

Imaging in Oftalmologia: principi di fisica e prospettive future

di Amedeo Lucente

Introduzione

L'imaging in oftalmologia ha avuto notevoli sviluppi negli ultimi vent'anni ed è sempre più presente e indispensabile nella diagnosi e follow-up delle malattie oculari. Il termine "imaging" è stato inventato qualche anno fa negli Stati Uniti per definire al meglio l'evoluzione dei processi di produzione e riproduzione dell'immagine. Identifica l'integrazione tra tutti gli elementi, prodotti, tecnologie e servizi che portano alla realizzazione di una *comunicazione visiva*, e integra insieme fotografia, informatica, grafica, sviluppo, stampa. Nella varietà delle sue possibilità tecnologiche, la tomografia ottica a radiazione coerente si è imposta come la più promettente e duttile al fine della migliore risoluzione tissutale, in modalità lineare B-scan e tridimensionale 3D. Stupisce l'enorme accelerazione e straordinaria evoluzione che questa tecnologia ha avuto in pochi anni, se pensiamo alla diffusione degli OCT e alla loro capacità di fornire informazioni, indispensabili nella corrente pratica clinico-chirurgica [1]. Le tre modalità d'imaging utilizzate in oftalmologia, le fundus camere, lo SLO lo Scanning Laser Ophthalmoscope e gli OCT, hanno avuto tempi e differenti modalità di sviluppo e diffusione. L'utilizzo e l'implementazione nei device delle Ottiche Adattive AO hanno reso possibile visualizzare dettagli morfologici sempre più vicini alle dimensioni cellulari, e intuire relazioni tra struttura e funzione. Quest'articolo cercherà di tracciare i possibili sviluppi dell'imaging in oftalmologia, accennando ai principi base di ottica fisica, necessari per una piena e più completa loro comprensione.

Fotografia e SLO

La fotografia con fundus camera ha oltre un secolo di vita. L. Howe ne dà una descrizione completa in occasione della riunione della Società Transamericana nel 1887 con il suo articolo "Photographs of the interior of the eye", anche se S. Duke-Elder riferisce che "The first co-

HISTORY OF IMAGING: A FLOOD OF INNOVATION

1851	Hermann von Helmholtz. (direct ophthalmoscope)
1871	Adolf von Bayer. (Nobel Prize in chemistry 1905, synthesized fluorescein dye)
1887	L. Howe "Photographs of the interior of the eye". Trans. Amer. Ophth. Soc. 1887
1915	Francis A. Welch and William Noah Allyn. (World's first hand-held direct illuminating ophthalmoscope)
1925/1932	Carl Zeiss by J.W. Nordenson. (Modern ophthalmoscopy and photography)
1930	Stroboscopic flash by Harold Edgerton. "The man who stopped time"
1957	Confocal microscopy by Marvin Minsk. (Father of artificial intelligence)
1961	Fluorescein angiography (FA) by Harold Novotny and David Alvis
1975	The digital camera Kodak Laboratories by Steven Sasson
1979	Scanning Laser Ophthalmoscopy SLO by Robert H. Webb
1987	Digital photography integrated into a fundus camera by Topcon
1991	Optical Coherence Tomography OCT by D. Huang, J. G. Fujimoto et al
1992	First angiographer using cSLO (HRA Classic) by Heidelberg Engineering

loured printed illustration of the fundus of the eye which appeared in the thesis of Adrian Christopher Van Trigh (1825-64), *Dissertatio Ophthalmologica Inauguralis de Speculo Oculi in 1853...* [2,3]. La prima fundus camera fu realizzata da Carl Zeiss e J.W. Nordensen nel 1926 con un'apertura angolare di 20°, aumentati dopo alcuni

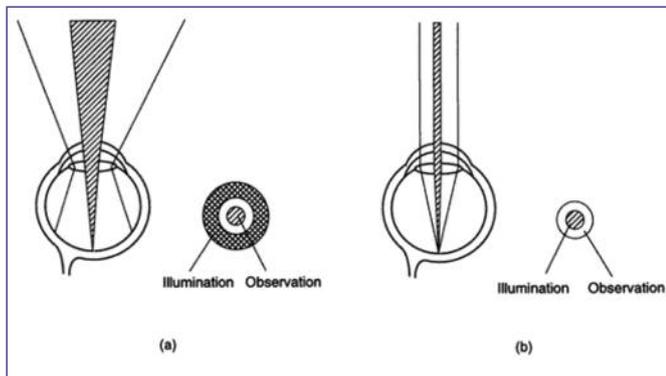


Fig. 1 - Differenza del percorso ottico nella fotografia da flash e SLO

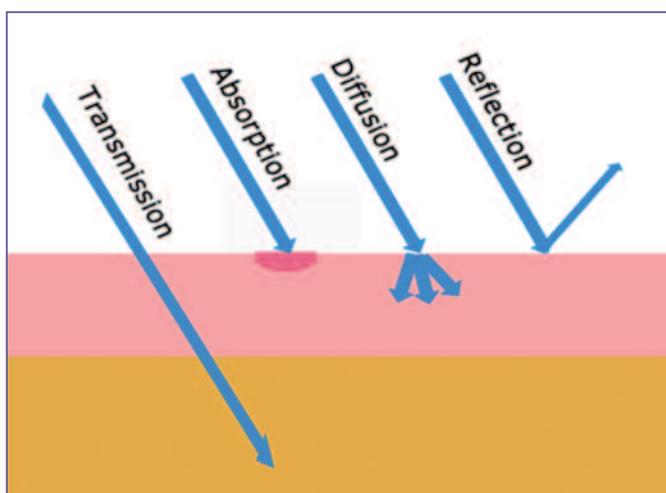


Fig. 3 - Possibili effetti dell'interazione luce/tessuto (Diffusione = Dispersione = Scattering = Sparpagliamento)

anni a 30°, standard angolare nella retinografia per decenni [4]. Il problema principale che la fotografia del fondo dovette superare era la difficile illuminazione, attraverso l'apertura pupillare, della cupola posteriore del bulbo, fino agli anni Trenta non ottenibile in modo soddisfacente. La via percorsa attraverso l'apertura pupillare è naturalmente la stessa in entrata e uscita, problema tecnico non secondario ancor ai nostri tempi. I primi tentativi di illuminare il fondo oculare con un bruciatore Bunsen furono così dolorosi, riferisce Lucien Howe, che si dovette ricorrere alla somministrazione di cocaina ai pazienti: *"The heat was so intense that we had to use topical cocaine to keep the patient from twisting in pain"*. Da allora la fotografia ha avuto notevoli miglioramenti, da tempo di comune e diffuso utilizzo nella pratica clinica oftalmologica[5]. La tradizionale oftalmoscopia utilizza la parte periferica più ampia dell'area pupillare come via d'entrata della luce; la parte centrale, più piccola, serve da ricezione, con una qualità finale d'imging 16 volte diminuita [6]. Lo SLO, inizialmente

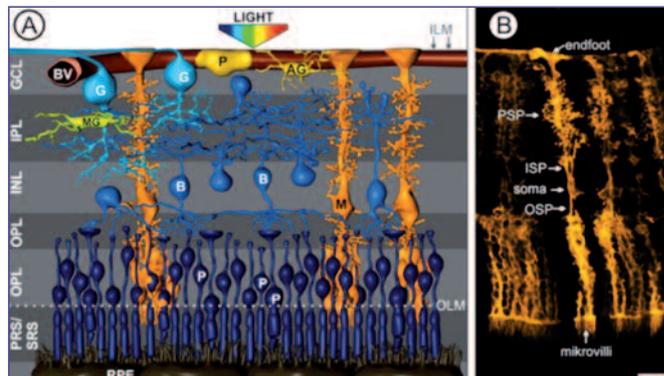


Fig. 2 - Immagine schematica della retina con in evidenza le cellule del Muller (www-huge.uni-resensburg.de)

descritto nel 1980 da Robert H. Webb, utilizza una sorgente laser al posto del flash e, beneficiando dei *"confocal pinhole"* lungo il percorso ottico, migliora, e di molto, la risoluzione finale [7→11].

La rimozione delle interferenze provenienti dai piani adiacenti a quello dove si è focalizzati, agevolata dall'uso dei *pinhole*, impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico d'intensità proporzionale. Nel sistema SLO l'illuminazione e l'osservazione nel percorso dell'area pupillare sono invertite rispetto alla fotografia. Il fascio laser utilizza la parte centrale dell'area pupillare; la rimanente area periferica è percorsa dalla luce riflessa dalla retina, con migliore risoluzione delle immagini, minore intensità di luce immessa nell'occhio, maggiore sicurezza e tolleranza retinica finale (Fig. 1).

Principi di fisica degli OCT

Tra i device utilizzati nell'indagine strutturale dei tessuti biologici gli OCT si pongono, per potere risolutivo, tra gli ultrasuoni e la microscopia. Il rilievo del segnale luminoso, per la velocità della luce (nel vuoto $\sim 3 \times 10^8 \text{ m/s} = 300.000 \text{ Km/s}$), permette migliori risoluzioni rispetto al suono ma, contemporaneamente, pone difficoltà nel trovare detector idonei a rilevare e misurare il ritardo delle onde riflesse dai tessuti. L'interferometria a bassa coerenza risolve in modo efficace queste problematiche. La risoluzione temporale di uno strumento T misura il ritardo delle onde luminose di ritorno dal tessuto indagato. Dipende dalla distanza del loro percorso Δz e dalla velocità di propagazione della luce nel tessuto C ; vale perciò la relazione $T = \Delta z/c$. Per valori di $\Delta z \sim 5 \mu\text{m}$, nota la velocità della luce nel vuoto, si avranno risoluzioni temporali $T \sim 15$ femtosecondi. Per rilevare adeguatamente segnali tanto rapidi è necessario ricorrere all'interferometria. La luce che attraversa un mezzo ri-

duce la propria velocità rispetto al vuoto per l'indice di rifrazione del mezzo attraversato: $v=c/n$ dove v =velocità della luce nel mezzo, c =velocità della luce, n =indice di rifrazione. L'indice di rifrazione n è, perciò, un rapporto tra due velocità, quella nota della luce c assoluta, non disturbata, e quella che ha nel mezzo v , per cui è anche vero $n=c/v$. L'indice di rifrazione rappresenta, in definitiva, un valore indiretto, una grandezza adimensionale, la variazione della velocità della luce nell'attraversare mezzi differenti, testimoniata e confermata dal cambio/ritardo del percorso luminoso (Fig. 2). Un raggio di luce è composto di campi elettrici e magnetici che oscillano nel tempo e nello spazio, ed è caratterizzato da un'ampiezza e da una lunghezza d'onda. Le teorie sulla natura della luce, risalenti al XVII secolo, sostenute da Isaac Newton e Christian Huygens, hanno visto contrapposto il dualismo onda/particella, la luce come entità corpuscolare oppure ondulatoria, teorie infine entrambe confermate. Quando due raggi luminosi s'incontrano, i due campi elettromagnetici interagiscono, con fenomeni d'interferenza. La radiazione che emerge da una sorgente luminosa naturale o da una comune lampadina ad incandescenza è formata da emissioni indipendenti di fotoni, con un fronte d'onda aleatorio, non regolare, con creste e valli che tendono a sottrarsi o sommarsi in modo indipendente dal tempo e dallo spazio.

Questa radiazione è definita non coerente o incoerente. La luce coerente (o in coerenza di fase) è, invece, dipendente dal tempo e dallo spazio, non variabile, con creste e valli equispaziate, della stessa ampiezza, come avviene con la luce laser, che ha coerenza pressoché monocromatica, è unidirezionale, caratteristiche fisiche proprie di coerenza spaziale o collimazione. Il numero delle creste e valli nell'unità di tempo individua la frequenza dell'onda luminosa. Solo con luce coerente si può avere interferenza e sono possibili misurazioni tomografiche. Nella realtà si hanno treni d'onda con frequenze non omogenee, quasi mono-cromatiche, in cui l'onda, che caratterizza meglio lo spettro e offre il maggior contributo è quella considerata, l'onda dominante o di riferimento.

Più stretto è lo spettro, tanto più la banda caratterizzante l'onda principale si avvicina alla monocromaticità e minore è la larghezza di banda Δf dell'onda coerente. Altri parametri da considerare sono il tempo e la lunghezza di coerenza. Il tempo di coerenza Δt è l'intervallo temporale in cui l'onda resta perfettamente sinusoidale, oscillando in modo costante e prevedibile, in rapporto inverso con la larghezza di banda Δf , per cui $\Delta t=1/\Delta f$. La lunghezza di coerenza Δz è, invece, il prodotto tra il tempo di coerenza Δt e la velocità della luce c , per cui $\Delta z=c \Delta t$. Se è vero che $\Delta t=1/\Delta f$, è anche vera la relazione

$\Delta z=c/\Delta f$, per sostituzione dei termini: la lunghezza di coerenza Δz e la larghezza di banda Δf dell'onda sono, perciò, tra loro inversamente proporzionali. Un'onda monocromatica, per definizione, è perfettamente sinusoidale, con lunghezza di coerenza infinita ∞ . La sorgente di luce che più si avvicina a queste caratteristiche fisiche è, come riferito, quella laser, con lunghezza di coerenza di alcune decine di chilometri. Gli OCT utilizzano luce a fronte d'onda coerente, possibilmente monocromatica, ristretta nella larghezza di banda, dove l'elemento rivelatore dei tempi di percorrenza della luce è l'interferometro di Mach-Zehnder o, più comunemente, l'interferometro di Michelson. Tramite l'interferometro il campo d'onda proveniente dalla sorgente luminosa, un LED Superluminescente (SLD) per gli SD-OCT, è suddiviso in un ramo di riferimento fisso e noto, rappresentato da uno specchio semiriflettente, e in un ramo proveniente dal campione del tessuto da esaminare.

I segnali ricombinati producono un'interferenza, registrata da un fotorivelatore e, infine, sono processati e algoritmicamente rielaborati. Il segnale riflesso o retro-diffuso dal tessuto E_{sig} e quello riflesso dallo specchio di riferimento E_{ref} sono uniti nel segnale totale d'uscita E_{out} : **$E_{out} = E_{sig} + E_{ref}$** . Anche se il segnale di ritorno dal tessuto è scarso, l'unione con E_{ref} , di riferimento e noto, rende quasi sempre possibile un'immagine tomografica, misura indiretta del cammino e della profondità percorsa. La coerenza ottica non deve essere a coerenza elevata, per le minori capacità di intercettare ed evidenziare le differenti caratteristiche strutturali dei tessuti oculari, così sottili, trasparenti e intimamente addensati in pochi micron. È opportuno che la sorgente sia luce a bassa coerenza. Un'interferenza è utile quando la differenza di ritardo temporale tra l'eco retrodiffuso dal tessuto e quello di riferimento è minore del tempo di coerenza della sorgente di luce utilizzata, con un errore introdotto che non va oltre la lunghezza di coerenza stessa [12,13]. È noto che l'interazione luce-materia avviene con fenomeni di trasmissione, assorbimento, diffusione e scattering.

Questi fenomeni rendono inevitabilmente limitato il range di penetrazione nei tessuti da indagare e le capacità di risoluzione (Fig. 3). Come si vede nella Figura 4, nei tessuti biologici ricchi di acqua si hanno poche finestre ottiche di miglior utilizzo, con scarso assorbimento della luce. La lunghezza d'onda centrata intorno ai 840 nm, largamente utilizzata dagli SD-OCT, mostra, infatti, nel grafico il minore assorbimento da parte dei tessuti. Recentemente è utilizzata dai nuovi SS-OCT nell'indagine in corioretina la lunghezza di 1050 nm per minor assorbimento e scattering, e di 1310 nm nell'indagine

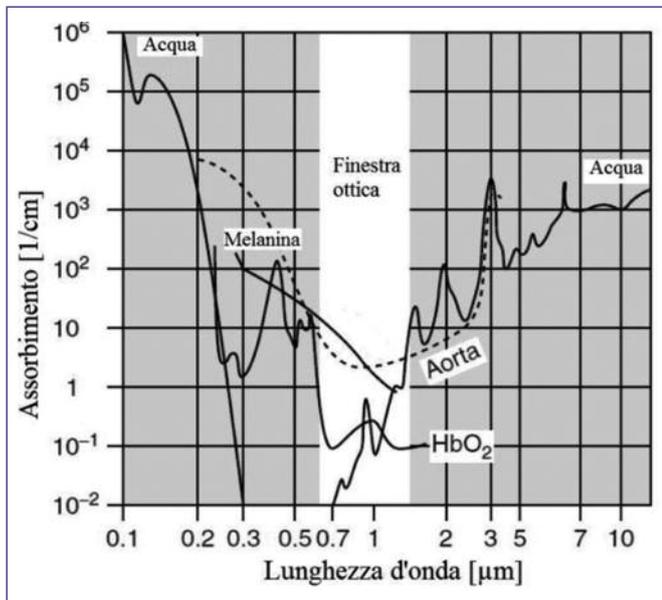


Fig. 4 - Finestra Ottica di migliore utilizzo delle lunghezze d'onda (600nm e 1500nm)

sul segmento anteriore, per la massima profondità di campo, quasi ad insidiare il range d'azione degli ultrasuoni, che continuano a restare ugualmente utili e, spesso indispensabili, nonostante l'avvento degli SS-OCT [12,13] (Fig. 4, Fig. 5).

Risoluzione degli OCT

Il segnale catturato dal fotorilevatore degli OCT permette informazioni strutturali evidenziate come gradienti di riflettività lungo l'asse Z più o meno "scuri" nel campo dei grigi, visionabili anche in falsi colori, non preferibili nella fine diagnosi tomografica con un grafico finale A-Scan. Con differenti posizioni lungo l'asse trasversale X si ottengono sezioni trasversali B-Scan, modalità d'imaging che ha reso familiare e universalmente riconoscibile le scansioni retiniche OCT. L'interazione luce-materia avviene, come riferito, tramite fenomeni di scattering, diffusione della luce in direzioni aleatorie, maggiore alle piccole lunghezze d'onda, e di assorbimento, maggiore al crescere della lunghezza d'onda, con attenuazione della potenza incidente in funzione della profondità. La risoluzione spaziale in generale è la capacità di distinguere come separati due oggetti vicini nello spazio. Comprende la risoluzione assiale e laterale. La risoluzione assiale (longitudinale o azimutale) si misura lungo la direzione del fascio della luce coerente. Evidenzia la capacità di distinguere due punti come singoli lungo la direzione longitudinale Z del campione. La risoluzione laterale o trasversale, invece, si misura perpendicolarmente all'asse Z e alla luce incidente, e discrimina due punti come singoli sull'asse XY. Il Potere di Risoluzione laterale è descritto in ottica fisica dal-

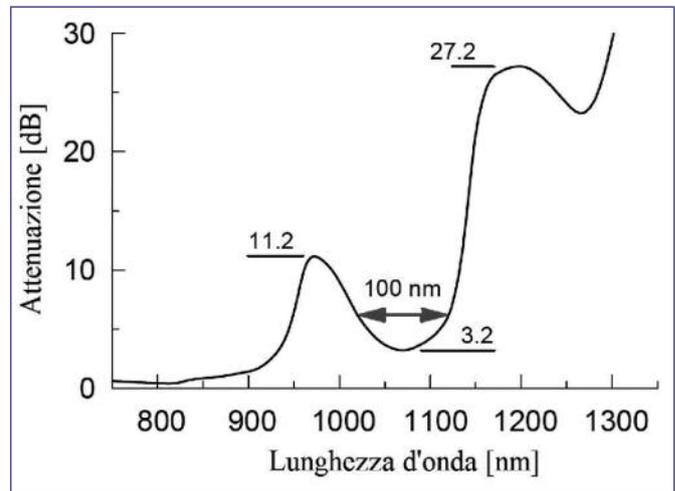


Fig. 5 - Finestre ottiche d'utilizzo dagli OCT

l'equazione di Abbe (Ernst Karl Abbe, 1840-1905): $d = 0.5 \lambda / AN$, dove λ =lunghezza d'onda della luce utilizzata, AN=Apertura Numerica

L'occhio umano ha un potere di risoluzione di 0,1 mm (100 μ m), un buon microscopio ottico di 0,2 μ m (1 μ m = 0,001 mm), un microscopio elettronico di 0,1 nm (1nm=0,001 μ m) [14→18]. Sarebbe meglio distinguere il termine generico limite di risoluzione, distanza minima per cui due punti sono distinti come separati, dal potere di risoluzione, di pertinenza strumentale, che indica la capacità di un sistema ottico di vedere due punti vicini come distinti, in microscopia ottica dipendente dall'apertura numerica AN degli obiettivi. Tale distinzione in pratica viene confusa, comunque non è essenziale. Gli ultrasuoni sono la pietra di paragone per comprendere meglio gli OCT. Hanno una risoluzione che dipende dalla frequenza dell'onda sonora utilizzata, solitamente 10MHz, con risoluzioni intorno a 150 μ m. A queste frequenze la profondità d'indagine arriva a circa 10 cm. Frequenze superiori, ~100 MHz, consentono risoluzioni intorno ai 15/20 μ m e profondità limitate a pochi millimetri. Più alte sono le frequenze, maggiore è l'attenuazione, il "taglio" del fascio di onde sonore nel percorso dei tessuti indagati, e minore è la penetrazione nel tessuto, anche se con più alte risoluzioni.

La capacità d'informazioni in profondità, Imaging Depth, e la capacità di risoluzione con gli ultrasuoni, si comportano perciò in modo inverso: a basse frequenze aumenta la profondità di campo e diminuisce la risoluzione; ad alte frequenze, le risoluzioni aumentano solo a piccole profondità. La microscopia ottica e quella confocale permettono alte risoluzioni ~1 μ m, limitate dalla diffrazione della luce. Com'è noto possono avvalersi di colorazioni per aumentare il contrasto nel tessuto,

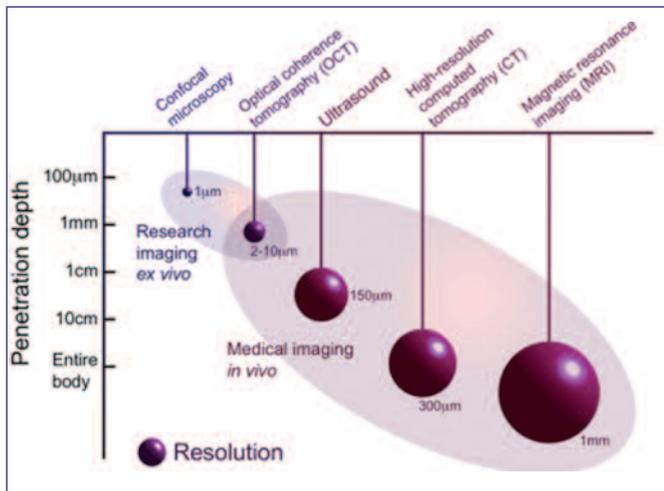


Fig. 6 - Differenze in Risoluzione e Penetrazione tra diversi device

anche se l'osservazione diventa meno "naturale". Gli OCT più moderni consentono una risoluzione assiale di 1-15 µm, 10/100 volte superiore agli ultrasuoni con sonde di 10 MHz, e una visione dell'architettura strutturale dei tessuti in vivo, consentendo una valutazione funzionale indiretta dei tessuti indagati. I device OCT non sono un'esclusiva dell'oftalmologia; possono essere integrati ed interfacciati, infatti, in cateteri, endoscopi e laparoscopi, utilizzabili in campo oncologico, cardiovascolare, muscolo-scheletrico, odontoiatrico, con un'immagine pseudo-istologica dei tessuti da studiare, e una profondità d'indagine Imaging Depth ~ 2mm, per i limiti dello scattering, della diffusione e assorbimento dei tessuti (Fig.6).

A differenza della microscopia confocale, gli OCT ottengono alte risoluzioni assiali indipendentemente dalla messa a fuoco; inoltre la risoluzione assiale e trasversale sono tra loro indipendenti.

La risoluzione assiale dipende essenzialmente dalla lunghezza d'onda della luce coerente utilizzata. E' il parametro più importante di un sistema tomografico. Tecnicamente è definita come la *FWHM* (*Full Width Half Maximum*) della Point Spread Function (PSF), individuabile matematicamente dalla Trasformata di Fourier dello spettro in potenza della sorgente che, per ampi spettri, corrisponde circa alla lunghezza della luce coerente utilizzata [12,13] (Fig. 7a, 7b). Riportando le definizioni da Wikipedia "La Full Width at Half Maximum (o FWHM, "larghezza a metà altezza") è un'espressione della larghezza di una funzione, data dalla differenza fra i valori assunti dalla variabile indipendente quando la variabile dipendente è pari a metà del suo valore massimo, mentre, data una sorgente puntiforme (di luce, onde radio, ultrasuoni o qualunque altro mezzo per la generazione di un'immagine), la PSF

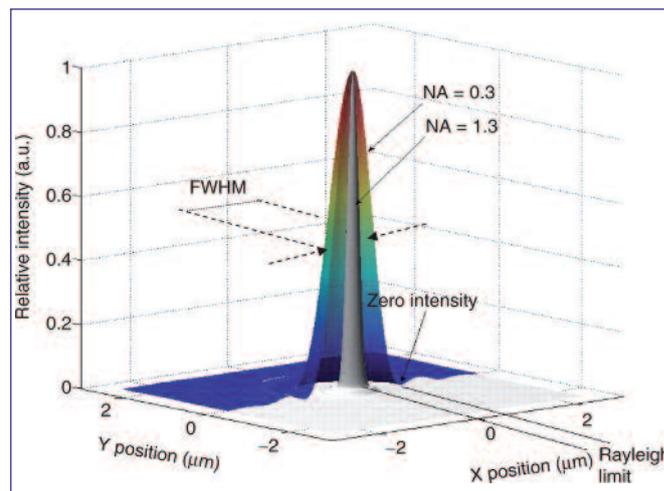
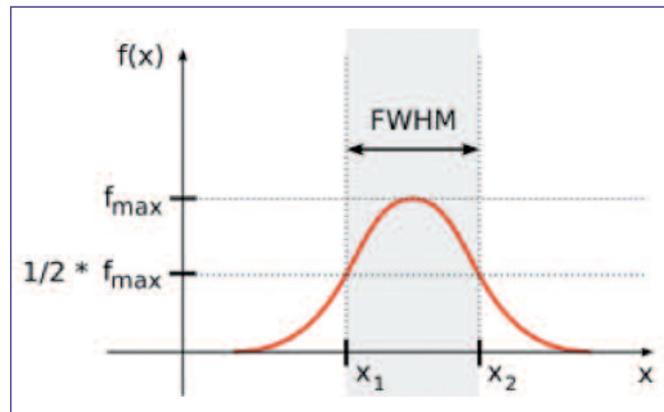


Fig. 7a e 7b - FWHM, Full Width at Half Maximum, è un'espressione della larghezza di una funzione, data dalla differenza fra i valori assunti dalla variabile indipendente quando la variabile dipendente è pari a metà del suo valore massimo; data una sorgente puntiforme (di luce, onde radio, ultrasuoni o qualunque altro mezzo per la generazione di un'immagine), la PSF, Point Spread Function, è il modo in cui essa è vista dal sistema di acquisizione (Wikipedia)

è il modo in cui essa è vista dal sistema di acquisizione". In pratica la risoluzione assiale indica la possibilità di separare due punti lungo la direzione longitudinale z del campione (Fig. 8).

La formula della risoluzione assiale, Δz , oltre ad una frazione fissa costante, mostra il rapporto tra il quadrato della lunghezza d'onda λ utilizzata e il prodotto tra l'ampiezza della banda $\Delta\lambda$ e l'indice di rifrazione n del mezzo considerato.

$$\Delta z = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{n \Delta\lambda}$$

L'utilizzo di sorgenti a spettro più ampio consente, di conseguenza, migliori risoluzioni assiali, minore scattering, che diminuisce con lunghezze d'onda maggiori.

Un invalicabile limite è l'assorbimento di energia da parte dei tessuti, che aumenta con l'aumento della lunghezza d'onda. Come si evince, se si migliora un parametro peggiora un altro, e viceversa. Esistono, inoltre, due modi per misurare la risoluzione assiale: ottico e digitale. Il primo modo è legato alle prestazioni del sistema delle lenti utilizzate ed ha proprietà matematiche ordinarie; il secondo dipende dal tipo di ricostruzione digitale delle diverse scansioni effettuate, sovrapposte e rielaborate, è una misura dei pixel di risoluzione del sistema, in definitiva una misura informatica. In prima approssimazione si può assumere che *la risoluzione digitale numericamente è la metà di quell'ottica.*

La risoluzione trasversale è legata, come nella microscopia ottica, alla geometria di focalizzazione del fascio

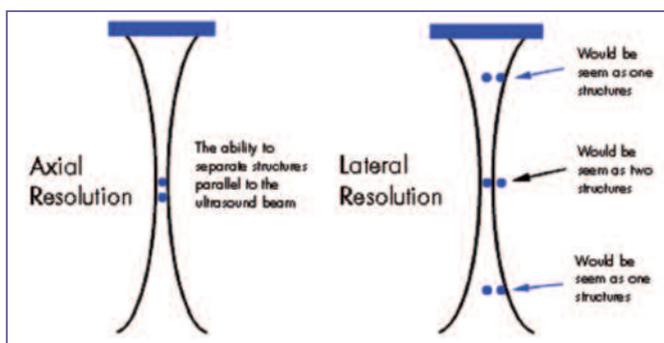


Fig. 8 - Risoluzione assiale e laterale

luminoso sul campione. In buona sostanza corrisponde al *piano di cintura, Beam Waist*, visibile nella Figura 9, in pratica alla minima distanza con cui si possono distinguere due punti giacenti sullo stesso piano trasversale XY, in dipendenza dell'apertura numerica AN utilizzata (Fig. 9). Nella microscopia ottica la risoluzione trasversale e di profondità sono in relazione con la messa a fuoco trasversale dello spot. Come si vede, l'aumento di AN determina una migliore risoluzione trasversale, la diminuzione dell'area dello spot focale e una minore profondità di campo depth of field indicata con b nella stessa figura. Si nota ancora che non si può incrementare ogni parametro: se si migliora la risoluzione trasversale, si penalizza la Depth Resolution e viceversa.

Questo limite vale anche per la tomografia. Si usano, infatti, basse aperture numeriche per consentire buone Imaging Depth e risoluzioni assiali adeguate, con limitate risoluzioni trasverse, vero limite della metodica tomografica. Si preferisce una risoluzione trasversale sopra 10 µm per avere una profondità di fuoco di 2 mm e coprire tutto lo spessore della corioretina. Per superare questo limite è necessario utilizzare il focus dinamico, le AO, gli SS-OCT, gli OCT multifocali (multibeam o multichannel) e, uscendo dai limiti dell'ottica gaussiana, le ottiche axiconiche.

Le caratteristiche essenziali, che è utile conoscere nella fisica degli OCT sono:

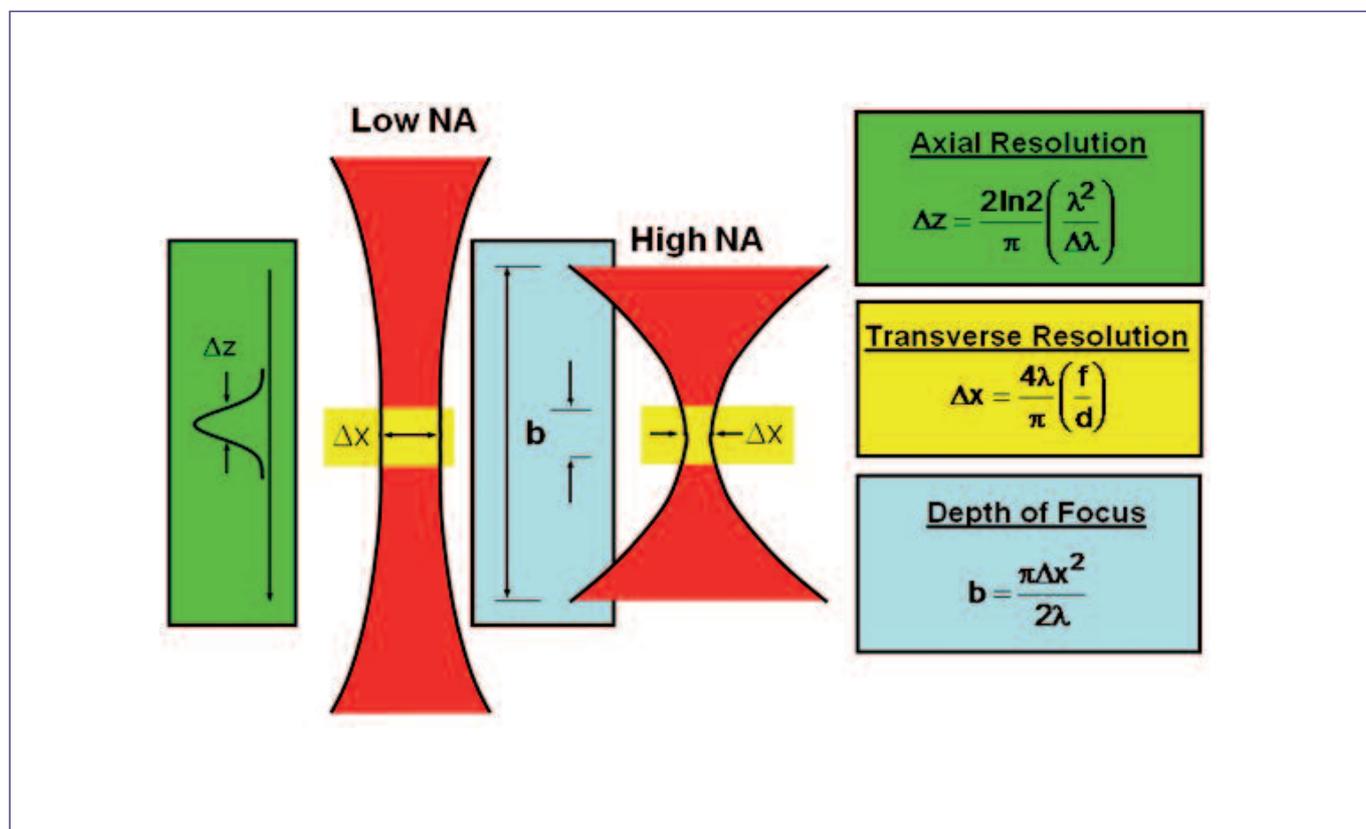


Fig. 9 - Schema riassuntivo della risoluzione assiale, trasversale e di profondità (Università di Vienna)

- *il Roll-off di performance;*
 - *la Sensibilità;*
 - *la Velocità d'acquisizione o d'imaging;*
 - *il Range dinamico.*
- Il *Roll-off di performance* determina la riduzione della potenza del segnale OCT con l'aumentare della profondità del tessuto esaminato. Un buon sistema OCT dovrebbe avere valori di Roll-off (attenuazione) non superiori a $\sim 20\text{dB}$ per una profondità di 2 mm.
- La *Sensibilità* è definita come il rapporto tra la potenza del segnale generato da uno specchio perfettamente riflettente e quella generata dalla minima riflettività del tessuto, e dipende principalmente dall'efficienza del sistema di rivelazione e dalle sorgenti di rumore presenti nel sistema. È rappresentata dal rapporto segnale/rumore SNR. Tipici valori dell'SNR degli OCT attuali sono 90/100dB; ciò significa che il sistema è sensibile ad un segnale con intensità riflessa o retrodiffusa fino a $\sim 95\text{dB}$.
- La *Velocità d'imaging o di acquisizione* è il tempo impiegato dal sistema a ricavare un profilo A-Scan/sec in profondità nel tessuto (A-scan rate). Può essere definita, oltre che con il numero di scansioni al secondo (A-scan), con il numero di frame al secondo (B-scan) o il numero di voxel al secondo (3D). Questi valori si usano secondo la specifica situazione, il protocollo di scansione e setup dell'imaging. Per i sistemi SS-OCT la velocità d'imaging è data dalla rapidità di ripetizione dello spazzolamento, mentre per SD-OCT dalla velocità con cui il dispositivo di rivelazione CCD (Charge-Coupled Device) acquisisce i dati. La velocità è importante per ridurre gli artefatti di movimento del paziente e per utilizzare maggiori potenze, senza danni ai tessuti, nei limiti di sicurezza imposti da organismi internazionali, come l'American National Standards Institute (ANSI).
- Il *Range dinamico* è un rapporto di potenza del segnale, tra la più forte e la più debole riflessione A-scan che può essere misurata. Le immagini OCT hanno solitamente un range dinamico di $\sim 35\text{dB}$, così un sistema OCT per essere soddisfacente deve fornire almeno 40-50dB.

Prospettive future

I sistemi per ottenere immagini in vivo con i sistemi OCT sono stati sviluppati dal gruppo di Fujimoto a Cambridge al MIT, Massachusetts Institute of Technology negli anni Novanta. Essenzialmente le possibilità

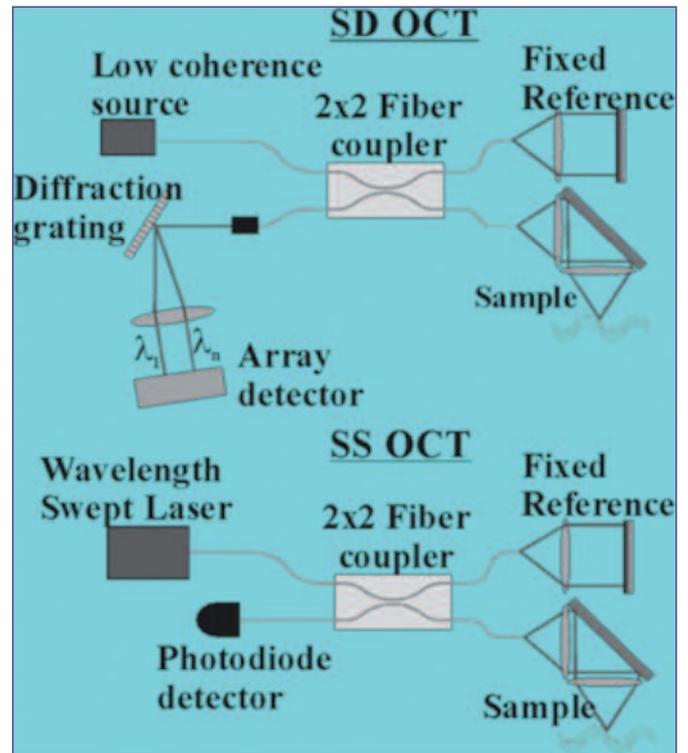


Fig. 10 - Schemi tecnologici tra SD-OCT e SS-OCT

d'acquisizione sono nel dominio del tempo (Time Domain) e della frequenza Fourier (Spectral Domain). La modalità Time Domain TD utilizza una sorgente luminosa ad ampio spettro, un'interferenza a bassa coerenza (low-coherence interference), un riferimento mobile. Con la modalità Fourier Domain SD o HD l'informazione viene ricavata dallo spettro del segnale di interferenza e il riferimento ha una posizione fissa. Questa seconda e attuale modalità d'acquisizione si suddivide a sua volta, in Spectral Domain OCT SD-OCT, in cui la sorgente utilizzata è ancora a banda larga, e Swept Source OCT SS-OCT, in cui la sorgente è un laser, a banda molto stretta, la cui lunghezza d'onda di lavoro viene variata linearmente in un intervallo predefinito. La modalità SS-OCT cerca di unire la sensibilità raggiunta dai SD-OCT alla semplicità hardware dei TD-OCT (Fig. 10).

Infatti, mentre in SD-OCT la ricezione del segnale è affidata ad un array di sensori CCD e ad uno spettrometro, seguita da elaborazioni numeriche, negli SS-OCT avviene tramite un singolo fotorivelatore, trasferendo la complessità del sistema alla sorgente laser che deve spazzolare un ampio intervallo di frequenze. Gli SS-OCT, con l'utilizzo di una sorgente a banda molto stretta e veloce come il laser sono, d'altra parte, poco soggetti alla dispersione ottica. Altri vantaggi degli SS-OCT consistono nella possibilità di impiegare intervalli di lunghezza d'onda di 1000-1300nm. Queste lunghezze permettono di visualizzazione ad alta risoluzione

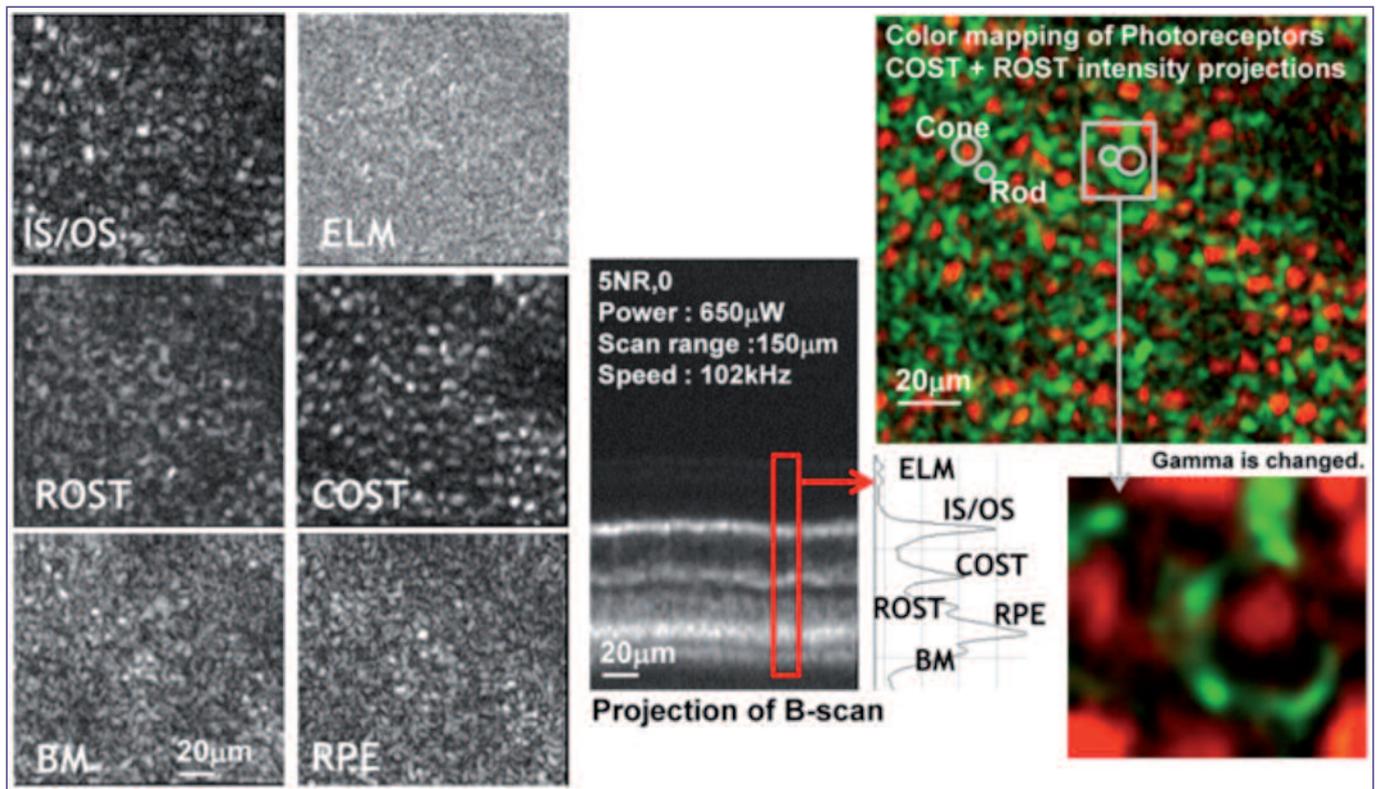


Fig. 11 - Immagine sezionale degli strati retinici con AO-OCT. ELM – external limiting membrane; IS/OS – photoreceptors inner/outer segment junction, COST – cone outer segments tips; ROST rod outer segments tips, RPE – retinal pigment epithelium, BM – Bruch's membrane (Sang-Hyuck Lee, John S. Werner, and Robert J. Zawadzki, 2013)

strutture in maggiore profondità. Inoltre, la linea di scansione OCT è invisibile al paziente che vede solo la mira di fissazione interna, senza la luce che spazzola la retina, possibile elemento di disturbo.

I device SS-OCT migliorano ulteriormente la velocità di scansione, fino a 80.000/100.000 A-scan/sec, con la possibilità di acquisire una B-scan in 0,01 sec invece di 0,02/sec, ed immagini 3D in 0.9 sec contro 1.9 sec degli SD-OCT. Altro vantaggio degli SS-OCT è che, non usando per la rivelazione del tessuto un array CCD, non si ha il drop-off del segnale all'aumentare della profondità di scansione, essendo svincolati della dimensione finita dei pixel del CCD. Per completare il quadro, nei sistemi SS-OCT la riduzione del segnale all'aumentare della profondità d'indagine è molto meno evidente, per utilizzo di una sorgente luminosa laser a banda stretta, vero motivo della migliore Depth Resolution rispetto agli SD-OCT, anche con utilizzo della modalità EDI (Tab. 1).

Riassumendo i vantaggi degli SS-OCT rispetto agli SD-OCT sono:

- Velocità 5-10 volte maggiore;
- Roll-off di performance quasi assente;
- Miglior rapporto segnale/rumore SNR;

- Larga area di scansione in retina;
- Alta qualità in megapixel;
- Maggiore Depth Resolution.

Le ottiche adattive

Nel 1997 le Ottiche Adattive AO furono impiegate nell'occhio da Liang et al. utilizzando un sensore a fronte d'onda Hartmann-Shack e uno specchio deformabile per correggere ed ottenere immagini con una risoluzione migliore [19]. E' stato così possibile vedere i singoli coni per la prima volta in vivo. La possibilità di assemblare un AO-OCT è stata riportata nel 2003 da Miller e al. al fine di migliorare la risoluzione trasversale [20]. La risoluzione trasversale, com'è stato riferito, è limitata a ~15/20 µm, con difficile visualizzazione delle singole strutture cellulari. Un metodo per migliorare la risoluzione trasversale è aumentare l'apertura numerica AN, con aumento del diametro del fascio OCT e diminuzione dello spot sulla retina. Tuttavia, la risoluzione è limitata dalla diffrazione e dalle aberrazioni oculari che aumentano maggiormente nella dilatazione pupillare, specialmente sopra 6 mm. La possibilità di avere un device OCT con AO rende meno influenti le aberrazioni, migliorando la risoluzione trasversale. Un primo device AO-OCT a risoluzione assiale ultraveloce è stato intro-

	SS-OCT	SD-OCT
Light source	Swept laser	SLD
Center wavelength	1,050 nm	840 nm
A-scan rate	100,000 Hz	50,000 Hz
Resolution (x)	20 μ m	20 μ m
Resolution (z)	8 μ m	6 μ m
B-scan measurement time	1.0 sec (96x)	1.0 sec (50x)
Imaging depth	2.6 mm	2.3 mm

Tab. 1 - Differenze d'utilizzo/Performance tra OCT Swept Source e Spectral Domain (da Topcon)

dotto nel 2004, aumentando la risoluzione trasversale che scende da 15 a 10 μ m nella retina [21] (Fig.11). Anche utilizzando le AO, se si migliora la risoluzione trasversale, diminuisce la profondità di fuoco, con impossibilità di visualizzare tutti gli strati retinici contemporaneamente. Con le AO, inoltre, il campo visivo si restringe approssimativamente da 1 a 3 gradi d'angolo. In pratica, acquisita l'immagine, si seleziona il campo di ricerca attivando le AO nel device, il campo si restringe e la risoluzione diventa a livello cellulare, per quella particolare area selezionata. Un migliore dettaglio ma limitato a piccole aree retiniche selezionate.

Ultimate Goal e considerazioni finali

Riscoprire alcuni principi di ottica fisica ci permette di comprendere meglio la rivoluzione tecnologica del mondo dell'imaging in oftalmologia. La fotografia retinica, come la tomografia, può usufruire delle ottiche AO. Esistono device già in commercio che implementano le AO allo SLO nelle fundus camera, con risoluzioni nel tessuto di 1-3 μ m e visione cellulare degli strati retinici (Immagine Eyes rtx1). Un modo alternativo per migliorare le risoluzioni specialmente trasversali dei device e, in particolar modo negli OCT, è quello di ricorrere

all'aiuto di algoritmi. Il *SSDA*, *Split-Spectrum Amplitude Decorrelation*, permette la visione della circolazione corio-retinica senza mezzo di contrasto, e promette di ridurre il numero delle fluoroangiografie circa del 90%. Messo a punto dall'Optovue è possibile averlo nell'ultimo modello di questa casa, SD-OCT Avanti. Altro algoritmo molto utile è il *Combo Report* che integra CV e OCT, consentendo il rapporto struttura/funzione nel glaucoma (Zeiss). Insieme alle indagini segmentate tomografiche GCL (Ganglion Cell Layer) per lo spessore dello strato ganglionare in macula, i Combo Report si stanno dimostrando sempre più indispensabili nella diagnosi e follow-up del glaucoma [22]. Il recentissimo algoritmo *MISAM*, *Multifocal Interferometric Synthetic Aperture Microscopy*, promette di migliorare insieme risoluzione trasversale e Depth Resolution e, anche se non ancora applicato sui device, di superare i limiti delle ottiche gaussiane [23]. L'uso di *lenti axiconiche*, infine, ci fa entrare definitivamente nell'ottica del *Bessel Beam*, frontiera inesplorata e, per tanti versi, sconosciuta alla stragrande maggioranza di noi oculisti. Studi già esistenti e recenti sviluppi ancora imprevedibili, fanno intravedere le performance di queste ottiche in associazione a SD-OCT multifocali, con risultati da verificare e testare ancora compiutamente [24,25]. A tanta nuova tecnologia, che può disorientare, deve corrispondere sempre più un crescente background culturale e un acume medico-clinico raffinato, costruito nel tempo con lo studio e l'esperienza, senza trascurare il rapporto umano con il paziente, spesso in secondo piano e poco curato. Il ricordo della massima di Edward Livingston Trudeau, che ha dedicato tutta la sua vita alla cura della tubercolosi, ci deve aiutare a non disperdere la nostra umanità di medici, il contatto empatico e la qualità del rapporto con il paziente, specialmente nelle patologie croniche: *"Il medico deve curare a volte, alleviare spesso, confortare sempre"*. ■

- 1) D Huang, EA Swanson, CP Lin, JS Schuman, WG Stinson, W Chang, MR Hee, T Flotte, K Gregory, Carmen A. Puliafito, James G. Fujimoto. Optical Coherence Tomography. *Science* 22 November 1991: Vol. 254 no. 5035 pp. 1178-1181, DOI: 10.1126/science.1957169.
- 2) L. Howe. "Photographs of the interior of the eye". *Trans. Amer. Ophth. Soc.* 23:568-571. 1887.
- 3) Duke-Elder S. 1961. *System of Ophthalmology Volume II*, St. Louis: CV Mosby pg 2-3.
- 4) Ciardella A, Brown D. Wide field imaging. In: Agarwal A, ed. *Fundus Fluorescein and Indocyanine Green Angiography: A Textbook and Atlas*. New York: Slack Inc., 2007:79-83.
- 5) L. A. Yannuzzi, M. D. Ober, J. S. Slakter, R. F. Spaide, Y. L. Fisher, R. W. Flower, and R. Rosen, "Ophthalmic fundus imaging: Today and beyond," *Amer. J. Ophthalmol.*, vol. 137, no. 3, pp. 511-524, Mar. 2004.
- 6) Plesch A. and Klingbeil U. 1989 *Optical Characteristics of a Scanning Laser Ophthalmoscope*. SPIE vol 1161 (Bellingham, WA: SPIE) pp 390-8.
- 7) R. H. Webb, G. W. Hughes, and O. Pomerantzeff, "Flying spot TV ophthalmoscope," *Appl. Opt.*, vol. 19, no. 17, pp. 2991-2997, 1980.
- 8) Webb RH, Hughes GW. Scanning laser ophthalmoscope. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1981;28(7):488-492.
- 9) R. H. Webb, G. W. Hughes, F. C. Delori. "Confocal scanning laser ophthalmoscope," *Appl. Opt.*, vol. 26, no. 8, pp. 1492-1499, 1987.
- 10) Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto J.G.. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035): 1178-81.
- 11) Drexler W. Ultrahigh resolution optical coherence tomography. *Journal Biomed Optics*, 9(1), 47-74, 2004
- 12) Tesi di Laurea Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria delle Telecomunicazioni, Università di Padova. Sviluppo sperimentale di un tomografo a coerenza ottica. Laureando: Matteo Bernardello, Relatore: Prof. Luca Palmieri, Padova, 7 Ottobre 2013 Anno accademico 2012/2013.
- 13) Tesi di Laurea Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, Corso di laurea magistrale in Bioingegneria, Università di Padova. OCT per studi su Zebrafish: risultati preliminari. Laureanda: SARA TRENTIN; Relatore: Dr. ENRICO GRISAN; Correlatore: Dr. LUCA PALMIERI, 23 Aprile 2013, Anno Accademico 2012/2013.
- 14) Drexler W. Ultrahigh resolution optical coherence tomography. *Journal Biomed Optics*, 9(1), 47-74, 2004.
- 15) DT Miller, OP Kocaoglu, Q Wang, S Lee. Adaptive optics and the eye (super resolution OCT). *Eye* (2011) 25, 321-330 & 2011. Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-222X/11.
- 16) www3.unisi.it/fisica/dip/dida/matinfef/ottica_geometrica
- 17) Corrado Mencuccini, Vittorio Silvestrini. *Fisica 2. Elettromagnetismo -ottica*. Corso di fisica per le facoltà scientifiche. Con esempi ed esercizi. Elementi di ottica.
- 18) Franco Gori. *Elementi di ottica*. Libreriauniversitaria.it.
- 19) Junzhong Liang, David R. Williams, and Donald T. Miller. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics. *JOSA A*, Vol. 14, Issue 11, pp. 2884-2892 (1997) <http://dx.doi.org/10.1364/JOSAA.14.002884>.
- 20) Donald T. Miller; Junle Qu; Ravi S. Jonnal; Karen E. Thorn. Coherence gating and adaptive optics in the eye. *Proc. SPIE 4956, Coherence Domain Optical Methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine VII*, 65 (July 1, 2003); doi:10.1117/12.477633.
- 21) B. Hermann, E. J. Fernández, A. Unterhuber, H. Sattmann, A. F. Fercher, W. Drexler, P. M. Prieto, and P. Artal. Adaptive-optics ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Optics Letters*, Vol. 29, Issue 18, pp. 2142-2144 (2004). <http://dx.doi.org/10.1364/OL.29.002142>.
- 22) A. Lucente. *Glaucoma tra struttura e funzione*. *Oftalmologia domani* - N. 1 - Anno 2014.
- 23) Yang Xu, Xiong Kai Benjamin Chng, Steven G. Adie, Stephen A. Boppart, P. Scott Carney. Multifocal interferometric synthetic aperture microscopy. Received 18 Apr 2014; revised 16 Jun 2014; accepted 17 Jun 2014; published 27 Jun 2014 30 June 2014 | Vol. 22, No. 13 | DOI:10.1364/OE.22.016606 | OPTICS EXPRESS 16606
- 24) J. Holmes, S. Hattersley, N. Stone, F. Bazant-Hegemark, and H. Barr, "Multi-channel Fourier domain OCT system with superior lateral resolution for biomedical applications," in "Biomedical Optics (BiOS) 2008" (International Society for Optics and Photonics, 2008), 68470.
- 25) J. Holmes, "Theory and applications of multi-beam OCT," in "1st Canterbury Workshop and School in Optical Coherence Tomography and Adaptive Optics" (International Society for Optics and Photonics, 2008), 713908.