

STRUMENTAZIONE

- La lampada a fessura (o biomicroscopio a fessura)
- Elettroretinogramma
- Tomografia a coerenza ottica

LAMPADA A FESSURA (Slit Lamp)

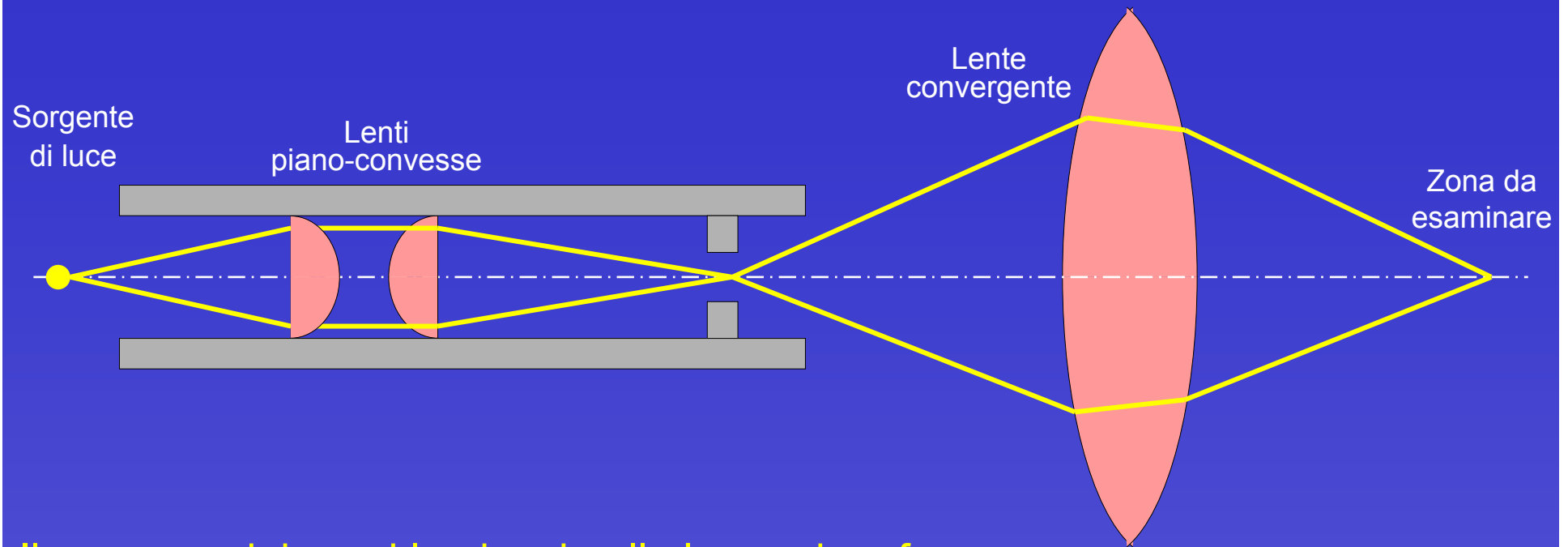
La lampada a fessura (o biomicroscopio a fessura) è uno strumento ottico utilizzato in particolare per l'esame clinico del cristallino.



A slitlamp is used to view the interior of the eye

© ADAM, Inc.

Schema della lampada a fessura



Il percorso dei raggi luminosi nella lampada a fessura:

1. La luce proveniente dalla sorgente passa attraverso un sistema collettore costituito da due lenti piano convesse;
2. La luce viene così concentrata su un piano metallico con una sottile fessura di uscita;
3. Una seconda lente fa convergere la luce sulla zona da esaminare.

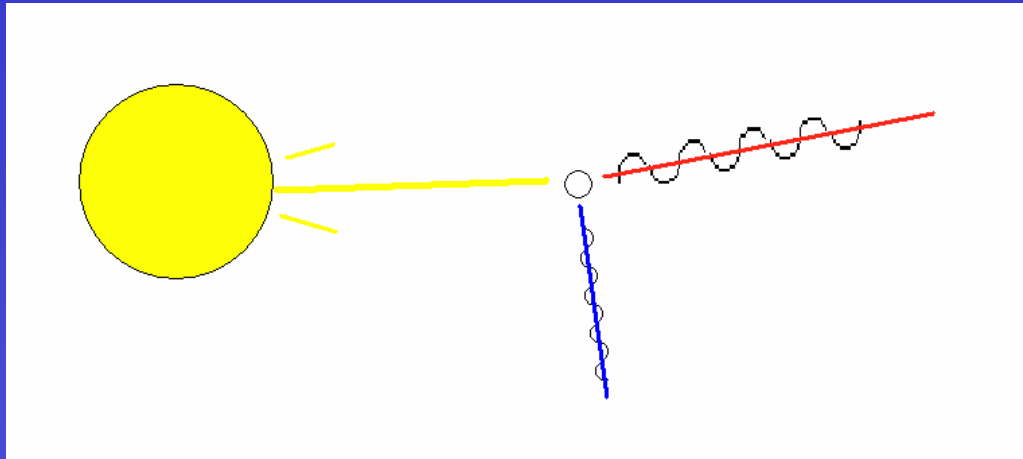
Lampada a fessura

Principio di funzionamento:

- La LaF è costituita da una **sorgente molto intensa** e da un **sistema di lenti** che concentrano in una piccola area un fascio di luce in grado di attraversare le strutture trasparenti dell'occhio.
- Le incidenze variabili del fascio luminoso permettono di valutare le caratteristiche strutturali, normali o patologiche, sfruttando il **fenomeno di Tyndall**, che consiste nella possibilità di evidenziare elementi al di sotto della visibilità colpendoli con una luce molto intensa in campo oscuro.
- Eventuali particelle, assimilabili ad ostacoli o corpuscoli, vengono visualizzate perché **riflettono i raggi luminosi** che le colpiscono: è la condizione che permette di vedere il pulviscolo atmosferico quando un raggio di sole attraversa una stanza al buio.
- L'**effetto Tyndall in oftalmologia** si ha in seguito alla comparsa patologica di corpuscolatura (cellule infiammatorie) nell'umore acqueo presente nella camera anteriore dell'occhio.

Effetto Tyndall

L'effetto Tyndall è un fenomeno di dispersione della luce, durante la sua diffusione per effetti propagativi, per la presenza di particelle, di dimensioni comparabili a quelle delle lunghezze d'onda della luce incidente, presenti in sistemi colloidali*, nelle sospensioni o nelle emulsioni.



La luce a più alta frequenza (blu) viene diffusa molto di più di quella a bassa frequenza (rosso) che passa quasi indisturbata (scattering Rayleigh).

Il fenomeno è facilmente rilevabile nella vita di tutti i giorni: ad esempio questo è il motivo per cui il cielo appare blu, oppure osservando dei raggi di luce quando attraversano sistemi in cui sono sospese o disperse delle particelle solide o liquide (ad esempio della polvere o delle gocce d'acqua).

**Un colloide è una sostanza che si trova in uno stato finemente disperso, intermedio tra la soluzione omogenea e la dispersione eterogenea. Questo stato "microeterogeneo" consiste quindi di due fasi: una sostanza di dimensioni microscopiche (diametro da 10^{-9} m a $1 \mu\text{m}$) dispersa in una fase continua.*



Il risultato è che la luce all'estremità blu dello spettro viene diffusa con forza in tutte le direzioni (anche verso l'osservatore) mentre quella all'estremità rossa dello spettro si propaga quasi indisturbata.

Di conseguenza è principalmente la luce blu ad essere diffusa verso l'osservatore ed il cielo appare del tipico colore azzurro.

Al tramonto tuttavia la luce del sole percorre una lunghezza maggiore nell'atmosfera, che filtra le frequenze blu e giungendo all'occhio dell'osservatore ad un angolo più lontano dalla perpendicolare rispetto alla sua direzione, tingendo i tramonti di rosso.

Nella LaF mediante un sistema di lenti collettrici si ottiene una illuminazione intensa e non diffusa, una lama di luce che crea un forte contrasto fra l'area illuminata e le zone circostanti.

E' possibile variare l'ampiezza della fessura, l'intensità della luce, la distribuzione spettrale e l'incidenza del fascio luminoso in modo da osservare diverse strutture oculari più o meno profonde.

Si può osservare la superficie capsulare del cristallino e si possono osservare le parti prossime delle fibre zonulari.

Il raggio a fessura permette di osservare la corteccia, il nucleo, le suture a Y anteriori e posteriori, la capsula lenticolare posteriore, e la porzione anteriore del vitreo.

Con la LaF è possibile osservare il nucleo del cristallino che in fase di invecchiamento assume un colore giallognolo (*sclerosi nucleare*).

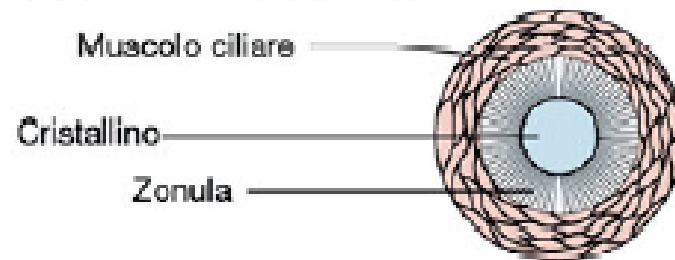
La LaF è dotata di ingrandimenti poco elevati, che permettono l'osservazione contemporanea di palpebra superiore, bulbo e palpebra inferiore.

Si possono diagnosticare opacità della cornea, del cristallino (cataratta) dell'umor acqueo, congiuntiviti, e in più con una lente opportuna e in midirasi è possibile effettuare anche l'esame del fondo oculare

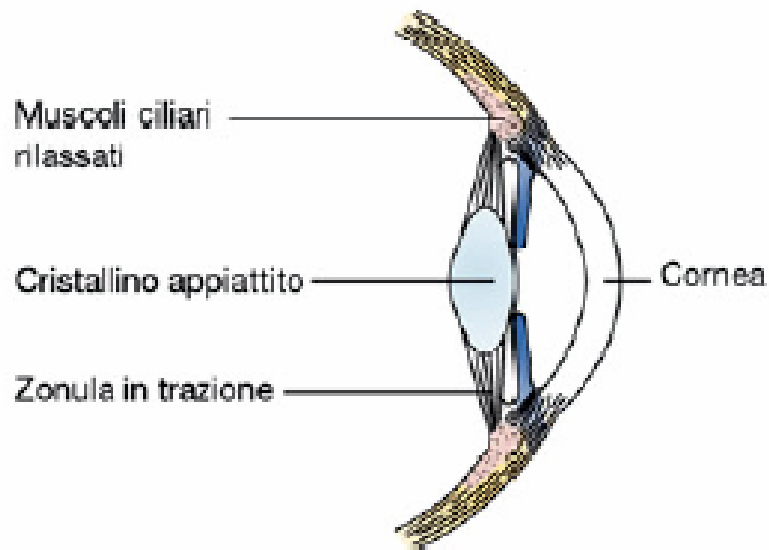
Come funziona?

La lampada a fessura
dott. F. Friede - www.friede.it

Il cristallino è collegato al muscolo ciliare da fibre anelastiche, dette collettivamente zonula.



Quando il muscolo ciliare è rilassato, la zonula tira sul cristallino e lo mantiene appiattito.



Quando il muscolo è contratto, diminuisce la tensione sulla zonula, e il cristallino, che è elastico, assume una forma più rotonda.

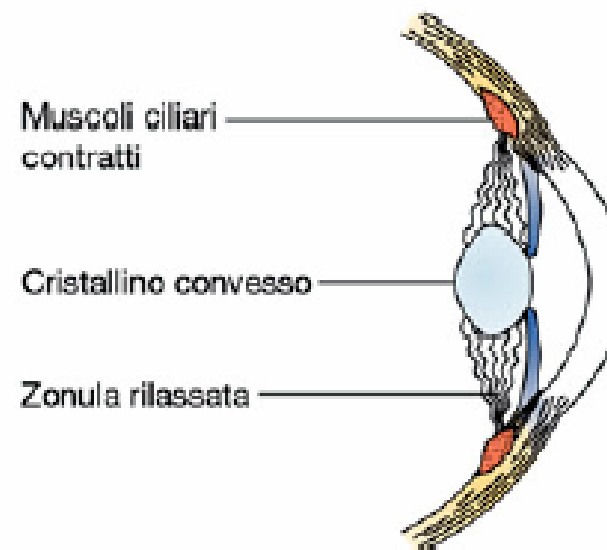
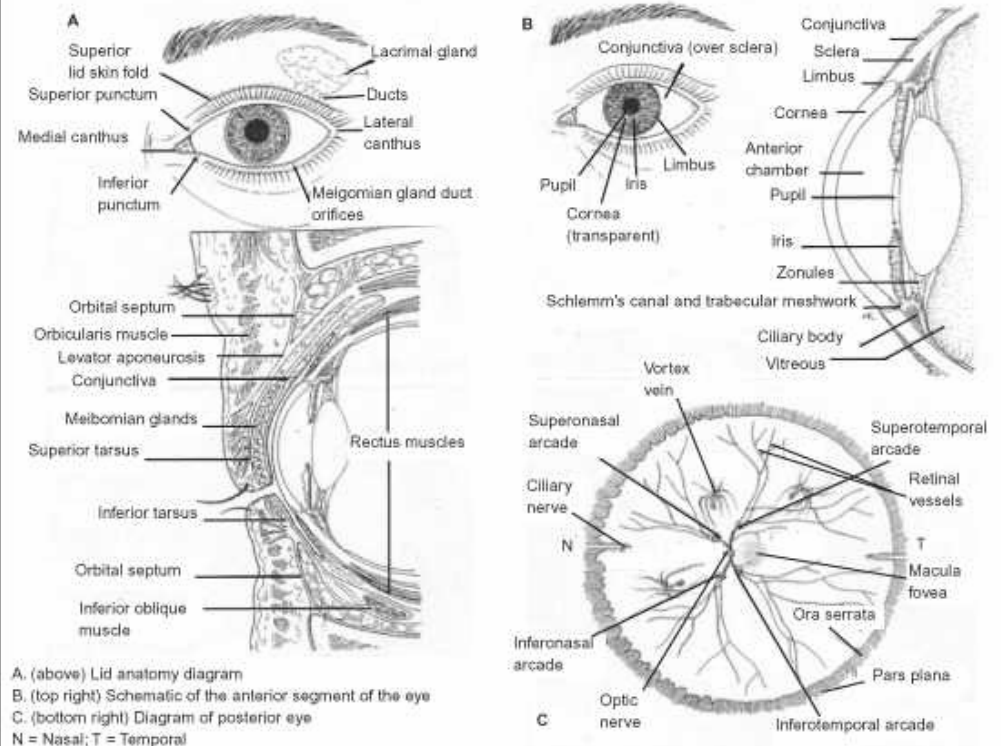




Figure 1. Gross Anatomy of the Eye



A. (above) Lid anatomy diagram
 B. (top right) Schematic of the anterior segment of the eye
 C. (bottom right) Diagram of posterior eye
 N = Nasal; T = Temporal

Reprinted with permission from: Shingleton B, Mead M. In: *New England Eye Center Handbook of Eye Emergencies*. Thorofare, NJ: Slack Inc;1998:45-49.

ELETTRORETINOGRAMMA (ERG)

L'ERG è la registrazione delle modificazioni della ddp fra un elettrodo interno all'occhio ed uno posto sul polo posteriore dell'occhio.

In condizioni di riposo vi è, fra questi due poli una ddp di 6 mV.

Uno stimolo luminoso provoca una serie di modificazioni di questo potenziale che costituisce appunto l'ERG.

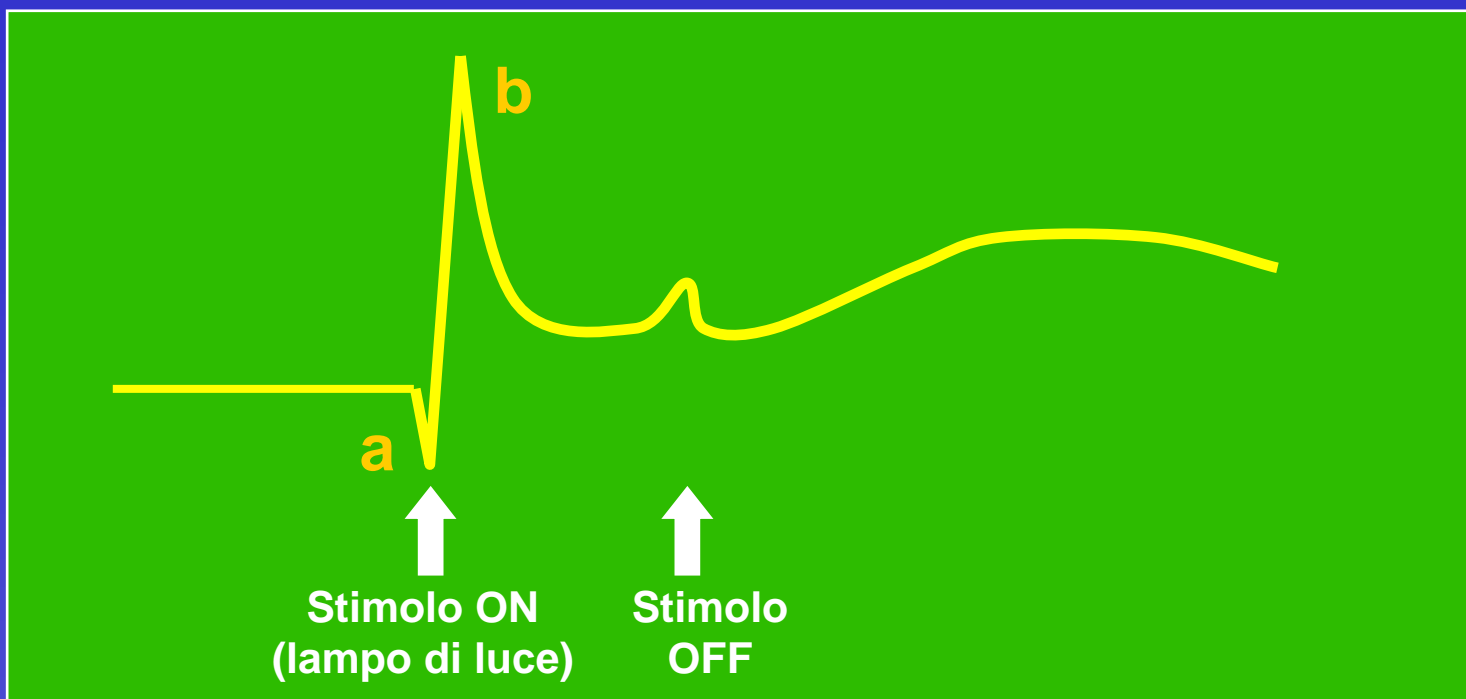
Tutte le cellule viventi sono sede di attività elettriche: l'eccitazione di una cellula genera una ddp.

Si parla di potenziale d'azione in contrapposizione al potenziale di riposo che le cellule presentano in assenza di stimolo.

La cornea funge da polo positivo e la retina da polo negativo: la ddp tra i due elettrodi è legata alle stimolazioni luminose ed in particolare si accentua dopo una breve caduta esponendo la retina alla luce e, viceversa, cade progressivamente, dopo un transitorio aumento, quando viene a mancare l'eccitazione luminosa.

L'ERG consiste nella registrazione dei potenziali di azione della retina.

Segnale ERG visualizzato sull'oscilloscopio



Il tracciato ERG è caratterizzato da vari tratti:

- un periodo di latenza che segue la stimolazione luminosa;
- un'onda negativa (*a*);
- un'onda positiva (*b*).

In base alle caratteristiche del tratto *b* il tracciato viene definito *normale*, *ipernormale* (onda *b* troppo alta), *iponormale* (onda *b* troppo bassa).

RIFERIMENTI:

1. FISICA BIO-MEDICA

E. Zingoni, F. Tognazzi, A. Zingoni, editore: Zanichelli;

1. <http://it.wikipedia.org>

TOMOGRAFIA A COERENZA OTTICA (OCT)

La OCT è una tecnica di imaging medico:

- non invasiva;
- fornisce immagini ad alta risoluzione della retina e della parte anteriore dell'occhio: il potere di risoluzione spaziale è di circa 7-10 μm ;
- si basa su una tecnica interferometrica che utilizza luce del vicino infrarosso (λ da 700 nm a 1 μm);
- La luce ad alta lunghezza d'onda permette di penetrare a maggiore profondità nel tessuto biologico rispetto ad altre tecniche;
- Le prime immagini *in vivo* della struttura della retina sono state pubblicate nel 1993.

Rispetto ad altre tecniche di imaging oculari ha i seguenti vantaggi:

- **Alta risoluzione spaziale** (circa 10 μm) rispetto all'oftalmoscopia a scansione laser, che forniscono rispettivamente immagini con una risoluzione di 150 e 300 μm ;
- **Maggiore capacità di penetrazione** (dell'ordine dei mm), rispetto alla microscopia confocale;
- **Imaging diretto ed istantaneo** della morfologia dei tessuti;
- **Il campione (o il soggetto) non va preparato** prima dell'indagine;
- **Assenza di radiazioni ionizzanti.**

La OCT si basa su una **tecnica interferometrica** a bassa coerenza.

Nella interferometria ad alta coerenza si ha che l'interferenza della luce laser avviene a distanza di metri dalla sorgente.

Nella OCT questa distanza è accorciata fino all'ordine dei micrometri grazie all'utilizzo di sorgenti di luce a banda larga (cioè, luce che emette radiazioni in un ampio intervallo di frequenze).

Tale luce viene prodotta da diodi superluminescenti o da laser con impulsi molto brevi (laser a femtosecondo).

Anche la luce bianca è a banda larga, ma ha bassa potenza.

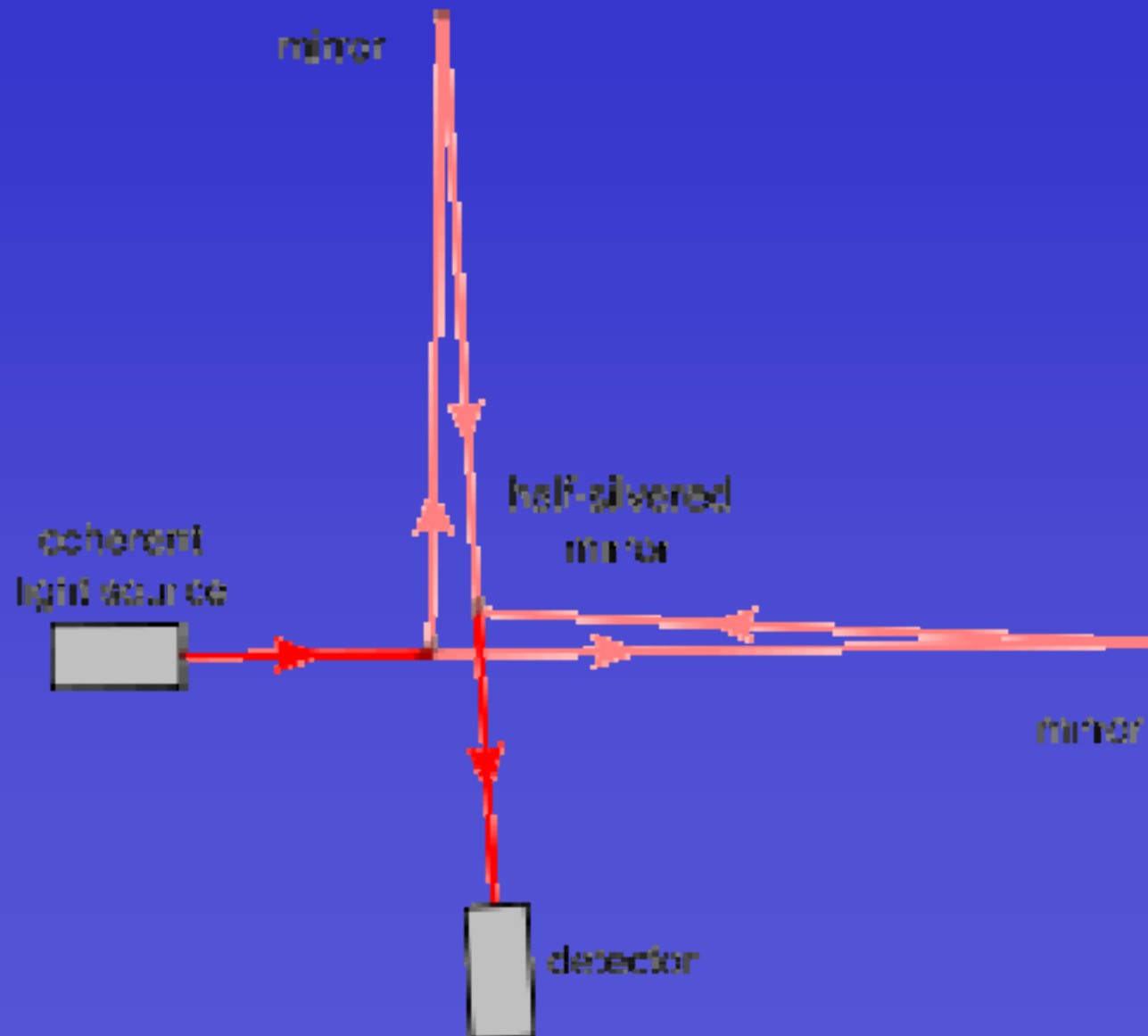
L'interferometria

è una tecnica basata sullo studio della

figura di interferenza

dovuta alla sovrapposizione
di due onde coerenti tra loro.

INTERFEROMETRO DI MICHELSON



L'interferometria fa uso del principio di sovrapposizione per combinare le onde separate.

Questo è dovuto al fatto che quando due onde coerenti con la stessa frequenza si combinano la figura che risulta è determinata dalla differenza di fase tra le due onde.

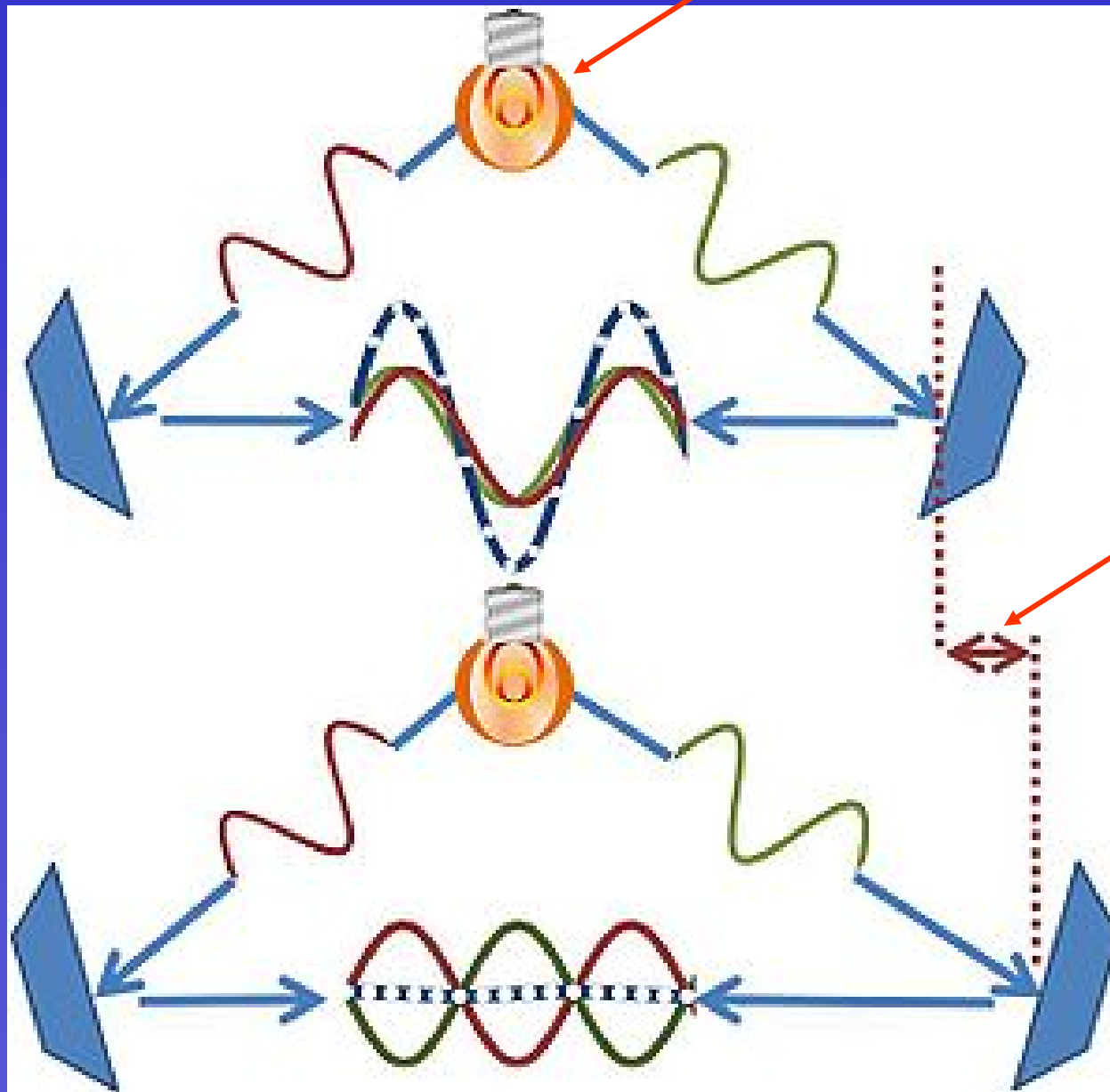
Onde che sono in fase tra loro daranno luogo ad interferenza costruttiva, mentre onde sfasate tra loro daranno luogo ad interferenza distruttiva.

Sorgente di luce coerente (laser)

Interferenza
costruttiva

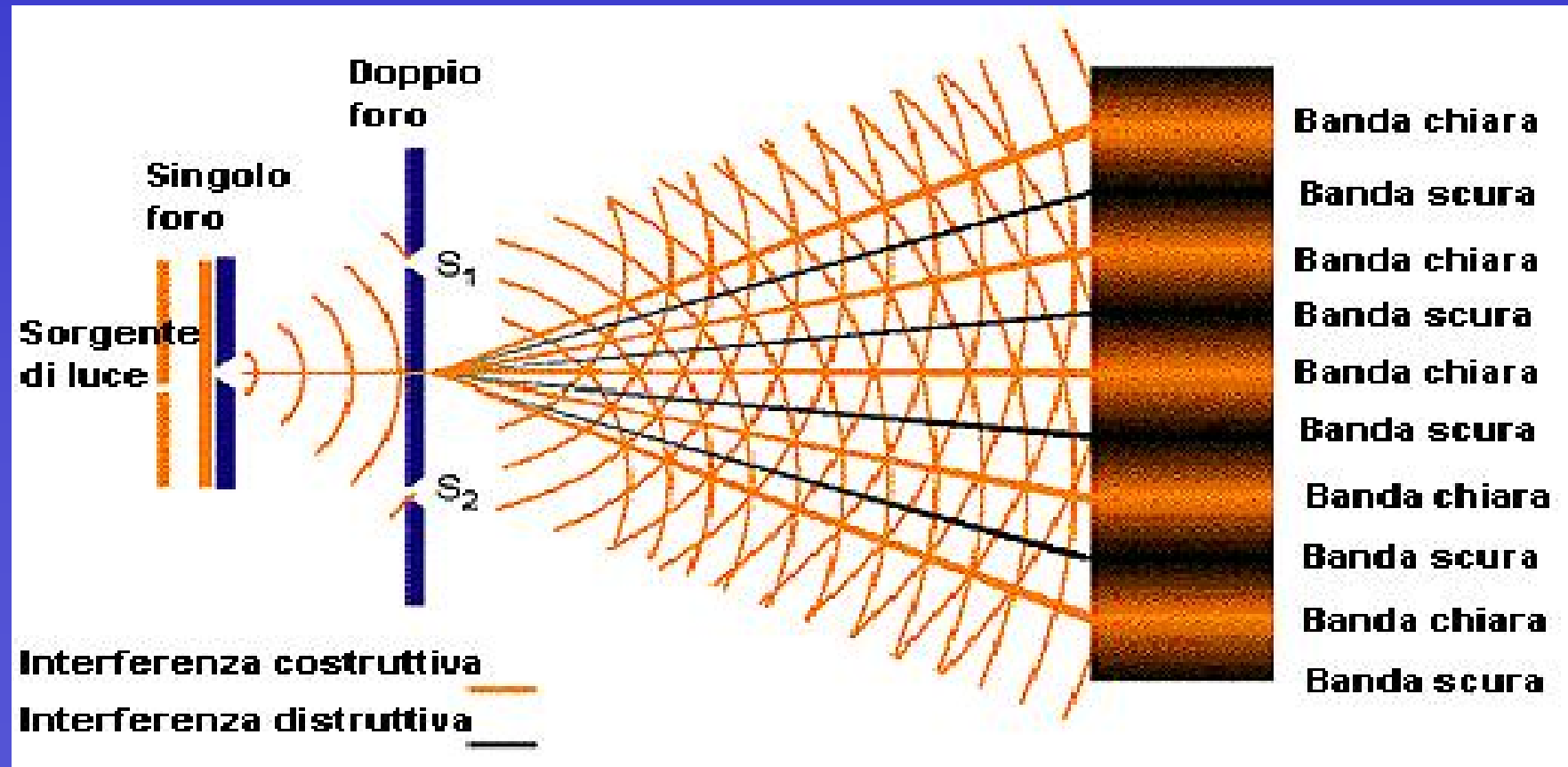
Il percorso
ottico viene
variato

Interferenza
distruttiva



Esperimento di Young

Nel **1801** Thomas Young (1773-1829) effettuò un'esperienza decisiva a favore dell'ipotesi ondulatoria della luce, mostrando che anche con i raggi luminosi si possono verificare i fenomeni di *interferenza* e *diffrazione*, tipici dei fenomeni ondulatori.

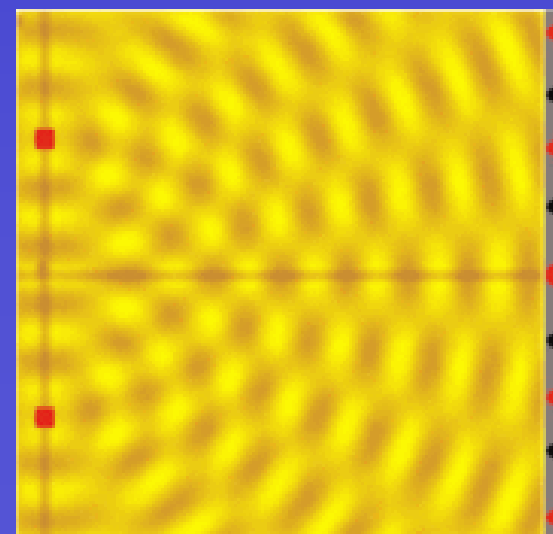
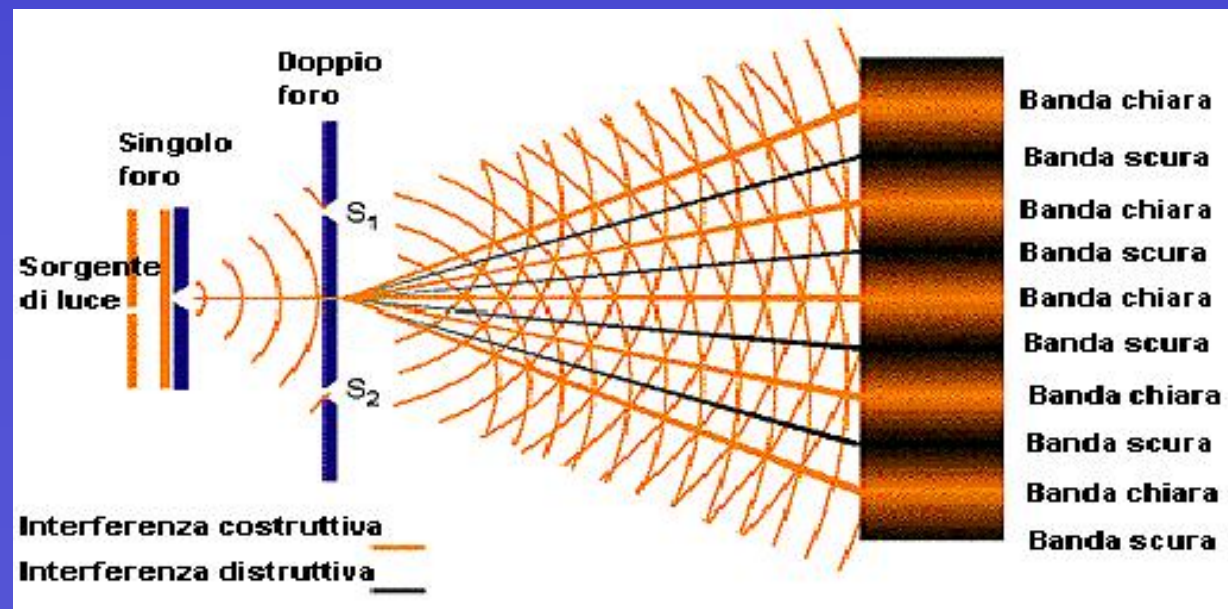


Un raggio di luce laser monocromatico colpisce un microscopico forellino e da questo, in base al principio di Huygens, viene *diffratto* sulle due sottilissime fenditure **S1** ed **S2** equidistanti dalla fenditura singola.

I due fori (di dimensioni paragonabili alla lunghezza d'onda della luce) si comportano come *sorgenti puntiformi e coerenti* e la luce da essi emessa interferisce come le onde sull'acqua prodotte da una sorgente doppia.

Proseguendo, la luce colpisce uno schermo sul quale si visualizza una *figura di interferenza* caratterizzata da **bande chiare e scure**, cioè da *antinodi* in cui l'interferenza è costruttiva e da *nodi* in cui l'interferenza è distruttiva.

L'esperimento di Young permette di ricavare anche, misurando la distanza tra le bande e la distanza dello schermo, di misurare la *lunghezza d'onda* della luce che è dell'ordine dei 10^{-7} m.



La lunghezza d'onda λ è data da:

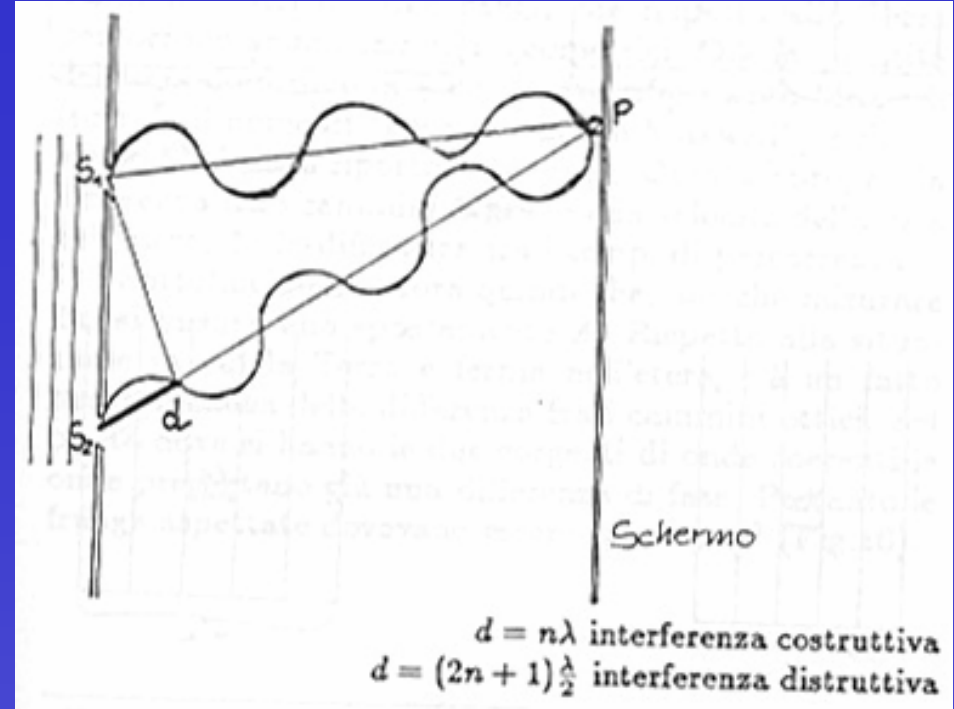
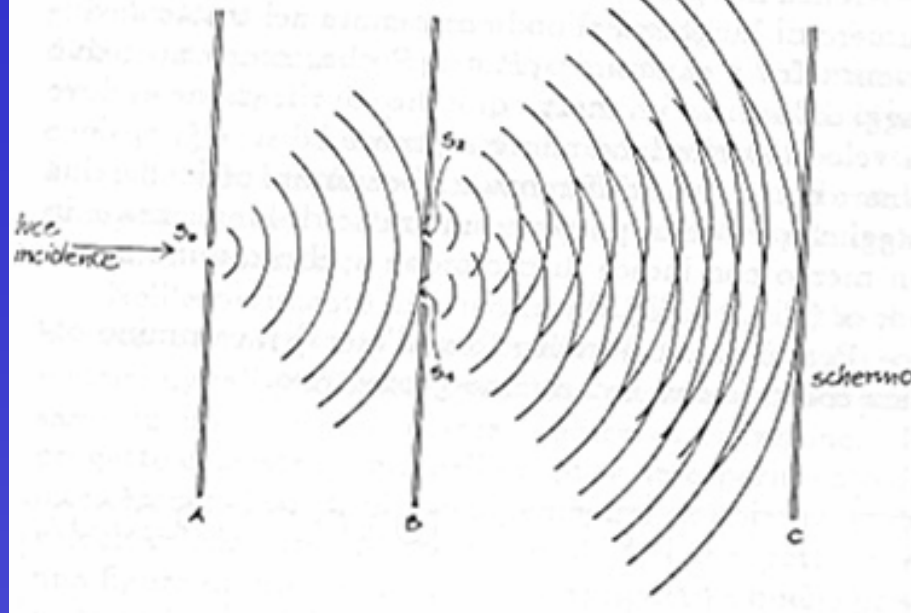
$$\lambda = \frac{d \cdot x}{l}$$

dove d è la distanza tra le fenditure, x è la distanza tra due massimi consecutivi e L la distanza dello schermo dalla doppia fenditura.

La relazione è valida per $l \gg d$.

L'esperimento della doppia fenditura ebbe un'importanza storica decisiva perchè pose un punto fermo alla annosa questione della natura della luce, stabilendone la natura ondulatoria.

Doppia fenditura di Young

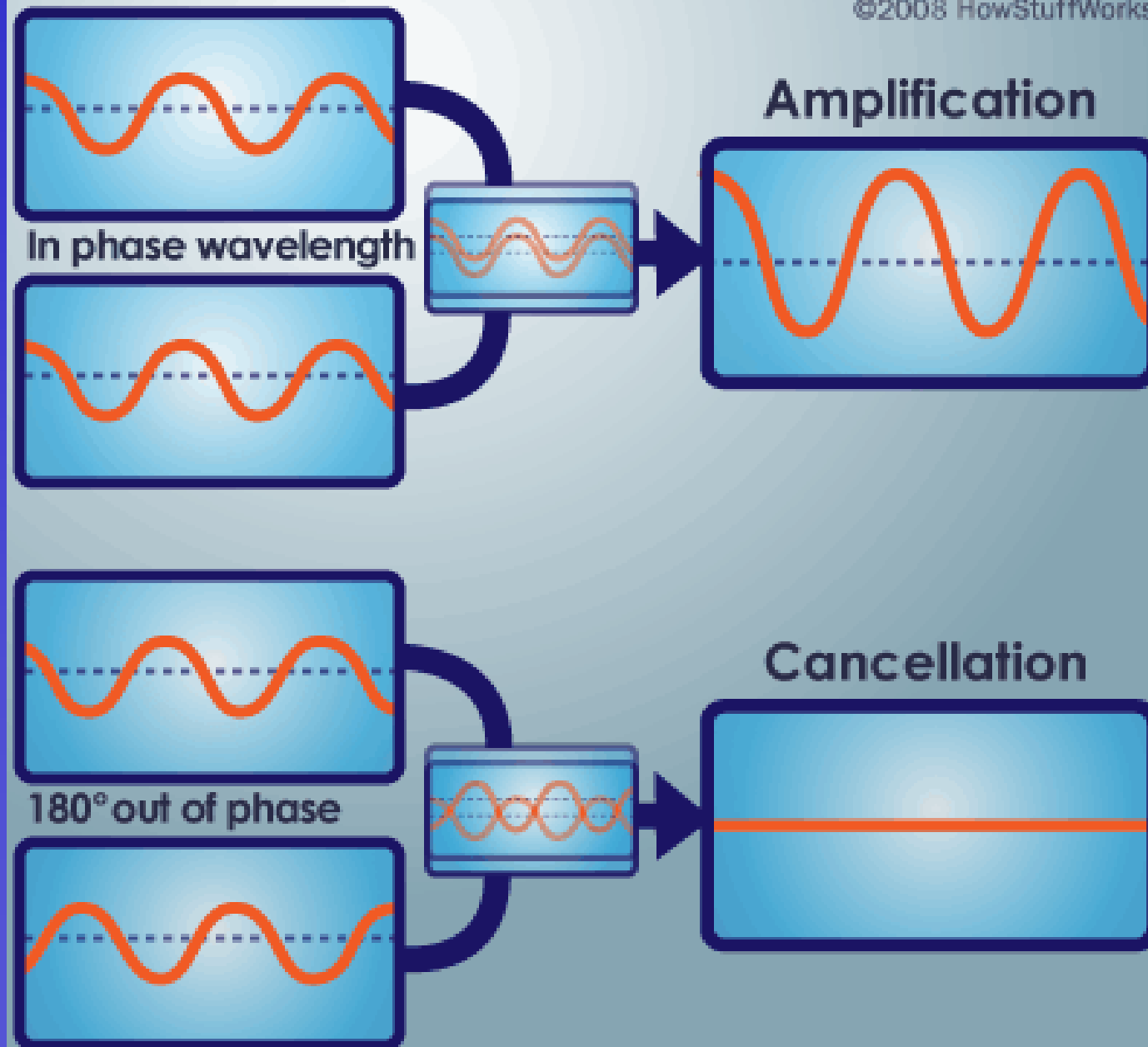


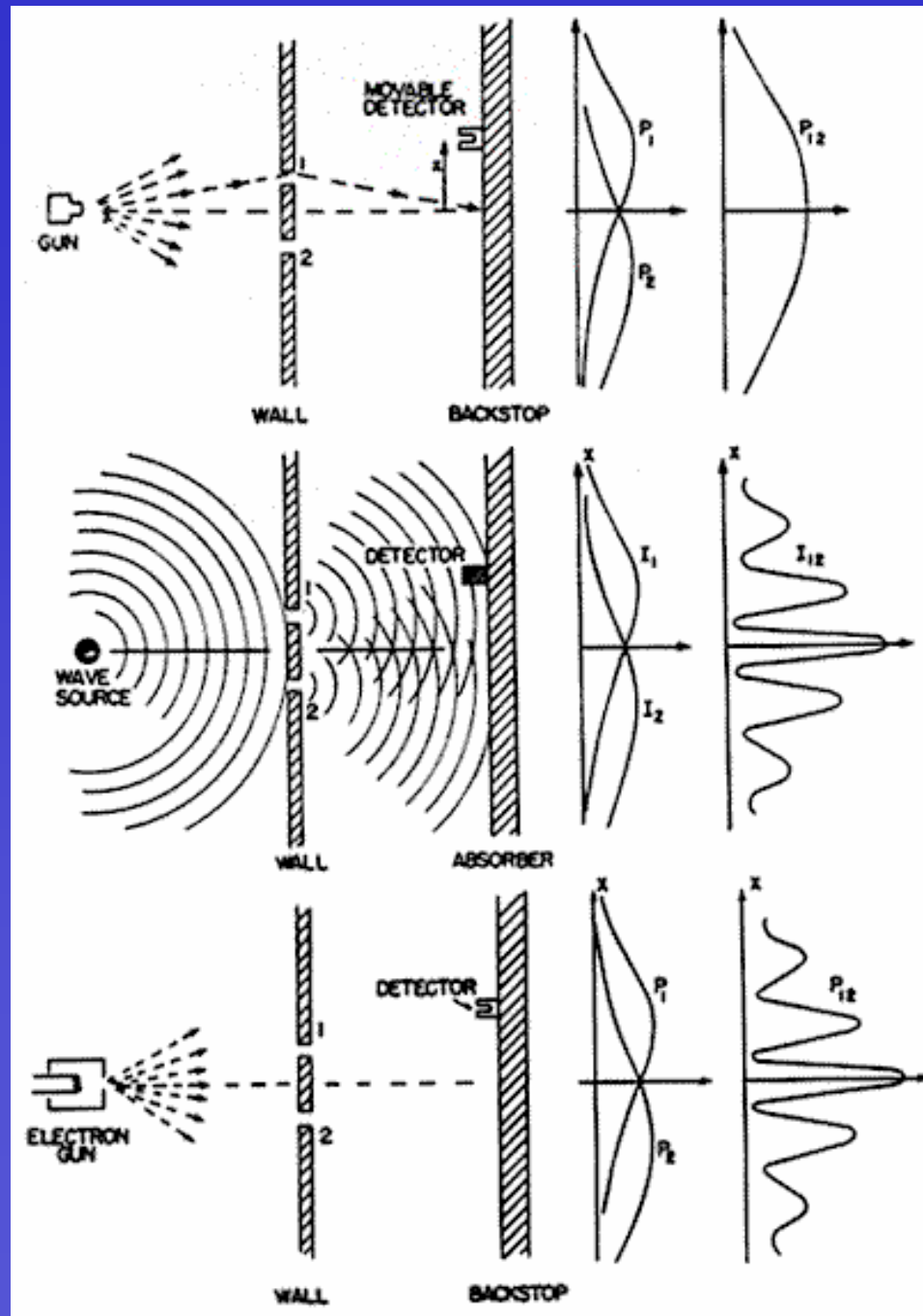
Se la differenza di fase fra le due onde è un multiplo intero pari della lunghezza d'onda, allora si ha, fra le due onde, interferenza **COSTRUTTIVA**.

Se la differenza di fase è pari a mezza lunghezza d'onda o ad un multiplo dispari, allora si interferenza **DISTRUTTIVA**.

Constructive & Destructive interference

©2008 HowStuffWorks





OCT nel dominio del tempo

In un sistema OCT il fascio di luce viene diviso in due bracci:

- in un braccio la luce viene riflessa dal campione da studiare,
- nell'altro braccio (detto di riferimento) la luce viene riflessa da uno specchio.

I due fasci di luce si rincontrano dopo i rispettivi percorsi e, purché la differenza fra i due cammini ottici sia minore di una lunghezza di coerenza, essi daranno luogo ad una figura di interferenza.

Il percorso ottico della luce proveniente dal campione dipende dalla forma del campione stesso, nel senso che la forma del campione determina il ritardo (o l'anticipo) del fascio ottico rispetto al fascio di riferimento.

Il fascio di luce coerente viene diviso, tramite un divisore di fascio, in due fasci identici. Ognuno di questi due fasci percorrerà un cammino diverso, fino a ricombinarsi sul rivelatore.

La differenza del cammino ottico percorso da ogni fascio genera una differenza di fase tra loro. E' questa differenza di fase che dà luogo alla figura di interferenza.

Nella OCT a dominio temporale la lunghezza ottica del braccio di riferimento viene traslata longitudinalmente (cioè, accorciata e allungata) nel tempo.

Una proprietà della interferometria a bassa coerenza e dell'interferometria in generale è che la figura di interferenza, cioè la serie di frange scure e luminose, si ottiene solamente se la differenza di cammino ottico fra i due bracci è minore della lunghezza di coerenza della luce stessa.

L'involuppo della figura di interferenza stessa cambia al variare del cammino ottico stesso, laddove il picco dell'involuppo corrisponde all'uguaglianza dei cammini ottici.

Tomografia

Origine della figura di interferenza:

- L'area del campione riflette la luce incidente in modo diverso, a seconda della sua forma e della sua dimensione.
- La luce che è al di fuori della lunghezza di coerenza NON contribuisce alla figura di interferenza.
- Il profilo dovuto al contributo della luce riflessa è chiamato **A-scan** e contiene informazioni sulle dimensioni spaziali e sulla localizzazione delle strutture all'interno del campione stesso.
- Combinando una serie di queste scansioni assiali laterali (A-scan) si può ottenere una tomografia (detta **B-scan**) del campione.

OCT nel dominio delle frequenze

Nella OCT a dominio nelle frequenze, la larghezza di banda dell'interferenza viene acquisita con dei rivelatori separati spettralmente.

In questa modalità non c'è bisogno di muovere il braccio di riferimento.

Questa caratteristica fornisce le immagini in tempi molto più brevi, e si riduce il rapporto segnale/rumore.

La OCT raggiunge un'alta risoluzione spaziale perché la lunghezza d'onda della luce utilizzata è più bassa di quella degli ultrasuoni o radio-frequenze.

La luce che incide sul campione è solo in parte riflessa (e va quindi a formare la figura di interferenza), in gran parte viene diffusa (*scattered*). La componente di luce diffusa contribuisce al riverbero.

Nella tecnica dell'OCT la componente di luce diffusa viene eliminata tramite dei filtri.

Il principio fisico che permette di filtrare la luce diffusa è la coerenza ottica (differenza di fase costante nel tempo).

Infatti, **solo** la luce riflessa (non diffusa) è coerente (cioè, conserva la fase ottica che consente ai raggi di luce di propagarsi in una piuttosto che in un'altra direzione).

Nella strumentazione OCT un interferometro ottico è regolato in modo tale da rivelare *solo* la componente coerente: in pratica, l'interferometro seleziona solo la luce coerente, necessaria alla formazione dell'immagine, facendo disperdere quella diffusa.

Nel processo di formazione dell'immagine si tiene conto anche della profondità e dell'intensità della luce riflessa proveniente da un sottostrato.

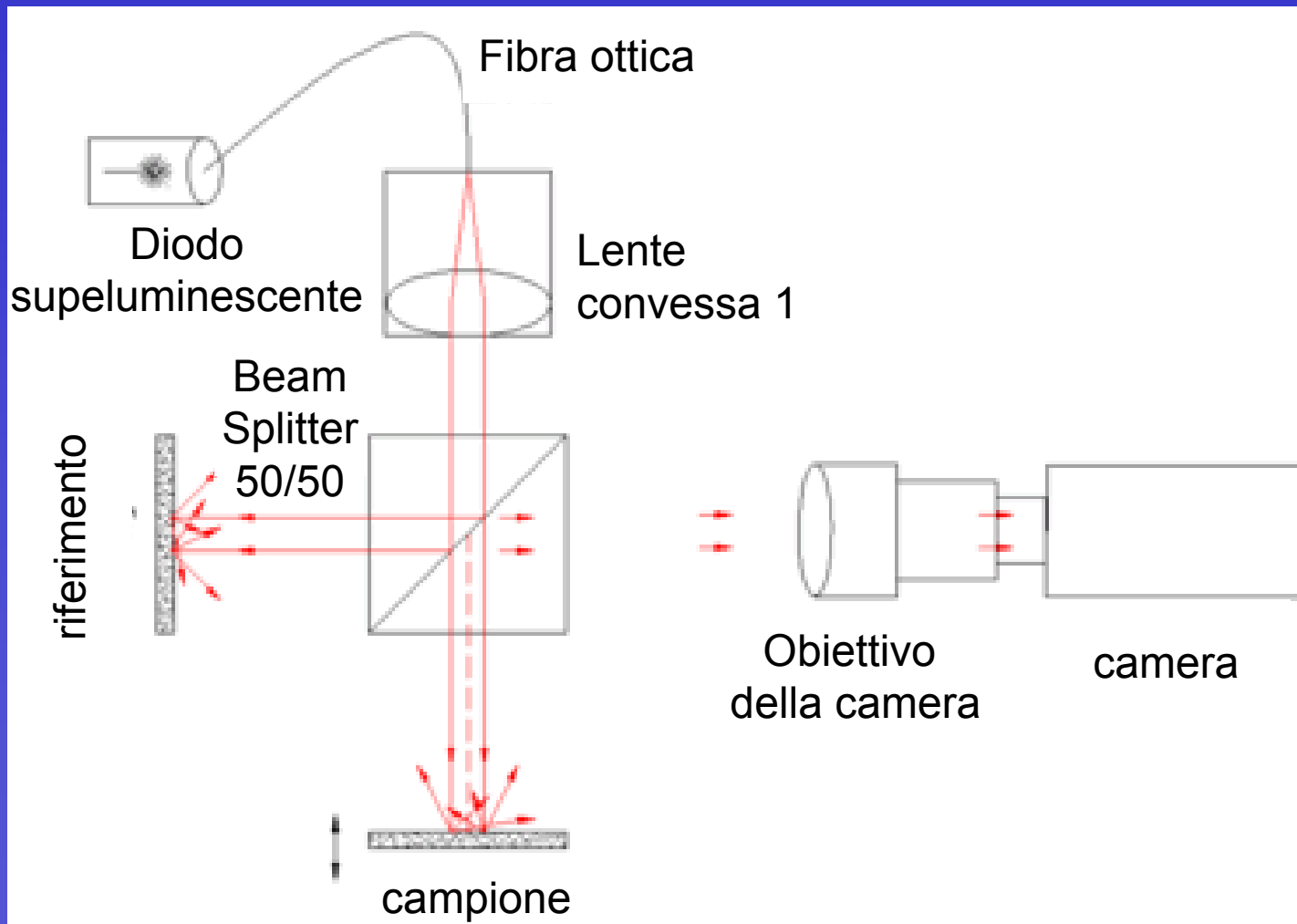
Nell'ambito delle tecniche di imaging 3D, la OCT è simile all'imaging con gli ultrasuoni.

La tecnica è limitata all'imaging fino ad 1-2 mm al di sotto della superficie del tessuto biologico perché a profondità maggiori la componente di luce riflessa è troppo piccola per essere rivelata.

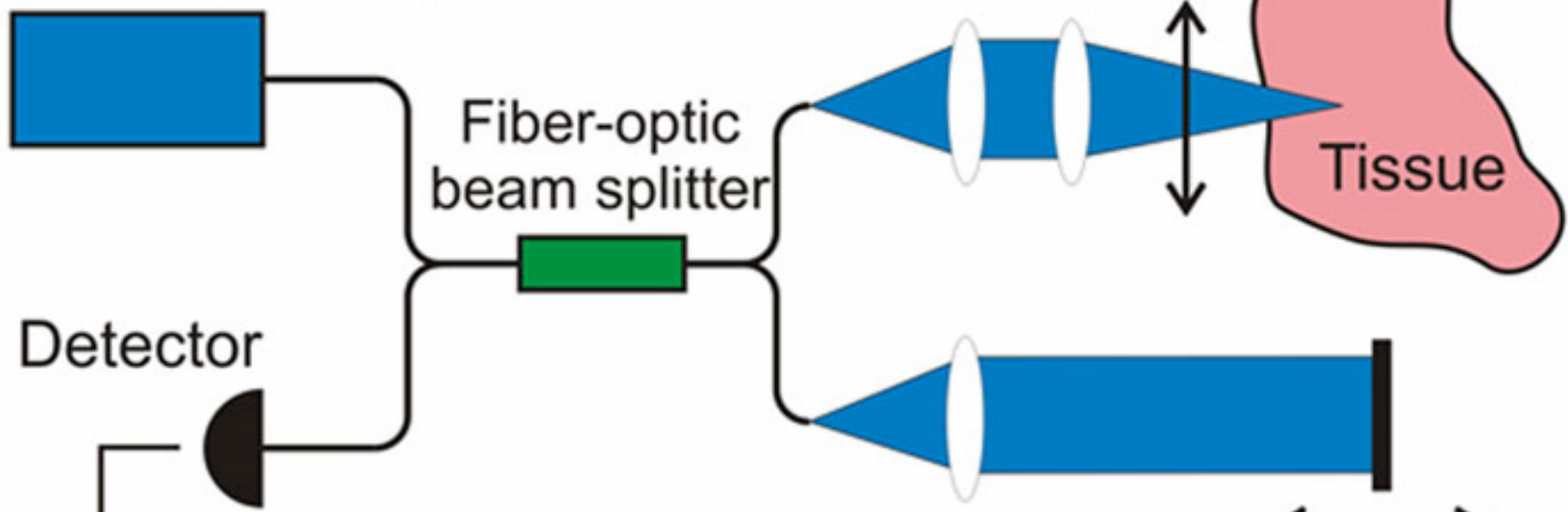
Non è richiesta una preparazione specifica del tessuto da investigare.

E' anche importante osservare che la potenza del laser in uscita è bassa e non è pericolosa per l'occhio.

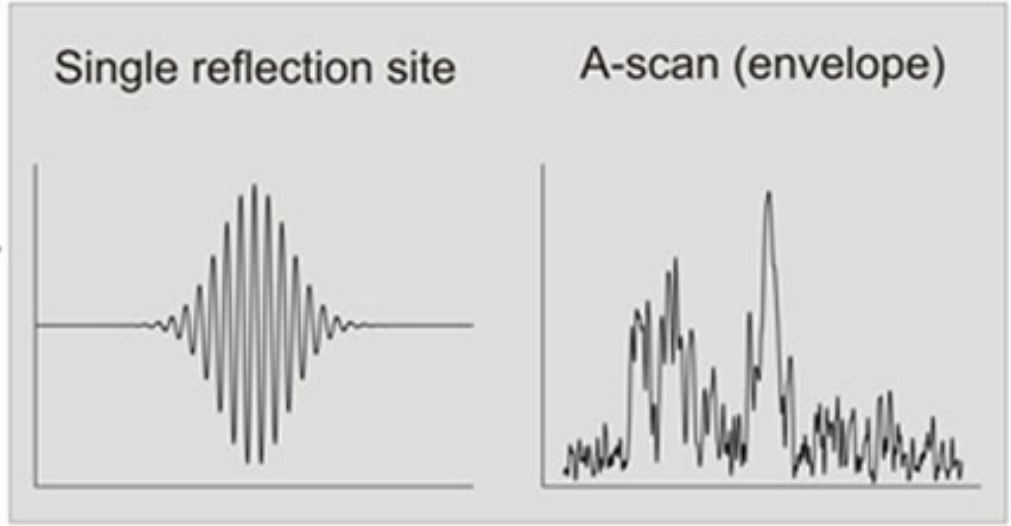
SCHEMA DI UN APPARATO DI OCT



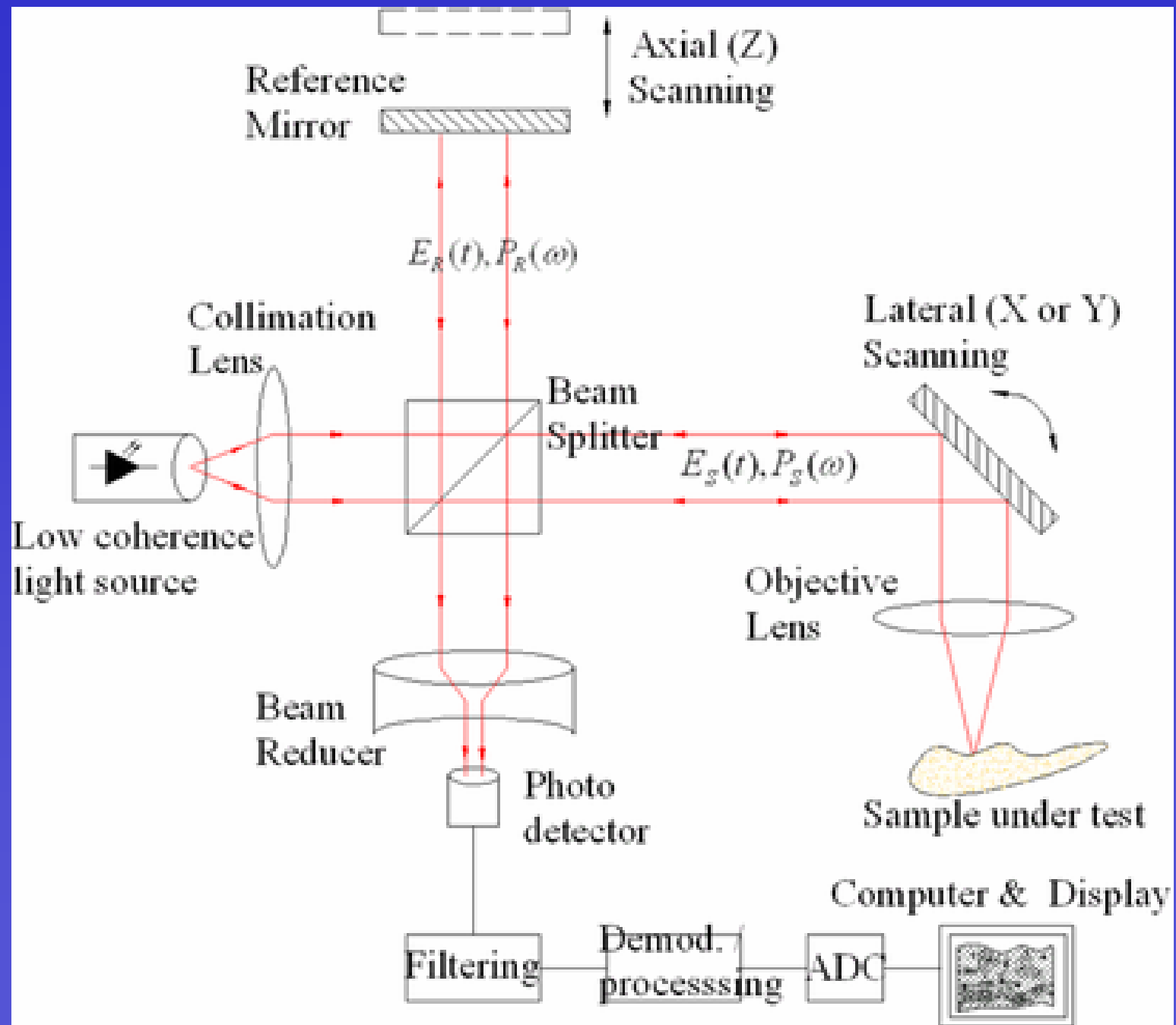
Broad bandwidth
source (QD-SLED)

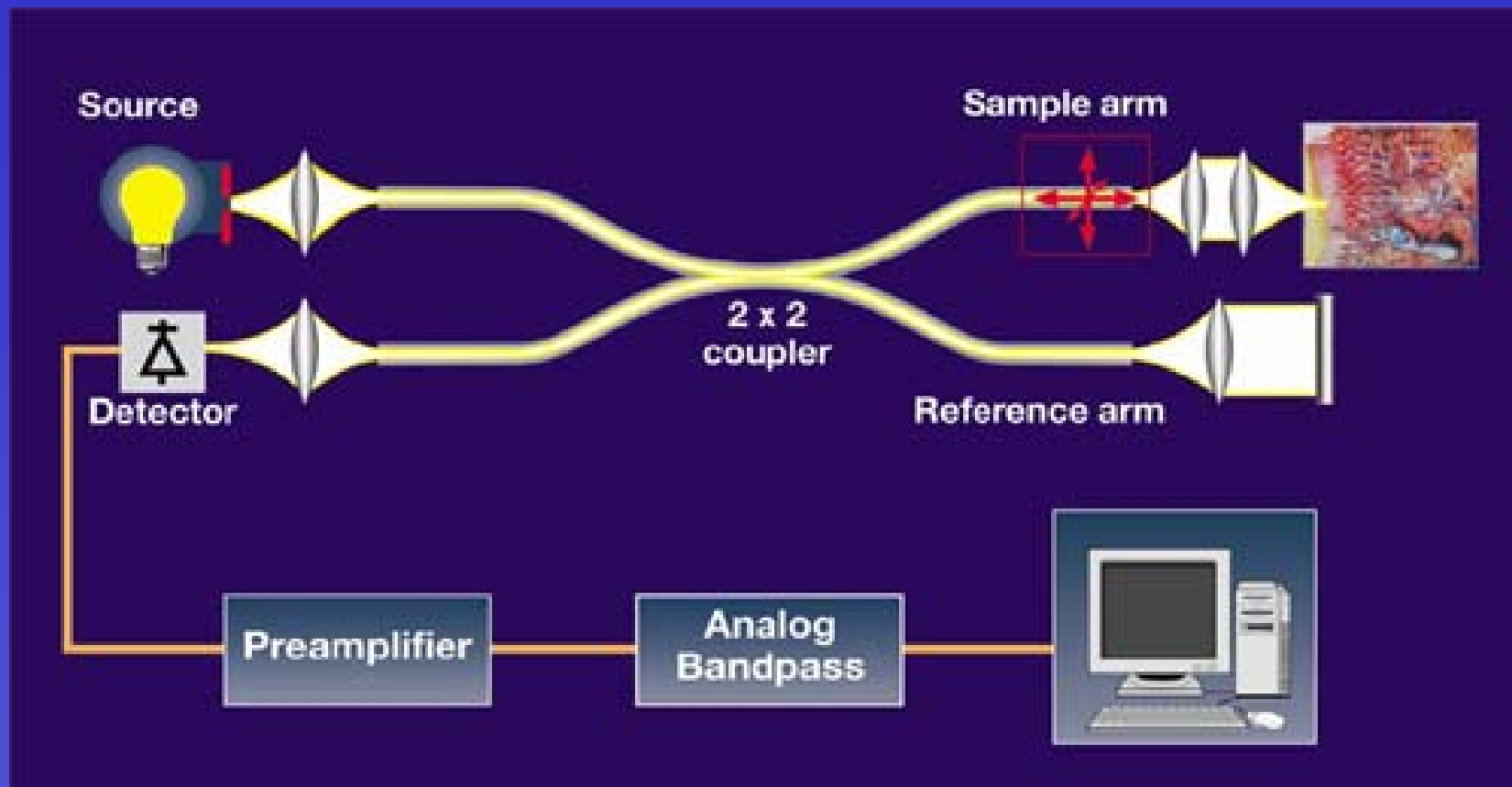


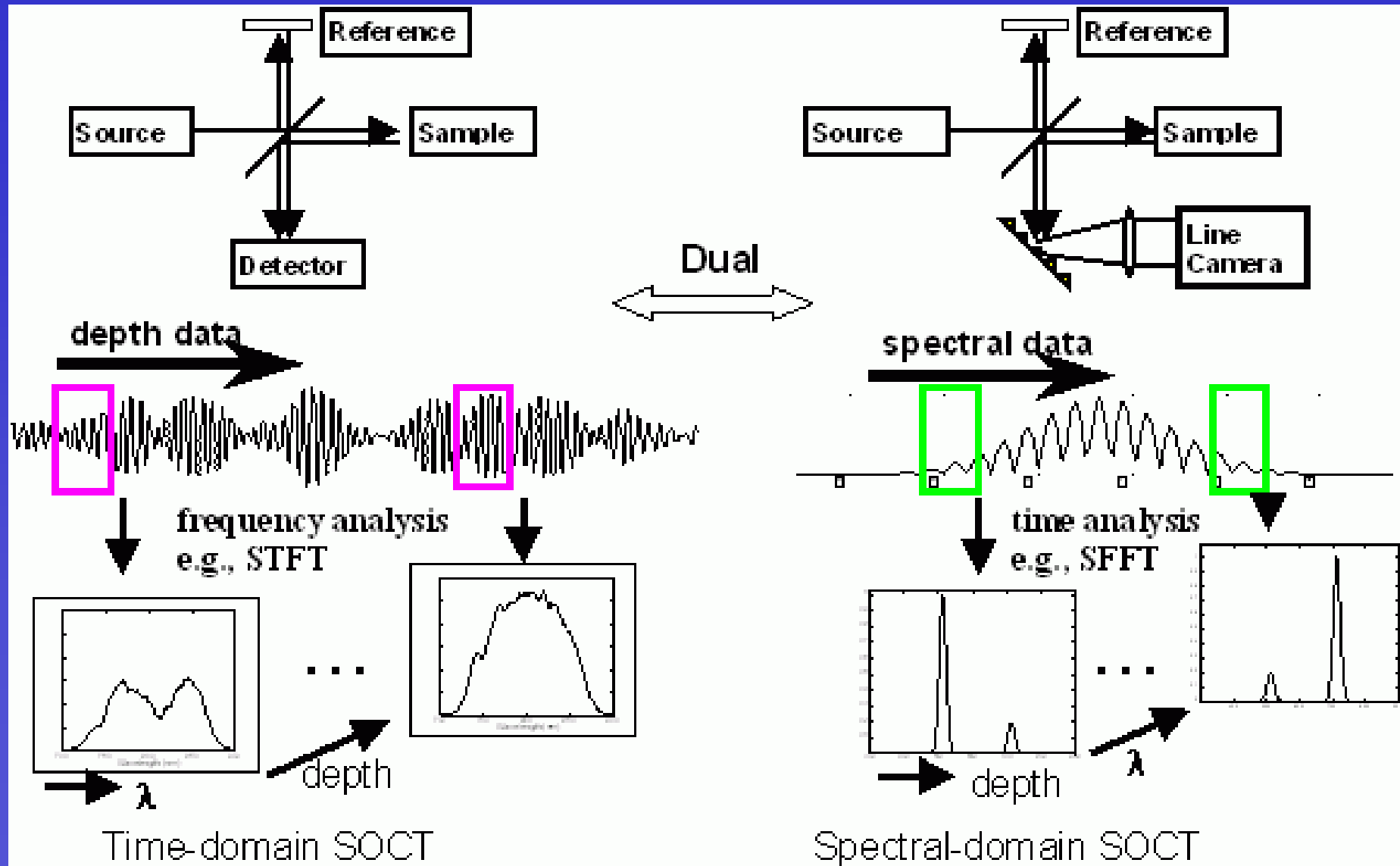
Detector



Optical
delay line
scanning reference
mirror







L'OCT proietta sulla retina un fascio di lunghezza d'onda nel vicino infrarosso (820 nm) generato da un diodo superluminescente; confronta quindi i tempi di propagazione dell'eco della luce riflessa dalla retina con quelli relativi allo stesso fascio di luce riflesso da uno specchio di riferimento posto a distanza nota. Benché la luce riflessa dalla retina sia composta da echi multipli, la distanza percorsa dagli stessi viene determinata tramite la variazione della distanza dallo specchio di riferimento.

L'interferometro OCT rileva elettronicamente, raccoglie, elabora e memorizza gli schemi di ritardo dell'eco provenienti dalla retina.

I tomogrammi vengono visualizzati in tempo reale utilizzando una scala in falsi colori che rappresenta il grado di riflettività dei tessuti posti a diversa profondità: i colori scuri (blu e nero) rappresentano zone a minima riflettività ottica, mentre i colori chiari come il rosso ed il bianco definiscono zone molto riflettenti.

Infine il sistema memorizza le scansioni selezionate, permettendone la successiva elaborazione, tra cui la possibilità di correggere l'effetto dei movimenti oculari longitudinali.

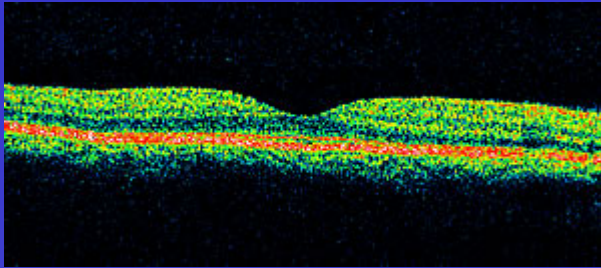
L'OCT è quindi un esame semplice, rapido, non invasivo ed altamente riproducibile, ma è limitato dalla presenza di qualsiasi opacità dei mezzi diottrici (edema o leucomi corneali, cataratta, emovitreo) e dalla miosi.

Le immagini tomografiche ottenute con l'OCT permettono uno studio sia di tipo qualitativo che quantitativo del tessuto retinico, con la possibilità di dirigere la scansione direttamente verso la zona di interesse grazie alla contemporanea osservazione della retina. Dal punto di vista qualitativo su ogni scansione si può effettuare un'analisi della morfologia e del grado di riflettività degli strati retinici. Per quanto riguarda la valutazione quantitativa lo strumento permette di misurare lo spessore della retina, che può anche essere rappresentato in mappe di spessore.

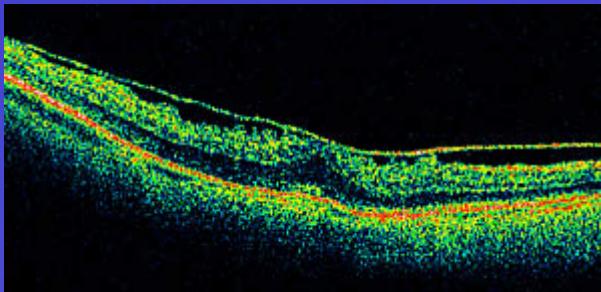
UN MODERNO APPARATO DI OCT



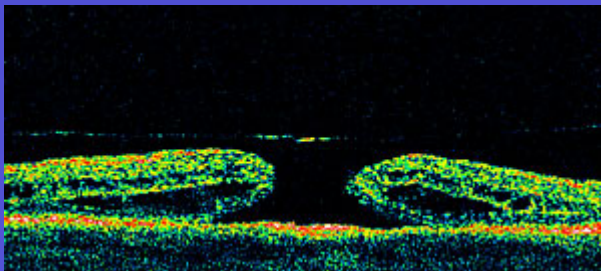
RICOSTRUZIONI: SITUAZIONI FISILOGICHE E PATOLOGIE



Sezione tomografica della regione maculare in condizioni normali



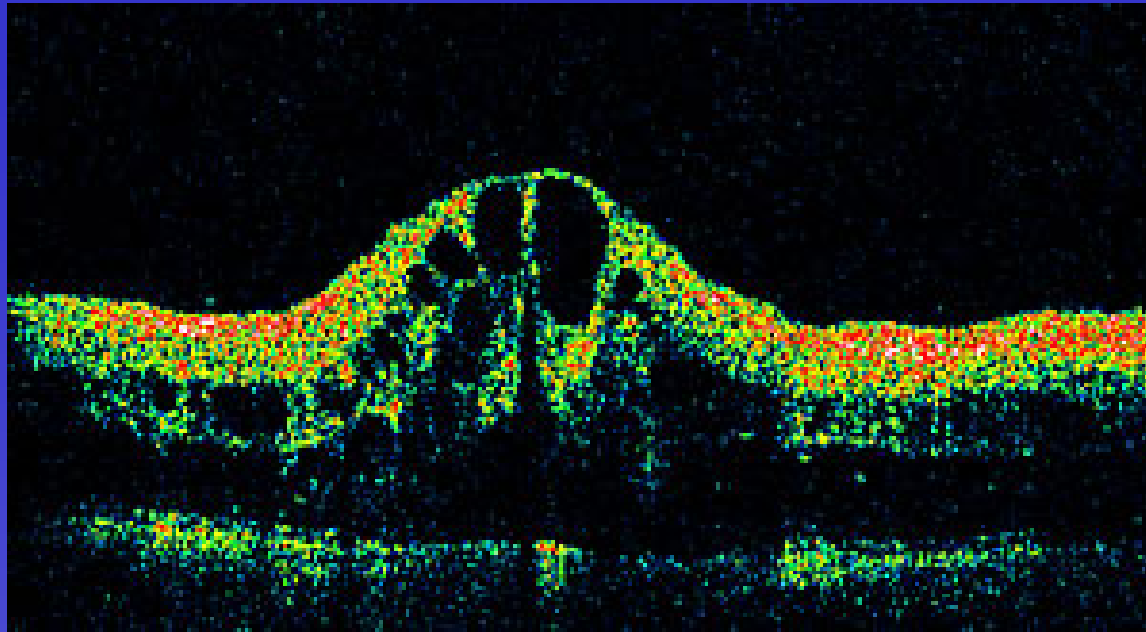
Fibrosi pre-retinica. Si possono osservare aumento dello spessore retinico, scomparsa della depressione foveale e presenza di aree a diminuita riflettività all'interno della retina, indice di edema intraretinico



L'OCT è l'esame più indicato per selezionare i casi di foro maculare e di sindrome dell'interfaccia vitreo-retinica potenzialmente suscettibili di trattamento chirurgico

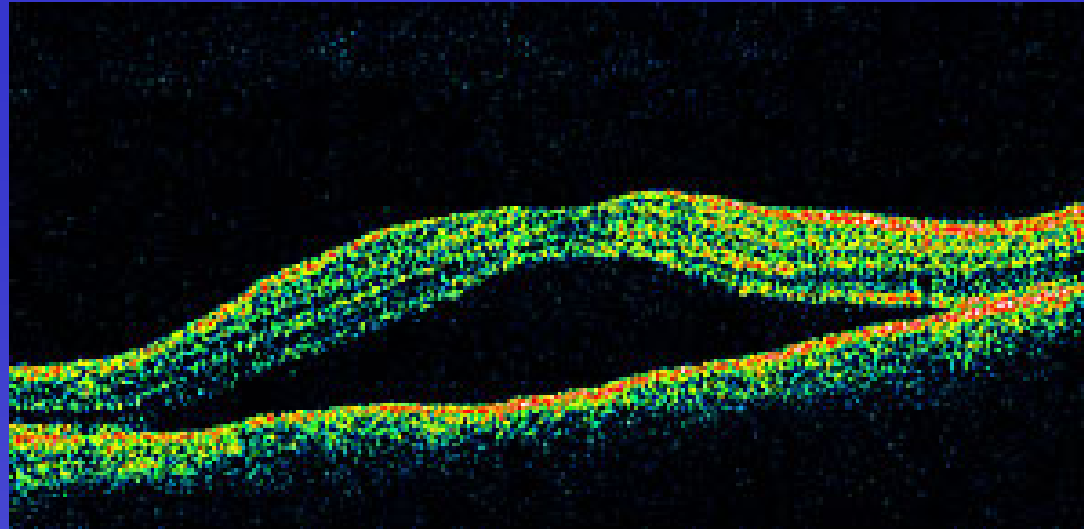
(vitrectomia)

RICOSTRUZIONI: PATOLOGIE



L'OCT consente una semplice e sensibile diagnosi dell'edema maculare secondario a retinopatia diabetica, occlusione della vena centrale della retina, uveite, fibrosi pre-retinica o post-intervento di cataratta. In questi casi le sezioni tomografiche mostrano un aumento più o meno marcato dello spessore della retina, che può mostrare al suo interno aree tondeggianti a ridotta riflettività, segno di accumulo intraretinico di liquido (edema cistoide). L'ispessimento retinico può essere quantificato e venir rappresentato in mappe di spessore retinico, di evidente utilità nel corso del follow-up del paziente

RICOSTRUZIONI: PATOLOGIE



Distacco del neuroepitelio maculare. Nella Corioretinopatia Sierosa Centrale di tipo acuto l'OCT permette di valutare in modo oggettivo e quantificabile il distacco del neuroepitelio e l'eventuale presenza di piccoli distacchi dell'epitelio pigmentato associati, con la possibilità di monitorarne l'evoluzione spontanea o successiva a trattamento fotocoagulativo. Anche piccoli sollevamenti del neuroepitelio, non clinicamente identificabili all'esame biomicroscopico, possono essere evidenziati dall'OCT sotto forma di sottili bande a ridotta riflettività comprese tra il complesso EPR-coriocapillare e lo strato dei fotorecettori

Riferimenti:

- 1) <http://www.fondazionemacula.it/pagine/tomografiaacoerenzaottica.php>
- 2) Wikipedia
- 3) <http://lob.epfl.ch/webdav/site/lob/users/138230/public/OCT.gif>
- 4) <http://www.fondazionemacula.it/pagine/tomografiaacoerenzaottica.php>