



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Biostrutture e Bioimmagini



HANDS-ON GUIDE

PERISCAN PIM II LDPI

TITOLO:	PERISCAN PIM II LDPI
SCOPO:	Istruire gli utenti della facility di imaging preclinico al corretto uso dello scanner LDPI e post-processing delle immagini
DESTINATARI:	Preclinical Imaging Facility, CEINGE scarl, Naples, Italy
ULTIMA REVISIONE:	2009
AUTORI:	Dr. Sara Gargiulo, Dr. Matteo Gramanzini

NOTA: la presente guida operativa non sostituisce la accurata lettura e consultazione dei manuali delle apparecchiature forniti dalla ditta produttrice

ANESTESIA

Anestesia gassosa con miscela di Isoflurano e Ossigeno o iniettabile

Periscan PIM II System

❖ Introduzione

Il Periscan laser doppler usa un fascio laser allo stato solido a basso potere 670nm, che esegue una scansione sequenziale e graduale della superficie tissutale. Per evitare artefatti di movimento, il fascio laser si ferma per circa 35 millisecondi prima di ogni misurazione. Questo significa che il fascio non è in movimento relativo al tessuto quando il segnale viene campionato. Le radiazioni riflesse sono captate dalle componenti del doppler dopo essere state generate dal movimento delle cellule ematiche della rete superficiale microvascolare, in 4096 punti della superficie in studio. In ogni punto del tessuto, il fascio laser monocromatico penetra per una profondità di poche centinaia di micrometri. In seguito all'interazione con particelle in movimento, generalmente globuli rossi, una frazione dei fotoni viene deviato in frequenza secondo il principio doppler, mentre altri fotoni, interagendo soltanto con la parte statica del tessuto, non vengono modificati in frequenza. Una piccola porzione di luce riflessa, comprendente un misto di luce non modificata e luce modificata in frequenza, colpisce il fotodetettore posizionato nello scanner. L'insieme dei fasci di luce sulla superficie del fotodetettore permette di modulare l'immagine in misura determinata dalla componente di luce deviata in frequenza. La ampia variazione di frequenza generata dalle cellule ematiche che si muovono ad alta velocità generalmente determina più alte frequenze nell'immagine, mentre la grandezza della porzione fluttuante dell'immagine è correlata al numero di cellule ematiche che si muovono nel campione volume.

In ogni punto del tessuto, il fascio laser si arresta per circa 50 millisecondi per registrare le radiazioni riflesse. Appena il fascio laser si sposta da un punto del tessuto al successivo, viene visualizzata la completa immagine di perfusione. In aggiunta, una foto in bianco e nero del tessuto basata sulla registrazione totale della luce riflessa viene rappresentata come immagine separata.

❖ Area di scansione

Ogni area di scansione comprende al massimo 64X64 punti di campionamento.

La attuale dimensione dell'area campionata e la distanza tra 2 punti consecutivi di campionamento ("step length") dipende dalla distanza tra scanner e tessuto e dalla modalità di risoluzione scelta.

Nb: la luce ambientale può influenzare i valori di perfusione!

❖ Applicazioni del Perimed laser doppler system

Il Perimed Laser Doppler è una nuova tecnologia per studi sul microcircolo in campo clinico e nella ricerca di laboratorio. La tecnica può essere usata per monitorare l'attività microcircolatoria nei tessuti sani e malati. Essa può essere utile anche a comprendere le risposte del microcircolo in seguito all'applicazione di uno stimolo. Il Periscan System è un sistema di imaging a laser doppler perfusion per l'esame della perfusione superficiale dei tessuti non invasiva. Basato sul principio del laser doppler, esso raccoglie i raggi luminosi riflessi senza toccare il tessuto e genera immagini a colori della distribuzione spaziale della perfusione dei tessuti.

Le variazioni nel tempo della perfusione ematica tissutale in un singolo sito o in più siti può essere registrata eseguendo l'esame in modalità "DUPLEX".

La modalità operativa citata rende il Periscan System adatto all'esame delle variazioni dinamiche e della eterogeneità della microcircolazione. Il software Periscan offre un supporto nella valutazione dei risultati, che possono anche essere esportati su altri software per ulteriori analisi. Dal momento che non c'è contatto fisico col tessuto bersaglio, l'influenza sulla perfusione ematica può essere considerata non rilevante. Questo significa che ripetuti esami clinici nel corso del tempo di una particolare condizione possono essere eseguiti senza rischi di contaminazione, infezione o disturbo per il paziente.

❖ Componenti del Periscan system

1) software: controlla il sistema di acquisizione delle immagini e valuta i risultati.

2) Sistema di acquisizione immagini: scanner, opto-isolation unit e scheda di acquisizione dati

❖ Acquisizione immagini

1) accendere pc e monitor

2) accendere l'opto-isolation unit

3) accendere il pulsante on-off dello scanner

4) far riscaldare lo scanner per almeno 20 minuti prima di cominciare le misurazioni.

5) Aprire il programma PERISCAN SISTEM SOFTWARE LDPIwin

6) Modulare l'intensità della luce riflessa:

a) posizionare lo scanner a circa 20 cm dall'oggetto

b) selezionare TOOLS=> INTENSITY e aumentare il valore di intensità tra 7 e 9 volts avvicinando lo scanner all'oggetto. La soglia predefinita va impostata a 6,2 volts , poi cliccare OK

7) impostare la funzione " MARK AREA"

Questa funzione va impostata prima delle misurazioni e permette di definire l'area oggetto di misurazioni e quanto essa sia ampia.

a) cliccare sull'icona "mark area" ed il laser si muoverà lungo il perimetro dell'immagine per mostrare l'area campionata. E' possibile contrassegnare i bordi specifici della zona cliccando i pulsanti numerati nella finestra di dialogo. I bordi possono essere marcati 1 volta selezionando F1 o continuamente, selezionando F2

b) Adattare le dimensioni delle immagini aumentando o riducendo la distanza tra lo scanner e l'oggetto.

NB: ricordare che al variare della distanza scanner-oggetto varia l'intensità

c) impostare la funzione "HEAD POSITION" orientando la scanner image nella direzione reale dello scanner.

d) NB: la funzione "MARK EDGES" deve essere interrotta!

❖ Immagine a singola perfusione

1) tools=> intensity

2) icona MD (measurement dialog) => Single mode

3) icona "marker area" : il laser mostra il perimetro dell'immagine=> ok

4) aprire una nuova immagine window selezionando FILE => NEW o

sull'apposita icona

5) avviare la registrazione con STAR:T il fascio laser scannerizza l'immagine passo a passo.

6) Aggiungere un commento da salvare con l'immagine col tasto "Comments"

7) Salvare l'immagine selezionando FILE => SAVE AS o cliccando sull'icona con l'immagine del floppy e scegliere il nome per il file immagine.

❖ Immagine a perfusione ripetuta

1) tools=> intensity

2) cliccare su MD , selezionare "repeat mode", impostare il settaggio predefinito:

WIDTH	32
HEIGHT	32
N° IMAGE	12
AUTO	PAUSE
TIME DELAY	5 SEC
THRESHOLD	6,2

e confermare con OK

3) selezionare Tools => Options, impostare il settaggio predefinito:

COLOR SCALE	USER DEFINED
MIN	0 VOLT
MAX	5 VOLT

e chiudere la finestra di dialogo.

4) aprire una nuova finestra-immagine windows selezionando File => New o utilizzando la corrispondente icona.

5) Avviare la registrazione cliccando START ed il laser scansisce progressivamente l'oggetto.

Quando la prima "sub immagine" è stata registrata, appare una finestra di "stato misurazione". Attendere il tempo restante per l'acquisizione. Quando sono state registrate tutte le immagini, una casella mostrerà il n° di immagini acquisite. Utilizzare tale casella per visualizzarle.

6) Salvare l'immagine con File => Save As o apposita icona

❖ Immagine di perfusione in "sequential mode"

1) tools=> intensity

2) cliccare su MD, selezionare "sequential mode", impostare il settaggio predefinito:

IMAGE SETUP	4 image 32X 32
START METHOD	AUTOP AUSE
RESOLUTION	HIGHT
TIME DELAY	5 SEC
THRESHOLD	6,2

e confermare con OK

3) aprire una nuova finestra- immagine windows selezionando File => New o utilizzando la corrispondente icona.

4) Avviare la registrazione cliccando

Quando tutte le immagini sono state registrate, una finestra mostra il numero di immagini acquisite. Essa permette di scorrere le immagini.

5) Salvare l'immagine con File => Save As o apposita icona

NOTA: non si può utilizzare la modalità ROI calculation in sequential mode

❖ Registrazione in "Duplex Mode"

Questa sezione mostra come registrare la per fusione in modo continuo per un singolo sito o un numero di siti adiacenti sulla superficie dei tessuti e presentare i risultati in funzione del tempo.

1) tools=> intensity

2) cliccare su MD, selezionare “sequential mode”, impostare il settaggio predefinito:

PROBE CONFIGURATION	3X3 MEASUREMENT SITE
RESOLUTION	HIGHT
THRESHOLD	6,2

e confermare con OK

3) aprire una nuova finestra- immagine windows selezionando File => New o utilizzando la corrispondente icona.

4) avviare la registrazione con START => RECORD; il laser scansisce i siti di misurazione (9 siti = 3X3)

Il valore medio in per fusione viene continuamente rappresentato in funzione del tempo. Il comando STOP permette di interrompere la registrazione. 5) Salvare l'immagine con File => Save As o apposita icona

❖ Elaborazione delle immagini

Un' immagine può essere modificata dopo la registrazione.

- Scegliere “ User defined perfusion color scale” e sttare min 0 max 8 Volt. Osservare quanti colri in più appaiono nell'immagine di per fusione riducendo il valore max.
- Deselezionare “Interpolate” e osservare quanto le reali immagini sono simili
- Selezionare “Superimpose2 per sovrapporre le 2 immagini (foto e perfusion).
- Selezionare “ View Foto” per visualizzare la foto dell'oggetto.

❖ Analisi dei dati

Usando lo strumento ROI è possibile confrontare differenti regioni dell'area misurata. Valori che possono essere analizzati sono min, max, deviazione standard, media, cambiamento assoluto, cambiamento percentuale e numero di siti nell'area. Si procede nel modo seguente:

- 1) aprire l'immagine salvata (cliccare sull'iimmagine. Poi su cartella, open ctrl + o e apri
- 2) scegliere un marker
- 3) marcare la ROI con l'ausilio del mouse
- 4) utilizzare l'apposito comando – freccia per eliminare, spostare, ridimensionare la ROI
- 5) quando l'area è marcata apparirà la finestra dei calcoli sulla ROI

I valori statistici sono calcolati con una delle aree come referenza. L'area di referenza può essere cambiata in corrispondenza di “referente ROI “ (1 di 4; 2 di 4; etc).

I dati possono essere esportati su un foglio excell o word (“ export options”) nella finestra ROI. Un'immagine di per fusione può essere copiata su word:

- aprire l'immagine
- edit => copy image => l'immagine viene copiata in “clipboard”
- edit => paste

REFERENZE

- 1- PERISCAN PIM II PERIMED MANUAL