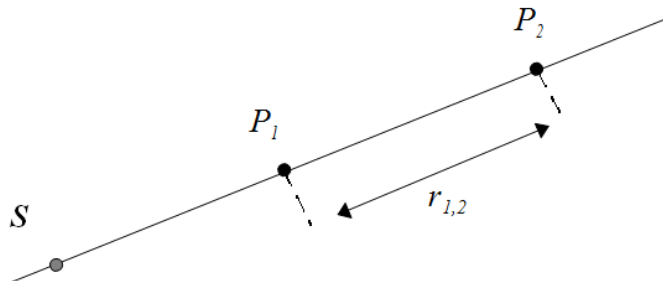
$$\Delta t = \frac{1}{\Delta f}$$

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

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

$$\Delta l = c \cdot \Delta t$$

Consideriamo per esempio due punti P_1 e P_2 giacenti sulla semiretta uscente da una sorgente S .



Se $\Delta l \gg r_{1,2}$ allora da P_1 a P_2 si presenta un singolo treno d'onda e la perturbazione in P_1 è *fortemente correlata* con quella in P_2 . In caso contrario, se $\Delta l \ll r_{1,2}$, le perturbazioni nei due punti sono completamente *scorrelate* e sono presenti molti treni d'onda.

Il concetto di *coerenza* è strettamente legato al grado di correlazione.

1.2 L'interferometro di Michelson

L'interferometro di Michelson è uno strumento che permette di misurare la coerenza temporale.

In figura 1.2 è mostrato uno schema semplificato.

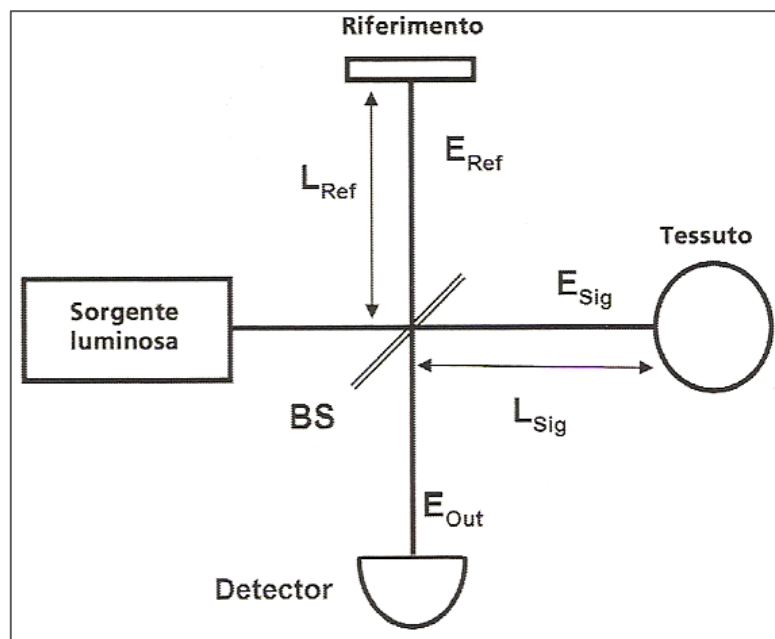


Figura 1.2: schema di un interferometro di Michelson.^[1]

Da una sorgente viene mandata un'onda luminosa verso un prisma parzialmente riflettente, Beam Splitter (BS) che divide la luce in due raggi: un primo raggio deviato verso uno specchio funge da riferimento, l'altro viene proiettato sul tessuto in esame per la misurazione.

La luce incidente sul tessuto può essere:

- **trasmessa**, cioè rimane inalterata e libera di interagire con gli strati più profondi;
- **assorbita**, quindi rimossa dal fascio incidente;
- **diffusa**, quando la luce incidente viene proiettata in direzioni multiple a causa delle variazioni spaziali dell'indice di rifrazione all'interno del tessuto;
- **riflessa** o **retrodiffusa**, quando la luce diffusa inverte completamente la direzione.

Definiamo $E_{Ref}(t)$ il segnale riflesso dallo specchio di riferimento, mentre $E_{Sig}(t)$ quello riflesso dal tessuto. I due raggi interferiscono a livello del prisma e un sensore misura l'intensità del segnale di emissione $E_{Out}(t)$ che è proporzionale al quadrato del campo elettrico:

$$E_{Out}(t) \sim E_{Ref}(t) + E_{Sig}(t)$$

L'intensità misurata è:

$$I_{Out}(t) \sim \frac{1}{4} |E_{Ref}|^2 + \frac{1}{4} |E_{Sig}|^2 + \frac{1}{2} E_{Ref} E_{Sig} \cos [2(2\pi/\lambda)\Delta L]$$

$I_{Out}(t)$ è quindi una funzione di E_{Ref} , E_{Sig} e ΔL , che è la differenza delle traiettorie dei due raggi.

$$\Delta L = L_{Sig} - L_{Ref}$$

Il ritardo del raggio di riferimento diventa variabile nel momento in cui lo specchio viene spostato ed avrà un andamento come mostrato in figura 1.3.

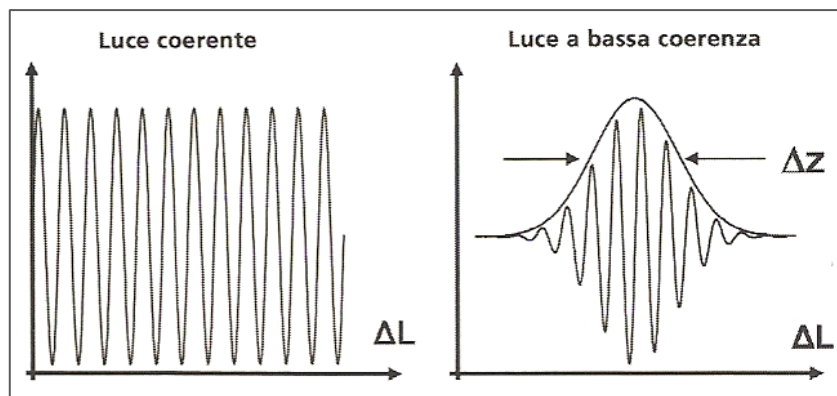


Figura 1.3: effetti dell'interferenza sull'intensità di emissione in funzione di ΔL .^[1]

Si può notare che il segnale di emissione oscilla tra un massimo ed un minimo ogni volta che la differenza di traiettoria delle due onde varia di una lunghezza d'onda, oppure quando la posizione dello specchio cambia di mezza lunghezza d'onda.

Se la lunghezza di coerenza della luce è elevata, si osservano oscillazioni di interferenza per tutti i ritardi relativi tra raggio di riferimento e quello di misurazione. Per un ottimale funzionamento di un OCT, al fine di misurare con precisione la posizione di una struttura in un tessuto, è necessario che la luce utilizzata abbia una lunghezza di coerenza breve, in modo che gli effetti di interferenza vengano osservati solo quando la differenza di lunghezza ΔL è minore della lunghezza di coerenza della luce.

Di conseguenza spostando opportunamente lo specchio e correlando il raggio riflesso con quello di riferimento, che ha un ritardo noto, l'interferometro è in grado di misurare il ritardo dell'eco e l'intensità della luce.

Qualitativamente il funzionamento del sistema può essere compreso immaginando che la fonte luminosa mandi brevi impulsi di luce; l'impulso luminoso riflesso dallo specchio di riferimento coinciderà con quello riflesso dal tessuto solo quando le distanze percorse saranno uguali. Questo causerà un'interferenza che verrà misurata dal rilevatore permettendo quindi di ricavare il ritardo esatto del riflesso.

1.3 Sensibilità

La qualità delle immagini prodotte da un OCT dipende da molti parametri, tra cui la sensibilità di rilevazione e la risoluzione.

Un'alta sensibilità è necessaria perché l'intensità delle riflessioni di alcune strutture, come per esempio quelli oculari, è molto debole e quindi risulta difficile rilevarle.

Per i tessuti invece otticamente più riflettenti la sensibilità è strettamente legata alla profondità esplorabile, poiché la luce incidente è ottenuta dall'assorbimento e dalla dispersione in questi tipi di tessuti.

Per garantire un'elevata sensibilità l'OCT utilizza una tecnica conosciuta come rilevazione ottica eterodina che assicura, nel caso in cui il segnale sia molto debole, un ottimo rapporto segnale rumore.

1.4 Risoluzione

Per quanto riguarda la risoluzione possiamo distinguere quella assiale e quella trasversale.

Le prima rappresenta la precisione con cui può essere misurata una distanza, ed è inversamente proporzionale all'ampiezza di banda della lunghezza d'onda ($\Delta\lambda$), come dimostra la seguente formula che definisce la risoluzione assiale:

$$\Delta z = (2\ln 2/\pi)(\lambda^2/\Delta\lambda)$$

Di conseguenza 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 onde luminose con lunghezza d'onda pari circa a 800 nm (prossime all'infrarosso) e un'ampiezza di banda della lunghezza d'onda di 20 nm. Tenendo conto di un mezzo di propagazione diverso dall'aria ne consegue una risoluzione assiale pari circa a 10 μm .

Tuttavia è possibile migliorare la risoluzione assiale dell'OCT usando nuove fonti luminose che hanno ampiezze di banda maggiori e lunghezze di coerenza inferiori.

Ad esempio è stato possibile ottenere risoluzioni assiali da 1 a 3 μm grazie all'utilizzo di fonti luminose laser a impulso rapido con ampiezze di banda da 100 a 200 nm.

La risoluzione trasversale invece deriva dai principi della microscopia ottica convenzionale e corrisponde all'ampiezza dello *spot* luminoso (Δx) risultante dalla focalizzazione del raggio esplorante:

$$\Delta x = (4\lambda/\pi)(f/d)$$

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

Quindi la larghezza dello *spot* Δx può essere regolata facendo variare opportunamente il diametro del raggio e la lunghezza focale, come mostra la figura 1.4.

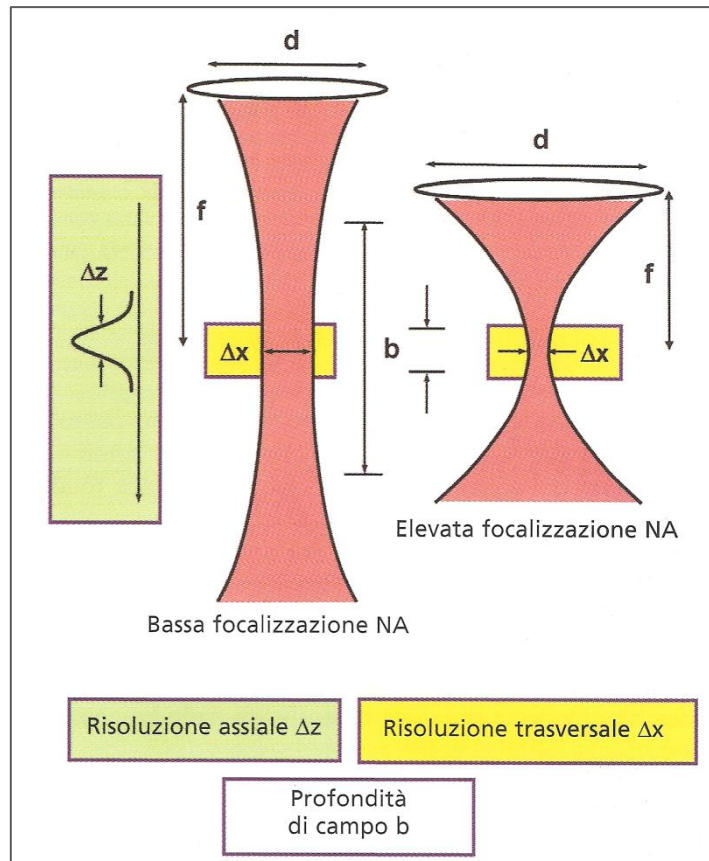


Figura 1.4: condizioni differenti di focalizzazione con spot luminosi di diametro grande e piccolo. ^[1]

Inoltre esiste un parametro confocale b che determina la profondità di campo:

$$b = \pi(\Delta x)^2 / 2\lambda$$

Minore è l'ampiezza dello spot luminoso, più ridotta ne 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.

In campo oftalmico, ad esempio per la retina, valori tipici del diametro dello *spot* sono attorno ai 20 μm .

Infine la figura 1.5 (raffigurante un epiglottide umano) mostra chiaramente la differenza di risoluzione dovuta alla diversa lunghezza d'onda usata: nella prima è di 1300 nm, nella seconda 850 nm, la terza invece mostra la corrispondente immagine istologica.

Si possono distinguere la cartilagine (c) e le ghiandole (g) molto meglio nella prima immagine grazie anche all'apertura focale e a una dispersione e assorbimento relativamente bassi.

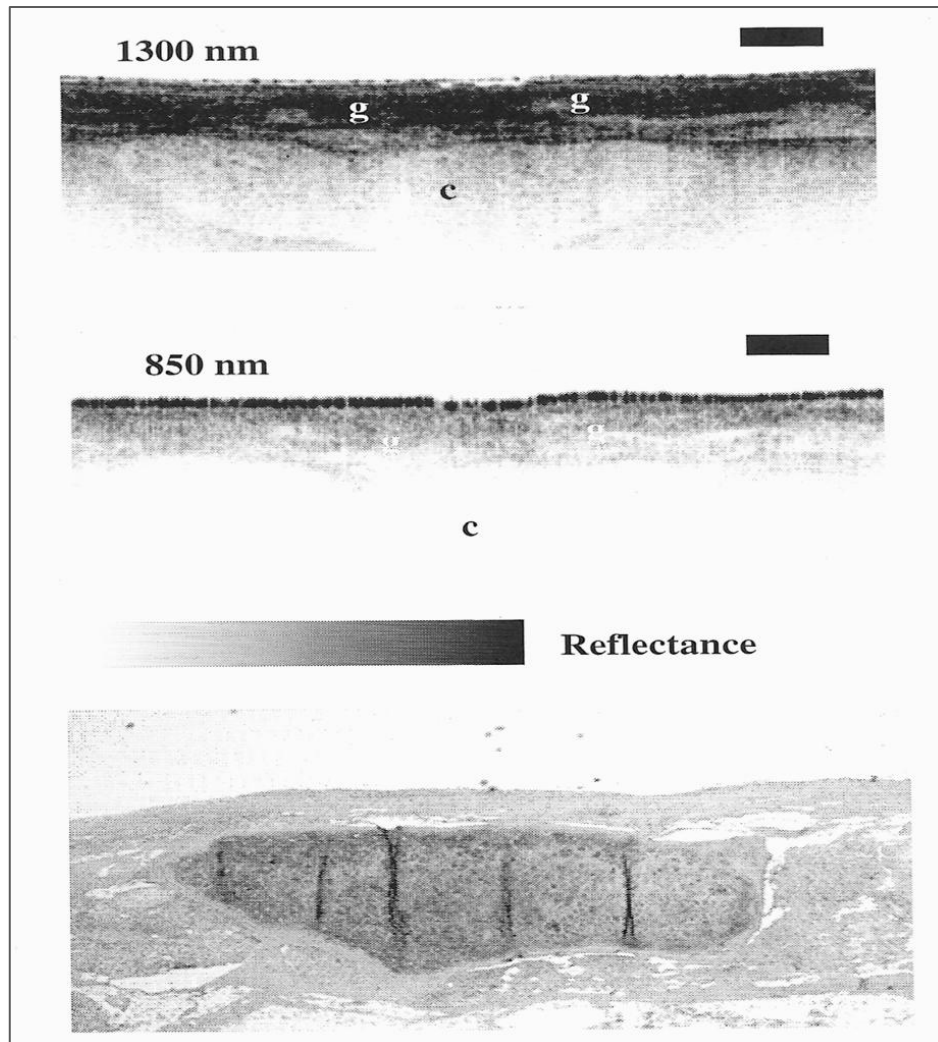


Figura 1.5: OCT di un epiglottide umano ad una lunghezza d'onda di 1300 nm (sopra), 850 nm (in mezzo) e la corrispondente immagine istologica (sotto).^[2]

2. Applicazioni

La maggioranza dei sistemi OCT è utilizzata in campo oculistico, e in tale ambito esiste un numero elevato di applicazioni che sono già attualmente in uso in clinica. Questo capitolo si focalizzerà principalmente in quelle che sono le applicazioni che possono raggiungere un'utilità clinica nel prossimo futuro in campi diversi da quello oftalmico:

- Sistemi cardiovascolari
- Sistemi muscolo-scheletrici
- Oncologia

Molte di queste applicazioni che si analizzeranno in seguito sono ancora oggetto di studio o comunque non hanno ancora ottenuto risultati certi.

Si analizzeranno inoltre i limiti riscontrati in questi studi e le prospettive di nuove metodologie che potranno essere introdotte grazie alla tomografia a coerenza ottica.

2.1 OCT nella medicina cardiovascolare

2.1.1 Sviluppi storici

Agli inizi degli anni '90 a far fronte al problema delle basse risoluzioni per la valutazione delle placche vascolari vulnerabili si posero tecniche ottiche di diagnostica per immagini che sembrarono promettere molto bene in questo tipo di applicazioni.

Particolare importanza venne posta nella tomografia a coerenza ottica che ottenne un gran successo inizialmente in ambito oculistico per l'analisi dei tessuti dell'occhio. Più difficile risultò la sua applicazione nei tessuti non trasparenti.

I tentativi di applicare questa tecnica all'*imaging* intravascolare incontrò non poche limitazioni:

- la profondità massima arrivava a circa 500 μm quando invece serviva qualche millimetro;
- i tempi di acquisizione di un immagine erano molto lenti (circa 40 secondi)
- non erano ancora utilizzati cateteri e endoscopi
- per verificare l'efficienza di questa tecnica risultava difficile registrare immagini a tali risoluzioni.

Nonostante tutto i recenti sviluppi tecnologici hanno permesso di applicare questa tecnica all'*imaging* intravascolare.

I primi risultati si ebbero nel 1996 quando si ottennero tramite OCT immagini che si dimostrarono fortemente correlate con le rispettive immagini istologiche. La figura 2.1 ne è un esempio.

In essa è rappresentata un'immagine OCT di una placca calcifica con un sottile strato di copertura intinale e la corrispondente immagine istologica. La risoluzione assiale è di 15 μm e la lunghezza d'onda utilizzata è di 1300 nm.

Inoltre è possibile notare una forte attenuazione del segnale all'aumentare della profondità, come anche la granulosità, fattori comuni a tessuti altamente diffondenti.

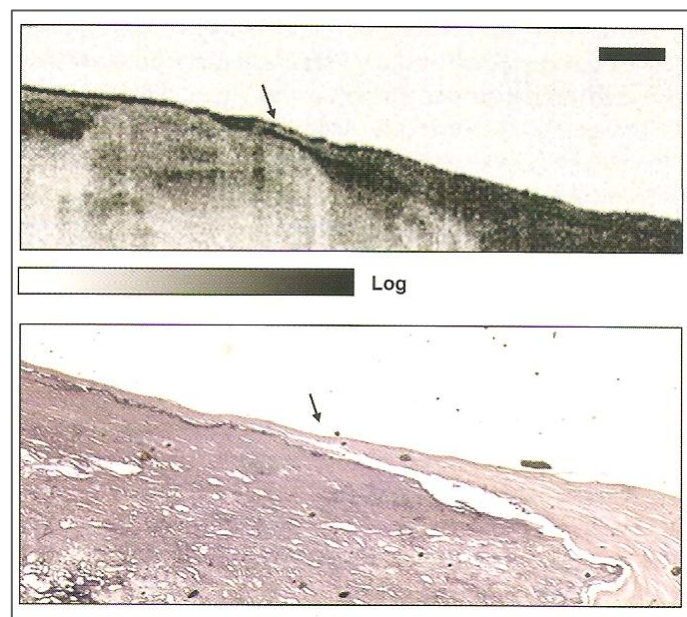


Figura 2.1: immagine OCT di una placca arteriosa in vitro (sopra) e la corrispondente immagine istologica (sotto).^[1]

Un primo paragone fu fatto con l'ultrasonografia intravascolare (IVUS), metodo invasivo di diagnostica per immagini che utilizza onde sonore ad alta frequenza trasmesse e registrate all'interno del vaso esaminato.

I primi risultati dimostrarono una netta superiorità di risoluzione dell'OCT: $16 \pm 1 \mu\text{m}$ contro i $110 \pm 7 \mu\text{m}$ dell' IVUS.

La figura 2.2 mostra il confronto di tre immagini OCT di arterie coronarie umane con le corrispondenti realizzate tramite IVUS a 40 MHz. E' evidente come nelle prime siano definite nettamente le placche, non visibili facilmente invece nelle seconde.

Il passo successivo fu quello di sviluppare nuove tecnologie per permettere lo studio dei vasi *in vivo*, tramite cateteri, sistemi ad alta velocità di acquisizione di immagini e sistemi elettronici per la riduzione dei rumori.

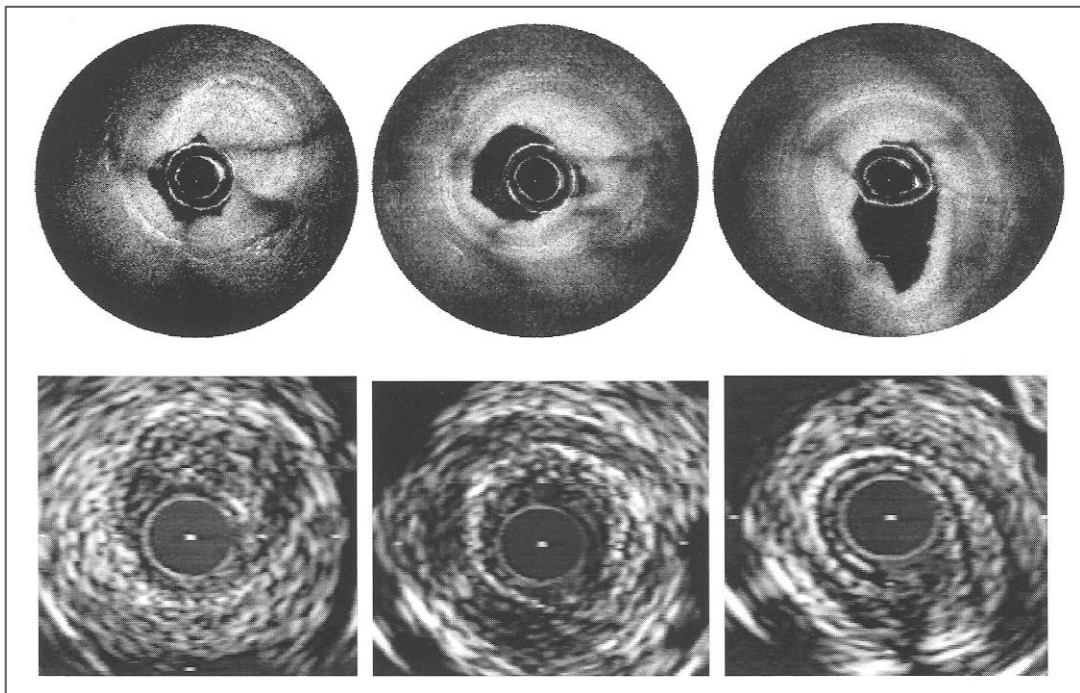


Figura 2.2: immagini OCT di arterie coronarie aterosclerotiche (sopra) e le corrispondenti immagini IVUS (sotto).^[2]

2.1.2 *In vivo imaging*

Uno dei vantaggi principali delle tecniche OCT è quello di poter effettuare l'analisi dei tessuti *in vivo*.

Le prime immagini realizzate *in vivo* furono quelle dell'aorta di un coniglio (figura 2.3), queste confermarono ancora una volta una risoluzione mai ottenuta prima in questo tipo di applicazioni.

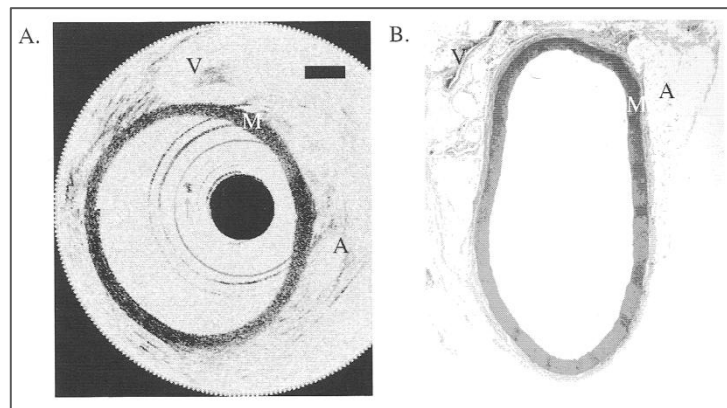


Figura 2.3: immagine OCT (sinistra) dell'aorta di un coniglio realizzata *in vivo* tramite catetere e in presenza di soluzione salina, a sinistra la corrispondente immagine istologica.^[2]

Un passo importante per il campo della diagnostica per immagini intravascolari umane *in vivo* fu la commercializzazione dell'OCT tramite LightLab Imaging nel Westford (MA).

Gli studi *in vivo* tramite OCT furono oggetto di diversi gruppi di studiosi, in particolare quello del Massachusetts General Hospital (MGH) il cui lavoro spaziò dalla valutazione della posizione degli *stent* coronarici all'analisi della morfologia delle placche.

Ad oggi tuttavia questi studi sono prevalentemente sperimentali e osservazionali, poiché non sono ancora chiari i marcatori delle placche che portano a sindrome coronaria acuta.

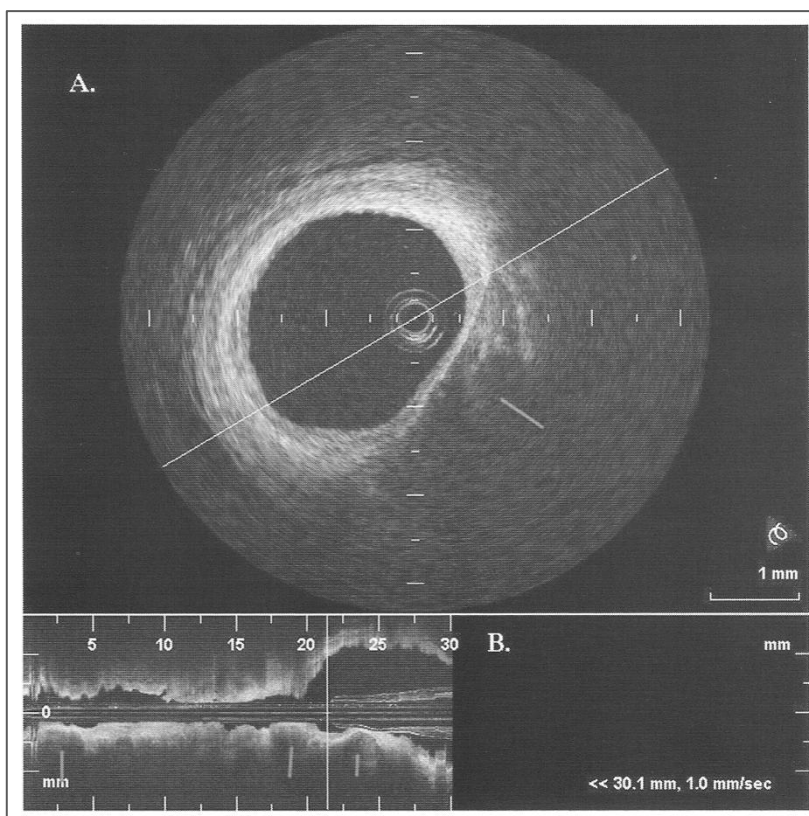


Figura 2.4: esempio di immagine in vivo di arteria coronaria umana. Sezione trasversale (A) e assiale (B) in cui le linee mostrano le placche sulla la lunghezza del catetere.^[2]

2.1.3 Limiti

L'esecuzione dell'OCT in ambito cardiovascolare presenta alcune problematiche di tipo tecnico. Prima tra queste l'elevata riflettanza dei globuli rossi nel sangue impedisce lo studio delle pareti vasali.

Inizialmente, per superare questo problema, si ricorse ad un rimedio che prevedeva iniezioni intermittenti di soluzione salina (per allontanare la parte corpuscolare del sangue). In questo modo però era possibile visualizzare solamente la lesione in esame, in pratica un segmento coronarico limitato.

Successivamente fu introdotta una tecnica oclusiva per l'acquisizione delle immagini che prevedeva l'introduzione della sonda OCT in un palloncino. Durante il gonfiaggio del pallone a bassa pressione veniva iniettata ancora una soluzione salina. Tutt'oggi questa tecnica è utilizzata dal sistema *LightLab* (LightLab Imaging Inc., MA, USA), anche se presenta delle notevoli limitazioni dal momento che sia l'infusione di soluzione salina che il gonfiaggio del palloncino, a seguito

dell'occlusione del vaso, possono evocare significativi periodi di ischemia nella zona del vaso in esame. Inoltre con l'uso del palloncino si rischia di modificare l'anatomia della parete vasale.

Riguardo invece la qualità delle immagini, questa può essere compromessa nei casi in cui il palloncino sia sottodimensionato e non blocchi in modo completo il passaggio del sangue.

Recentemente alcuni studi hanno permesso lo sviluppo di una tecnica non occlusiva. Grazie a diversi test su un modello animale è stato possibile valutare (tra tre tipi di soluzioni saline al diverso grado di viscosità, osmolarità e composizione elettrolitica) la migliore soluzione, avente il miglior rapporto tra la qualità dell'immagine e gli effetti collaterali permettendo lo studio di segmenti arteriosi di sufficiente lunghezza (29.8 ± 2.1 mm). L'efficacia della tecnica è stata confermata attraverso uno studio sull'uomo, senza riscontri di complicazioni e/o aritmie.

Un altro importante limite tecnico è la limitata capacità di penetrazione della luce attraverso le pareti arteriose, solitamente di 2-3 mm, una misura non sempre sufficiente ma migliorabile grazie ad espedienti quali: l'aumento del range dinamico, l'uso parallelo di più fasci di luce e varie tecniche di elaborazione delle immagini.

2.1.4 Potenzialità

ICTUS CEREBRALI

L'OCT gioca un ruolo fondamentale nell'identificazione delle placche che portano a ictus e come guida per procedure interventistiche sulla circolazione cerebrale. Le cellule cerebrali sono le più vulnerabili alla perdita di flusso sanguigno.

L'ictus (o infarto cerebrale) è la perdita di sangue in una specifica regione del cervello, che porta alla morte del tessuto colpito.

Le cause derivano da una serie di processi tra cui malattie dei vasi (osteosclerosi), embolia non aterogenica, riduzione del flusso sanguigno al cervello (ischemia) o rottura di un vaso (ictus emorragico).

In questo caso il cervello provvede a proteggersi attraverso la formazione di una cicatrice fibroglotica.

I sintomi sono diversi a seconda della parte del cervello colpita; in genere in un attacco ischemico transitorio (TIA) e generalmente si risolvono entro 24 ore, tuttavia hanno un'alta incidenza di progressione in ictus ischemici, se non trattati in tempo. Probabilmente l'applicazione più importante dell'OCT in questo ambito (prevenzione dell'ictus) è la valutazione ed il trattamento delle placche carotidee e la prevenzione delle embolizzazioni di siti distali.

IPERTENSIONE POLMONARE

L'ipertensione polmonare è definita come l'aumento della pressione sistolica polmonare sopra i 30 mmHg o l'aumento di quella media sopra i 20 mmHg. Essa è associata ad un alto tasso di mortalità a causa di insufficienza ventricolare destra, aritmie, polmonite, tromboembolia.

L'ipertensione polmonare è un'altra area in cui il potenziale dell'OCT può avere forte impatto clinico in quanto l'alta risoluzione permette di superare i limiti che hanno le normali tecniche di acquisizione.

FIBRILLAZIONE ATRIALE

La fibrillazione atriale è la più comune forma di aritmia e la sua incidenza aumenta con l'età dell'individuo.

Anche in questo ambito l'OCT può giocare un ruolo fondamentale sia come guida nell'ablazione della vena polmonare che nelle terapie per il trattamento della fibrillazione atriale.

2.2 OCT nei sistemi muscolo-scheletrici

2.2.1 Osteoartriti

L'osteoartrite è una delle più comuni malattie ed è la più frequente causa di disabilità negli Stati Uniti. La sua cura potrebbe essere una delle più grandi innovazioni per il sistema sanitario con un conseguente miglioramento della qualità della vita.

Il disturbo colpisce principalmente ginocchio, anca, vertebre articolazioni distali (dita). Il segno distintivo della malattia è la degenerazione della cartilagine.

I fattori di rischio per l'osteoartrite comprendono: età, sesso, rapporto peso forma, squilibri muscolari, andatura anomala, lesione ad un giunto, e probabilmente fattori genetici.

Esiste quindi bisogno concreto di una tecnica di *imaging* per identificare precocemente la malattia o lievi cambiamenti in modo da verificare l'efficacia delle terapie. Ciò non è possibile con le normali tecniche di diagnostica.

2.2.2 Attuali modalità di *imaging*

Recenti studi su animali hanno ottenuto risultati positivi sulla progressione del danno della cartilagine nelle osteoartriti. Tali risultati però non possono essere applicati nell'uomo dato che non vi sono attualmente tecniche di *imaging* efficaci per una valutazione accurata dei cambiamenti della cartilagine e della sua progressione in tutte le fasi.

I metodi non invasivi (o mini invasivi) usati finora nella valutazione delle patologie della cartilagine sono svariati: radiografia, ecografia, TC, la risonanza magnetica (MRI) e l'artroscopia. Nessuna di queste però si è dimostrata sufficientemente efficace nella valutazione ad alta risoluzione della cartilagine.

La **radiografia convenzionale** rappresenta il metodo più comune per la valutazione dell'integrità delle articolazioni, anche se in grado di identificare soltanto sostanziali modifiche delle articolazioni.

La risoluzione relativamente bassa e l'incapacità di valutare molte aree della superficie della cartilagine, e le modifiche micro strutturali come la variazione del

contenuto d'acqua e la degradazione del collagene, impediscono la sua generale applicazione sulla valutazione precoce dei cambiamenti della cartilagine. Un tentativo si è fatto con tecniche di radiografia digitale e microfocale ma con scarso successo.

Anche l'**ecografia** a "bassa frequenza" (< 10 MHz) ha avuto scarsi successi a causa della risoluzione relativamente bassa (500 µm) e dell'accesso limitato solamente a poche aree delle articolazioni.

L'*imaging* intrarticolare ad alta frequenza ha il vantaggio di migliorare sensibilmente la risoluzione (attualmente sonde da 25 MHz hanno una risoluzione di circa 125 µm). Tuttavia gli ultrasuoni ad alta frequenza richiedono la presenza di un supporto di trasduzione, hanno una penetrazione limitata e trasduttori sono relativamente grandi (richiedono una sala operatoria). Inoltre le applicazioni con produttore a 40 MHz non otterranno una risoluzione migliore di 80-90 µm e l'attenuazione del calcio diventa un problema.

L'*imaging* a **risonanza magnetica** (MRI) rappresenta infine un valido strumento per la valutazione delle anomalie articolari, dimostrando maggiore sensibilità rispetto la TAC o la radiografia nella valutazione di modifiche osteoartritiche come sclerosi subcondrale, degenerazione del menisco e o osteofitosi.

L'MRI ha avuto un certo successo nell'identificazione dell'assottigliamento della cartilagine e la degradazione del collagene.

Nonostante i vantaggi citati precedentemente, fattori come costo elevato (soprattutto se è richiesto *screening* in serie), risoluzione relativamente bassa e lunghi tempi di acquisizione hanno ostacolato il suo utilizzo. Pertanto considerando tutti i vari aspetti si può affermare che la risonanza magnetica è una tecnica eccellente per dare un quadro completo del giunto ma non certo efficace come monitoraggio di routine.

2.2.3 *Imaging in vitro e in vivo*

In questo contesto il ruolo dell'OCT è triplice:

- valutazione del grado dell'osteoartrite;
- valutazione dell'efficacia dei trattamenti delle osteoartrite con agenti condroprotettivi;
- valutazione dell'efficacia delle tecniche di riparazione della cartilagine.

Di seguito vengono presentate alcune immagini che dimostrano le potenzialità dell'OCT.

La figura 2.5 rappresenta una rotula umana sana in cui è ben visibile l'interfaccia osso(b)-cartilagine(c) (la larghezza è definita a 10 μm di risoluzione).

La figura 2.6 invece mostra una cartilagine articolare patologica diventata fibrocartilagine, una forma di degradazione della cartilagine nelle osteoartriti, le bande fibrose (F) sono infatti ben delineate.

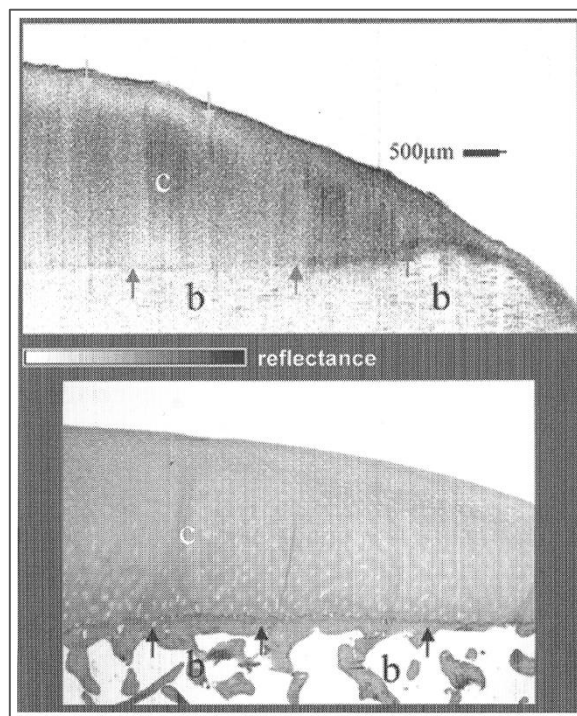


Figura 2.5: immagine OCT (sopra) di cartilagine umana e relativa istologica (sotto).^[2]

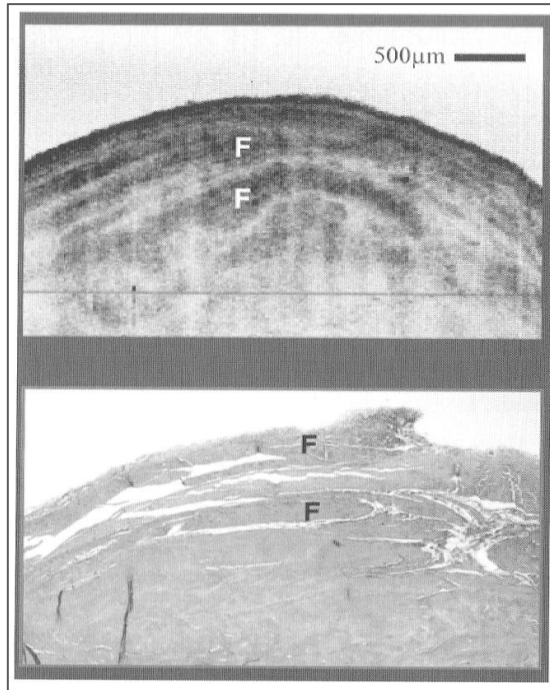


Figura 2.6: immagine OCT di fibrocartilagine. ^[2]

L'immagine 2.7 rappresenta un esempio di immagine ottenuta con OCT sensibile alla polarizzazione (PS-OCT), una tecnica che prevede la polarizzazione di segnali luminosi negli algoritmi di elaborazione per ottenere immagini con superiore contrasto visivo.

Questa tecnica è adatta a studiare l'organizzazione di tessuti come il collagene.

A sinistra c'è il tessuto normale, a destra quello osteoartritico. Sono presenti due stati di polarizzazione, nel tessuto malato la sensibilità alla polarizzazione si perde, invece nel tessuto normale invece l'effetto della polarizzazione è indicato da una serie di bande causate dalla rotazione di polarizzazione dovuta alla birifrangenza dei tessuti.

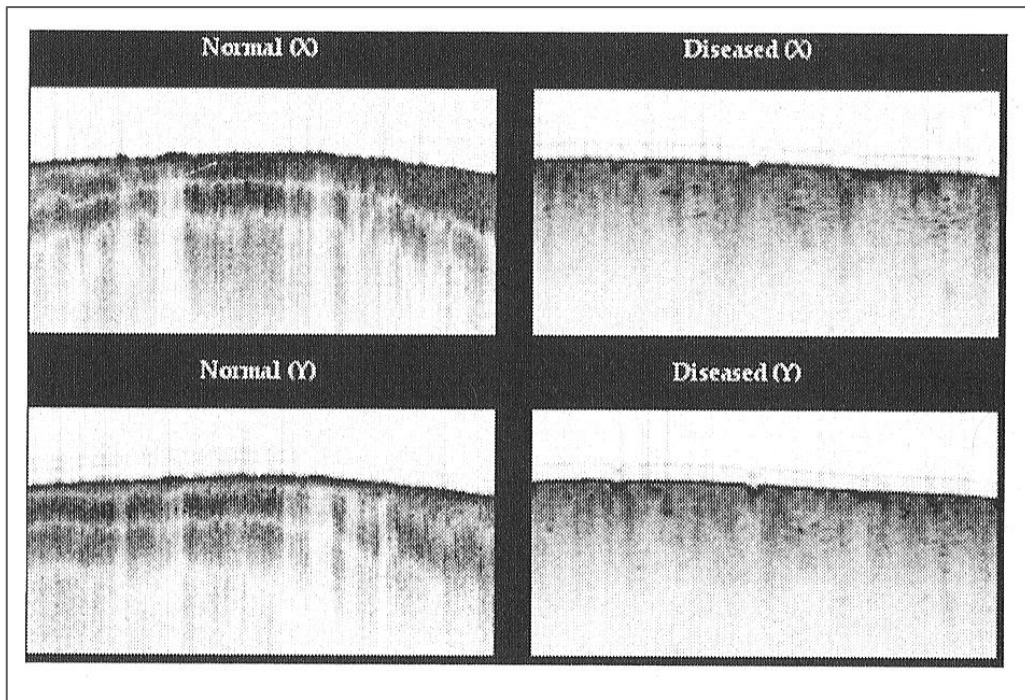


Figura 2.7: immagine di cartilagine ottenuta tramite PS-OCT. ^[2]

La figura 2.8 prova i cambiamenti dovuti alla sensibilità a diversi stati di polarizzazione (a,b,c) e la sezione macchiata *picrosirius* (e) evidenzia l'organizzazione del collagene.

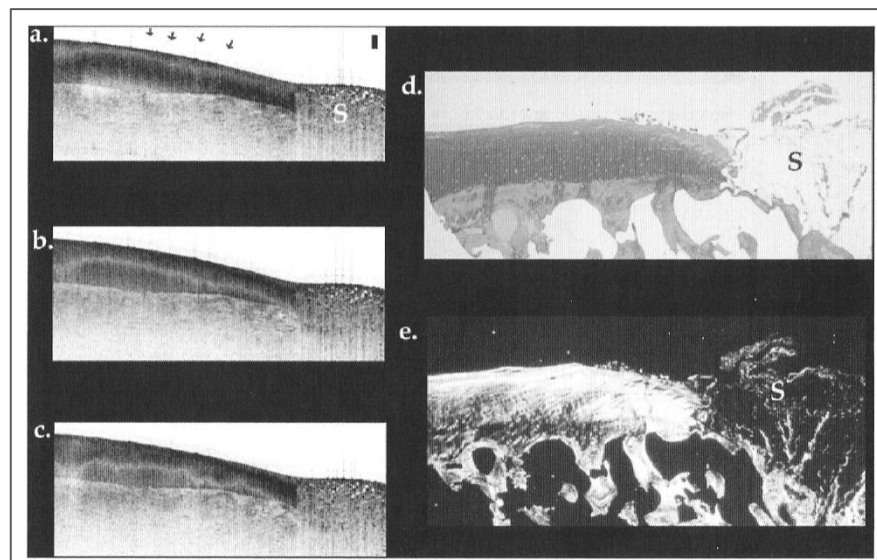


Figura 2.8: sensibilità della cartilagine a PS-OCT, in 3 diversi stati di polarizzazione (a,b,c). ^[2]

Nell'immagine OCT in figura 2.9 (che mostra la cartilagine malata) si nota che i cambiamenti sono più irregolari e, in accordo con questa, anche la sezione macchiata *picrosirius* è irregolare.

Ciò è coerente con l'ipotesi che l'OCT possa essere utilizzato per individuare precocemente le osteoartriti, identificando così la disorganizzazione del collagene.

Attraverso vari studi e test su campioni in vitro è stata valutata la correlazione tra sensibilità di polarizzazione dell'OCT e la birifrangenza delle macchie *picrosirius*.

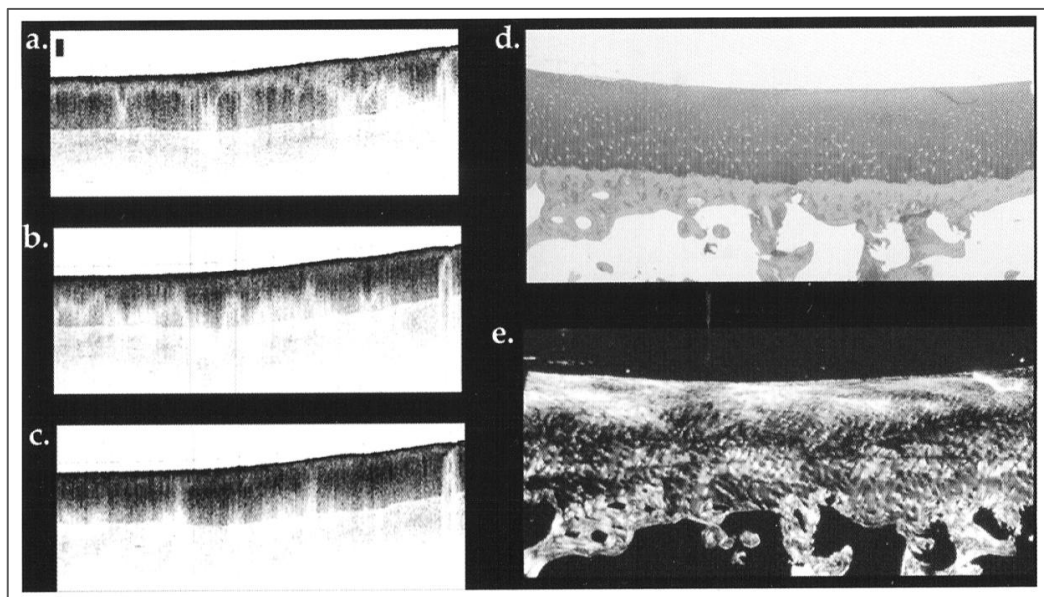


Figura 2.9: immagine PS-OCT di cartilagine malata.^[2]

Infine nella figura 2.10, che mostra un ginocchio osteoartritico, si possono distinguere il tessuto sano (a sinistra) e la parte malata in cui le sezioni sono meno dense e la birifrangenza è sostanzialmente più debole.

Studi clinici sono tutt'ora in corso per esaminare la possibilità che l'OCT possa ottenere in questo ambito esiti a lungo termine (tramite procedure micro-awl e meniscectomia). L'OCT rappresenta quindi un potente strumento per le tecnologie di *imaging* del sistema muscolo-scheletrico, con innumerevoli applicazioni oltre a quelle viste per le osteoartriti.

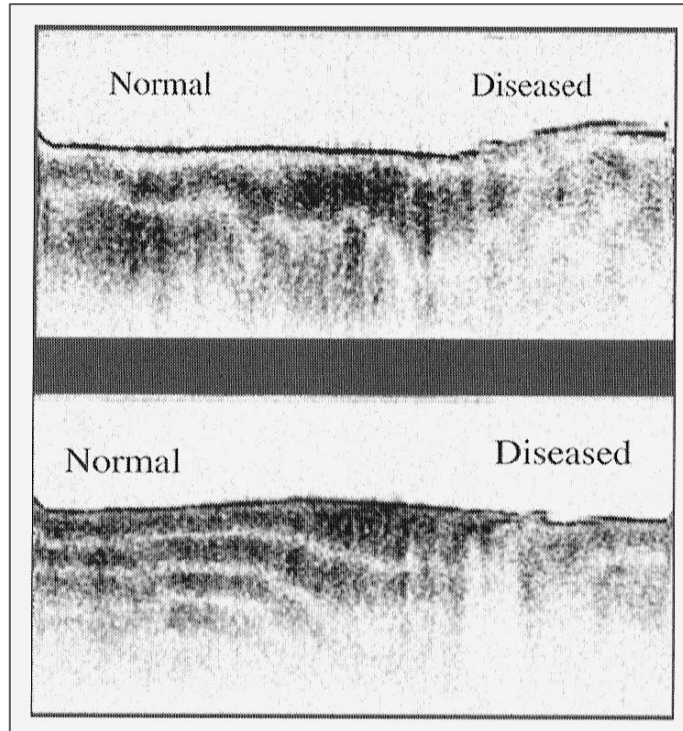


Figura 2.10: immagine OCT in vivo di cartilagine di un ginocchio, parte sana (a sinistra) e malata (a destra).^[2]

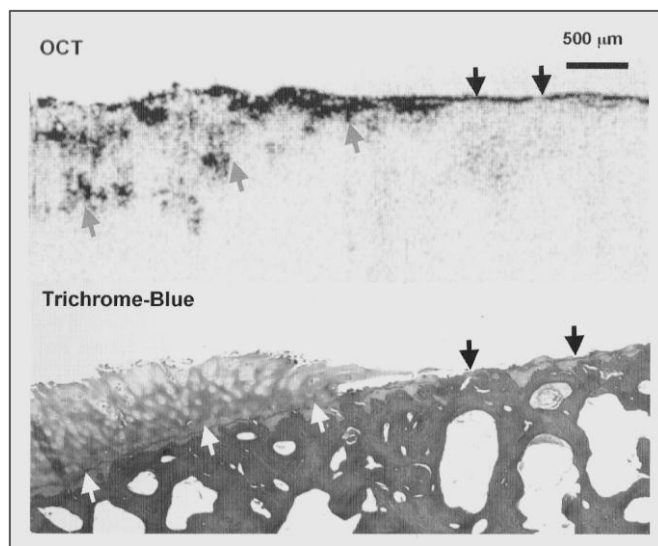


Figura 2.11: immagine ginocchio fortemente osteoartritico, la cartilagine è concentrata sulla sinistra in modo altamente disomogeneo, sulla destra è assente.^[2]

2.2.4 Altre potenziali applicazioni

Nel campo delle malattie muscolo scheletriche il numero delle potenziali applicazioni dell'OCT è enorme, ad esempio può risultare utile come guida nella chirurgia spinale, nella riparazione di nervi e nella valutazione dei margini di tumori. Inoltre esiste l'osteogenesi imperfetta (OI), un disturbo raro ma con effetti devastanti sul paziente. L'OI è una malattia genetica che rende le ossa molto fragili provocandone frequenti fratture e, nel peggiore dei casi, portando il paziente addirittura alla morte.

In generale la terapia medica non ha successo tuttavia recentemente per questa malattia sono stati usati i difosfati, utilizzati normalmente per trattare l'osteoporosi.

Questi potenti farmaci anti riassorbimento hanno dimostrato una certa efficacia nei casi più gravi. Tuttavia le preoccupazioni per gli effetti collaterali sono notevoli, soprattutto effetti a lungo termine di scarsa crescita dell'osso e diminuzione del rimodellamento osseo. È importante dunque valutare con attenzione la possibilità di applicare questa terapia a quei pazienti che presentano sintomi meno gravi.

La possibilità di quantificare lo stato di collagene in questi pazienti con OI, grazie alla tecnologia OCT, può migliorare sostanzialmente la valutazione del medico per l'utilizzo di questi farmaci potenzialmente pericolosi.

2.3 OCT in oncologia

Un tumore (o neoplasia) è stato definito dall'oncologo R.A. Willis:

*“ una massa anormale di tessuto che cresce in eccesso e in modo scoordinato rispetto ai tessuti normali, e persiste in questo stato anche dopo la cessazione degli stimoli che ne hanno indotto il processo ”.*¹

Ciò che distingue un tumore maligno da uno benigno è la capacità di dare metastasi, cioè spostarsi e invadere tessuti anche distanti attraverso il sistema sanguigno e linfatico, formando nuovi siti tumorali.

¹ CIT. IN *ROBBINS BASIC PATHOLOGY*, 8ª EDIZIONE, SAUNDERS/ELSEVIER 2007, CAP. 6

La causa principale è un'alterazione anomala del proprio patrimonio genetico che provoca l'attivazione di fattori proto-oncogeni e l'inattivazione dei geni oncosoppressori.

I tessuti più colpiti sono quelli soggetti ad un continuo rimodellamento (ad esempio il tratto gastrointestinale).

L'identificazione precoce di mutamenti maligni resta uno dei maggiori obiettivi degli studi clinici, in quanto la maggior parte dei tumori, quando sono in fase di metastasi, diventano incurabili.

A questo scopo la biopsia escissionale e la citologia hanno conseguito risultati significativi nella gestione di molte neoplasie come il cancro cervicale (collo dell'utero) e della pelle. Talvolta la diagnosi basata su queste tecniche risulta inefficace a causa ad esempio di errori di campionamento, che possono portare all'identificazione di falsi negativi.

Una tecnologia in grado di eseguire una biopsia ottica, che fornisca immagini con una risoluzione paragonabile a quella istopatologica senza il bisogno di rimuovere parti di tessuti, potrebbe migliorare notevolmente la capacità dei medici di identificare tumori in fase in cui vi è ancora la possibilità di trovare una cura efficace.

Sostanzialmente questo è il tipo di approccio nell'applicazione di sistemi OCT nella diagnosi precoce di modificazione maligne nei tessuti, nella valutazione dei margini del tumore durante la resezione chirurgica e nel verificare l'efficacia delle terapie.

2.3.1 Cancro esofageo

E' una forma di cancro molto aggressiva, con elevata probabilità di morte.

Ne esistono di due tipi: adenocarcinoma, che colpisce l'ultimo tratto del canale ed è originato dalle ghiandole della mucosa, e il carcinoma a cellule squamose, che è quello più comune che si sviluppa nella parte superiore e centrale del canale a carico delle cellule di rivestimento.

Tra le cause principali ci sono fattori genetici, alcol e tabacco, dieta ricca di grassi e l'infiammazione cronica della mucosa che riveste l'esofago. Quest'ultima è causata da un reflusso di succhi gastrici acidi che provoca, a lungo termine, una sostituzione

del normale epitelio squamoso dell'esofago con epitelio colonnare metaplastico dal quale poi si può sviluppare il tumore.

Questa situazione prende il nome di "esofago di Barrett" ed è considerata una vera e propria precancerosi.

Il ruolo dell'OCT è stato quello di consentire di riconoscere le normali cellule squamose da quelle di Barrett, tuttavia l'identificazione di displasia è molto più complessa, sia tramite immagini OCT sia attraverso istopatologia.

Un'ulteriore utilità dell'uso di un catetere OCT introducibile dal naso o dalla cavità orale è quella di evitare l'uso di un endoscopio e quindi dell'anestesia generale.

La dimensione dell'esofago però rende meno semplice questo tipo di procedure, le quali necessitano della progettazione di cateteri speciali non ancora sviluppati.

Si può dire allora che in questo caso l'OCT non ha ancora assunto un ruolo ben definito ma rappresenta una tecnologia in via di sviluppo e perfezionamento per la diagnosi precoce del cancro esofageo.

2.3.2 Cancro gastrico

Il tumore dello stomaco è provocato da una massa di cellule in crescita incontrollata che ha origine dal suo rivestimento interno.

Purtroppo i sintomi ad esso legati sono molto simili a quelli di una gastrite o di un'ulcera gastrica, quindi se le cure per questi ultimi non fanno alcun effetto è necessario eseguire una gastroscopia per valutare lo stato della mucosa interna dell'organo.

Anche in questo caso l'OCT gioca un triplice ruolo: identificare la malattia alla sue fasi iniziali, valutarne i margini e guidare l'operazione di resezione chirurgica.

Fondamentale è la possibilità di riconoscere la cosiddetta "*early gastric cancer*", cioè una fase precoce del tumore che colpisce solo mucosa e sottomucosa (i primi due strati dei tessuti dell'organo). L'OCT è in grado di fornire immagini in cui si distinguono queste due parti del tessuto, immagini che con un esame endoscopico attualmente non si è in grado di ottenere.

2.3.3 Cancro alla vescica

La tipologia di cancro alla vescica più frequente è il cosiddetto carcinoma a cellule di transizione che colpisce per lo più le pareti delle cellule dell'organo.

La cistoscopia rappresenta uno degli standard attuali per la diagnosi del tumore alla vescica e consiste nella visualizzazione diretta della superficie della vescica attraverso fasci di fibre ottiche. Questo esame però non è in grado di riconoscere alcune patologie clinicamente rilevanti che possono sembrare benigne nella loro fase iniziale, inoltre non consente di perlustrare gli strati più interni e quindi di riconoscere eventuali estensioni interne del tumore.

Altre tecniche come risonanza magnetica e TC non si sono dimostrate maggiormente utili a causa della loro relativamente bassa risoluzione (>500 µm), non in grado di visualizzare strutture interne spesse anche fino a 100 µm. Medesimo risultato lo si ottiene con l'ecografia ad alta frequenza (20MHz) con la quale si è ottenuta una risoluzione di circa 150 µm.

Sono stati fatti diversi studi *in vitro* che *in vivo* attraverso la vescica di un coniglio. Questi hanno confermato nuovamente le limitazioni degli attuali sistemi endoscopici, in particolare l'*imaging* attraverso cateteri si è rivelato di scarsa utilità a causa delle grandi dimensioni della vescica.

L'utilizzo dell'OCT è stato combinato con metodi a fluorescenza, tuttavia oggi non si è ancora stati in grado di definire un suo ruolo ben preciso.

2.3.4 Cancro ai polmoni

Il tumore ai polmoni è la prima causa di morte nei paesi industrializzati e rappresenta il 20% dei tumori maligni nelle persone di sesso maschile.

Una delle cause più frequenti è il fumo delle sigarette, che contiene circa 60 cancerogeni certi ed è responsabile di circa il 90% dei tumori polmonari mortali nei paesi sviluppati. Inoltre la sua azione coinvolge anche il sistema immunitario, diminuendo la capacità dell'organismo di controllare e uccidere cellule neoplasiche.

Altre cause sono il radon, gas generato dai processi di decadimento del radio, l'amianto, inquinamento atmosferico, virus e predisposizione genetica.

Gli esami per la diagnosi precoce del carcinoma polmonare sono, innanzitutto l'esame istologico, fondamentale per poter impostare il programma della terapia, poi radiografia e TAC del torace sono altrettanto importanti, nei casi dubbi si adottano anche metodi più invasivi e fastidiosi come la broncoscopia.

Negli ultimi anni si è cercato di introdurre metodologie di imaging OCT anche in questo ambito clinico.

La figura 2.12 rappresenta dei bronchi in cui si può osservare una buona correlazione tra immagine istologica e quella OCT, oltre alla distinzione della mucosa (l), cartilagini (C) e ghiandole (g).

Nella figura 2.13 (a) è rappresentata l'immagine di un carcinoma a cellule squamose ricavata tramite broncoscopia (il tumore è indicato dalla lettera A), in (b) invece la corrispondente istologia. Quest'ultima dimostra nuovamente la buona correlazione con le immagini OCT, confermando ancora una volta il ruolo potenzialmente importante nella diagnosi precoce di tumori e nello studio dell'evoluzione delle displasie.

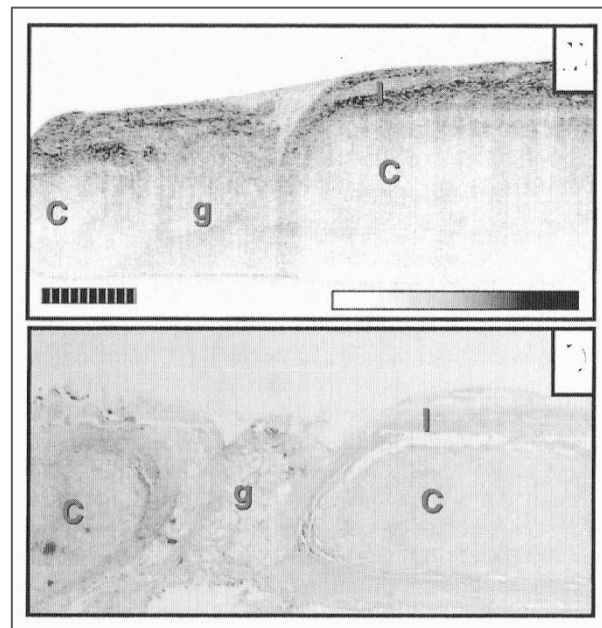


Figura 2.12: imaging OCT in vivo di epiglottide umana(sopra) e relativa immagine istologica(sotto).^[2]

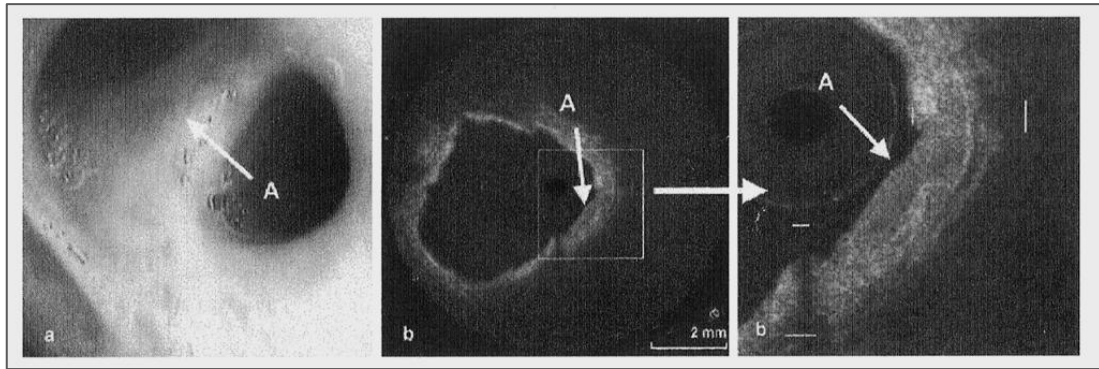


Figura 2.13: imaging in vivo di carcinoma a cellule squamose. ^[2]

2.3.5 Cancro cervicale

Il cancro cervicale colpisce la cervice, o collo dell'utero, ed è il terzo tipo di tumore che colpisce le donne. La maggior parte dei tumori di questo tipo si evolve molto lentamente e iniziano con una displasia pre-cancerosa, fase che può essere rilevata da un Pap test e che è curabile.

Per questo motivo il ruolo dell'OCT nello screening generale per il cancro cervicale è molto improbabile, tuttavia il Pap test ha dei limiti intrinseci ad esempio la sua sensibilità, valutata circa del 60-70%, ciò significa che da un esame possono presentarsi falsi positivi o anche falsi negativi. In questo caso è possibile utilizzare l'OCT come ulteriore esame di approfondimento e controllo.

La figura 17.5 è il risultato di uno studio in vitro della fase iniziale della malattia (A), in cui si nota lo strato epiteliale irregolare e l'ispessimento della membrana basale. Nella parte (B) invece è rilevata la fase in cui il cancro è diventato più invasivo, gli strati sono assenti e hanno un aspetto eterogeneo, inoltre la membrana basale è indistinguibile.

Di maggiore interesse sono stati gli studi delle immagini in vivo che hanno dimostrato una tendenza all'irregolarità e un ispessimento epiteliale nei tessuti affetti da una fase invasiva della malattia (come accadeva per le analisi fatte in vitro). Le figure 2.14 e 2.15 ne sono degli esempi.

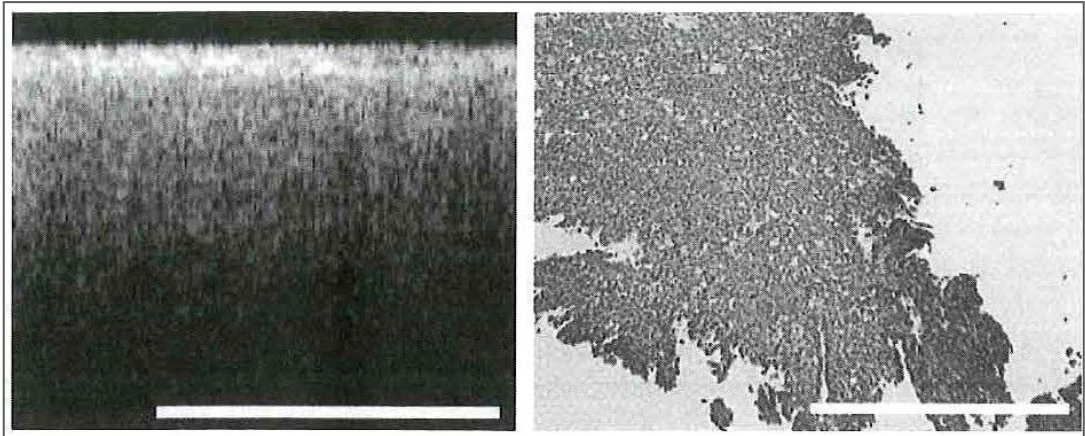


Figura 2.14: imaging in vivo di carcinoma invasivo della cervice. ^[2]

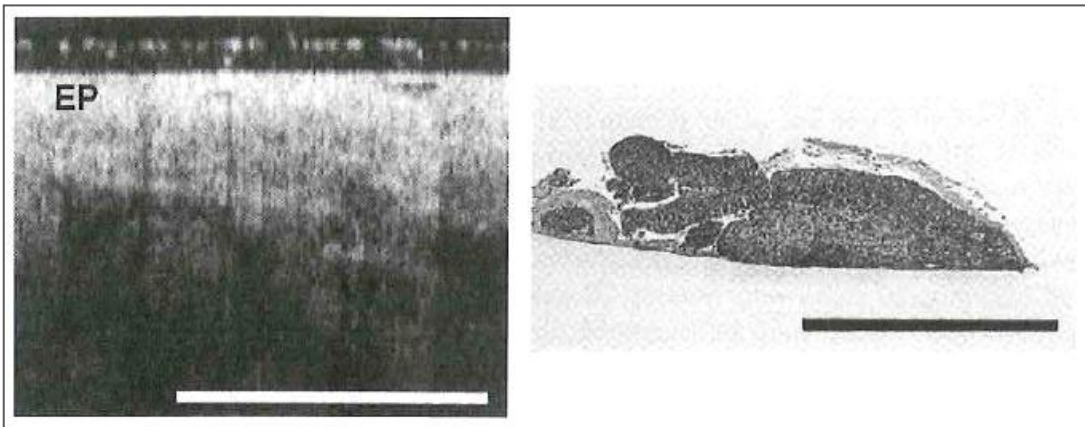


Figura 2.15: imaging in vivo di carcinoma. (EP) indica uno strato squamoso di epitelio. ^[2]

3. Conclusioni

Partendo dai principi fisici su cui si basa la tomografia a coerenza ottica, si è arrivati a descrivere in maniera semplificata in che modo tale tecnica possa arrivare a risoluzioni così alte.

Nel capitolo precedente si sono descritti gli studi attuali e le applicazioni in cui, grazie all'OCT, si sono ottenuti dei risultati promettenti nel campo dell'*imaging* diagnostico.

Poiché si tratta di una tecnologia relativamente nuova ed in continuo sviluppo, gli argomenti trattati talvolta non mostrano degli esiti certi o completamente positivi ma premettono delle limitazioni intrinseche che necessitano di essere studiate e analizzate nel dettaglio per consentire la progettazione di nuovi strumenti in grado di superare queste problematiche.

E' verosimile infatti che nel prossimo futuro l'OCT possa cambiare drasticamente il modo di esplorare e trattare molte patologie, grazie alla sua risoluzione *in vivo* molto maggiore di ogni altra tecnica diagnostica. Ciò comunque non esclude l'utilizzo delle attuali tecnologie ma prevede l'integrazione dell'OCT alle tecniche già esistenti per poter ottenere migliori risultati.

Ciò deve essere uno stimolo per la ricerca futura affinché si possa arrivare a definire con maggiore precisione l'utilità finale dell'OCT nel campo dell'*imaging* biomedico.

Bibliografia - Sitografia

- [1] Joel S. Schuman, Carmen A. Puliafito, James C. Fujimoto. “*Tomografia a coerenza ottica delle patologie oculari*”. Verduci Editore , 2006
- [2] Mark E. Brezinski. “*Optical coherence tomography: principles and applications*”. Elsevier , 2006
- [3] John G. Webster. “*Strumentazione Biomedica. Progetto ed applicazioni*”. EdiSES, 2010
- [4] http://www.giornaledicardiologia.it/allegati/00579_2010_10/fulltext/10-09_03%20644-649.pdf
- [5] <http://www.airc.it>
- [6] <http://www.medscape.com>
- [7] <http://www.news-medical.net>
- [8] http://newton.ph.unito.it/~midolo/lab_zosi.pdf