

Alberto Donazzan

1038705 - IL

Studio teorico e
Progettazione ottica di un
Microscopio Confocale Corneale
a scansione LASER

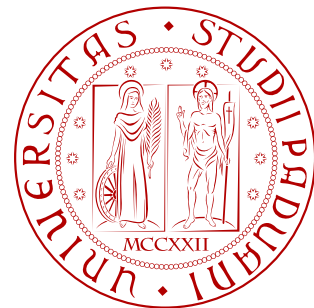
Tesi di
Laurea Magistrale in
Ingegneria Elettronica

RELATRICE
Prof.ssa Maria G. Pelizzo


CO-RELATORE
Dott. Michele Pascolini

Università degli Studi di Padova
Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Anno Accademico 2013/2014
31 marzo 2014



Alberto Donazzan: *Studio teorico e progettazione ottica di un microscopio confocale corneale a scansione LASER*, Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Elettronica, © marzo 2014.

Questo lavoro è stato realizzato con \LaTeX [49] su  Windows 7 usando il pacchetto ArsClassica, una rielaborazione dello stile ClassicThesis di André Miede ispirato a *Gli elementi dello stile tipografico* di Robert Bringhurst.

I nomi commerciali, i loghi e i marchi registrati menzionati nella tesi appartengono ai rispettivi proprietari.

E-MAIL

alberto.donazzan@gmail.com

INDICE

1	MICROSCOPIA OTTICA	1
1.1	Il microscopio ottico composto	2
1.1.1	Risoluzione laterale	5
1.1.2	Risoluzione assiale	7
1.1.3	Struttura	9
1.1.4	Tipi di illuminazione	11
1.2	Tecniche di contrasto	14
1.2.1	Microscopia in campo oscuro (darkfield)	14
1.2.2	Microscopia a contrasto di fase	15
1.2.3	Microscopia in luce polarizzata	16
1.2.4	Microscopia a contrasto interferenziale (DIC)	17
1.2.5	Microscopia a fluorescenza	18
1.2.6	Microscopia a due fotoni	19
1.3	Microscopia confocale	21
1.3.1	Struttura di base	21
1.3.2	Risoluzione confocale laterale	23
1.3.3	Risoluzione confocale assiale	25
1.3.4	Sorgenti	26
1.3.5	Sistemi di scansione	27
1.3.6	Rivelatori	31
2	NECESSITÀ CLINICA DELLA MICROSCOPIA CONFOCALE CORNEALE	33
2.1	L'occhio umano	33
2.1.1	Tonaca esterna	33
2.1.2	Tonaca media	34
2.1.3	Tonaca interna	35
2.1.4	Saccadi	35
2.2	La cornea	36
2.2.1	Anatomia e fisiologia	36
2.2.2	Patologia	39
2.3	Perché usare la microscopia confocale corneale?	40
3	STATE-OF-THE-ART DELLA MICROSCOPIA CONFOCALE CORNEALE	43
3.1	Nidek Confoscan 4	43
3.1.1	Modalità operative	44
3.1.2	Struttura	45
3.1.3	Limiti e problemi	46
3.2	Heidelberg HRT Rostock Cornea Module	47
4	PROTOTIPO NIDEK CONFOSCAN 5	49
4.1	Studio teorico del sistema	50
4.1.1	Selezione della configurazione base	50
4.1.2	Sorgente	51
4.1.3	Rivelatore	52
4.1.4	Robot sagittale	53
4.1.5	Obiettivo	54
4.1.6	Pinhole ottimale	56
4.1.7	Sistema ideale	57

4.1.8	Specchio risonante	60
4.2	Il software Zemax®	63
4.3	Progettazione del percorso di imaging	64
4.3.1	Sistema con lenti reali	74
4.3.2	Effetti della curvatura corneale	74
4.4	Progettazione del percorso di illuminazione	79
4.4.1	LED/LASER accoppiato in fibra	79
4.4.2	QI Optiq iFLEX-iRIS	81
4.4.3	Nichia NDB7352 con lenti di collimazione	83
4.4.4	Polarizzazione	85
4.5	Costruzione del prototipo da banco ottico	86
4.5.1	Cage system	86
4.6	Conclusioni	90
A	CODICE ZPL MACRO	91
A.1	Macro ZPL per il calcolo della BFL	91
A.2	Macro ZPL per il calcolo della FFL	91
	BIBLIOGRAFIA	93

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1.1	Microscopio semplice	2
Figura 1.2	Microscopio composto	3
Figura 1.3	Definizione di tube-length	4
Figura 1.4	Disco di Airy	6
Figura 1.5	Lente-obiettivo ad immersione	7
Figura 1.6	Figura di diffrazione tridimensionale	8
Figura 1.7	Definizione della profondità di fuoco	8
Figura 1.8	Microscopio per uso scientifico	10
Figura 1.9	Piani focali coniugati in luce trasmessa	11
Figura 1.10	Principio di Köhler	12
Figura 1.11	Piani focali coniugati in luce riflessa	13
Figura 1.12	Schema della microscopia darkfield	14
Figura 1.13	Schema della microscopia a contrasto di fase	15
Figura 1.14	Schema della microscopia in luce polarizzata	16
Figura 1.15	Schema della microscopia DIC	17
Figura 1.16	Progressione dei raggi luminosi nel microscopio DIC	18
Figura 1.17	Schema della microscopia a fluorescenza	18
Figura 1.18	Microscopia a due fotoni	19
Figura 1.19	Microfotografie con varie tecniche di contrasto	20
Figura 1.20	Brevetto del microscopio confocale di Minsky	22
Figura 1.21	Sezioni ottiche lungo l'asse z	23
Figura 1.22	Schema del microscopio confocale in riflessione	24
Figura 1.23	Risposta al gradino di un microscopio confocale	25
Figura 1.24	Illuminazione Köhler con sorgente LASER	26
Figura 1.25	Stage-scanner	27
Figura 1.26	Deflettore acustico-ottico	28
Figura 1.27	Specchio galvanometrico	28
Figura 1.28	Specchio risonante ad attuazione magnetica	29
Figura 1.29	Disco di Nipkov	30
Figura 1.30	DMD	31
Figura 2.1	Struttura dell'occhio umano	34
Figura 2.2	Sezione anteriore dell'occhio umano	35
Figura 2.3	Sezione della retina	36
Figura 2.4	Sezione della cornea	37
Figura 2.5	Microfotografie degli strati corneali	38
Figura 3.1	Nidek Confoscan 4	44
Figura 3.2	Z-ring	45
Figura 3.3	Schema ottico del CS4	46
Figura 3.4	Strati corneali acquisiti con l'RCM	47
Figura 3.5	HRT Rostock Cornea Module	48
Figura 3.6	Struttura dell'HRT RCM	48
Figura 4.1	Schema del CS5 basato sul DMD	51
Figura 4.2	Curva di sensibilità dell'occhio umano	52
Figura 4.3	Modello 3D del robot sagittale	53
Figura 4.4	Proiezione laterale del robot sagittale	54
Figura 4.5	Obiettivo Olympus LMPlanFl 20x0.40	55
Figura 4.6	Modello parassiale dell'obiettivo Olympus	56
Figura 4.7	Schema essenziale del CS5	60

Figura 4.8	Specchio risonante ad attuazione elettrostatica	61
Figura 4.9	Angolo massimo assoluto per lo specchio risonante . . .	62
Figura 4.10	Angolo massimo relativo per lo specchio risonante . . .	63
Figura 4.11	Schema ottico parassiale del CS5	65
Figura 4.12	Layout e spot-diagram della tube-lens	69
Figura 4.13	Layout e spot-diagram della lente di scansione	70
Figura 4.14	Lente di scansione con singoletto negativo	71
Figura 4.15	Lente di scansione con ottica negativa da catalogo . . .	72
Figura 4.16	Layout e spot-diagram della lente di rivelazione	73
Figura 4.17	Layout e spot-diagram del percorso di imaging	75
Figura 4.18	Effetti della curvatura corneale	76
Figura 4.19	Curvatura corneale e tube-lens	77
Figura 4.20	Curvatura corneale e lenti dietro l'obiettivo	78
Figura 4.21	Illuminazione Köhler con fibra	79
Figura 4.22	Illuminazione Köhler con Fibra	80
Figura 4.23	Illuminazione critica con fibra	81
Figura 4.24	Illuminazione Köhler con sorgente Qioptiq	81
Figura 4.25	Sorgente Qioptiq e illuminazione Köhler	82
Figura 4.26	Efficienza della soluzione Qioptiq	82
Figura 4.27	Sorgente Nichia e illuminazione critica	83
Figura 4.28	Setup di misura della sorgente Nichia	84
Figura 4.29	Potenza ed efficienza del LASER Nichia	85
Figura 4.30	Schema del metodo di polarizzazione	86
Figura 4.31	Cage-system	86
Figura 4.32	Modello 3D del CS5	88
Figura 4.33	Proiezione ortogonale del CS5	89
Figura 4.34	Immagine raccolta dal CS5	90

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 3.1	Caratteristiche tecniche del Confoscan 4	44
Tabella 3.2	Caratteristiche tecniche dell'HRT RCM	47
Tabella 4.1	Definizione dei parametri del prototipo	59
Tabella 4.2	Specifiche tecniche degli specchi risonanti	62
Tabella 4.3	Angolo di tilt dello specchio risonante	67

SOMMARIO

La microscopia confocale corneale rappresenta oggi uno dei più validi metodi di indagine e valutazione delle patologie della cornea umana. Le elevate risoluzioni assiali e laterali raggiungibili con questa tecnica *in vivo* non invasiva sono possibili grazie alla particolare geometria confocale, caratterizzata da due diaframmi su piani focali coniugati e un rapido sistema di scansione e acquisizione della luce.

Con l'obiettivo di innovare e migliorare il microscopio confocale corneale Nidek Confoscan 4, è stato ideato e sviluppato un prototipo completo denominato Confoscan 5 con prestazioni superiori, che sfrutta una sorgente LASER blu e uno specchio MEMS risonante di nuova concezione.

ABSTRACT

Corneal confocal microscopy is a powerful technique for the *in vivo* and non invasive investigation of numerous corneal diseases. Its high axial and lateral resolutions are due to a smart confocal geometry, including two conjugate pinholes and a fast light scanning device.

Nidek Confoscan 5 is a new great performing prototype which has been designed and developed with the aim of improving Nidek Confoscan 4 corneal confocal microscope. The optical system takes advantage of a blue LASER source and a new concept MEMS resonant mirror.

C'est que, malheureusement, on ne se doute pas que le livre le plus précieux du plus savant serait celui où il dirait tout ce qu'il ne sait pas, c'est qu'on ne se doute pas qu'un auteur ne nuit jamais tant à ses lecteurs que quand il dissimule une difficulté.

Sfortunatamente non si comprende come i libri scientifici più validi siano quelli in cui l'autore indica chiaramente tutto ciò che non sa; non vi è alcun dubbio infatti che un autore faccia maggiormente del male ai suoi lettori quando nasconde le difficoltà.

— Évariste Galois

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto la Prof.ssa Maria G. Pelizzo per l'inesauribile fiducia e per avermi dato l'opportunità di svolgere un lavoro tanto difficile quanto ricco e stimolante.

Un sincero ringraziamento va anche a tutto il reparto R&D di Nidek Technologies, che mi ha accolto calorosamente e sempre sostenuto; mi rivolgo in particolar modo al Dott. Michele Pascolini, perché senza il suo saggio consiglio e scanzonato sostegno la mia strada sarebbe stata assai più faticosa da percorrere, persino più dura che assistere al ritiro del Bologna. Ringrazio Mattia Minozzi per l'aiuto insostituibile, la competenza e la pazienza, nonché per aver assecondato contro voglia le mie velleità di giocoliere.

Un grazie di cuore va ai miei genitori, senza i quali non sarei chi sono né avrei potuto scegliere di fare ciò che faccio.

E infine... Fabio... interni in pelle immagino! E Ale, da domani offro io!

Questo lavoro è dedicato interamente a Noemi, che si dedica a me senza riserve dal giorno in cui ci siamo (re)incontrati.

Non finirò mai di ringraziarti, mia bella calabrese.

Padova, marzo 2014

A. D.

INTRODUZIONE

La vista è il più immediato dei cinque sensi, ossia quello che permette all'uomo di acquisire le maggiori e più dettagliate informazioni sull'ambiente che lo circonda. Ciò è reso possibile dalla complessa e delicata struttura oculare, una "fotocamera biologica" che ci interfaccia con il mondo esterno. Le patologie che compromettono il corretto funzionamento di questo delicato apparato sono dunque particolarmente debilitanti e possono peggiorare in modo considerevole la vita del malato.

Negli ultimi anni le tecniche di diagnostica oculare per immagini si sono evolute rapidamente, permettendo l'identificazione di tali patologie fin negli stadi iniziali e consentendo ai medici di intervenire con rapidità ed efficacia per fornire le cure necessarie. La microscopia ottica confocale è emersa recentemente in ambito oftalmologico come potente metodo di studio clinico della cornea, la parte anteriore trasparente del bulbo oculare.

Lo scopo di questo lavoro è offrire un'analisi preliminare delle tecniche di microscopia ottica, con particolare riguardo alla variante confocale, e descrivere nel modo più chiaro e organico possibile i passi di progetto che hanno portato dalla ideazione alla realizzazione prototipale di un microscopio confocale corneale a scansione LASER.

L'esposizione degli argomenti si articola come segue:

IL PRIMO CAPITOLO introduce alle basi della microscopia ottica, descrivendone i principi base e le tecniche di contrasto; analizza poi dettagliatamente la microscopia confocale e le sue prestazioni.

IL SECONDO CAPITOLO esplora le caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'occhio umano e della cornea, nonché le sue patologie, offrendo un rapido confronto fra le diverse tecniche di indagine corneale.

IL TERZO CAPITOLO presenta l'avanguardia dei microscopi confocali per l'imaging corneale.

IL QUARTO CAPITOLO descrive dettagliatamente il flusso progettuale che ha permesso lo sviluppo del prototipo *Nidek Confoscan 5*.

È doveroso informare che il lavoro di tesi qui esposto si è svolto quasi totalmente presso il reparto R&D di *Nidek Technologies Srl* (NT), con sede ad Alghinate (PD). Se ne fornisce di seguito una breve descrizione.

Informazioni su Nidek Technologies Srl

Nidek Co. Ltd è una società specializzata nella ricerca, sviluppo e produzione di strumenti diagnostici e informatici per l'oftalmologia. Con la sua fondazione nel 1971 a Gamagori (Giappone), Hideo Ozawa e altri sei soci si proponevano di creare un connubio che potesse legare l'ottica e l'elettronica [43].

Ancora oggi, infatti, Nidek Technologies, incorporata nel gruppo giapponese Nidek nel 2001, si dedica alla progettazione e allo sviluppo di sistemi software e strumentazioni ottiche innovative per la diagnostica oftalmologica. La filiale con sede ad Albignasego, mostrata in ??, collabora con la casa madre operando anche come supporto alla vendita e alla distribuzione dei prodotti Nidek nel mercato europeo, africano e mediorientale. L'obiettivo principale dell'azienda resta la realizzazione di prodotti all'avanguardia che rispecchino alti standard qualitativi per l'industria dell'*Eye Care*, collaborando attivamente con istituzioni accademiche e centri di ricerca internazionali [55].

Attualmente NT produce diversi strumenti oftalmologici:

- software *NAVIS (Nidek Advanced Vision Information System)*
- topografo corneale *Magellan Mapper*
- microperimetro *MP-1*
- autoretinografo *Orion*
- microscopio confocale corneale *Confoscan 4*

per i quali ha ottenuto la certificazione EN 46001 (sistemi di qualità, dispositivi medici e particolari requisiti di applicazione della ISO 9001) da parte dell'agenzia accreditata *TÜV Product Service* ed è quindi autorizzata ad apporre la marcatura CE ai suoi prodotti. Ha inoltre ottenuto, in anticipo rispetto alla data di obbligatorietà, la certificazione secondo la norma ISO 9001:2000 (anche nota come *Vision 2000*) e quella secondo la norma ISO 13485:2003.

1

MICROSCOPIA OTTICA

INDICE

1.1	Il microscopio ottico composto	2
1.1.1	Risoluzione laterale	5
1.1.2	Risoluzione assiale	7
1.1.3	Struttura	9
1.1.4	Tipi di illuminazione	11
1.2	Tecniche di contrasto	14
1.2.1	Microscopia in campo oscuro (darkfield)	14
1.2.2	Microscopia a contrasto di fase	15
1.2.3	Microscopia in luce polarizzata	16
1.2.4	Microscopia a contrasto interferenziale (DIC)	17
1.2.5	Microscopia a fluorescenza	18
1.2.6	Microscopia a due fotoni	19
1.3	Microscopia confocale	21
1.3.1	Struttura di base	21
1.3.2	Risoluzione confocale laterale	23
1.3.3	Risoluzione confocale assiale	25
1.3.4	Sorgenti	26
1.3.5	Sistemi di scansione	27
1.3.6	Rivelatori	31

In microscopia il sistema ottico elementare è rappresentato dal *microscopio semplice*, o *lente di ingrandimento*, in grado di presentare all'osservatore un'immagine ingrandita di un oggetto vicino (campione). L'immagine risulta allargata perché sottende un angolo maggiore rispetto a quello sotteso dall'oggetto quando questo viene osservato dalla "distanza di visione distinta", che equivale a circa 250 mm e rappresenta la distanza media alla quale la maggior parte delle persone distingue meglio i dettagli.

Il potere di ingrandimento di un microscopio è definito dal rapporto fra l'angolo sotteso dall'immagine e l'angolo sotteso dall'oggetto quando posto alla distanza di 250 mm dall'osservatore.

Il microscopio semplice è costituito da una lente convergente posta in modo che l'oggetto si trovi entro la sua distanza focale. In riferimento alla [figura 1.1](#), un oggetto alto h si trova alla distanza s dalla lente e viene immaginato alla distanza s' con un'altezza h' ; l'immagine è virtuale e sia s che s' sono quantità negative.

È possibile determinare con semplicità l'ingrandimento del sistema ricorrendo alle equazioni dell'ottica *parassiale* [53]:

$$\frac{1}{s'} = \frac{1}{f} + \frac{1}{s} \quad (1.1)$$
$$s = \frac{fs'}{f - s'}$$

Per convenzione sono positive le altezze al di sopra dell'asse ottico, le distanze alla destra dell'origine del sistema e le focali delle lenti convergenti.

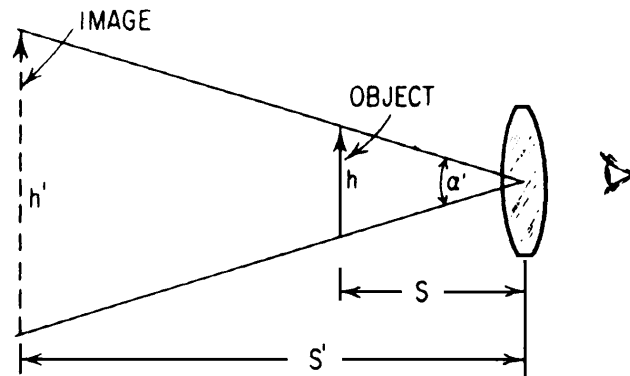


Figura 1.1: Microscopio semplice.

e sostituendo nell'equazione per il calcolo dell'altezza dell'immagine

$$h' = h \frac{s'}{s} = \frac{h(f - s')}{f}$$

Ora, se l'occhio dell'osservatore è posizionato in corrispondenza della lente, l'angolo sotteso dall'immagine è dato da

$$\alpha' = \frac{h'}{s'} = \frac{h(f - s')}{fs'}$$

mentre nel caso di occhio nudo, che osserva alla distanza di visione distinta, l'angolo sotteso dall'oggetto è

$$\alpha = \frac{-h}{250 \text{ mm}}$$

Il potere di ingrandimento MP (*magnification power*) risulta

$$\begin{aligned} MP &= \frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{h(f - s')}{fs'} \cdot \frac{250 \text{ mm}}{-h} \\ &= \frac{250 \text{ mm}}{f} - \frac{250 \text{ mm}}{s'} \end{aligned}$$

Un occhio umano sano a riposo mette a fuoco sulla retina oggetti che si trovano all'infinito.

e quindi dipende sia dalla focale della lente usata, sia dal punto di fuoco scelto. Imponendo $s = -f$ si ottiene $s' = -\infty$: l'immagine si trova all'infinito e può essere osservata con l'occhio a riposo, dunque

$$MP = \frac{250 \text{ mm}}{f} \quad (1.2)$$

che è l'espressione convenzionalmente usata in microscopia per esprimere il potere di ingrandimento di un sistema ottico generico.

1.1 IL MICROSCOPIO OTTICO COMPOSTO

Il microscopio composto è rappresentato da una coppia di lenti convergenti (figura 1.2): la lente-*obiettivo* produce un'immagine reale invertita, in genere ingrandita, dell'oggetto; la lente-*oculare* reimmagina l'oggetto ad una distanza confortevole per l'osservatore, ingrandendo ulteriormente l'immagine. Questa seconda fase si verifica ponendo l'oculare in modo tale che l'immagine

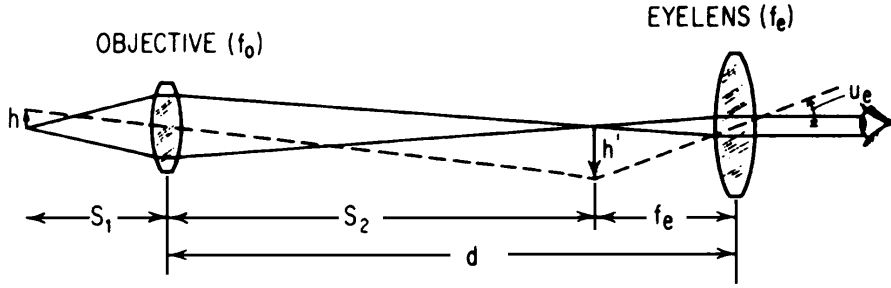


Figura 1.2: Microscopio composto.

intermedia formata dall'obiettivo si trovi esattamente alla distanza focale f_e dell'oculare.

Si nota che il piano contenente l'oggetto (ortogonale all'asse ottico) viene immaginato dalla lente-obiettivo nel piano sul quale si forma l'immagine intermedia; questo, a sua volta, è immaginato nel piano a cui appartiene il rivelatore (retina) dalla lente formata dalla combinazione di oculare, cornea e cristallino. Vi è quindi una corrispondenza biunivoca fra i punti di questi piani, che vengono definiti *piani coniugati*.

Il potere di ingrandimento del sistema può essere determinato sostituendo nell'equazione (1.2) il valore della focale complessiva f_{eo} dato dalla coppia di lenti [53]:

$$f_{eo} = \frac{f_e f_o}{f_e + f_o - d}$$

$$MP = \frac{250 \text{ mm}}{f_{eo}} = \frac{f_e + f_o - d}{f_e f_o} \cdot 250 \text{ mm}$$

Si può pervenire allo stesso risultato osservando che l'ingrandimento totale corrisponde al prodotto degli ingrandimenti dell'obiettivo e dell'oculare:

$$\begin{aligned} MP &= M_o \cdot M_e = \frac{s_2}{s_1} \cdot \frac{250 \text{ mm}}{f_e} \\ &= (d - f_e) \cdot \frac{f_e + f_o - d}{f_o(d - f_e)} \cdot \frac{250 \text{ mm}}{f_e} \\ &= \frac{250 \text{ mm}}{f_{eo}} = \frac{f_e + f_o - d}{f_e f_o} \cdot 250 \text{ mm} \end{aligned}$$

dove s_1 è stata espressa in funzione di f_o e s_2 tramite l'equazione (1.1).

In riferimento alla struttura chiusa ai cui estremi si fissano obiettivo ed oculare, si definisce *tube-length* la distanza fra il secondo punto focale dell'obiettivo e il primo punto focale dell'oculare, ossia $TL = s_2 - f_o$. Sfruttando nuovamente l'equazione (1.1) si verifica che

$$\begin{aligned} \frac{s_2}{s_1} &= \frac{-TL}{f_o} \\ MP &= \frac{-TL}{f_o} \cdot \frac{250 \text{ mm}}{f_e} \end{aligned} \quad (1.3)$$

Nel caso di ottiche corrette al finito, obiettivo e oculare sono a distanza fissa. La *tube-length* è definita in base alla lunghezza fisica del tubo di allog-

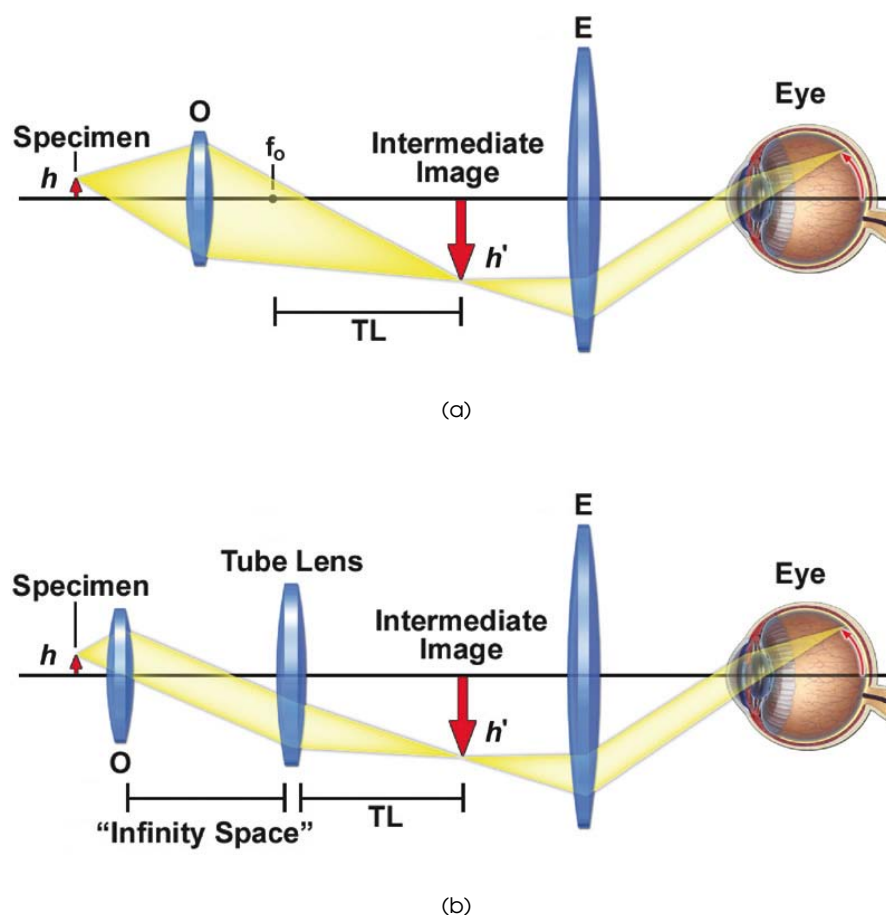


Figura 1.3: Definizione di tube-length per un microscopio composto, (a) con obiettivo corretto al finito e (b) con obiettivo corretto all'infinito.

giamento delle lenti (figura 1.3a). Il valore di 160 mm per TL divenne uno standard durante il XIX secolo per volere della Royal Microscopical Society (RMS) e godette di ampio consenso per oltre cent'anni [54].

L'aggiunta di accessori lungo il percorso ottico di un microscopio a lunghezza fissa altera l'effettivo valore di TL e introduce aberrazione sferica in un sistema altrimenti perfettamente bilanciato. I produttori del passato erano perciò obbligati ad abbinare agli accessori introdotti ulteriori elementi per ripristinare le caratteristiche originali del microscopio. Le contropartite di questo approccio erano l'incremento dei costi, un aumento dell'ingrandimento e la riduzione dell'intensità luminosa delle immagini.

La maggior parte dei moderni microscopi ottici professionali è dotata di obiettivi *corretti all'infinito*, ossia progettati per non creare più direttamente un'immagine intermedia. La luce che emerge da questi obiettivi è collimata; una seconda lente, chiamata *tube-lens* si occupa di creare l'immagine intermedia che viene poi ulteriormente manipolata dall'oculare (figura 1.3b). Nello spazio compreso fra obiettivo e tube-lens è dunque possibile inserire componenti ausiliari, come prismi per il contrasto interferenziale (vedi 1.2.4), polarizzatori (vedi 1.2.3), illuminatori a fluorescenza (vedi 1.2.5), con effetti minimi sulla correzione delle aberrazioni o la lunghezza focale del sistema.

Con l'uso di un obiettivo corretto all'infinito la tube-length TL corrisponde alla focale della tube-lens e varia fra 160 mm e 250 mm in base al costruttore: Leica e Nikon adottano $TL = 200$ mm, per Olympus il valore si riduce a

180 mm, mentre Zeiss, con 165 mm si mantiene vicino allo standard RMS.

Man mano che la focale della tube-lens aumenta, cresce anche la distanza alla quale si forma l'immagine intermedia, con un allungamento totale del sistema. Tube-length fra 200 mm e 250 mm sono considerate ottimali perché un valore di TL maggiore, a parità di ingrandimento, comporta angoli ridotti per i raggi principali più inclinati, limitando le aberrazioni, e aumenta la flessibilità del sistema offrendo più spazio per l'inserimento di accessori.

1.1.1 Risoluzione laterale

In microscopia il termine “risoluzione” indica la minima distanza, dal lato oggetto, che permette a due punti di apparire come distinti nell'immagine elaborata dal sistema ottico.

La *risoluzione laterale* di un microscopio si definisce su un piano xy ortogonale al suo asse ottico ed è determinata principalmente da tre fattori: diffrazione, aberrazioni e risoluzione del rivelatore d'immagine (sia esso l'occhio umano oppure un dispositivo elettronico).

Più precisamente, un oggetto puntiforme viene immaginato come uno spot di dimensioni e forma determinate dalla diffrazione e dalle caratteristiche del sistema. La distribuzione di ampiezze di questa immagine corrisponde alla PSF (*Point Spread Function*) del microscopio e ne caratterizza la qualità dal punto di vista prettamente ottico.

Nel caso approssimato parassiale con ottiche perfette, la PSF prende la forma del noto disco di Airy [3, 7]:

$$A(r) = \frac{2 \cdot J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda} n \sin \alpha \cdot r\right)}{\frac{2\pi}{\lambda} n \sin \alpha \cdot r} \quad (1.4)$$

r : coordinata radiale sul piano xy , con origine nel punto di intersezione con l'asse ottico;

α : angolo che il raggio marginale forma con l'asse ottico dal lato oggetto;

λ : lunghezza d'onda utilizzata;

n : *indice di rifrazione* dal lato oggetto.

La distribuzione di intensità $I(r) = |A(r)|^2$ descrive l'effettiva immagine luminosa che si ottiene e il suo diametro corrisponde, per convenzione, alla larghezza a mezza altezza del picco centrale di $I(r)$, anche detta FWHM dall'acronimo inglese “*Full Width at Half Maximum*”:

$$d_{3dB} = \frac{0.51 \lambda}{NA} \quad (1.5)$$

dove $NA = n \sin \alpha$ è l'*apertura numerica* del sistema. L'equazione (1.5) identifica la distanza dal punto di massimo alla quale l'intensità si dimezza e l'ampiezza di riduce di un fattore $\sqrt{2}$ (−3 dB); questo valore viene anche identificato come la *risoluzione puntuale* del sistema.

Il criterio di Rayleigh determina la minima distanza fra due punti dell'oggetto che permette loro di essere risolti:

$$d = \frac{0.61 \lambda}{NA} \quad (1.6)$$

Una risoluzione di valore minore indica prestazioni migliori per il sistema.

In merito alla PSF si faccia riferimento alla cosiddetta “ottica di Fourier”, Goodman [29]

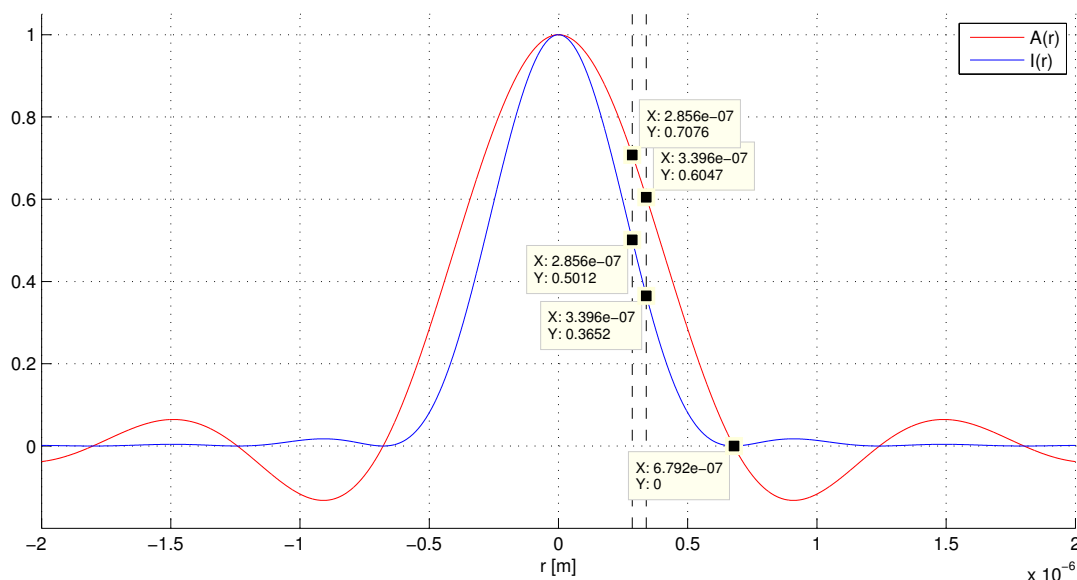


Figura 1.4: Ampiezza $A(r)$ e intensità $I(r)$ luminosa per un sistema parassiale a simmetria circolare attorno all'asse ottico; le righe tratteggiate verticali definiscono la risoluzione puntuale e il criterio di Rayleigh. Il calcolo numerico è stato effettuato con $NA = 0.4$ e $\lambda = 500\mu\text{m}$.

che corrisponde alla distanza fra il massimo centrale e il primo minimo della funzione $I(r)$. Ciascuno dei due punti oggetto crea una figura di diffrazione sul piano immagine, I_1 e I_2 . Il criterio di Rayleigh fa corrispondere il limite di distinguibilità dei due spot immagine con il caso in cui il massimo centrale di I_1 coincide con il primo minimo di I_2 . In questa situazione l'intensità luminosa fra i due spot è inferiore del 26.5% rispetto al valore dei picchi (figura 1.4).

Si nota che questo criterio si fonda sull'ipotesi di illuminazione con luce incoerente. Nel caso di luce coerente, invece, dev'essere tenuta in conto la distribuzione di ampiezza piuttosto che quella di intensità e vale

$$d = \frac{0.82 \lambda}{NA}$$

Vi è quindi un aumento della distanza minima di distinguibilità, anche se il tipo di dipendenza dai parametri chiave del microscopio resta invariata [3].

Per capire il legame fra NA e risoluzione si faccia riferimento alla figura a margine: la luce che illumina e attraversa un oggetto viene diffratta secondo angoli tanto più ampi quanto più minuti sono i suoi dettagli strutturali. Dunque per ottenere un'immagine definita di tali strutture è necessario raccogliere la luce diffratta con un angolo α il più ampio possibile [38].

A causa della stretta dipendenza fra apertura numerica e risoluzione di un sistema ottico, gli obiettivi per microscopi vengono in genere classificati in termini di ingrandimento e NA. Attualmente la più alta NA per un obiettivo "a secco" arriva a 0.95. L'unico modo per ottenere aperture numeriche superiori a 1 è utilizzare un mezzo liquido fra lente e campione, in grado di abbattere il salto d'indice di rifrazione causato dall'interfaccia aria-vetro (figura 1.5); a tal proposito si usano lenti-obiettivo *ad immersione* appositamente progettate [5].

La risoluzione del sistema non è limitata dalla diffrazione quando la sua

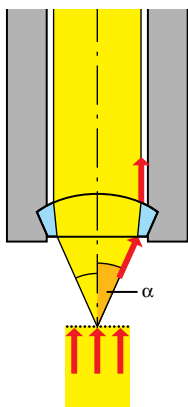
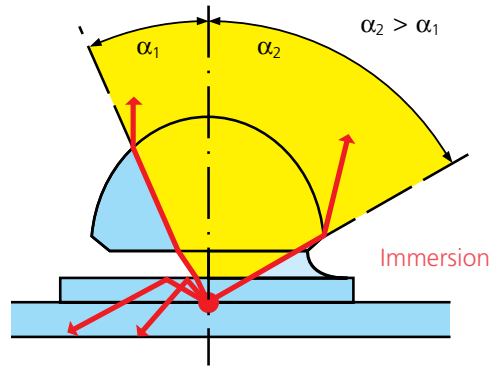


Figura 1.5: Incremento dell'apertura numerica di un obiettivo attraverso l'uso di un liquido ad alto indice di rifrazione; nel caso di lente "a secco" si nota come il salto d'indice provochi riflessione interna totale dei raggi più inclinati.



risoluzione laterale R (distanza minima fra due punti distinguibili sul piano oggetto xy) è superiore a quella determinata dall'equazione (1.6):

$$R \geq d$$

$$\frac{R_d}{MP} \geq \frac{0.61 \lambda}{NA}$$

$$MP \leq \frac{R_d NA}{0.61 \lambda}$$

dove R_d rappresenta la risoluzione lineare del rivelatore. Considerando l'occhio umano come rivelatore ($R_d = 72.7 \mu\text{m}$) e sfruttando la lunghezza d'onda alla quale questo è maggiormente sensibile ($\lambda = 0.55 \mu\text{m}$), si ottiene

$$MP \leq 216.75 NA$$

e qualunque ingrandimento superiore risulta "a vuoto", perchè non permette di discernere ulteriori dettagli. Ad ogni modo, l'ingrandimento dei microscopi ottici reali è in genere svariate volte superiore al limite calcolato ed è determinato da un compromesso pratico fra facilità di osservazione e *blurring* (sbavatura, sfocatura) dell'immagine. Si nota infatti che l'uso di ottiche non perfette porta ad aberrazioni nell'immagine, tanto più accentuate quanto più sono ampie le porzioni illuminate delle lenti: i raggi incidono sulle zone più esterne, lontane dall'asse ottico, con maggiore inclinazione (maggiore α) e la condizione di parassialità non è più verificata.

Un obiettivo reale è costituito da molte lenti (anche oltre dieci), in genere cementate in gruppi di due o tre, a formare *doppietti* e *tripletti* acromatici, corretti per aberrazione sferica e curvatura di campo [13, 47].

Per raggiungere un'elevata apertura numerica, la complessità e il costo di un obiettivo aumentano rapidamente: la necessità di raccogliere luce diffratta ad ampi angoli obbliga a mantenere una distanza focale molto corta (campione "avvolto" dalla lente) e dunque un ingrandimento elevato. Se così non fosse, ossia avendo f_o irragionevolmente lunga, sarebbero necessarie ottiche meccanicamente irrealizzabili e l'obiettivo finale soffrirebbe di aberrazioni tanto elevate da compromettere l'incremento di risoluzione dato dalla grande NA.

1.1.2 Risoluzione assiale

Quanto visto fin'ora si applica alla risoluzione sul piano xy perpendicolare all'asse ottico. Il *potere risolutivo assiale* si riferisce invece alla direzione z

La risoluzione angolare dell'occhio umano sano è di circa 1 arcmin.

Per una trattazione esaustiva delle aberrazioni ottiche si veda Smith [53].

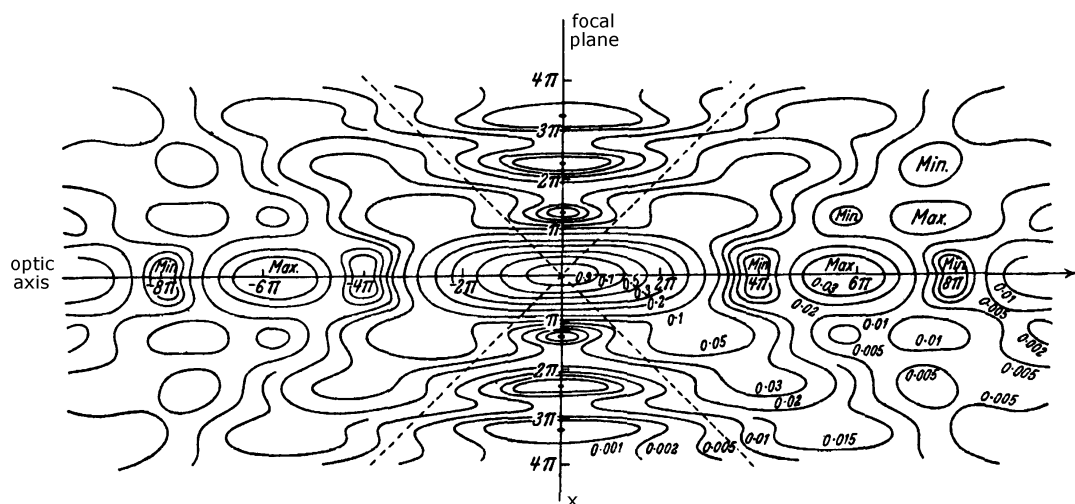


Figura 1.6: Isotope della distribuzione di intensità sul piano xz nell'intorno del fuoco di un'onda sferica diffratta da un'apertura (lente) circolare; i valori di intensità sono normalizzati a 1 in corrispondenza del fuoco. Ruotando la figura attorno all'asse ottico z , i minimi lungo l'asse x generano gli anelli scuri del disco di Airy.

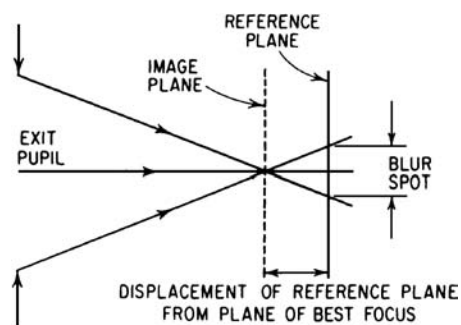


Figura 1.7: Definizione della profondità di fuoco.

parallela all'asse ottico e determina la capacità del microscopio di selezionare uno "spessore" limitato del campione sotto esame. La risoluzione assiale R_z è limitata sia dalla diffrazione che dalla risoluzione del rivelatore d'immagine.

È importante notare che la figura di diffrazione di una sorgente puntiforme non è limitata al solo disco di Airy sul piano dell'immagine parassiale, bensì è una distribuzione di intensità tridimensionale che si estende in modo simmetrico al di sopra e al di sotto di tale piano, lungo l'asse z (figura 1.6). In altre parole, l'immagine formata dal sistema ottico è la somma (in modulo e fase) dei contributi dati dai raggi diffratti dall'oggetto e provenienti sia da punti distinti sul piano xy , sia da punti posti su piani diversi lungo z .

L'esatta distribuzione di energia lungo l'asse ottico non può essere dedotta attraverso il tracciamento geometrico dei raggi di luce (*ray-tracing*), specialmente nel caso di lenti-obiettivo con elevata apertura numerica. Grazie all'ottica ondulatoria e adottando nuovamente il criterio di Rayleigh [3, 56], si ricava che per un sistema privo di aberrazioni la minima distanza assiale fra due punti dell'oggetto che permette loro di essere risolti è

$$d_z = 2 \frac{\lambda n}{NA^2} \quad (1.7)$$

e per un sistema limitato dalla diffrazione vale $R_z = d_z$. Spesso però si preferisce associare la risoluzione assiale di un microscopio ad un criterio di valutazione più pratico.

Per un dato sistema ottico è possibile determinare un grado di sfocatura sufficientemente basso da non comprometterne eccessivamente le prestazioni: assumendo un oggetto puntiforme, se l'allargamento dello spot immagine dovuto al *defocusing* si mantiene entro R_d , allora la risoluzione del sistema non ne risente e rimane limitata a quella del rivelatore.

La *profondità di campo* DoF (*depth of field*) è, rispetto al punto di fuoco parassiale, il massimo spostamento longitudinale dell'oggetto che consente di mantenere un grado di sfocatura accettabile nell'immagine; dunque tutti i piani oggetto compresi entro 2DoF risulteranno similmente a fuoco sul piano immagine. Viceversa, la *profondità di fuoco* rappresenta il massimo spostamento longitudinale consentito al rivelatore (figura 1.7) ed equivale al massimo errore accettabile sul suo posizionamento.

Profondità di campo e profondità di fuoco DoF' (*depth of focus*) sono legate dall'ingrandimento longitudinale MP_z :

$$\text{DoF}' = \text{MP}_z \cdot \text{DoF} \approx \text{MP}^2 \cdot \text{DoF}$$

Per via geometrica e in condizioni di parassialità si ha

$$\text{DoF} \simeq \frac{R_d}{2 \text{NA}} \frac{1}{\text{MP}^2} \quad (1.8)$$

che costituisce una stima grossolana, valida solo in assenza di aberrazioni. In genere la DoF è un parametro empirico, fortemente variabile e influenzato dalle condizioni operative e dal grado di dettaglio con cui si vuole indagare il campione.

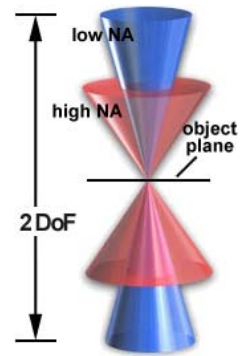
Spesso nei microscopi composti tradizionali $\text{DoF} > d_z$ e quindi risoluzione assiale e profondità di campo coincidono. Ciò avviene a causa dei piani oggetto fuori fuoco che, investiti anch'essi dal fascio di illuminazione, producono luce diffusa indesiderata che viene raccolta dall'obiettivo, riducendo il *contrasto* dell'immagine; in questo modo la profondità di fuoco apparente aumenta in modo considerevole. Questo fenomeno viene notevolmente ridotto, se non eliminato, dall'approccio confocale (vedi 1.3), vincolando la risoluzione assiale al solo limite diffrattivo d_z .

In ogni caso, sia l'equazione (1.7) che l'equazione (1.8) mostrano la dipendenza inversa da NA. Dunque un microscopio con una grande apertura numerica (bassa R_z) è in grado di "isolare" spessori molto sottili del campione, permettendone la scansione longitudinale ed eventualmente, con l'uso di software specifici, la sua ricostruzione in tre dimensioni.

1.1.3 Struttura

I moderni microscopi composti sono progettati per fornire un'immagine bidimensionale ingrandita e facilmente focalizzabile su piani oggetto differenti, permettendo così l'analisi completa dei fini dettagli strutturali del campione in due e tre dimensioni. Un meccanismo di traslazione su tre assi assicura il posizionamento accurato, l'orientazione e la messa a fuoco del campione, ottimizzando la visualizzazione e la raccolta delle immagini. L'intensità dell'illuminazione e le caratteristiche dei percorsi ottici attraverso lo strumento possono essere controllati grazie a diaframmi, specchi, prismi ed altri elementi ottici dedicati, fino a raggiungere i livelli di luminosità e contrasto desiderati [54].

I componenti ottici e meccanici principali di un microscopio si sviluppano lungo un asse ottico che attraversa l'intero apparato (figura 1.8):



Il contrasto di un'immagine è definito come la differenza normalizzata fra l'intensità luminosa del soggetto I_s e quella dello sfondo I_b :

$$\frac{I_s - I_b}{I_b}$$

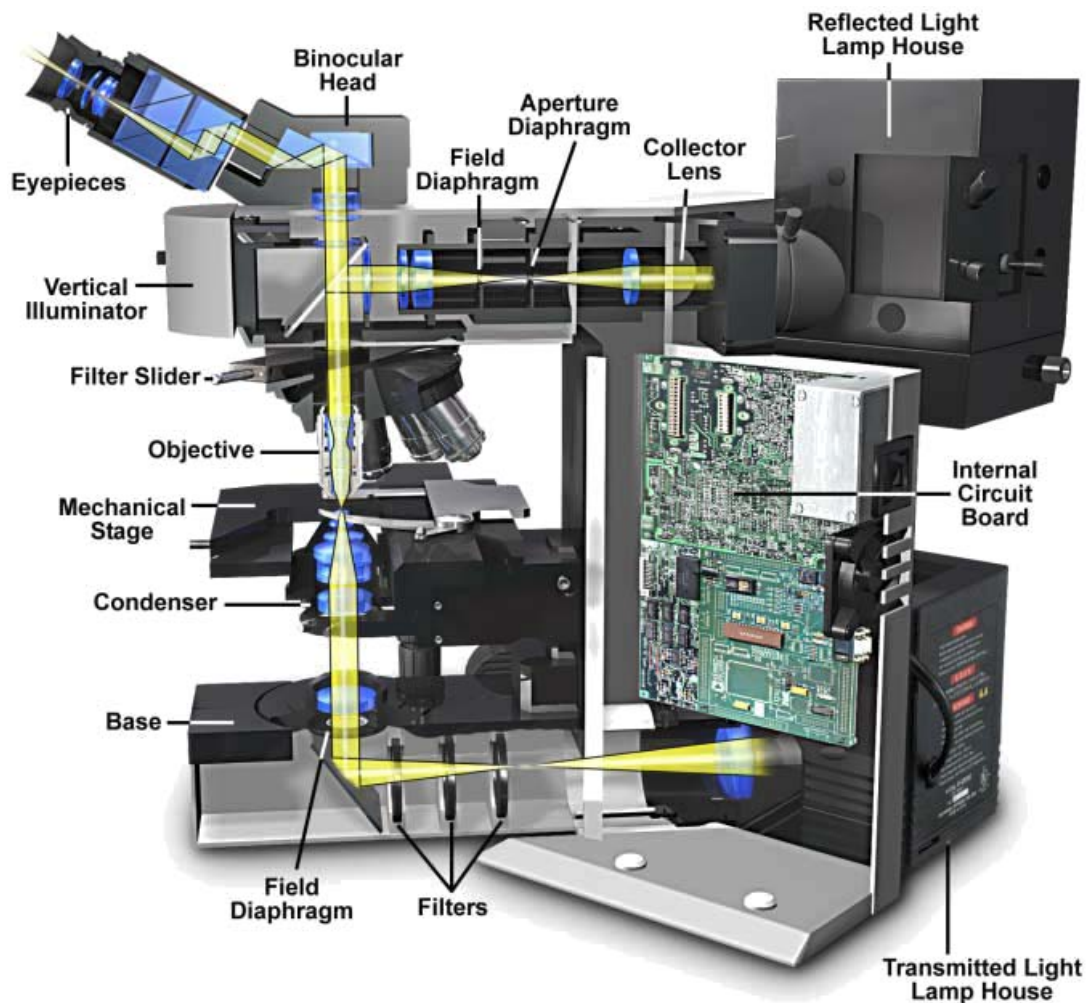


Figura 1.8: Microscopio composto per uso scientifico con indicazione dei principali componenti ottici e meccanici.

- *sorgente*, può essere coerente o incoerente, di potenza e lunghezza d'onda variabili entro ampi intervalli, in base al tipo di immagini e campioni;
- *collettore*, lente che raccoglie la luce proveniente dalla sorgente, focalizzandola sul piano focale anteriore della lente-condensatore, dove è presente il diaframma di apertura (introdotto da Köhler, figura 1.10 e figura 1.9);
- *diaframma di campo del collettore*, adiacente al collettore, regola il diametro del fascio di luce emesso, ossia le dimensioni del campo oggetto che viene immaginato dallo strumento;
- *condensatore*, raccoglie la luce proveniente dal collettore e crea un fascio collimato e uniforme che investe il campione;
- *diaframma di apertura del condensatore*, regola la divergenza del cono d'illuminazione e può limitare l'apertura numerica dell'obiettivo;
- *campione*, posto su un traslatore di precisione;
- *obiettivo*, raccoglie la luce trasmessa/riflessa e diffratta dal campione e forma, con l'eventuale tube-lens, l'immagine intermedia ingrandita;

La pupilla d'uscita di un sistema di lenti è l'immagine del diaframma data da tutte le lenti poste dopo di esso.

- *diaframma di apertura dell'obiettivo*, situato in corrispondenza del piano focale posteriore dell'obiettivo, è fisso e rappresenta la sua pupilla di uscita;
- *diaframma di campo dell'oculare*, posizionato in corrispondenza dell'immagine intermedia, è fisso e determina le dimensioni del campo visivo dell'osservatore o del rivelatore;
- *oculare*, raccoglie la luce proveniente dall'obiettivo e forma l'immagine finale, ulteriormente ingrandita e reale (rivelatore) o virtuale (osservatore umano);
- *rivelatore/occhio*, posto sul piano immagine del sistema, registra l'immagine creata del sistema.

La presenza dei diaframmi è necessaria per impedire alla luce diffusa o eccessivamente aberrata di raggiungere i piani immagine e serve inoltre, come si vedrà, per assicurare un'illuminazione adeguata e uniforme del campione.

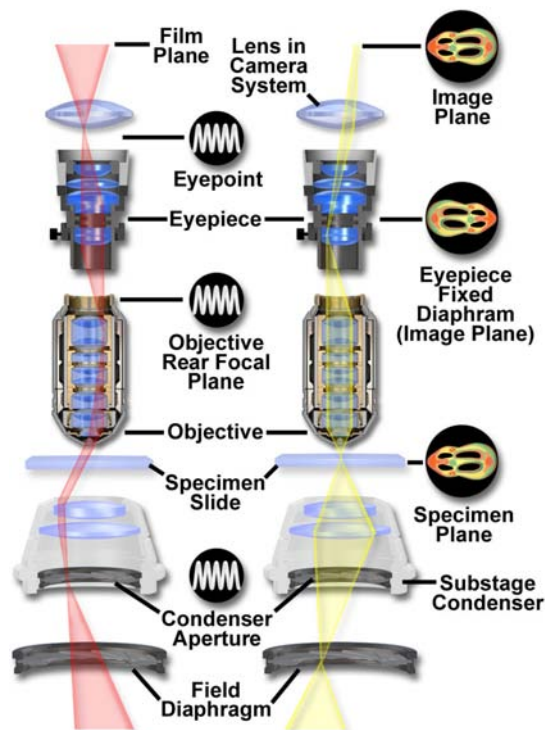
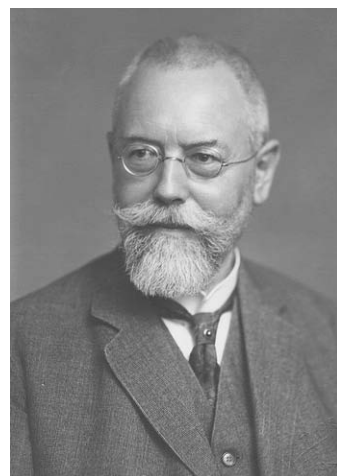


Figura 1.9: Schema dei due gruppi di piani focali coniugati per un microscopio in luce trasmessa; in rosso il percorso ottico di illuminazione (*illumination path*) e in giallo il percorso ottico di formazione dell'immagine (*imaging path*).

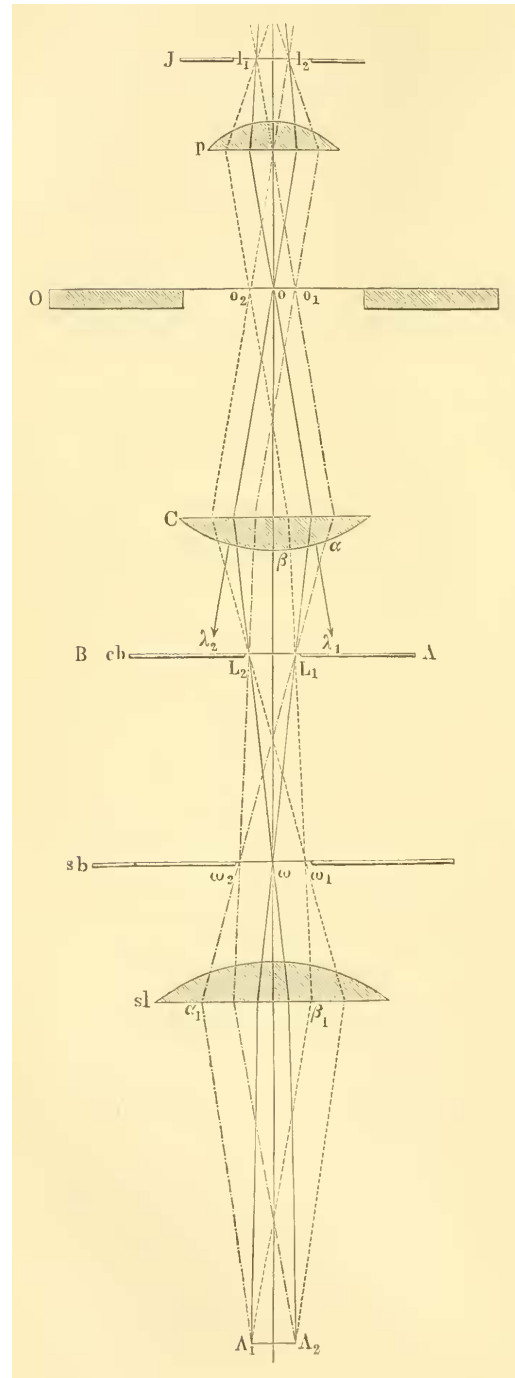
1.1.4 Tipi di illuminazione

Osservando le proprietà geometriche del percorso ottico è possibile distinguere due gruppi di piani focali coniugati, che si alternano in successione dalla sorgente al rivelatore: l'insieme dei piani di campo (*field-limiting*), dedicati alla formazione dell'immagine, e l'insieme dei piani di apertura (*aperture-limiting*), dedicati all'illuminazione [15]. Nei piani di campo va a fuoco l'oggetto o una sua immagine; nei piani di apertura va a fuoco la sorgente o una sua immagine.

La netta distinzione in due insiemi di piani è possibile solo quando lo strumento adotta una configurazione che rispetta il *principio di Köhler* [39], ideato dall'omonimo fisico alla fine del XIX secolo. La condizione di illuminazione



(a)



(b)

Figura 1.10: Köhler introdusse il suo nuovo metodo di illuminazione nel 1893, presso l'istituto zoologico di Giessen, in Germania, dove si occupava di microfotografia per studi tassonomici. L'uso dell'illuminazione critica portava a fuoco sui campioni l'alone luminoso della lampada a gas usata come sorgente, rendendo le immagini inadatte alla fotografia dell'epoca, che impiegava emulsioni a reazione molto lenta. La soluzione consistette nell'introdurre una lente-collettore che focalizzava l'immagine della sorgente in corrispondenza del piano focale anteriore del condensatore. Lo stratagemma assicurò luce brillante e uniforme sul campione, fissando al contempo le posizioni chiave per il posizionamento dei diaframmi all'interno del microscopio.

(a) August Köhler (1866-1948).

(b) Schema ottico della configurazione Köhler tratto dal testo originale [39].

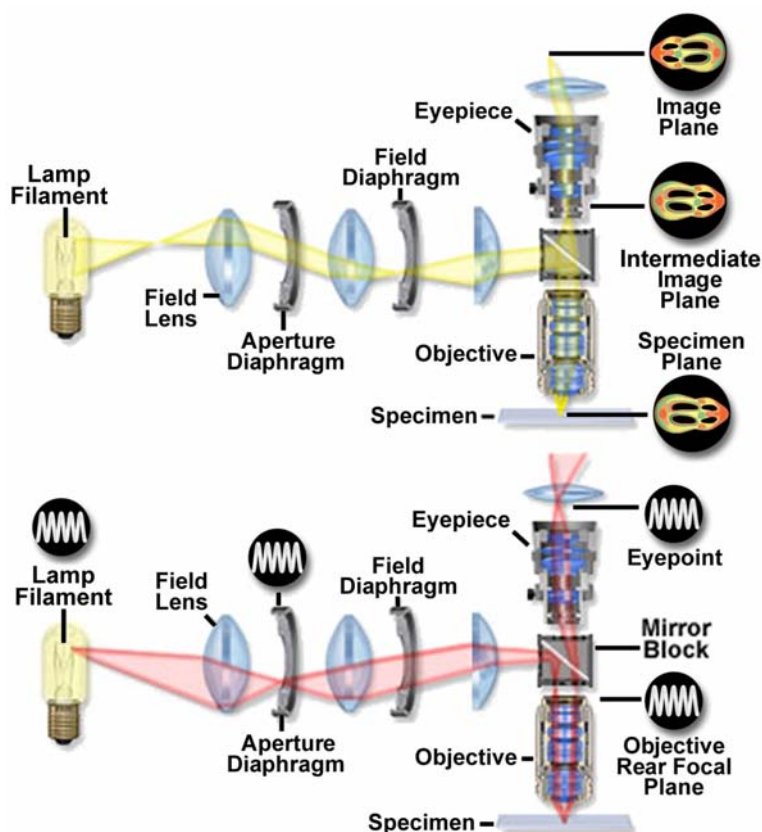


Figura 1.11: Schema dei due gruppi di piani focali coniugati per un microscopio in luce riflessa; in rosso il percorso ottico di illuminazione e in giallo il percorso ottico di imaging.

ottimale, ossia quella che massimizza campo e apertura di un microscopio, si ottiene quando i due gruppi di piani focali coniugati sono ben separati e i raggi luminosi che vanno a fuoco in corrispondenza di uno dei due gruppi passano invece pressoché collimati attraverso l'altro gruppo (figura 1.9).

Si hanno quindi due percorsi ottici interconnessi ma distinti e questo permette di regolare NA, luminosità, uniformità e ampiezza del campo visivo in modo indipendente, intervenendo sui diaframmi che appartengono all'uno o all'altro insieme.

Quando il principio di Köhler non viene rispettato è possibile che la sorgente vada a fuoco sul campione, compromettendo l'uniformità dell'illuminazione; si parla allora di *illuminazione critica*. Il problema non si presenta nel caso in cui la sorgente sia intrinsecamente uniforme (vedi 4.4.3).

La configurazione *in luce trasmessa* vista finora sfrutta una sorgente posta a monte del campione: la luce lo attraversa per tutto il suo spessore, subendo rifrazione e diffrazione, per poi essere raccolta dall'obiettivo che si trova a valle. La semplicità e flessibilità di questo approccio si scontra però con la natura di alcuni campioni, che possono risultare opachi alla luce (ceramiche, metalli, circuiti integrati, ecc.) o comunque non adatti a questo tipo di analisi (oggetti di grandi dimensioni e/o spessori, pazienti umani, ecc.).

Per risolvere il problema si adotta la configurazione *in luce riflessa*: il percorso di illuminazione e quello di formazione dell'immagine condividono la lente-obiettivo, che funge anche da condensatore, e il punto di raccordo fra i due percorsi è rappresentato da un *beam-splitter*.

Un beam-splitter è un dispositivo ottico in grado di dividere un raggio di luce in due parti.

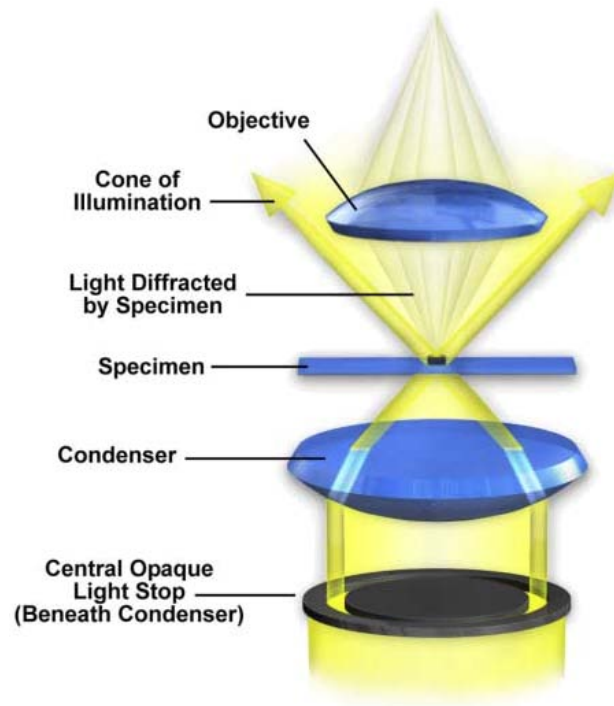


Figura 1.12: Configurazione schematica della microscopia in campo oscuro.

Il duplice ruolo svolto dall'obiettivo richiede la presenza di un diaframma di apertura che non giaccia lungo il percorso di imaging, cioè fra obiettivo e rivelatore. Dunque per rispettare il principio di Köhler si inseriscono nel percorso di illuminazione delle lenti apposite, creando un piano coniugato fra la sorgente e il diaframma di campo, in cui viene posizionato il diaframma di apertura, che risulta quindi coniugato con il piano focale posteriore dell'obiettivo (figura 1.11).

Al giorno d'oggi molti costruttori di microscopi offrono modelli che permettono di alternare o usare contemporaneamente entrambe le tecniche di illuminazione.

1.2 TECNICHE DI CONTRASTO

In microscopia molti campioni, soprattutto quelli privi di colorante o i materiali biologici viventi, forniscono un livello di contrasto così basso da risultare pressoché invisibili in campo chiaro, indipendentemente dal potere risolutivo dell'obiettivo con cui vengono osservati. Spesso è impossibile intervenire su tali campioni con marcatori chimici o fissanti perché ne comprometterebbero la struttura. Questo problema ha spinto i ricercatori a sviluppare delle tecniche di aumento del contrasto che non comportassero modifiche dirette sull'oggetto da esaminare [14].

1.2.1 Microscopia in campo oscuro (darkfield)

La microscopia in campo oscuro sfrutta uno stop anulare posizionato all'altezza del diaframma di apertura del condensatore: in questo modo il campione viene attraversato da un cono di luce cavo e la luce diretta non investe l'obiettivo, che raccoglie così solamente la componente diffratta (figura 1.12). Guardando alla figura di diffrazione che si forma sul piano focale posteriore

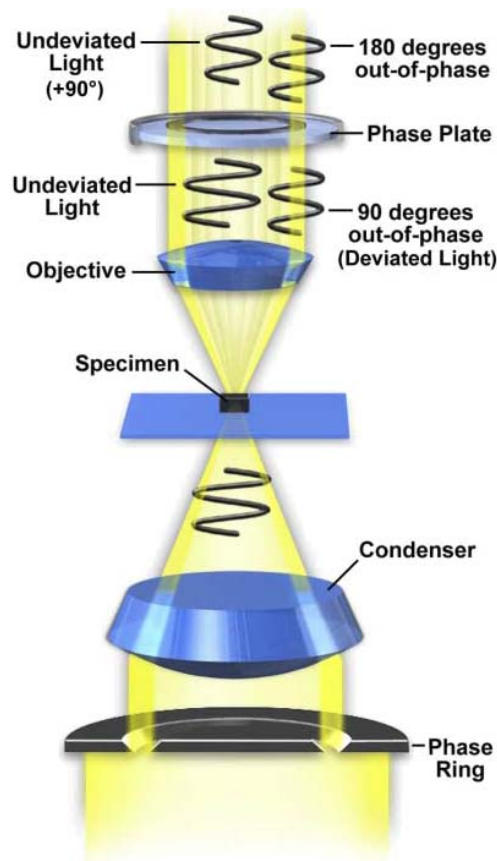


Figura 1.13: Configurazione schematica della microscopia a contrasto di fase.

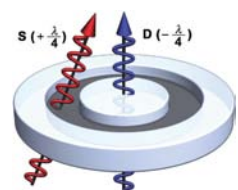
dell'obiettivo, ciò significa rimuoverne l'ordine zero, lasciando che siano i soli ordini di diffrazione superiori a formare l'immagine [18].

Questa tecnica è semplice e diffusa, permette di studiare oggetti brillanti su sfondo scuro ed è particolarmente indicata per mettere in risalto profili e bordi (figura 1.19a).

1.2.2 Microscopia a contrasto di fase

Questo metodo, descritto dal fisico Frits Zernike nel 1934, non solo gli fece guadagnare il premio Nobel per la fisica nel 1953, ma rivoluzionò la ricerca biomedica di base sulle cellule viventi. I campioni non marcati con colorante che non assorbono la luce in modo apprezzabile possono comunque essere studiati sfruttando il fatto che alterano la fase della luce che li attraversa, ritardandola di circa $\lambda/4$ in base allo spessore dell'oggetto.

La configurazione che si adotta per convertire le alterazioni di fase in variazioni di ampiezza, ossia contrasto, è simile a quella darkfield, con uno stop anulare al posto del diaframma di apertura del condensatore. A differenza della prima, però, l'intero fascio luminoso viene raccolto dall'obiettivo, sul cui piano focale posteriore è posizionato un *phase-ring*. Il *phase-ring* è una lamina sottile e trasparente, ad eccezione di un anello più scuro e di spessore modificato, che si trova in corrispondenza del punto in cui la lamina viene attraversata dal fascio luminoso diretto (figura 1.13). Questo componente ottico ha due funzioni: attenua la brillante luce diretta, che altrimenti soverchierebbe la componente diffratta, e introduce un anticipo o un ritardo di fase tali da permettere l'interferenza costruttiva o distruttiva fra luce diretta e diffratta.



Phase-ring positivo.

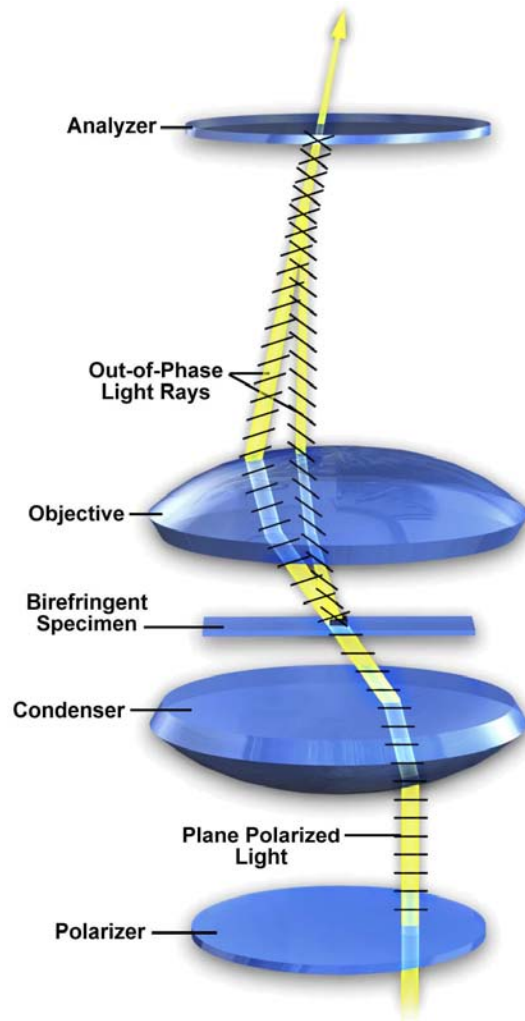


Figura 1.14: Configurazione schematica della microscopia in luce polarizzata.

Il contrasto può essere ottimizzato intervenendo sulle caratteristiche costruttive del phase-ring. Si riporta in [figura 1.19b](#) una fotografia ottenuta con questo metodo.

1.2.3 Microscopia in luce polarizzata

La luce polarizzata, ottenuta inserendo un polarizzatore prima del condensatore, risulta molto efficace per rivelare campioni che esibiscono il fenomeno della birifrangenza. Questa tecnica di contrasto in luce riflessa prevede un secondo polarizzatore (analizzatore), disposto ortogonalmente al primo e posto a valle dell'obiettivo ([figura 1.14](#)). In assenza del campione l'immagine appare quindi scura.

Se un campione viene illuminato, in base alle sue caratteristiche di spessore, composizione e struttura cristallina, può ruotare la direzione di polarizzazione della luce incidente, che viene così parzialmente trasmessa dall'analizzatore, creando un'immagine visibile.

La microscopia in luce polarizzata richiede obiettivi e condensatori privi di stress meccanici, per evitare effetti di depolarizzazione della luce trasmessa. Inoltre i produttori offrono una vasta gamma di compensatori e ritardatori (lamine $\lambda/2$ o $\lambda/4$) per effettuare misure quantitative di birifrangenza e per aggiungere colore alle microfotografie ([figura 1.19c](#)).

Un mezzo con indice di rifrazione anisotropo si dice birifrangente.

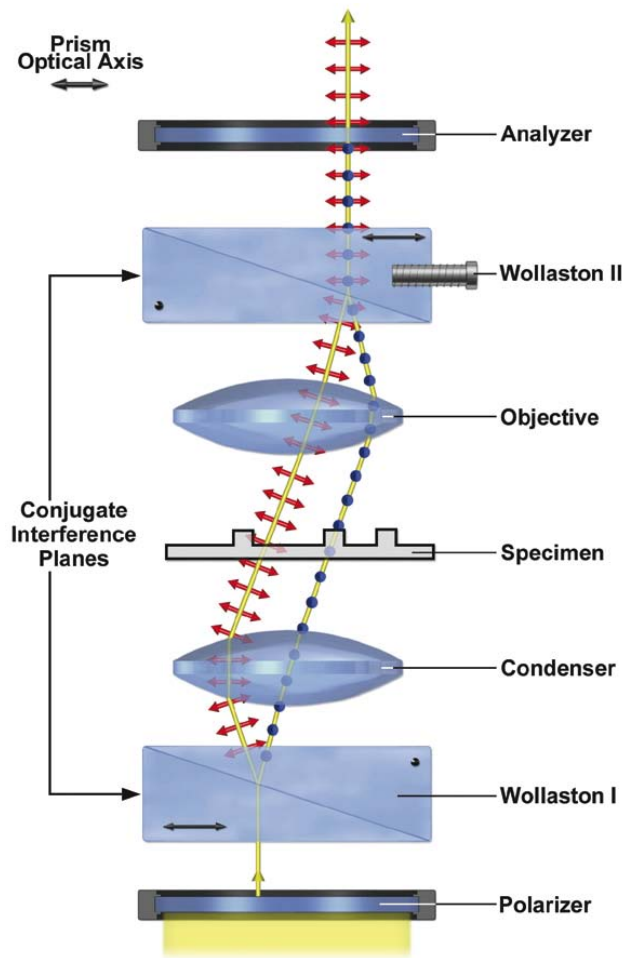


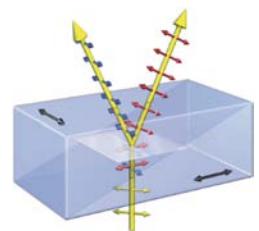
Figura 1.15: Configurazione schematica della microscopia a contrasto interferenziale.

1.2.4 Microscopia a contrasto interferenziale (DIC)

Verso la metà degli anni '50 del XX secolo l'ottico teorico francese Georges Nomarski perfezionò un metodo per rivelare i gradienti ottici dei campioni e convertirli in differenze di intensità. Oggigiorno esistono diverse implementazioni di questo metodo, che vanno tutte sotto il nome di *Differential Interference Contrast* (DIC).

La configurazione che si adotta è simile a quella in luce polarizzata, con l'aggiunta, a valle del polarizzatore e a monte dell'analizzatore, di due prismi di Wollaston, in grado di dividere (e poi ricongiungere) il fascio polarizzato in due fasci paralleli e separati da una distanza inferiore al limite di risoluzione del microscopio. Nell'attraversare il campione i due fasci subiscono alterazioni di fase diverse, perché diversi sono lo spessore, l'indice di rifrazione e la composizione delle zone investite. Il secondo prisma li riunisce, permettendone l'interferenza, e l'analizzatore si occupa dell'eliminazione della componente di luce che non è stata alterata dal campione (figura 1.15, figura 1.16).

In presenza di variazione di spessore del campione, l'immagine che si ottiene presenta dettagli chiari da un lato e scuri dall'altro, un effetto "ombreggiato" che dà l'impressione di tridimensionalità (figura 1.19d).



Prisma di Wollaston: scinde la luce in due fasci con polarizzazione ortogonale.

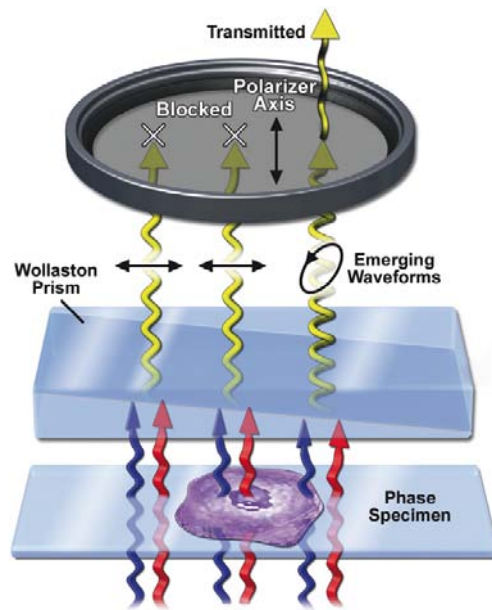


Figura 1.16: Progressione dei raggi luminosi attraverso il microscopio DIC: se i raggi precedentemente separati dal primo attraversano mezzi con medesime caratteristiche, quando interferiscono nel secondo prisma generano luce polarizzata linearmente, che viene bloccata dall'analizzatore; se invece i due raggi accumulano una differenza di fase, interferiscono creando luce con polarizzazione ellittica, che riesce ad attraversare l'analizzatore, formando l'immagine.

1.2.5 Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è uno strumento eccellente per lo studio di materiale che può divenire fluorescente, sia in modo naturale (fluorescenza primaria o autofluorescenza), sia per trattamento chimico (fluorescenza secondaria). Questa forma di microscopia ottica sta raggiungendo in fretta la maturità e rappresenta una delle aree di ricerca dalla crescita più rapida [47].

Alla base di questa tecnica vi è una sorgente luminosa con uno spettro adatto ad eccitare i fluorocromi presenti nel campione. Questo assorbe la luce incidente e la riemette con una lunghezza d'onda maggiore, adatta ad essere isolata da un apposito filtro (figura 1.17); in questo modo al rivelatore non giunge l'illuminazione primaria, ma solamente la fluorescenza del campione, mettendo in luce i dettagli strutturali a cui i fluorocromi si legano (figura 1.19e).

I fluorocromi sono molecole che esibiscono fluorescenza, usate per marcare le parti di interesse dei campioni.

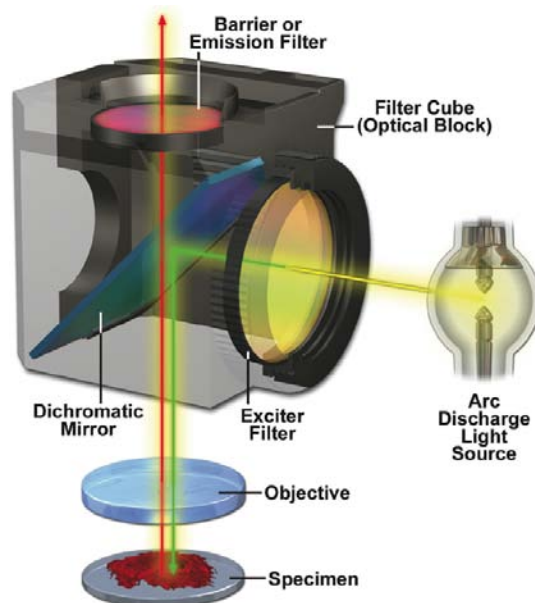


Figura 1.17: Configurazione schematica della microscopia a fluorescenza.

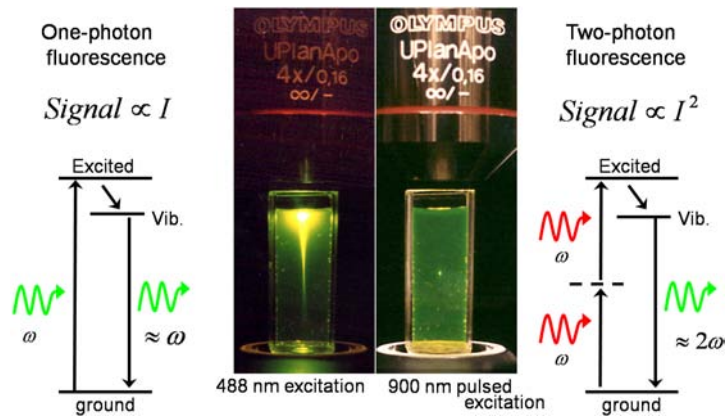


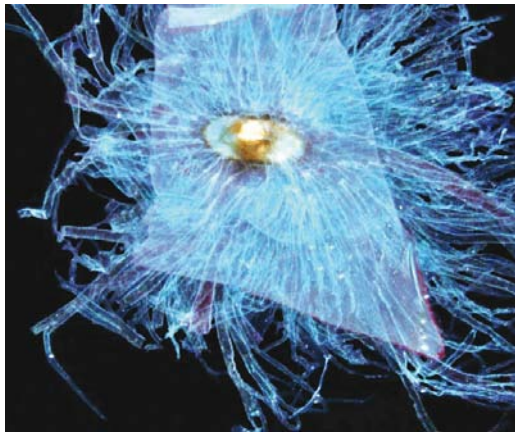
Figura 1.18: Confronto fra microscopia a fluorescenza e microscopia a due fotoni.

1.2.6 Microscopia a due fotoni

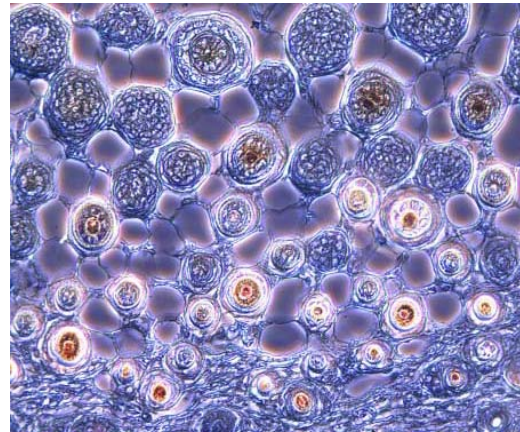
Questa tecnica si basa sull'*assorbimento a due fotoni*, un fenomeno fisico di ottica non lineare scoperto all'inizio degli anni '30 del XX secolo. In certe condizioni due o più fotoni a bassa energia possono interagire con gli atomi di una molecola (fluorocromo) come se fossero un solo fotone ad energia più alta, diventando così in grado di eccitarla (figura 1.18). La molecola eccitata torna allo stato energetico base riemettendo radiazione ad una lunghezza d'onda inferiore, adatta ad essere isolata da un apposito filtro, in maniera complementare a quanto visto per la microscopia a fluorescenza tradizionale.

Per l'applicazione del fenomeno alla microbiologia si dovette attendere il 1990 e la messa a punto di particolari LASER infrarossi ad impulsi ultracorti [16]. I fotoni a bassa energia vengono focalizzati dall'obiettivo sul campione ed eccitano solo i fluorocromi che li ricevono a coppie. L'arrivo simultaneo di due fotoni sulla stessa molecola è un evento che diventa sufficientemente probabile solo sul piano focale, ossia dove l'intensità luminosa è molto elevata.

Questo tipo di approccio concede ottime risoluzioni assiali ma è efficace solo investendo il campione con intensità luminose elevate.



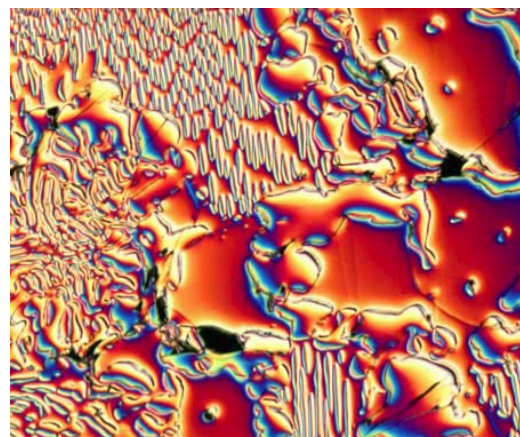
(a)



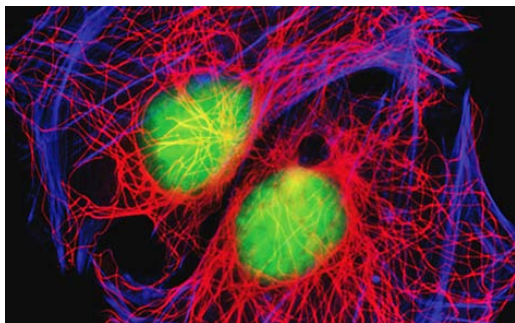
(b)



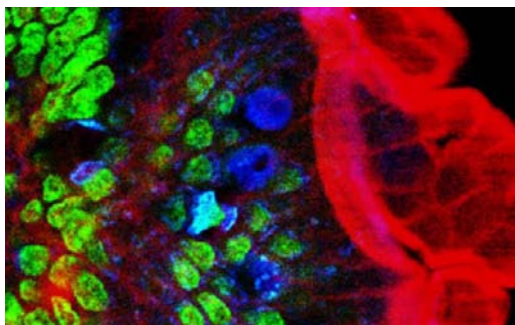
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 1.19: Confronto fra microfotografie ottenute con varie tecniche di contrasto [14].

(a) Microfotografia in campo oscuro dello stigma e delle trachee della larva del baco da seta (scala: $100\ \mu\text{m}$).

(b) Microfotografia delle sezioni trasversali di peli murini fetali, acquisita usando ottiche per il contrasto di fase e un obiettivo 20x.

(c) Microfotografia in luce polarizzata di DNA cristallino ad alta densità, estratto da timo vitellino; l'immagine è stata raccolta con un obiettivo 10x polarizzato.

(d) Microfotografia dei difetti sulla superficie di una lega ferro-silicio, scattata usando ottiche a contrasto interferenziale e un obiettivo 10x.

(e) Microfotografia delle cellule dell'aorta di ratto, marcate con i fluorocromi Alexa Fluor 350 (actina), Alexa Fluor 568 (tubulina) e syToX Green (DNA).

(f) Microfotografia a due fotoni di intestino murino, marcato con i fluorocromi Alexa Fluor 350 (actina), Alexa Fluor 568 (muco delle cellule caliciformi) e syToX Green (nuclei cellulari); ottenuta usando un LASER pulsato $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ a $780\ \text{nm}$.

1.3 MICROSCOPIA CONFOCALE

Le più frequenti applicazioni della microscopia confocale alle scienze biomedicali riguardano la raccolta di immagini da tessuti viventi e non, contrassegnati da uno o più marcatori fluorescenti. Quando questo genere di campioni viene osservato tramite un microscopio ottico convenzionale, la fluorescenza dei piani fuori fuoco si somma a quella delle strutture a fuoco, riducendone il contrasto e la risoluzione. Ciò accade in particolare durante l'analisi di oggetti con spessore superiore a $2\ \mu\text{m}$ [48].

L'invenzione del microscopio confocale risale al 1955, da parte di Marvin Minsky (figura 1.20), ma è stata sfruttata diffusamente a livello commerciale solo a partire dalla fine degli anni '80 del XX secolo. Solo gli sviluppi tecnologici recenti nel campo dei LASER, dei computer e dei rivelatori hanno reso il progetto originale disponibile ai biologi.

1.3.1 Struttura di base

Il metodo di formazione dell'immagine in un microscopio confocale differisce da quello di un microscopio composto convenzionale per il fatto che, mentre nel secondo il fascio di illuminazione investe l'intero campione e forma istantaneamente l'immagine sul rivelatore, nel primo la luce proveniente dalla sorgente illumina l'oggetto un solo punto per volta ed è necessaria una scansione per formare l'immagine finale. L'uso di questa tecnica permette di raggiungere risoluzioni assiali molto ridotte. Infatti un'immagine così ottenuta viene comunemente chiamata "sezione ottica", in riferimento al fatto che è possibile indagare il campione nelle tre dimensioni spaziali con un metodo non invasivo (figura 1.21).

In microscopia confocale lo spot di luce puntiforme è prodotto da un pinhole posto davanti alla sorgente, ossia in sostituzione del diaframma di campo, che risulta così fisso è molto ridotto. La luce viene poi focalizzata dal collettore e dal condensatore (o dall'obiettivo, nel caso di configurazione in luce riflessa) sul campione, per poi essere raccolta dall'obiettivo e dall'eventuale oculare e focalizzata su un secondo pinhole. In corrispondenza di questo è presente anche il rivelatore d'immagine, che produce un segnale proporzionale all'intensità della luce che lo colpisce.

Il pinhole di illuminazione e quello di rivelazione appartengono a piani focali coniugati e si dicono dunque *confocali*, da cui il nome di questa particolare tecnica microscopica.

La quasi totalità dei sistemi confocali moderni utilizza la configurazione in luce riflessa, che, come anticipato da Minsky stesso [44], aumenta la simmetria e la risoluzione del sistema a spese della luminosità, che si riduce per la presenza dello specchio dicroico o del beam-splitter (figura 1.22a).

Va fatto notare che la confocalità e il principio di Köhler (vedi 1.1.4) intervengono su aspetti differenti della struttura di un microscopio e, almeno in teoria, non sono in conflitto: il rispetto del principio di Köhler determina l'esistenza di due ben distinti insiemi di piani focali coniugati e la conseguente possibilità di regolare campi e aperture in modo indipendente, grazie a diaframmi posizionati in punti dell'asse ottico facilmente identificabili; la confocalità comporta invece l'estremo restringimento dei campi del microscopio, ottenendo una drastica riduzione della luce diffusa dai piani fuori fuoco e il notevole incremento della risoluzione assiale, grazie alla diminuzione della profondità di campo apparente (vedi 1.1.2).

Dec. 19, 1961

M. MINSKY

3,013,467

MICROSCOPY APPARATUS

Filed Nov. 7, 1957

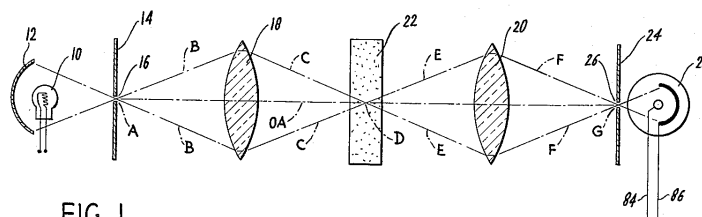


FIG. 1.

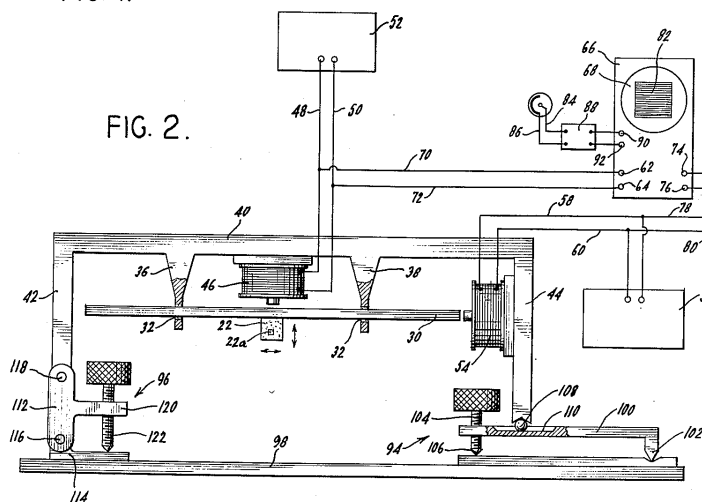


FIG. 2.

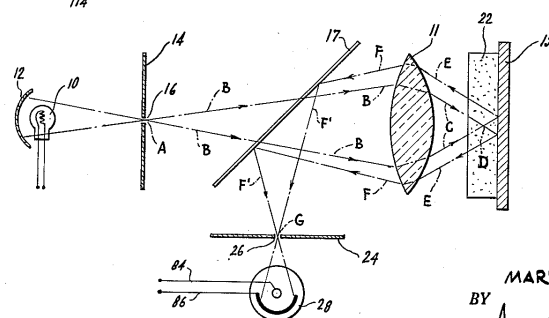


FIG. 3.

INVENTOR.
MARVIN MINSKY
BY *Ameter & Levy*
ATTORNEYS

Figura 1.20: Minsky realizzò il primo microscopio confocale nel 1955, mentre lavorava, come membro della Harvard Society of Fellows, su un metodo per raccogliere immagini definite di denso tessuto neuronale. Le tecniche tradizionali disponibili all'epoca ottenevano solo un diffuso bagliore, dovuto alla luce diffratta dai piani fuori fuoco: l'alta densità di cellule nervose interconnesse, marcate e illuminate tutte allo stesso modo, faceva sì che l'obiettivo raccogliesse troppa radiazione indesiderata, riducendo di molto il rapporto segnale-rumore.

L'idea risolutiva fu quella di illuminare selettivamente un solo punto oggetto per volta e spostare tale punto sul piano focale, scandendolo nelle due direzioni xy per creare l'immagine finale. Il progetto originale di Minsky presentava, al posto del condensatore, una lente identica all'obiettivo, mentre l'illuminazione, fornita da una lampada allo zirconio, era limitata da un pinhole. L'immagine ridotta di quest'ultimo andava a fuoco sull'oggetto, creando un singolo disco luminoso. Un secondo pinhole, posto fra l'obiettivo e il fotomoltiplicatore di rivelazione, contribuiva ad eliminare l'eventuale luce diffusa dai piani non a fuoco. Ci si trova dunque davanti ad una geometria simmetrica, semplice ed elegante [44].

Il sistema di scansione prevedeva il movimento del campione grazie a due aste oscillanti di metallo elastico, poste ortogonalmente e controllate da elettromagneti. La variazione di intensità luminosa, modulata dal campione e tradotta in fotocorrente, creava l'immagine finale grazie ad un tubo catodico a lunga persistenza [45].

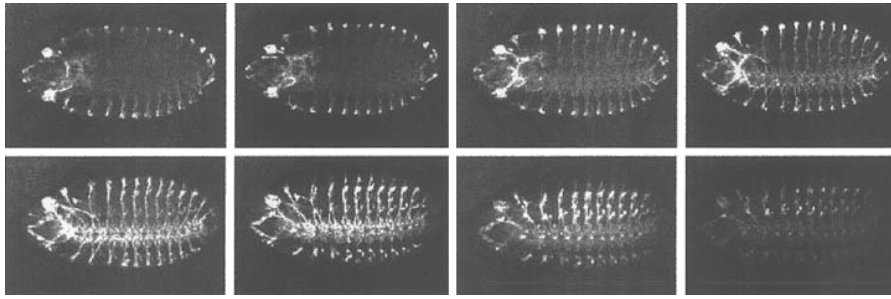


Figura 1.21: Serie di sezioni ottiche xy lungo l'asse z , raccolte da un embrione di moscerino della frutta, marcato con l'anticorpo 22C10, che ne evidenzia il sistema nervoso periferico [48].

A livello pratico, purtroppo, il rispetto del principio di Köhler in un microscopio confocale risulta molto problematico. I pinhole costituiscono un ostacolo al passaggio della luce e la soluzione che sorge spontaneamente consisterebbe nel focalizzarla proprio nel punto in cui questi sono posizionati. Ciò però non è possibile, perché in tal modo la sorgente andrebbe a fuoco sull'oggetto, il cui piano è coniugato con quello dei pinhole. Si deve allora cercare di ottenere un fascio collimato tanto stretto da attraversare i pinhole con perdite trascurabili: un problema non semplice, in particolar modo quando le dimensioni in gioco sono vicine ai limiti diffrattivi dello strumento. Fortunatamente, essendo il campo oggetto idealmente puntiforme, ossia di diametro h_{ob} idealmente infinitesimo, il problema dell'uniformità di illuminazione non è tanto grave quanto in microscopia tradizionale e, con le dovute cautele, può essere adottata l'illuminazione critica.

1.3.2 Risoluzione confocale laterale

In ipotesi di parassialità e ottiche perfette, si può dimostrare [7] che il microscopio confocale ideale, ossia quello con pinhole infinitesimi, ha una PSF $A_c(r) = A(r)^2$, cioè il quadrato di quella valida per un microscopio tradizionale (equazione (1.4)). Questo significa che un microscopio confocale può fornire un'immagine meglio definita di oggetti puntiformi, bordi e dettagli in generale. Lo stesso si può dire per la distribuzione di intensità $I_c(r)$: in figura 1.23 si vede come entrambe le tipologie di microscopio riescono a rispondere al medesimo intervallo di frequenze spaziali; la differenza sta nella rapidità con cui cala la risposta, determinando un maggior contrasto per il sistema confocale.

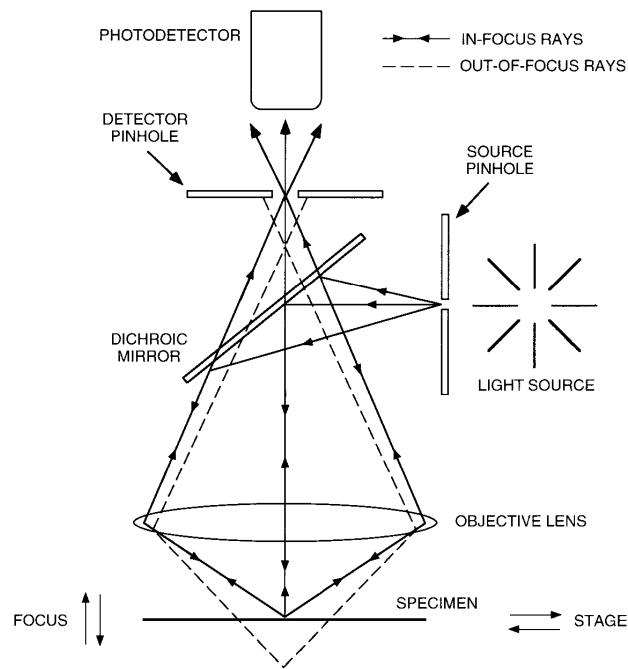
Come già fatto per il microscopio standard (vedi 1.1.1) si definisce la risoluzione puntuale, che corrisponde alla FWHM di I :

$$d_{c3dB} = \frac{0.37 \lambda}{NA} \quad (1.9)$$

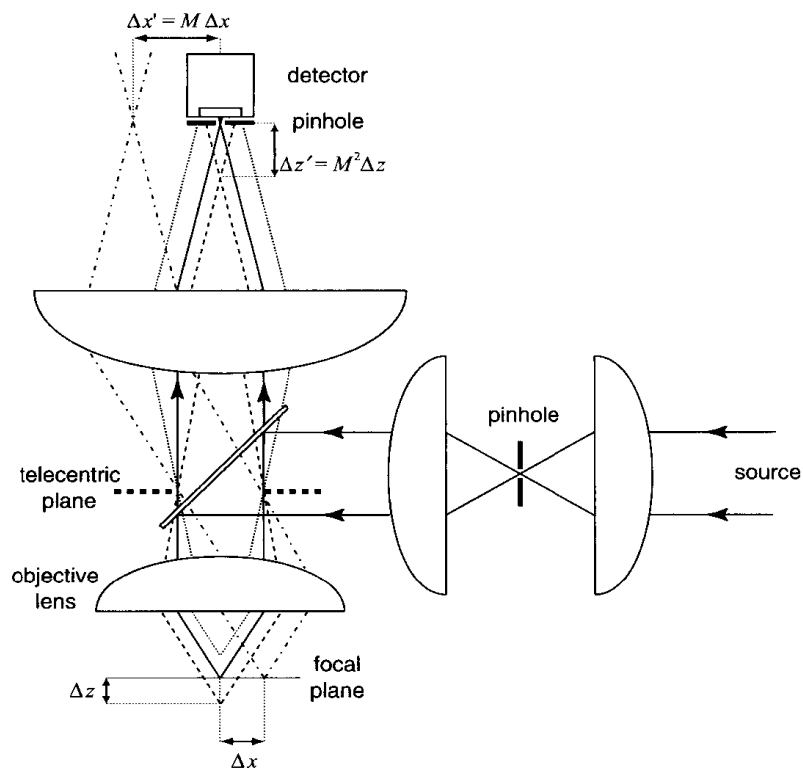
che risulta inferiore rispetto a quella del microscopio tradizionale, infatti $d_{c3dB} = 0.73 d_{3dB}$. Questo parametro però, come anticipato, non significa una migliore risoluzione trasversale per l'approccio confocale, bensì un miglior confinamento dello spot, ossia miglior contrasto.

Ciò giustifica la possibilità di imaging con luce coerente in assenza di *speckle*; infatti i lobi laterali del disco di Airy subiscono un'attenuazione di 26 dB rispetto al picco centrale, contro i 18 dB del microscopio standard. Poiché lo *speckle* è generato dalla somma dei lobi laterali di molti punti vicini, l'effetto

Lo speckle è la figura di interferenza che si genera quando si sommano onde coerenti provenienti da zone diverse di una superficie bagnata da luce LASER.



(a)



(b)

Figura 1.22: Struttura schematica essenziale di un microscopio confocale in riflessione; per semplicità è stato omesso l'oculare, posizionando il rivelatore nel punto di formazione dell'immagine intermedia.

(a) Percorso di imaging per un microscopio confocale ispirato al brevetto originale di Minsky, dove si sfrutta l'illuminazione critica.

(b) Percorso di imaging per un microscopio confocale che rispetta il principio di Köhler: il beam-splitter è posto sul piano focale posteriore dell'obiettivo e del collettore, rappresentando uno stop telecentrico per entrambe le lenti.

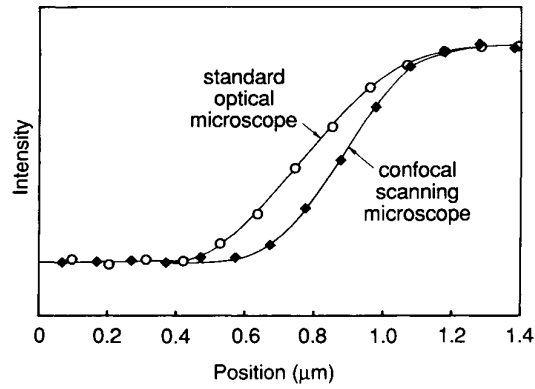


Figura 1.23: Confronto fra le risposte al gradino di un microscopio confocale e di un microscopio standard.

diventa quasi impercettibile nel caso confocale.

Il criterio di Rayleigh definisce la risoluzione laterale del sistema confocale ideale, quando questa è limitata dalla sola diffrazione ($R_c = d_c$)

$$d_c = \frac{0.56 \lambda}{NA} \quad (1.10)$$

che risulta minore dell'8 % rispetto a quella del microscopio tradizionale (equazione (1.6)).

1.3.3 Risoluzione confocale assiale

Per calcolare l'entità del contributo diffrattivo alla risoluzione assiale di un sistema confocale si fa riferimento alla *Teoria scalare per il punto riflettore* [7]. Si ritiene che questo modello sia il più adatto a rappresentare la natura della cornea, che è costituita da cellule sospese in un mezzo denso, ciascuna assimilabile ad una sorgente puntiforme che retro-diffonde la luce incidente di illuminazione.

Si assume che l'obiettivo, privo di aberrazioni per ipotesi, venga illuminato con un fascio collimato (figura 1.22b). Attraverso alcuni calcoli si ottiene l'estensione assiale della figura di diffrazione al di sopra e al di sotto del piano immagine confocale, intesa come la FWHM di $I_c(z)$:

$$d_{cz3dB} = \frac{0.62 \lambda}{n(1 - \cos \alpha)} \simeq \frac{1.24 \lambda n}{NA^2} \quad (1.11)$$

Applicando a $I_c(z)$ il criterio di Rayleigh si ottiene invece l'effettiva risoluzione assiale del sistema confocale con pinhole infinitesimo in presenza della sola diffrazione ($R_{cz} = d_{cz}$):

$$d_{cz} = \frac{0.89 \lambda}{n(1 - \cos \alpha)} \simeq \frac{1.78 \lambda n}{NA^2} \quad (1.12)$$

che risulta minore dell' 11 % rispetto a quella del microscopio standard (equazione (1.7)).

In definitiva, con l'impiego della configurazione confocale, si osserva un incremento teorico delle prestazioni, dovuto alla riduzione del contributo diffrattivo e ad un aumento del contrasto.

Si nota che le approssimazioni effettuate sono sufficientemente accurate solo per $NA < 0.5$. Va inoltre tenuto in considerazione che tutta l'analisi qui riportata mette in luce solo gli aspetti legati alla diffrazione e, rispetto alla realtà dei fatti, i risultati ottenuti rappresentano delle sole stime ottimistiche.

Lo sviluppo di Taylor di $\cos \alpha$ attorno a zero è
 $\cos \alpha \simeq 1 - \frac{\alpha^2}{2} + \dots$

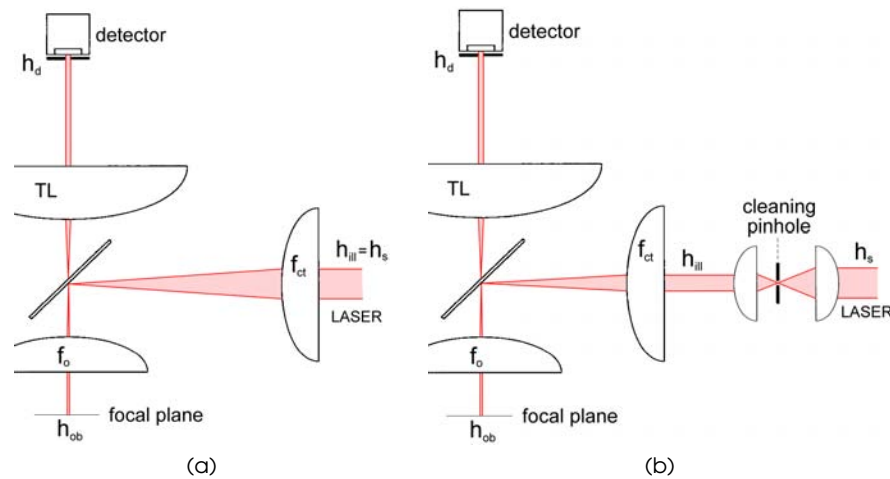


Figura 1.24: Sorgente di illuminazione Köhler (a) con sorgente LASER TEM_{00} e (b) con sorgente LASER multimodo. È importante notare che il pinhole presente non è uno dei pinhole confocali coniugati.

Infatti si può dimostrare sperimentalmente che le inevitabili aberrazioni introdotte dalle lenti allargano il picco centrale della PSF calcolata, modificano l'altezza dei lobi laterali e ne alterano la simmetria.

1.3.4 Sorgenti

Il ruolo della sorgente è di fornire luce stabile e sufficientemente brillante da permettere la raccolta di un segnale utile nonostante la presenza dei pinhole.

L'uso di una sorgente incoerente permette l'imaging a colori ma obbliga all'uso di ottiche costose e corrette per lunghezze d'onda multiple. Inoltre si rende necessario un sistema di raccolta della luce che, in genere, per questo tipo di sorgenti, viene emessa in tutte le direzioni. La luce incoerente si rivela particolarmente utile per l'osservazione di campioni con strutture geometriche periodiche. Queste infatti, quando illuminate con luce coerente, alterano l'immagine a causa dell'interferenza fra strati riflettenti successivi [7].

La sorgente coerente LASER è particolarmente appetibile perché mette a disposizione ad un prezzo ridotto una luce estremamente brillante, monocromatica e collimata. La monocromaticità semplifica il progetto di lenti e filtri, riducendo ulteriormente i costi, e la raccolta di immagini a colori resta possibile con l'utilizzo di più LASER, a formare un sistema RGB.

Nel caso di LASER con modo TEM_{00} in uscita, l'uso del pinhole di illuminazione diventa superfluo, poiché la luce appare al sistema come se provenisse da una sorgente puntiforme posta all'infinito (si consideri un LASER con eventuale lente collimatrice in uscita). In tal caso è sufficiente considerare il diametro di uscita h_s del fascio emesso come se fosse il diametro del pinhole h_{ill} e regolare la focale f_{ct} del collettore per ottenere il corretto rapporto di riduzione sul piano oggetto (figura 1.24a). Si nota che se il rapporto h_s/h_{ob} è molto elevato, diventa necessaria una focale f_{ct} irragionevolmente lunga. Se invece il fascio risulta imperfetto o multimodale, può essere "ripulito" focalizzando attraverso un pinhole di diametro inferiore a quello del primo minimo del disco di Airy che si forma nel fuoco (figura 1.24b).

Figura 1.25: Modello Thorlabs di stage-scanner (MLS203) con portacampione assemblato [24].



In generale, ad una sorgente LASER sono richieste intensità e direzione di puntamento estremamente stabili, pena la veridicità dei dati raccolti. La stabilità della lunghezza d'onda di emissione invece non rappresenta un fattore critico [7].

Apparentemente l'illuminazione coerente dovrebbe portare sull'immagine il caratteristico *speckle* dei LASER, ma come si è visto (equazione (1.3.2)), grazie alla configurazione confocale, ciò non accade poiché viene illuminata solo una piccolissima regione del campione per volta, riducendo la differenza di cammino ottico fra onde coerenti.

1.3.5 Sistemi di scansione

Per riuscire a costruire un'immagine bidimensionale, lo spot di illuminazione che colpisce il campione deve essere spostato sul piano xy , effettuando una scansione estremamente precisa e quanto più veloce possibile. I microscopi confocali vengono in genere classificati proprio in base al sistema di scansione adottato:

- *stage-scanning*, movimento del campione;
- *single-beam-scanning*, movimento di un fascio di illuminazione singolo;
- *multiple-beam-scanning*, generazione di fasci di illuminazione multipli.

L'approccio *stage-scanning* è concettualmente il più semplice: l'intero percorso ottico è fisso e il campione viene fatto traslare (vibrare) con precisione, spostandosi continuamente rispetto allo spot luminoso. In questo modo gli spot confocali di illuminazione e imaging giacciono esattamente sull'asse ottico, semplificando il progetto delle ottiche, che non devono essere corrette per grandi aperture.

D'altra parte, muovere il campione con precisione risulta problematico, perché i mezzi fluidi in cui sono immerse la maggioranza delle strutture biologiche di interesse non ne assicurano la stabilità durante gli spostamenti. Inoltre spostare fisicamente un oggetto richiede molto tempo e dunque vincola a frequenze di scansione incompatibili con l'imaging in tempo reale.

Nella configurazione *single-beam-scanning* è il fascio di illuminazione a muoversi sul campione in modo controllato. La deviazione del fascio può avvenire grazie all'uso di diversi dispositivi, ciascuno con i suoi pro e contro.

DEFLETTORE ACUSTICO-OTTICO Anche detto AOD (*Acousto-Optic Deflector*), è costituito da un cristallo fotoelastico che viene sollecitato da un trasduttore piezoelettrico ed attraversato da un'onda acustica di frequenza regolabile (figura 1.26). Il comportamento birifrangente del mezzo può essere dunque modulato ed è possibile imporre l'angolo di deflessione del fascio di luce che lo attraversa [6].

Questi dispositivi a stato solido beneficiano del fatto di avere pochissime parti in movimento e un'inerzia trascurabile, permettendo scansioni a denti di sega con tempi di recupero irrisori e frequenze elevatissime (fino a

Tipicamente la precisione richiesta è non superiore a $0.1 \mu\text{m}$.

In genere il frame-rate raggiungibile con questa tecnica è di circa 0.1 Hz [50].

Un materiale fotoelastico esibisce birifrangenza quando sottoposto a tensione meccanica.

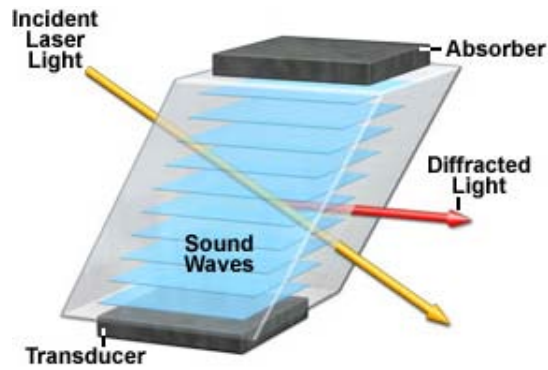
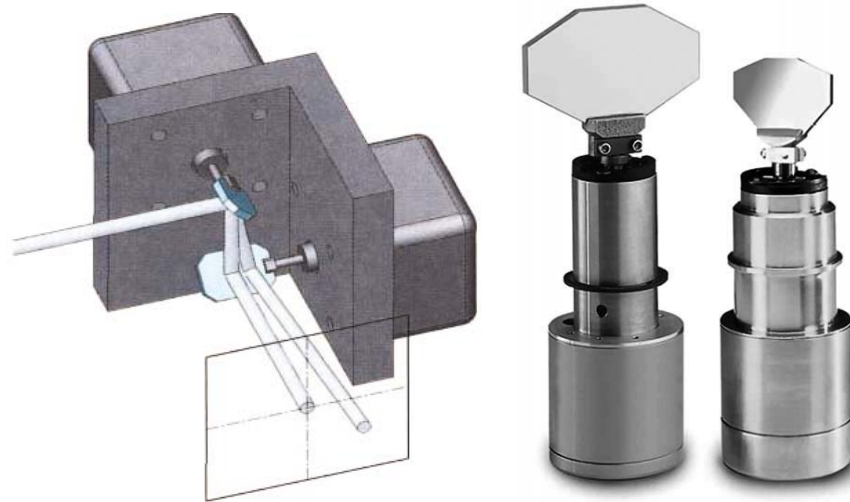


Figura 1.26: Schema di funzionamento del deflettore acustico-ottico.



(a) Specchi galvanometrici disposti ortogonalmente per la scansione xy del fascio. (b) Due modelli di specchio galvanometrico [30].

Figura 1.27: Impiego e struttura dello specchio galvanometrico.

100 KHz). Purtroppo, essendo basati sulle proprietà dispersive del materiale fotoattivo, gli AOD vincolano all'uso di luce monocromatica e permettono angoli di deflessione limitati. Un altro aspetto da considerare è l'apertura rettangolare del cristallo, che deve essere accoppiata al fascio LASER attraverso lenti cilindriche [40].

Un galvanometro è un dispositivo in grado di trasdurre una corrente elettrica in un momento magnetico.

SPECCHIO GALVANOMETRICO È uno specchio collegato ad un galvanometro ad alta precisione e pilotato in corrente con un segnale di controllo a dente di sega. Come mostrato in figura 1.27a, sono necessari due dispositivi posti ortogonalmente per scandire il campione nelle due direzioni xy : uno sposta rapidamente lo spot confocale lungo l'asse orizzontale (*fast axis*) mentre l'altro effettua la scansione lenta lungo l'asse verticale (*slow axis*).

Gli specchi galvanometrici offrono grandi superfici riflettenti e pilotaggio semplice, a scapito della velocità di scansione. Essendo costruiti analogamente ai motori elettrici, usando un rotore e uno statore, l'inerzia di un sistema così concepito non permette accelerazioni troppo elevate, pena il surriscaldamento e la rottura [40]. Tipicamente questi specchi concedono frequenze di scansione lineare non superiori a 1000 Hz.

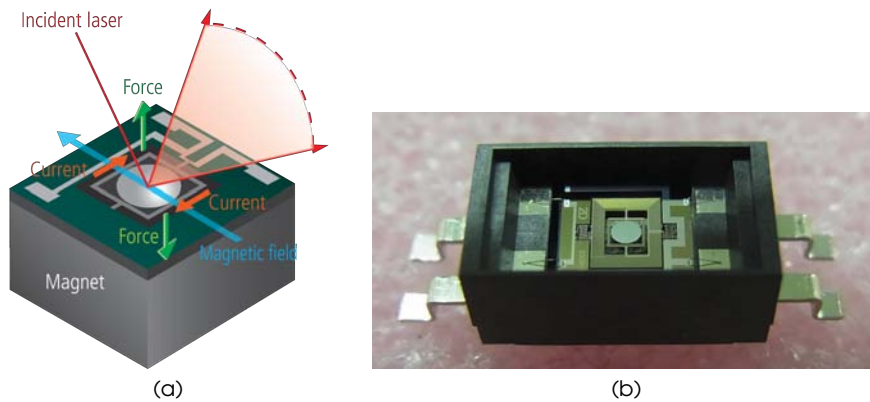


Figura 1.28: Specchio MEMS risonante; (a) principio di funzionamento (attuazione magnetica) e (b) struttura.

SPECCHIO RISONANTE È uno specchio realizzato con tecnologia MEMS, che incorpora sia il dispositivo di attuazione che l'elettronica di controllo [37]. Questo dispositivo adopera lo stesso principio di base del galvanometro, ma raggiunge frequenze di scansione ben più elevate (4-8 KHz) grazie alla diversa tecnica di pilotaggio: la corrente (attuazione magnetica) o la tensione (attuazione elettrostatica) di controllo hanno un andamento sinusoidale ed sono sfruttate per instaurare un'oscillazione armonica (figura 1.28). Il segnale pilota è sincronizzato con il periodo di oscillazione dello specchio, che può così "risuonare" a frequenze dell'ordine di qualche KHz. Con l'uso di parti meccaniche più complesse, il dispositivo può inclinarsi (*tilt*) sui due assi perpendicolari, risuonando rapidamente in una direzione e scandendo lentamente lungo l'altra in modo analogo ad uno specchio galvanometrico.

Gli svantaggi principali di questo approccio sono l'area ridotta offerta dagli specchi MEMS e l'angolo di inclinazione non lineare in funzione del tempo (vedi 4.1.8).

Quale che sia il mezzo utilizzato per la scansione, è necessario che le ottiche del sistema siano corrette per le aberrazioni fuori asse e per minimizzare la curvatura di campo. Inoltre, in aggiunta al meccanismo di scansione, i microscopi single-beam-scanning impiegano delle lenti aggiuntive per immaginare il fulcro dello scanner sul piano focale posteriore dell'obiettivo, risultando in un sistema telecentrico, ossia il cui potere di ingrandimento non dipende dal punto di messa a fuoco (figura 1.22b).

Un microscopio confocale single-beam-scanning che adotta una sorgente LASER viene comunemente detto CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscope*).

Per quanto riguarda la configurazione multiple-beam-scanning, l'idea di base è ottimizzare i tempi di scansione sfruttando la presenza contemporanea di più spot illuminati. Fare ciò senza compromettere la confocalità del sistema è possibile solo studiando un adeguato pattern di illuminazione, tale da conservare una certa distanza fra i fasci e limitarne così la luce interdiffusa. Le principali tecniche adottate sono due:

DISCO DI NIPKOW Si tratta di un disco rotante che contiene una matrice di pinhole disposti a spirale. La sorgente posta dietro al disco illumina l'oggetto in modo selettivo, attraverso fasci multipli che scandiscono l'intero piano oggetto nel corso di una rotazione (figura 1.29a).

Purtroppo la maggior parte della luce incide sulle zone opache del disco, va persa inutilmente e può diffondere nel percorso di imaging, riducendo

I dispositivi MEMS, ossia "Micro Electro-Mechanical Systems", coniugano le proprietà elettriche degli integrati a semiconduttore con proprietà opto-meccaniche, in forma altamente miniaturizzata.

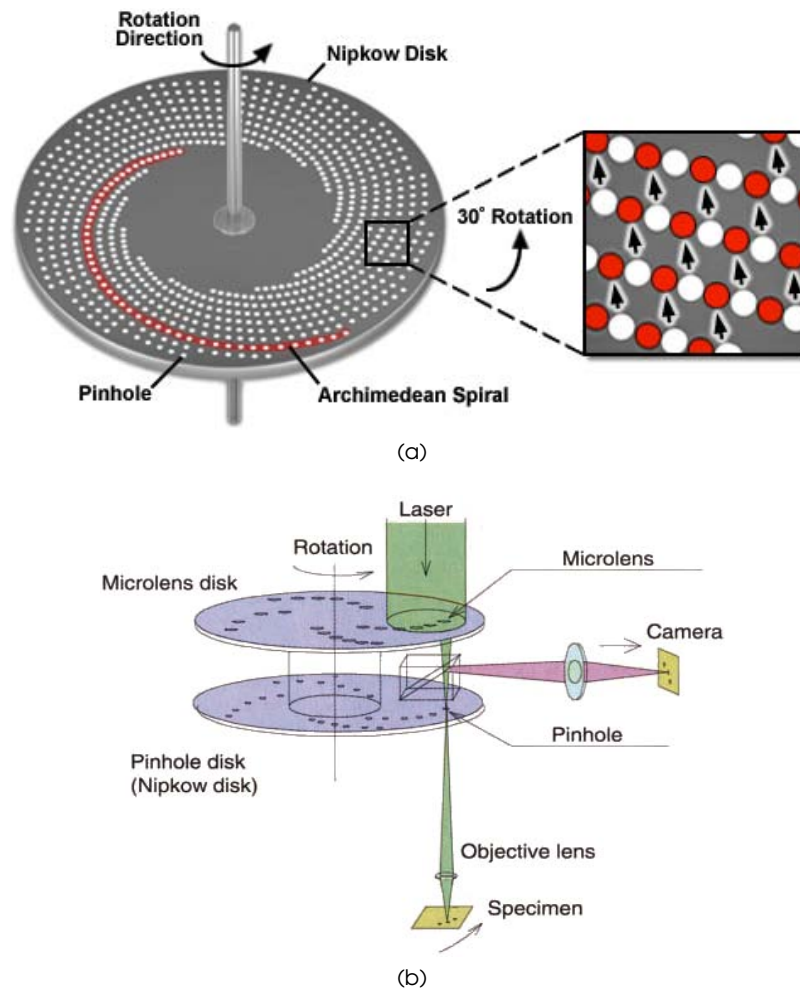


Figura 1.29: Impiego e struttura del disco di Nipkov.

(a) Pattern dei pinhole sul disco rotante.

(b) Variante del disco di Nipkov, che impiega una matrice di microlenti (Yokogawa).

drasticamente il contrasto. Una soluzione a questo problema consiste nel sovrapporre al disco di Nipkov un secondo disco contenente una matrice di microlenti, in grado di raccogliere più luce e focalizzarla sui relativi pinhole, come mostrato in figura 1.29b.

DIGITAL MICROMIRROR DEVICE Detto anche DMD, il “Dispositivo Digitale a microspecchi” è una matrice di specchi quadrati micrometrici, pilotabili per via digitale in modo indipendente (figura 1.30). Ciascuno specchio può assumere due inclinazioni diverse in base al segnale digitale di comando, indirizzando la luce incidente lungo percorsi ben distinti. Il passaggio da una configurazione all'altra è molto rapido, facendo di questo dispositivo un'ottima soluzione per l'imaging in tempo reale.

D'altra parte, i DMD sono seriamente penalizzati per ciò che riguarda l'efficienza: la luce che proviene dalla sorgente deve illuminare l'intera matrice, ma solo una piccola quantità per volta viene effettivamente indirizzata verso il campione. C'è inoltre da tenere in considerazione che un'ulteriore frazione di luce va persa negli spazi, pur stretti, presenti fra microspecchi adiacenti. Inoltre, proprio le ridotte dimensioni degli specchi fanno della matrice un vero e proprio reticolo di diffrazione bidimensionale, con gli ovvi problemi legati

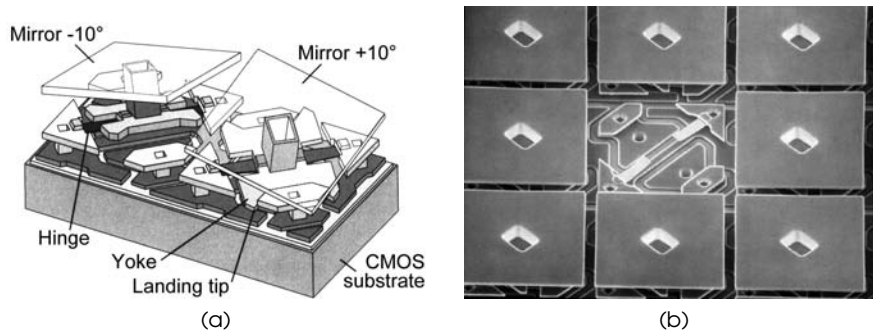


Figura 1.30: Unità base di un DMD, mostrate (a) in uno schema dei componenti principali e (b) come appaiono al microscopio elettronico.

all'uniformità del campo illuminato.

Qualunque sia il metodo di scansione utilizzato, è facile notare come sussista una sorta di principio di indeterminazione: non è possibile ottenere simultaneamente un'elevata risoluzione temporale (alte frequenza di scansione) e un'elevata risoluzione spaziale (piccolo spot confocale), senza ridurre le dimensioni del campo oggetto, ossia il numero di pixel dell'immagine finale. Allargare il pinhole, o aumentarne il numero, aumenta la luminosità e dunque la velocità di scansione ma compromette il potere risolutivo; viceversa, un pinhole molto stretto ottimizza la qualità dell'immagine raccolta ma vincola a lunghi tempi di scansione, a causa della scarsa luce che raggiunge il rivelatore.

Esistono microscopi confocali che utilizzano una fenditura al posto del pinhole, scandendo il campione lungo una sola direzione (*slit-scanning*, vedi 3.1.2): ne conseguono una semplificazione del progetto e un notevole miglioramento del frame-rate. La risoluzione purtroppo ne risente lungo una direzione, ma rimane comunque elevata la soppressione della luce diffusa dai piani fuori fuoco [7, 50].

1.3.6 Rivelatori

Come già anticipato, in un microscopio confocale la luce raccolta dal sistema ottico viene focalizzata attraverso il pinhole di rivelazione, riducendo drasticamente la quantità di luce disponibile per la formazione delle immagini; si rende dunque necessario l'uso di rivelatori ad alta sensibilità, in grado di rispondere in modo rapido ad un flusso di luce di intensità variabile.

La discriminazione spaziale non è, in genere, una caratteristica richiesta, poiché l'immagine raccolta è puntuale e l'area sensibile di rivelazione non rappresenta un parametro critico. Ciò non è vero nei casi di multiple-beam-scanning e slit-scanning, in cui viene impiegato un sensore CCD, rispettivamente, bidimensionale e lineare.

I tipi di rivelatore di gran lunga più utilizzati sono due: il tubo fotomoltiplicatore (PMT, *PhotoMultiplier Tube*) e il fotodiodo a valanga (APD, *Avalanche PhotoDiode*).

Il PMT, con un'efficienza quantica ridotta ma guadagno elevatissimo e risposta rapida, può funzionare in regime di conteggio di fotoni e presenta un alto rapporto segnale-rumore. L'ingombro, il costo e le alte tensioni di alimentazione possono però rappresentare un problema.

L'efficienza quantica è il rapporto fra elettroni fotoemessi e fotoni assorbiti da un rivelatore.

L'APD è un dispositivo compatto, stabile e relativamente economico; presenta efficienza quantica elevata e risposta rapida, con un'amplificazione interna di circa 50-100. Un fotodiodo di tal genere lavora a tensioni di 100-300 V, molto più basse di quelle richieste ad un tubo fotomoltiplicatore, ma di contro offre rapporti segnale-rumore ben più elevati.

2

NECESSITÀ CLINICA DELLA MICROSCOPIA CONFOCALE CORNEALE

INDICE

2.1	L'occhio umano	33
2.1.1	Tonaca esterna	33
2.1.2	Tonaca media	34
2.1.3	Tonaca interna	35
2.1.4	Saccadi	35
2.2	La cornea	36
2.2.1	Anatomia e fisiologia	36
2.2.2	Patologia	39
2.3	Perché usare la microscopia confocale corneale?	40

Per un microscopio oftalmologico l'occhio umano rappresenta il “campione” da esaminare ed è perciò molto importante conoscerne la struttura e il funzionamento. In questo modo è possibile sia definire con criterio le caratteristiche e le dimensioni dell'oggetto che il sistema ottico deve immaginare, sia comprendere i risultati che lo strumento stesso fornisce durante il suo funzionamento.

2.1 L'OCCHIO UMANO

Comprendere l'anatomia dell'occhio è fondamentale per capirne la fisiologia. La sua complessa struttura e il suo delicato equilibrio permettono la vista, ossia la raccolta di immagini ottiche dell'ambiente circostante: la luce viene raccolta da un sistema di lenti organiche e produce un'immagine su uno strato di cellule fotosensibili connesse al sistema nervoso e al cervello.

È possibile identificare tre membrane sovrapposte (figura 2.1), diverse per caratteristiche e funzione, che costituiscono e danno la forma al bulbo oculare [19]:

- *tonaca esterna* (fibrosa);
- *tonaca media* (vascolare), detta anche *uvea*;
- *tonaca interna* (nervosa), conosciuta come *retina*;

2.1.1 Tonaca esterna

La tonaca esterna è il rivestimento visibile dell'occhio ed è costituita da due porzioni di sfera: anteriormente vi è la *cornea*, con un raggio di curvatura di circa 8 mm; posteriormente si trova la *sclera*, con un raggio di curvatura maggiore (12 mm); il punto in cui queste si intersecano è detto *limbo sclerocorneale*.

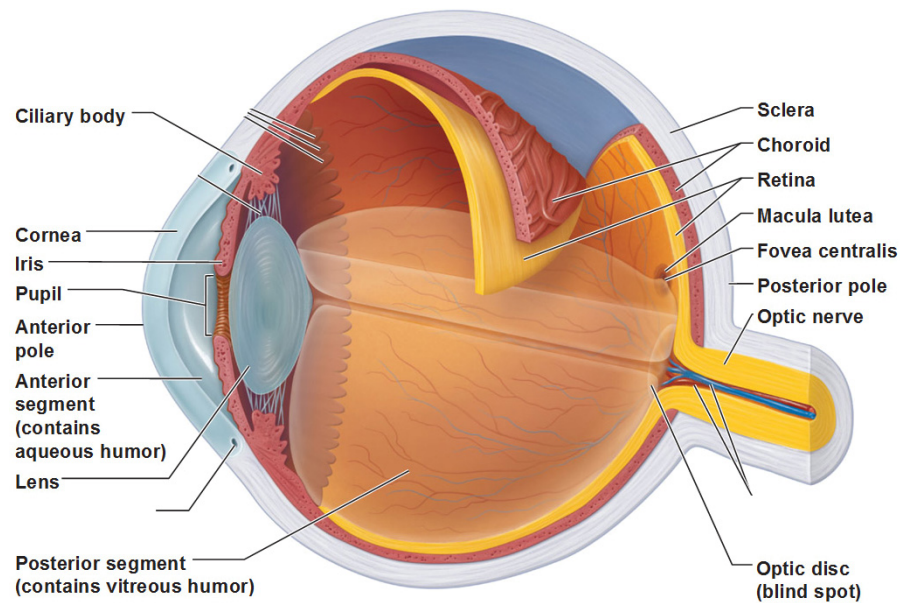


Figura 2.1: Struttura dell'occhio umano.

La cornea (vedi 2.2) è la parte anteriore e trasparente del bulbo oculare, protegge *iride* e *cristallino*, occupando una piccola porzione della superficie oculare totale; insieme al cristallino la sua funzione è raccogliere e focalizzare la luce per indirizzarla verso attraverso le strutture interne dell'occhio.

La sclera invece costituisce la gran parte della tonaca fibrosa dell'occhio: è molto resistente e svolge funzioni di protezione e sostegno nei riguardi delle membrane oculari più interne. È composta da un fitto intreccio di fibre di collagene disposte in modo da creare un'intelaiatura a strati capace di mantenere la pressione oculare e offrire la massima resistenza alle sollecitazioni meccaniche esterne. Nella sclera, inoltre, si inseriscono i muscoli che controlla il movimento oculare (vedi 2.1.4).

2.1.2 Tonaca media

Chiamata anche *uvea*, la tonaca media si suddivide in quattro elementi.

La *coroide* si estende posteriormente ed è una membrana connettiva ricca di vasi, che ha il compito di nutrire le cellule della retina, che su di essa si stratifica, e altre parti del bulbo oculare prive di vasi. È ricca di elementi pigmentati ed è parte integrante dell'apparato visivo poiché assorbe la luce diffusa.

L'*iride* è il segmento anteriore, posta davanti al cristallino e costituita da un anello muscolare con un foro al centro, chiamato *pupilla*. Il diametro della pupilla si adatta in base alla quantità di luce che colpisce l'occhio.

Infine si cita il *corpo ciliare*, che si estende dall'iride e termina con la *coroide*, separandosi da essa grazie ad un solco chiamato *ora serrata*. Questo tessuto prende il nome dai *processi ciliari* che rivestono la sua superficie e che costituiscono i punti di inserzione per le fibre che sostengono il cristallino (figura 2.2).

Il cristallino è una struttura trasparente, a forma di lente biconvessa e priva di vascolarizzazione e innervazione; ciò le consente di rimanere otticamente perfetta. Questo elemento è situato circa 2 mm dietro la cornea e può modificare la propria forma, alterando così il suo potere ottico in modo tale

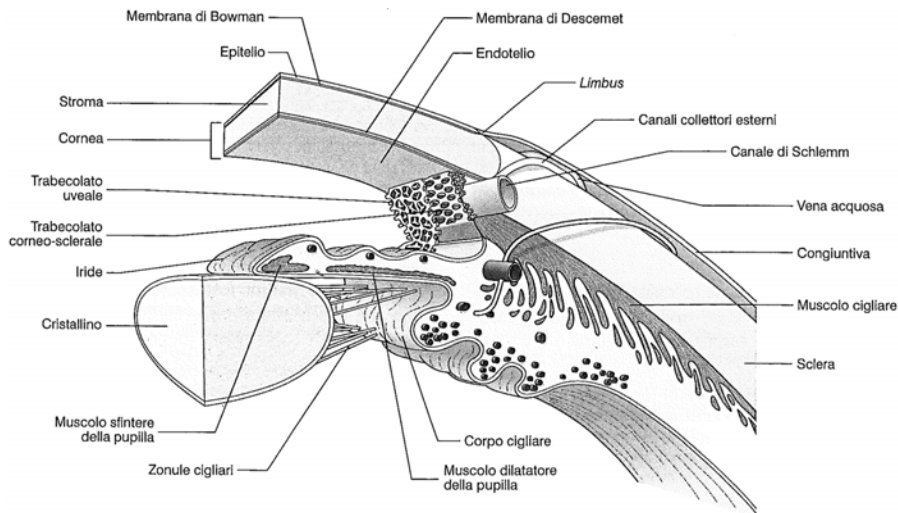


Figura 2.2: Sezione dettagliata dell'occhio che mette in evidenza le sue strutture anteriori.

da permettere una corretta focalizzazione sulla retina di oggetti a distanze diverse (*accomodamento*).

Si nota che la *camera anteriore* fra cornea e iride e la *camera posteriore* fra iride e cristallino sono riempite di un liquido trasparente prodotto dal corpo ciliare e denominato *umor acqueo*.

2.1.3 Tonaca interna

La tonaca nervosa costituisce la parte più interna dell'apparato visivo: si presenta come una doppia membrana epitelio-sensoriale di cui si possono distinguere due porzioni, una posteriore a contatto con la coroide e di natura sensoriale ed epiteliale, e una anteriore a contatto con iride e corpo ciliare di natura esclusivamente epiteliale. La retina contiene i recettori che convertono la luce ricevuta dal cristallino in un segnale nervoso che viene poi trasmesso al cervello dai nervi ottici (figura 2.3). I fotorecettori si distinguono in:

- *bastoncelli*, maggiormente sensibili alla luce, sono molto utili in condizioni di scarsa illuminazione ma non distinguono i colori;
- *coni*, stimolati selettivamente da raggi luminosi a lunghezze d'onda differenti, permettono di vedere i colori ma richiedono maggiori quantità di luce per attivarsi.

Nel punto di intersezione fra retina e asse ottico oculare è posizionata la *fovea*, la regione centrale della retina, ricca di coni e dotata della maggiore acuità visiva.

Lo spazio compreso fra cristallino e retina, detto *camera vitrea*, è riempito di un fluido gelatinoso trasparente chiamato *umor vitreo*.

L'acuità visiva corrisponde alla risoluzione laterale dell'occhio umano.

2.1.4 Saccadi

La *saccade* è il rapido movimento oculare che porta al centro del campo visivo, sulla fovea, una regione inizialmente periferica. La distanza spaziale tra la regione periferica di interesse e la fovea è detta "ampiezza della saccade". La durata di una saccade è determinata unicamente dalla sua ampiezza e può

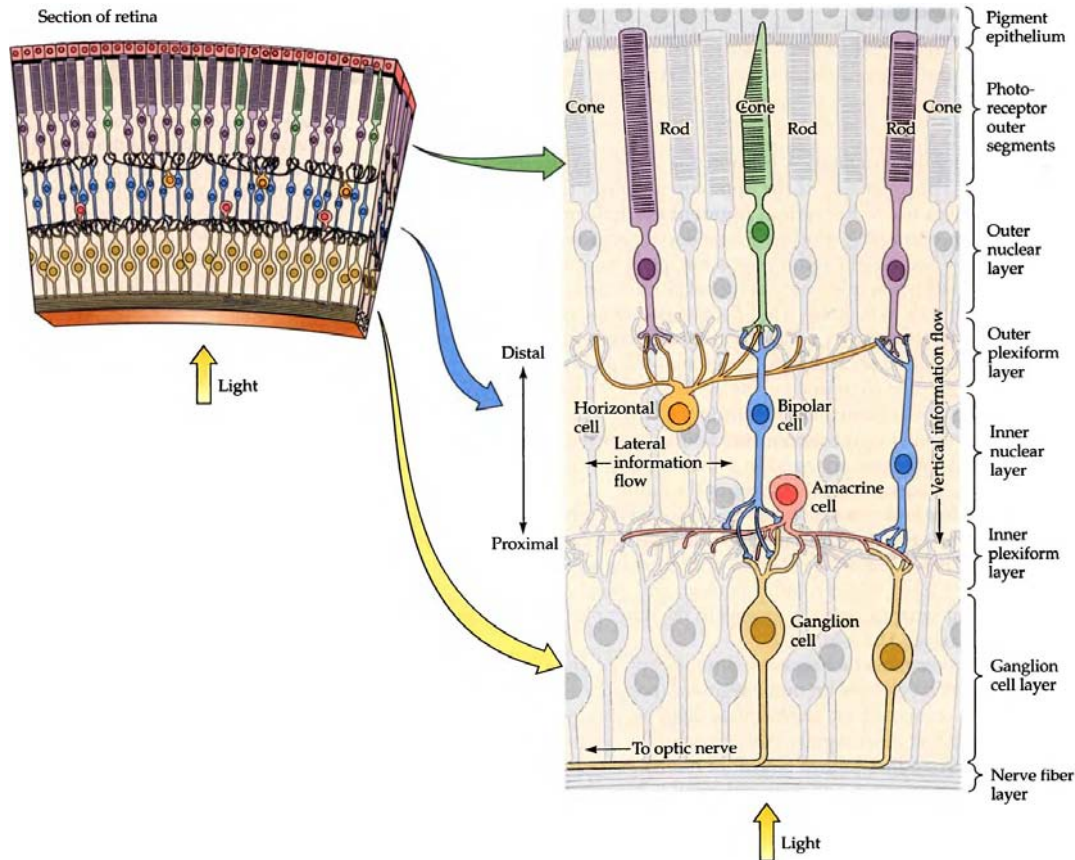


Figura 2.3: Sezione della retina; si noti la particolare forma dei fotorecettori.

variare dai 30 ai 50 ms per i movimenti involontari (*micro-saccadi*) a più di 150 ms per quelli volontari (*macro-saccadi*).

Queste rotazioni avvengono attorno ad assi sempre diversi e non prevedibili, sono generate dai muscoli che si innestano nella tonaca esterna e hanno natura balistica: una volta iniziato, il movimento non può essere corretto nel corso del suo svolgimento. Infatti, una volta che il processo neuronale che provoca la saccade è iniziato, il sistema nervoso di controllo non è in grado di generarne un altro prima di 200 ms.

2.2 LA CORNEA

Come anticipato, la cornea è la parte anteriore trasparente dell'occhio e occupa circa 1/6 della superficie oculare totale. Insieme al cristallino, con il quale forma il *diottero oculare*, permette il passaggio della luce verso le strutture interne dell'occhio, facendo convergere i raggi luminosi verso la retina. La cornea fornisce circa i 2/3 del potere ottico totale dell'occhio ma, a differenza del cristallino, la sua capacità di convergenza è fissa.

2.2.1 Anatomia e fisiologia

La cornea è priva di vasi sanguigni, ma densamente innervata e sensibile al tatto, alla temperatura e ai prodotti chimici. L'avascolarità la obbliga a ricevere sostanze nutritive tramite diffusione dal liquido lacrimale dall'e-

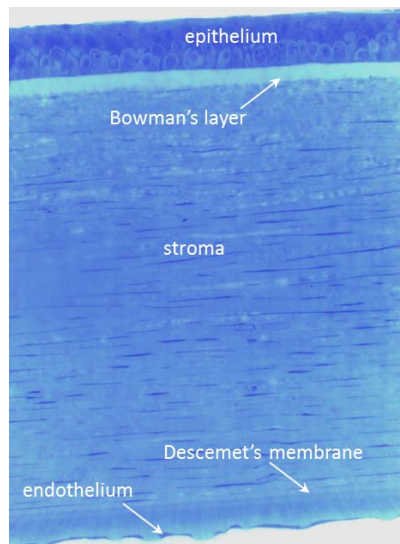


Figura 2.4: Sezione della cornea.

sterno e tramite l'umore acqueo dall'interno, mentre l'ossigeno viene attinto direttamente dall'aria per diffusione.

Lo spessore normale della cornea è di poco superiore al mezzo millimetro (520-540 μm) al centro e si ispessisce verso il limbo (670 μm).

Strutturalmente si compone di cinque strati (figura 2.4):

- *epitelio*
- *lamina di Bowman*
- *stroma*
- *membrana di Descemet*
- *endotelio*

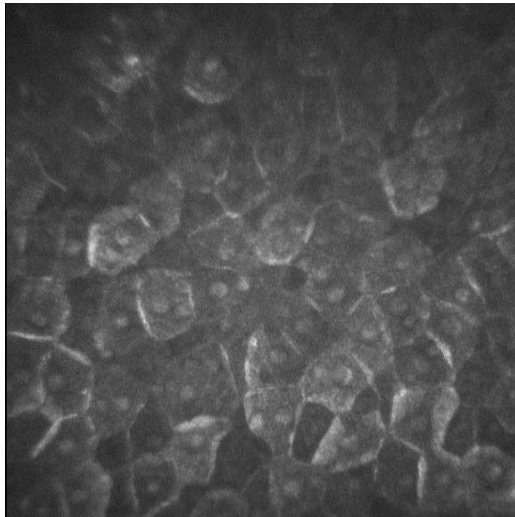
Lo strato più superficiale è l'epitelio, spesso circa 50 μm , ovvero un decimo dello spessore totale. È un tessuto pluristratificato (5 o 6 strati) con cellule piatte nei primi due, poliedriche nei successivi due o tre e allungate, quasi cilindriche, negli ultimi due (figura 2.5a).

Sotto l'epitelio corneale si trova la lamina di Bowman o membrana limitante anteriore: al microscopio ha un aspetto amorfo (figura 2.5c), è priva di cellule, spessa circa 12 μm e formata da fibre di collagene. Da questa membrana dipende la difesa degli strati inferiori della cornea perché garantisce resistenza a traumi ed infezioni, oltre che idratazione allo stroma.

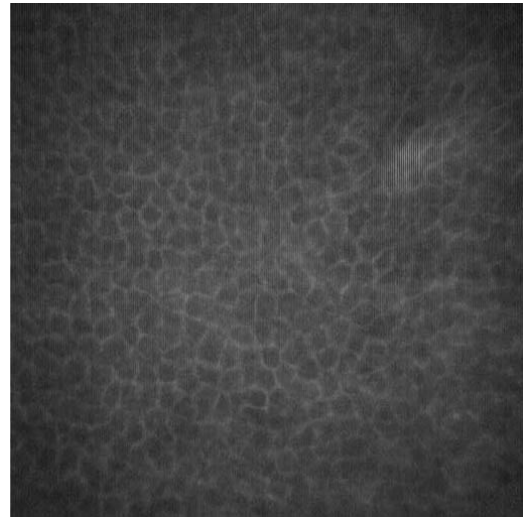
Lo stroma occupa la gran parte dello spessore corneale totale (circa 450 μm) ed è costituito da circa 200 lamelle spesse appena 2 μm e larghe da poche decine a centinaia di micron, formate da fibre di collagene parallele tra loro (figura 2.5d). Il loro spessore tende ad aumentare con l'età e procedendo dalla zona centrale verso il limbo.

Il quarto strato è la membrana di Descemet (o limitante posteriore); ha uno spessore variabile dai 4 ai 12 μm e tende anch'essa ad ispessirsi proporzionalmente all'età. Come lo strato di Bowman, anche la membrana di Descemet si presenta amorfa e priva di cellule: è composta da sole fibre di collagene, che le forniscono elasticità.

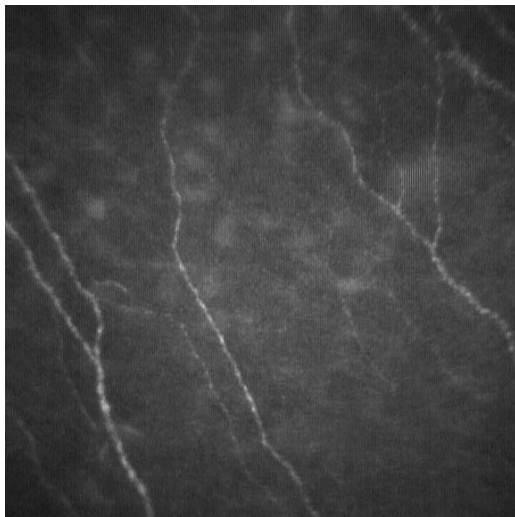
Infine si trova l'endotelio corneale, quinto e più profondo strato della cornea. Si tratta di un singolo strato di cellule piatte e dalla forma esagonale, strettamente adese tra loro (figura 2.5e). Il compito essenziale di questo strato è quello di fungere da filtro posteriore per gli strati superiori della cornea e idratarli.



(a)



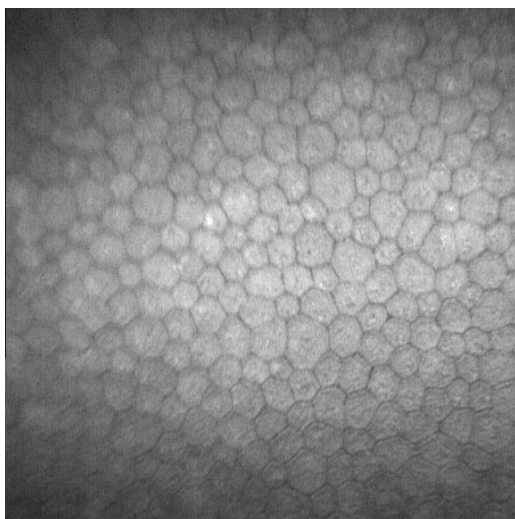
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 2.5: Microfotografie dei diversi strati della cornea, acquisite con il microscopio confocale corneale Nidek Confoscan 4.

- (a) epitelio superficiale;
- (b) epitelio basale;
- (c) lamina di Bowman;
- (d) stroma;
- (e) endotelio.

2.2.2 Patologia

Le patologie che possono affliggere la cornea sono facilmente diagnosticabili con un microscopio in grado di selezionare i diversi strati che la compongono, mettendo in luce i sintomi caratteristici della malattia in questione [46].

CHERATITE ERPETICA Si tratta di un'infezione dovuta all'Herpes Virus e rappresenta uno dei problemi clinici oftalmologici più gravi a causa dell'elevato rischio di invalidità permanente. Gli esiti dell'infezione sono: perdita di trasparenza corneale, neovascolarizzazione corneale profonda, deficienza limbare.

CHERATITE DA ACANTHAMOEBA Anche in questo caso si incontra un'infezione corneale grave, più diffusa a causa di lenti a contatto rigide di lungo utilizzo, la cui manutenzione e sterilizzazione quotidiana non vengono rigorosamente rispettate, permettendo alle cisti del protozoo (disseminate con la polvere) di raggiungere lo spazio tra la lente e la cornea. Questa può presentare microcisti subepiteliali che, rompendosi, danno origine a lesioni epiteliali simili a quelle erpetiche. Nella sua fase più avanzata la cheratite da *Acanthamoeba* coinvolge anche lo stroma, che si può ulcerare.

CHERATOCONO Indica il progressivo assottigliamento dello stroma corneale, che determina una riduzione visiva notevole; le sue cause sono ancora da chiarire, ma presenta un'evidente correlazione genetica. A causa di questa malattia la cornea si deforma allungandosi in avanti e assumendo una forma conica. La curvatura irregolare creata produce distorsioni delle immagini e una visione confusa sia da vicino che da lontano.

OPACITÀ CORNEALE Spesso di natura cicatriziale, è l'opacizzazione più o meno estesa della cornea e si manifesta sotto forma di una macchia in genere bianca, che può essere o meno visibile sull'occhio, a seconda delle sue dimensioni. Tale macchia determina una diminuzione dell'acuità visiva se occupa il centro della cornea.

CORPI ESTRANEI La presenza di un corpo estraneo sulla superficie corneale può lederne la struttura se non rimosso immediatamente. Corpi estranei con dimensioni molto ridotte possono penetrare negli strati più interni della cornea causando infezioni e infiammazioni.

EDEMA CORNEALE L'edema è una patologia caratterizzata dall'aumento di contenuto acquoso all'interno della cornea determinando la diminuzione della sua trasparenza.

OCCHIO SECCO Colpisce maggiormente il sesso femminile, soprattutto a causa di modificazioni ormonali legate alla menopausa o per la frequente associazione a malattie autoimmuni. È dovuto ad una ridotta produzione di lacrime o ad una loro eccessiva evaporazione. La parte principale del film lacrimale è costituita da acqua ricca di sali, zuccheri, proteine, enzimi e altre sostanze fondamentali per il nutrimento e la difesa degli strati corneali esterni. La riduzione eccessiva di questo apporto causa la morte cellulare e sensazione di bruciore e infiammazione per il malato.

POLIMEGATISMO E PLEOMORFISMO Si tratta dell'aumento del numero di cellule endoteliali con area alterata forma diversa da quella esagonale. Polimegatismo e polimorfismo vanno sempre di pari passo e l'alterazione di questi due parametri significa è indice di un'alterazione nella fisiologia dell'endotelio.

DISTROFIA ENDOTELIALE DI FUCHS La distrofia corneale endoteliale di Fuchs (FECD) è la forma più frequente di distrofia corneale posteriore; è caratterizzata da escrescenze (gutte corneali) sulla membrana di Descemet, che è ispessita, e da edema corneale generalizzato, che provoca una diminuzione progressiva dell'acuità visiva.

DISTROFIA CRISTALLINA DI SCHNYDER La distrofia corneale di Schnyder (SCD) è una forma rara di distrofia corneale stromale, caratterizzata dalla presenza di opacità e cristalli all'interno dello stroma e dalla progressiva diminuzione dell'acuità visiva. Nelle forme caratteristiche è presente un'opacità giallo-bianca a forma di anello, composta da innumerevoli cristalli fini a forma di ago, nello strato di Bowman e nello stroma anteriore. Sono risparmiati l'epitelio corneale, l'endotelio e la membrana di Descemet.

La LASIK è un'operazione chirurgica LASER di rimodellamento della cornea per migliorare l'acuità visiva

CHERATITE LAMELLARE DIFFUSA Rara complicanza della LASIK, la Cheratite Lamellare Diffusa (*Diffuse Lamellar Keratitis*, DLK) è un'irritazione che si verifica quando del materiale estraneo viene a trovarsi sotto il lembo corneale creato durante l'operazione. Alla luce di una lampada a fessura questa condizione appare come se delle piccole onde di sabbia fossero presenti all'interno della cornea, per questo motivo è anche detta "Sabbia del Sahara".

MICRODOTS STROMALI Si tratta di depositi di materiale granuloso nello stroma corneale, che spesso riguardano portatori di lenti a contatto a lungo termine, come risultato di una privazione di ossigeno e di microtraumi alla cornea.

2.3 PERCHÉ USARE LA MICROSCOPIA CONFOCALE CORNEALE?

Come appena visto, la cornea è una struttura adibita a diffrangere la luce per permetterne la focalizzazione sulla retina; in qualità di lente, quindi, deve essere trasparente alla radiazione sensibile. La sua superficie epiteliale inoltre riflette con efficacia la luce proveniente da sorgenti dirette (*riflesso epiteliale*).

Da quanto già constatato in merito alle tecniche di contrasto, si può comprendere la grande difficoltà insita nella creazione di un'immagine ottica, per di più in riflessione, di un oggetto con queste caratteristiche. Se la microscopia tradizionale nulla può fare a causa del bagliore diffuso che si ottiene, anche le tecniche di contrasto esaminate sono applicabili con difficoltà.

La microscopia in campo oscuro elimina il riflesso epiteliale, ma soffre della luce diffusa dai piani fuori fuoco, che determinano una risoluzione assiale troppo elevata. Questo difetto inoltre fa sì che il riflesso epiteliale ricompaia durante l'imaging di spessori interni alla cornea.

La tecnica a contrasto di fase, basandosi sulla stessa configurazione, riporta gli stessi problemi, senza considerare il fatto che il phase-ring è efficace solo con campioni di spessore limitato.

Polarizzare la luce non porterebbe alcun vantaggio perché la cornea non contiene elementi birifrangenti in grado di fornire un'immagine misurabile.

La microscopia DIC, invece, non è applicabile perché la complessità del sistema difficilmente si adatta all'uso di lenti-obiettivo convenzionali. Inoltre la presenza del prisma birifrangente introduce riflessioni indesiderate che degradano l'immagine [4].

La tecnica di eccitazione a due fotoni è improponibile per l'imaging corneale perché, considerate le potenze in gioco, significherebbe ledere il paziente. Lo stesso vale per l'uso della fluorescenza perché rappresenta una tecnica invasiva; l'autofluorescenza corneale invece si attiva solo con intensità luminose troppo elevate per applicazioni *in vivo*.

Alla luce di queste considerazioni si comprende come la microscopia confocale possa rappresentare una tecnica di indagine corneale efficace e dallo schema ottico molto semplice, presentando due soli pinhole aggiuntivi rispetto alla configurazione del microscopio standard.

Un altro aspetto fondamentale da tenere in conto è la necessità di imaging con frame-rate elevati. L'occhio infatti, pur in presenza di una luce di fissazione, continua a muoversi e rende inefficace qualsiasi tecnica microscopica che necessiti di lunghi tempi di acquisizione. In genere per ottenere un'immagine utile della cornea il tempo di acquisizione non deve superare i 50 ms, che equivale ad un frame-rate minimo di 20 Hz.

Sia la microscopia confocale multiple-lens-scanning, sia quella che adotta uno specchio risonante, forniscono frame-rate superiori a questo valore limite e quindi adatti allo scopo.

La luce di fissazione è un piccolo punto luminoso che lo strumento oftalmologico mette a fuoco sulla retina del paziente durante l'esame; in questo modo l'occhio fissa lungo una determinata direzione e se ne minimizzano i continui movimenti.

3

STATE-OF-THE-ART DELLA MICROSCOPIA CONFOCALE CORNEALE

INDICE

3.1	Nidek Confoscan 4	43
3.1.1	Modalità operative	44
3.1.2	Struttura	45
3.1.3	Limiti e problemi	46
3.2	Heidelberg HRT Rostock Cornea Module	47

Lo studio dei dispositivi per imaging confocale corneale attualmente in commercio permette di conoscere e comprendere il livello delle odierne prestazioni raggiungibili nel settore. Ciò è importante per capire come approcciare al meglio i problemi legati alla ideazione e al progetto di un nuovo strumento efficace, competitivo e in grado di superare i limiti raggiunti dalla tecnologia già esistente.

Attualmente i modelli di punta di microscopio confocale corneale presenti in commercio sono due:

- *Nidek Confoscan 4 (CS4)*;
- *Heidelberg HRT Rostock Cornea Module*.

3.1 NIDEK CONFOSCAN 4

Il microscopio confocale corneale Nidek CS4 (figura 3.1) permette di visualizzare, registrare e misurare in tempo reale e in modo non invasivo le cellule dei diversi strati della cornea. Ciò è assai utile per il follow-up di molte patologie corneali (opacità, degenerazioni endoteliali, effetti di traumi, edema, distrofia, cornea guttata, cheratiti, infiammazioni e infezioni, corpi estranei, alterazioni da lenti a contatto). Risulta inoltre uno strumento fondamentale per lo screening pre-operatorio e nella valutazione del decorso post-operatorio.

Lo strumento, in tutte le sue configurazioni, possiede un alto livello di automazione che permette non solo un minimo intervento da parte dell'operatore, ma soprattutto una alta ripetibilità d'esame, riproducendo le scansioni sempre nella medesima posizione corneale, aspetto che risulta fondamentale nel follow-up di qualsiasi patologia, sia chirurgica che farmacologica. È possibile in ogni caso effettuare esami in modalità manuale non solo per personalizzare lo studio, ma anche per evidenziare strutture in zone corneali periferiche.

Il CS4 effettua delle conte endoteliali in maniera completamente automatica, fornendo la stima della densità cellulare endoteliale, l'intervallo di normalità in base all'età del paziente e gli indici di polimegatismo e polimorfismo



Figura 3.1: Nidek Confoscan 4.

	40× mode	20× mode
Frame-rate	25 Hz	25 Hz
Numero di pixel dell'immagine finale	768 × 576 pixel	384 × 576 pixel
Ampiezza dell'area in esame	460 × 345 μm	460 × 690 μm
Risoluzione laterale	0.6 μm/pix	1.2 μm/pix
Numero di immagini raccolte	< 350	< 200
Distanza di lavoro	1.98 mm	12 mm
Risoluzione pachimetrica	±5 μm	-

Tabella 3.1: Caratteristiche tecniche del Confoscan 4.

correlati rispettivamente all'area e alla forma delle cellule endoteliali. In particolare, grazie all'ampio campo inquadrato questi calcoli sono resi maggiormente affidabili dalla possibilità di analizzare tra le 500 e le 800 cellule per immagine.

Questo strumento è dotato di una configurazione stand-alone senza necessità di un computer collegato. Le immagini sono visualizzate su un monitor LCD da 8,4 pollici.

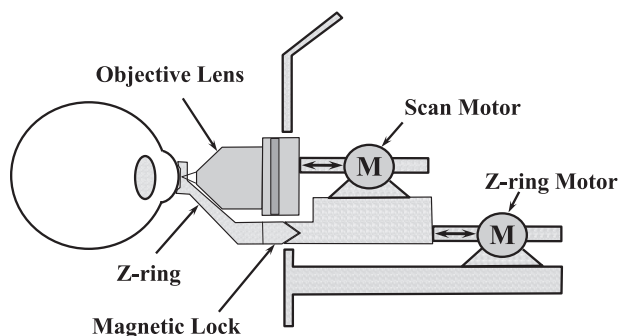
3.1.1 Modalità operative

Il CS4 offre diverse modalità operative, ciascuna dedicata ad un particolare tipo di indagine:

MODALITÀ A CONTATTO Prevede la scansione di tutti gli strati corneali con una lente-obiettivo che utilizza un fattore di ingrandimento 40× ed analizza porzioni di cornea di 460 μm di lunghezza per 345 μm di altezza, con una risoluzione di 768 × 576 pixel. La scansione viene effettuata ponendo un gel oftamico fra lo strumento e l'occhio del paziente e mantenendo una distanza di lavoro di 2 mm.

L'utente può personalizzare l'esame eseguendo scansioni automatiche dell'intera cornea o scansioni parziali. Ogni esame produce al massimo 350 immagini corneali e per ognuno degli esami esiste la possibilità di impostare

Figura 3.2: Schema di base del funzionamento dello z-ring per la pachimetria corneale.



in micron la profondità del punto di messa a fuoco iniziale ed il passo di scansione lungo z.

MODALITÀ NON A CONTATTO Prevede la scansione degli strati della cornea profondi (endotelio e stroma) grazie all'uso di una lente-obiettivo con fattore di ingrandimento $20\times$. Vengono acquisite porzioni corneali di $460\ \mu\text{m}$ di lunghezza per $690\ \mu\text{m}$ di altezza alla risoluzione di 768×576 pixel. La scansione viene effettuata senza contatto ad una distanza di lavoro di $12\ \text{mm}$.

Anche in questo caso l'utente può personalizzare l'esame eseguendo scansioni automatiche dell'intera parte posteriore della cornea o scansioni che identifichino automaticamente le migliori immagini dell'endotelio.

Con questa lente è possibile effettuare anche l'esame del film lacrimale, con la possibilità di filtrare immagini troppo scure o troppo brillanti per ottenere fin da subito le migliori. Ogni esame produce al massimo 20 immagini e, ancora una volta, la profondità ed il passo di scansione sono personalizzabili.

PACHIMETRIA Durante l'utilizzo della lente $40\times$ è possibile applicare un particolare dispositivo chiamato *Z-Ring* (figura 3.2) per effettuare scansioni corneali complete o parziali associandovi misure precise e ripetibili di *pachimetria* ottica. Tale dispositivo, formato da un anello di materiale di biocompatibile che va a diretto contatto con la zona periferica della cornea, permette di stabilizzare i movimenti dell'occhio e di seguirne i movimenti.

Questa tecnica permette di effettuare pachimetrie anche attraverso eventuali opacità corneali.

La pachimetria è la misura dello spessore della cornea.

3.1.2 Struttura

La struttura ottica del CS4 risulta piuttosto complessa ad un primo sguardo: il suo approccio slit-scanning nasconde un'ingegnosa soluzione per consentire l'utilizzo di un rivelatore CCD bidirezionale anziché un array lineare. Un galvanometro scansisce il fascio di illuminazione, che viene messo a fuoco sul campione da un gruppo di lenti comprensivo della lente-obiettivo. La luce proveniente dal campione ripercorre il sistema fino a subire una riflessione ad angolo retto grazie alla presenza di un beam-splitter. Infine una lente di rivelazione focalizza il fascio su una fenditura larga $300\ \mu\text{m}$, in corrispondenza della quale, però, non si trova il CCD. Il fascio prosegue la sua corsa riflettendosi nuovamente sulla faccia opposta del galvanometro prima di colpire il rivelatore (figura 3.3).

Questo stratagemma, possibile grazie ad un uso intelligente di lenti e specchi, permette di sincronizzare la scansione del campione con la scansione sul

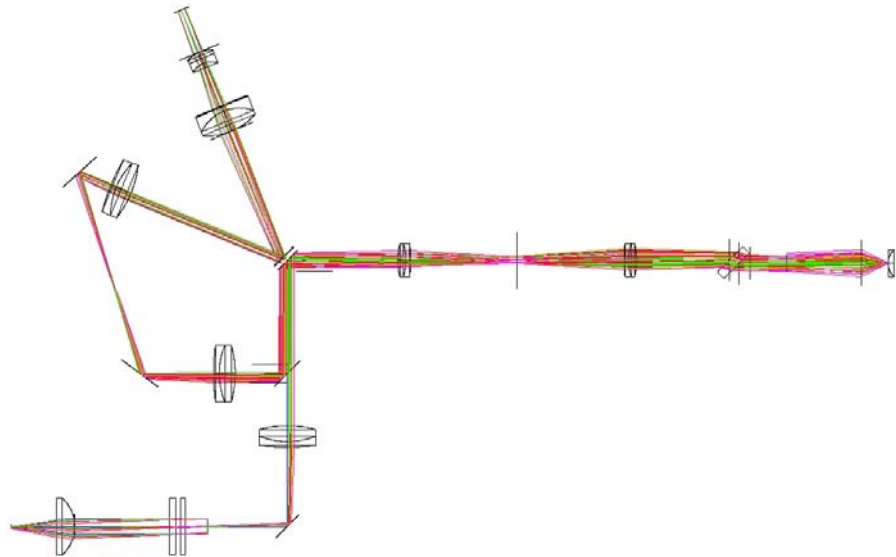


Figura 3.3: Percorso ottico di illuminazione e imaging del CS4; si noti la doppia riflessione sullo specchio galvanometrico.

rivelatore, associando univocamente ciascuna riga illuminata sul campione con ciascuna riga di pixel sul CCD.

La sorgente utilizzata è una lampada alogena *Osram Xenophot* da 100 W con picco di emissione a 620 nm e banda di circa 300 nm, con filtri per ultravioletto e infra-rosso.

Il rivelatore è un CCD *Sony Exview* ad alta sensibilità ed elevato guadagno.

3.1.3 Limiti e problemi

Considerando la configurazione slit-scanning di questo microscopio confocale, è immediato constatare una scarsa confocalità nel sistema, dovuta sia all'uso della fenditura al posto del pinhole, sia al fatto che la fenditura usata non è stretta a sufficienza. Da misure sperimentali risulta infatti una risoluzione assiale di circa 100 μm utilizzando l'obiettivo 40 \times e di 200 μm con l'obiettivo 20 \times .

La scarsa confocalità determina la saturazione delle immagini acquisite con l'obiettivo 20 \times , a causa del forte riflesso epiteliale, che non viene bloccato a sufficienza dalla geometria del sistema. È possibile ridurre questo problema decentrando in modo controllato la fenditura di rivelazione rispetto all'asse ottico.

La sorgente usata risulta fastidiosa per il paziente perché emette ben all'interno dell'intervallo di sensibilità dell'occhio umano.

Infine la presenza di due diversi obiettivi si traduce in una maggiore complessità di hardware e software e rende necessario il riallineamento dello strumento dopo il cambio di obiettivo.

3.2 HEIDELBERG HRT ROSTOCK CORNEA MODULE

Il *Rostock Cornea Module* (RCM) è un kit modulare che trasforma il CLSM oftalmologico *Heidelberg Retina Tomograph* (HRT) in un microscopio confocale corneale (figura 3.5).

L'HRT utilizza due pinhole confocali e un sistema di scansione e acquisizione in grado di raccogliere 384×384 punti immagine in 24 ms, ossia con un frame-rate superiore a 40 Hz, sufficiente ad evitare il blur causato dai movimenti saccadici. Lo strumento dispone di autoallineamento e funzioni di acquisizione automatizzate per l'imaging 2D e 3D. Le immagini raccolte vengono poi selezionate e combinate a formare il risultato finale dell'esame. La sorgente è un diodo LASER a 670 nm e potenza di 200 mW.

Il Rostock Cornea Module è costituito da una lente-obiettivo $63\times$ addizionale, che si innesta sulla lente frontale standard dell'HRT e lo rende in grado di analizzare le strutture e le patologie corneali (figura 3.4). L'area immaginata dal dispositivo ha un lato di $400 \mu\text{m}$ e una risoluzione laterale di circa $1 \mu\text{m}$ [21].

	Frame-rate	40 Hz
	Numero di pixel dell'immagine finale	384×384 pixel
	Ampiezza dell'area in esame	$400 \times 400 \mu\text{m}$
	Risoluzione laterale	$1.04 \mu\text{m}/\text{pix}$
	Numero di immagini raccolte	< 40
	Distanza di lavoro	1.98 mm
	Risoluzione pachimetrica	$\pm 5 \mu\text{m}$

Tabella 3.2: Caratteristiche tecniche dell'HRT Rostock Cornea Module.

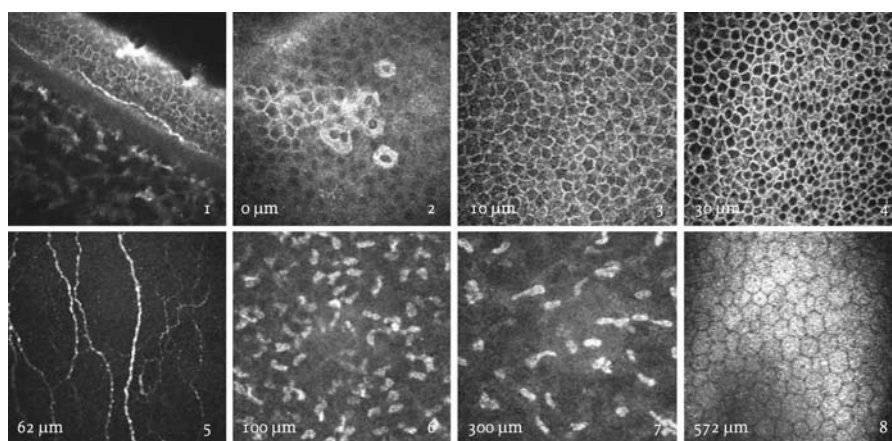


Figura 3.4: Strati corneali acquisiti con l'HRT Rostock Cornea Module: in sequenza si distinguono una sezione longitudinale della cornea, epitelio



Figura 3.5: Heidelberg Retina Tomograph con Rostock Cornea Module innestato.

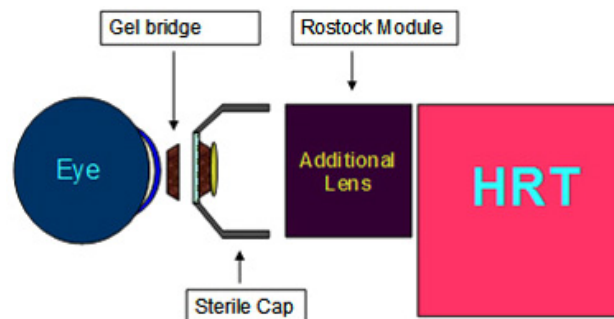


Figura 3.6: Rappresentazione schematica della struttura del Rostock Cornea Module.

4

PROTOTIPO NIDEK CONFOSCAN 5

INDICE

4.1	Studio teorico del sistema	50
4.1.1	Selezione della configurazione base	50
4.1.2	Sorgente	51
4.1.3	Rivelatore	52
4.1.4	Robot sagittale	53
4.1.5	Obiettivo	54
4.1.6	Pinhole ottimale	56
4.1.7	Sistema ideale	57
4.1.8	Specchio risonante	60
4.2	Il software Zemax®	63
4.3	Progettazione del percorso di imaging	64
4.3.1	Sistema con lenti reali	74
4.3.2	Effetti della curvatura corneale	74
4.4	Progettazione del percorso di illuminazione	79
4.4.1	LED/LASER accoppiato in fibra	79
4.4.2	QI Optiq iFLEX-iRIS	81
4.4.3	Nichia NDB7352 con lente di collimazione	83
4.4.4	Polarizzazione	85
4.5	Costruzione del prototipo da banco ottico	86
4.5.1	Cage system	86
4.6	Conclusioni	90

Il progetto *Confoscan 5* (cs5) si propone di dar vita ad un nuovo microscopio confocale corneale a scansione, in grado di operare in tempo reale in modo non invasivo e di restituire immagini ad alta risoluzione assiale e laterale, sfruttando il principio di confocalità e un dispositivo di scansione all'avanguardia.

Il nuovo *Scanning Laser Ophthalmoscope* (SLO) si fonda sull'esperienza maturata con il precedente cs4 per ciò che riguarda scopi di utilizzo e modalità di interfaccia con il medico e il paziente, all'insegna di facilità d'uso, automatizzazione, rapidità e comfort durante l'esame oftalmologico.

D'altra parte la struttura interna del cs5 è completamente diversa dal suo predecessore a causa della totale trasformazione del sistema di scansione: uno specchio MEMS risonante sostituisce il galvanometro e permette di raggiungere frame-rate elevati senza rinunciare all'illuminazione puntiforme; in questo modo la velocità si conserva e non è necessario sacrificare la confocalità impiegando una fenditura al posto del pinhole (vedi 3.1.2). Il comportamento risonante di questo nuovo tipo di specchi è più difficile da gestire rispetto a quello del tradizionale specchio galvanometrico (figura 1.3.5), ma i vantaggi che si ottengono ben ripagano dall'aumento di complessità del microscopio.

Un altro scopo del prototipo CS5 è capire se sia possibile l'uso esclusivo della modalità operativa non-contact; lo strumento deve essere in grado di raccogliere immagini ben definite attraverso i differenti strati corneali senza entrare in contatto con l'occhio del paziente o usare un gel oftalmico fra occhio e lente-obiettivo. L'esclusione della modalità a contatto è desiderabile per vari motivi: prima di tutto elimina le problematiche legate alla sterilizzazione dello strumento e al rischio di contaminazione e infezioni; in secondo luogo rende l'esame più veloce, meno disagiata e meno sgradevole per il paziente, che non deve più provare fastidio o sensazione di freddo e umido su occhi e palpebre. Inoltre si elimina totalmente il rischio di infortunio dovuto all'urto dell'occhio con lo strumento perché la distanza di lavoro è considerevolmente superiore. L'assenza di un gel fra cornea e obiettivo comporta però notevoli problemi legati al salto d'indice di rifrazione, che si sommano a quelli dovuti alla curvatura corneale e al riflesso epiteliale.

Infine il prototipo prevede la possibilità di imaging a colori, grazie all'uso di sorgenti LASER multiple e ottiche acromatiche. La disponibilità di lunghezze d'onda diverse permette di studiarne l'efficienza di rivelazione e decidere quale sia quella migliore. Ci si propone inoltre di rendere gli esami più confortevoli per i pazienti particolarmente fotosensibili, grazie all'uso di luce con spettro agli estremi della curva di sensibilità spettrale dell'occhio umano.

4.1 STUDIO TEORICO DEL SISTEMA

Prima di procedere alla fase di progetto vera e propria è fondamentale uno studio teorico del sistema, volto ad identificare lo schema base del microscopio e i suoi parametri chiave a partire dai dati noti e dalle specifiche imposte.

4.1.1 Selezione della configurazione base

Come anticipato, ci si propone di usare uno specchio risonante per muovere il fascio di illuminazione lungo le due direzioni xy del piano oggetto. Il dispositivo in questione è particolarmente promettente e competitivo se comparato con le altre tecniche di scansione per applicazioni in tempo reale: l'approccio slit-scanning, adottato nel CS4, penalizza la confocalità e la risoluzione finale; lo stesso può dirsi per il disco di Nipkow, che in aggiunta presenta una bassissima efficienza e l'esigenza di un campo di illuminazione estremamente uniforme [50]. Inoltre la luce retrodiffusa dal disco sovrasterebbe la debole luce diffratta dalla cornea.

Per quanto riguarda l'ipotesi di utilizzo di un DMD, si accenna al fatto che nel febbraio 2012 è stato avviato presso Nidek Technologies un progetto preliminare per valutarne l'applicabilità. La configurazione studiata prevedeva due percorsi ottici separati e simmetrici per l'imaging e l'illuminazione, accomunati dal solo obiettivo (figura 4.1). Purtroppo il degrado dell'immagine dovuto alla diffrazione generata dal reticolo DMD e all'illuminazione critica poco uniforme, nonché la scarsa efficienza e la velocità di scansione non eccellente, hanno determinato l'accantonamento del progetto.

Ricapitolando, lo specchio MEMS risonante sembra ad oggi il dispositivo più promettente per l'imaging confocale in tempo reale; il progetto del sistema prototipale si sviluppa, perciò, attorno alle caratteristiche di questo particolare componente.

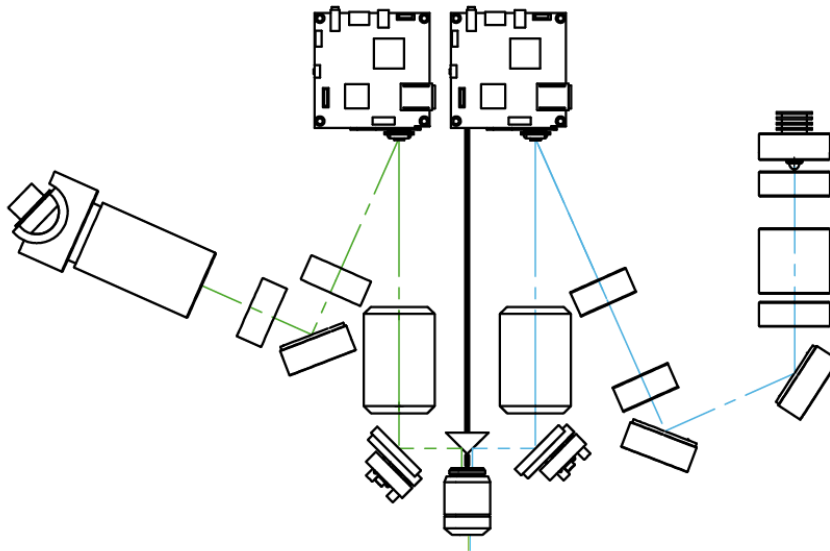


Figura 4.1: Rappresentazione schematica del prototipo CS5 basato sul DMD

Un'attenzione particolare va posta anche nella selezione della sorgente e del suo spettro di emissione: la scelta ricade in modo naturale sul LASER, considerati la struttura single-beam-scanning e quanto osservato nel [capitolo 1](#). La maneggevolezza e i costi ridotti dei dispositivi a semiconduttore fanno dei diodi LASER e degli SLED le sorgenti più appetibili, tenendo anche conto dell'ampia offerta di lunghezze d'onda e potenze di emissione disponibile in commercio.

Ciò che ci si propone di realizzare è dunque un vero e proprio CLSM per uso oftalmologico.

Il campo oggetto da immaginare è una porzione quadrata di cornea con un lato di $500\ \mu\text{m}$, che in prima approssimazione può considerarsi piana. La scelta di queste particolari dimensioni è legata al proposito di un diretto confronto del prototipo con il suo predecessore CS4. C'è poi da considerare che l'imaging di un'area corneale più piccola costringerebbe all'uso di una lente-obiettivo con ingrandimento più elevato, inconciliabile con una soluzione non a contatto. Per di più un'area ridotta non fornirebbe sufficienti informazioni per il calcolo statistico della forma e delle dimensioni delle cellule corneali. Viceversa, l'imaging di un campo oggetto più esteso costringerebbe ad un compromesso fra risoluzione e frame-rate.

La risoluzione laterale richiesta al microscopio è inferiore a $1\ \mu\text{m}$, poiché le cellule dei tessuti corneali hanno dimensioni di qualche decina di micron [17] ed è fondamentale poterne distinguere la morfologia e la struttura interna.

La risoluzione assiale ha invece vincoli meno stringenti, perché dipende fortemente dal grado di confocalità del sistema e dalle caratteristiche dello strato corneale osservato. I microscopi confocali corneali odierni raggiungono valori di R_{CZ} non inferiori a $30\ \mu\text{m}$; il prototipo CS5 si propone di arrivare a $10\ \mu\text{m}$.

4.1.2 Sorgente

La scelta della sorgente di luce rappresenta una fase di progetto determinante per il risultato finale. Come già anticipato, è fondamentale evitare la

Per i problemi legati alla curvatura corneale vedi 4.3.2.

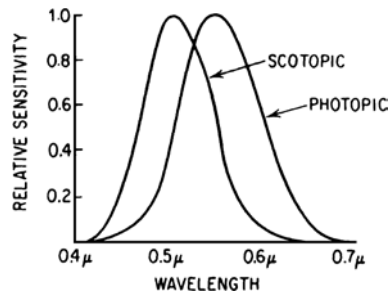


Figura 4.2: Curva di sensibilità dell'occhio umano alle diverse lunghezze d'onda, in condizioni di illuminazione buona (curva di visione fotopica) e scarsa (curva di visione scotopica).

regione centrale della curva di visibilità dell'occhio umano, che spazia dal blu (450 nm) al rosso (750 nm), con un picco nel verde a 555 nm (figura 4.2). Le lunghezze d'onda di interesse per l'illuminazione si collocano dunque agli estremi di questa curva, in modo da sollecitare il meno possibile l'occhio del paziente durante la visita oftalmologica.

La regione ultravioletta dello spettro elettromagnetico, pur promettente per la potenziale riduzione della diffrazione e del riflesso epiteliale, non può essere presa in considerazione perché nociva per i tessuti viventi. La luce nell'infrarosso medio e lontano permetterebbe invece di ridurre i costi grazie alle ben rodute tecnologie delle telecomunicazioni, ma non è utilizzabile a causa della scarsa opacità della cornea in questa banda spettrale.

Con l'obiettivo di ridurre i costi del prototipo si è tenuto in considerazione quanto già in possesso dall'azienda, selezionando in definitiva le seguenti possibili sorgenti:

- *Nichia Blue Laser Diode* [10], diodo LASER con emissione a 445 nm e potenza di 1 W;
- *Qioptiq iFLEX-iRIS Laser Diode* [51], diodo LASER a 445 nm, potenza di 75 mW e accoppiamento in fibra per bassa divergenza;
- *Cobolt 05-01 Flamenco* [1], diodo LASER con emissione a 660 nm e potenza di 500 mW;
- *InPhenix Super-Luminescent Light Emitting Diode* [36], LED superluminescente con picco di emissione a 840 nm, banda a 3 dB di 35 nm e potenza di 5 mW.

Si nota che la potenza luminosa utilizzata per illuminare la cornea non deve superare i limiti imposti dalla normativa ISO 15004-2:2007 ed è molto inferiore a quella fornita dalle sorgenti indicate. Sorgenti con potenze più elevate danno margini più ampi di lavoro nel caso in cui il sistema, per varie ragioni, risulti particolarmente inefficiente.

4.1.3 Rivelatore

Per selezionare i rivelatori più adatti si è tenuto in prima considerazione l'intervallo spettrale di emissione delle sorgenti, preferendo l'uso di due rivelatori distinti: uno per i 445 nm e l'altro per entrambe le lunghezze d'onda di 660 nm e 840 nm.

Se si confrontano prezzo, ingombro e prestazione di ADP e PMT, i primi sono di gran lunga preferibili, soprattutto nell'ottica di un uso puramente prototipale.

I fotodiodi selezionati sono:

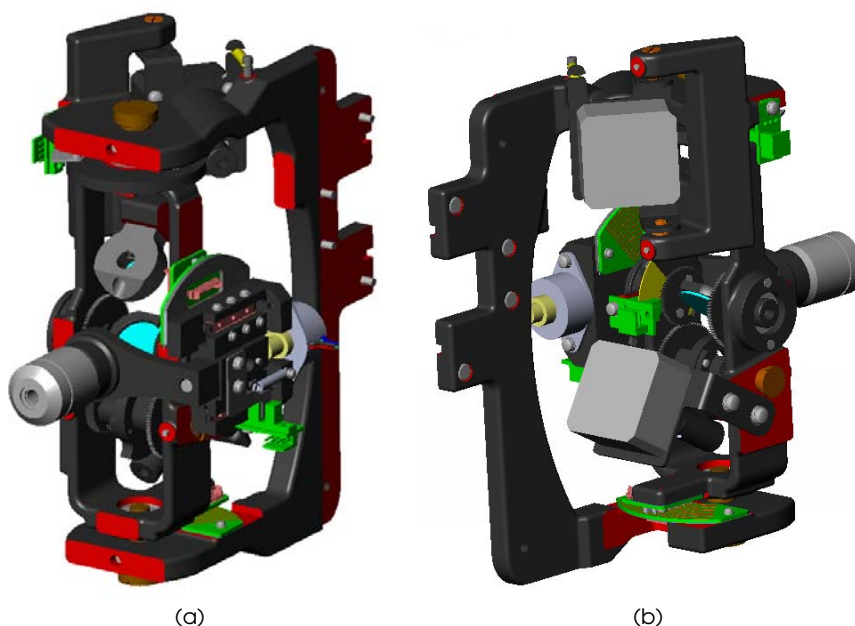


Figura 4.3: Modello tridimensionale del robot sagittale progettato da NT: (a) vista anteriore e (b) vista posteriore.

- *Excelitas Si APD Preamplifier Module* [8], fotodiodo a valanga con picco di risposta a 900 nm, banda di 200 MHz e preamplificatore compreso nel package;
- *Exceltis UV-Enhanced APD Preamplifier Module* [9], fotodiodo a valanga ottimizzato per il blu, con picco di risposta a 550 nm, banda di 50 MHz e preamplificatore compreso nel package.

Entrambi i rivelatori indicati possiedono una frequenza di lavoro sufficiente a soddisfare le richieste di progetto (tabella 4.1) e una corrente di buio molto ridotta, sufficientemente bassa da non sovrastare il debole segnale utile proveniente dalla cornea.

Pur non rappresentando un parametro critico per via della geometria confocale del sistema, l'area attiva e l'angolo di entrata estesi assicurano un facile allineamento a valle dell'apertura confocale di rivelazione.

Considerando la disponibilità immediata del diodo LASER Nichia e dell'APD Excelitas per UV, perchè già in possesso di NT, il disegno ottico del sistema è stato sviluppato con particolare attenzione per $\lambda = 445$ nm. Inoltre tale lunghezza d'onda concede una migliore risoluzione, pur essendo maggiormente fastidiosa per il paziente rispetto a quelle nel rosso e nell'infrarosso.

4.1.4 Robot sagittale

Il *robot sagittale* è un congegno opto-meccanico sviluppato da Nidek Technologies per permettere all'obiettivo del microscopio confocale corneale di ruotare e traslare attorno all'occhio del paziente, seguendone con precisione la curvatura.

La presenza di questo dispositivo è fondamentale per limitare i problemi di acquisizione delle immagini legati ai rapidi e continui movimenti oculari. Lo sguardo del paziente rimane fisso in avanti, mentre il robot sagittale, controllato elettronicamente con motori di precisione, fa seguire all'obiettivo la

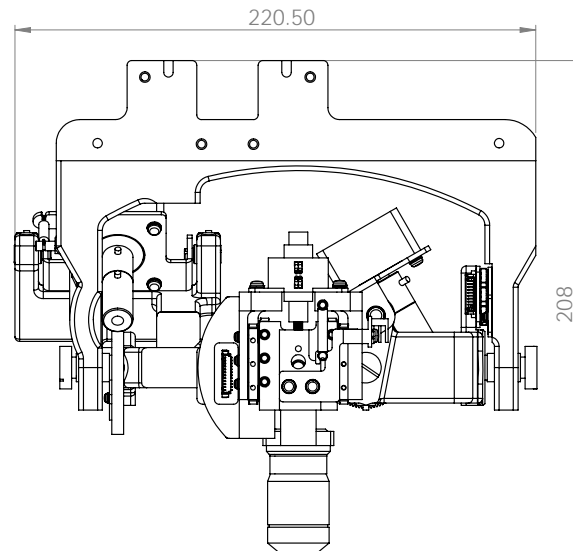


Figura 4.4: Proiezione sul piano laterale del robot sagittale, con quote di riferimento.

curvatura della cornea e consente la raccolta di immagini da diverse angolazioni, mantenendo l'ortogonalità fra la superficie corneale e l'asse ottico del sistema. La soluzione progettata dall'azienda è particolarmente efficace perché aggira i problemi legati all'inclinazione del piano oggetto, che con questa soluzione risulta sempre correttamente disposto rispetto all'obiettivo.

In alternativa, il cambio dell'angolo di ripresa può avvenire spostando la luce di fissazione e invitando il paziente a spostare lo sguardo verso la direzione desiderata. Questo modo di agire presenta però alcune controindicazioni: l'occhio ruota attorno a diversi assi contemporaneamente e rimane con difficoltà in una posizione diversa da quella di riposo; inoltre la rotazione oculare avviene seguendo la curvatura della sclera, che è minore di quella corneale, determinando l'inclinazione del piano oggetto menzionata sopra, che colloca zone diverse dell'oggetto a distanze diverse dall'obiettivo.

Il robot sagittale si inserisce a valle dell'obiettivo, in uno spazio ottico in cui i raggi luminosi sono collimati (figura 1.1). Contenendo solo specchi per modificare la direzione del fascio, questo strumento è idealmente "trasparente" al percorso ottico, nel senso che non introduce alcuna modifica nell'immagine del sistema e può essere tralasciato in fase di progetto.

Complessivamente il dispositivo misura $220.5 \text{ mm} \times 208 \text{ mm} \times 103.74 \text{ mm}$ e il suo percorso ottico interno è lungo 150 mm (figura 4.4 e figura 4.3).

4.1.5 Obiettivo

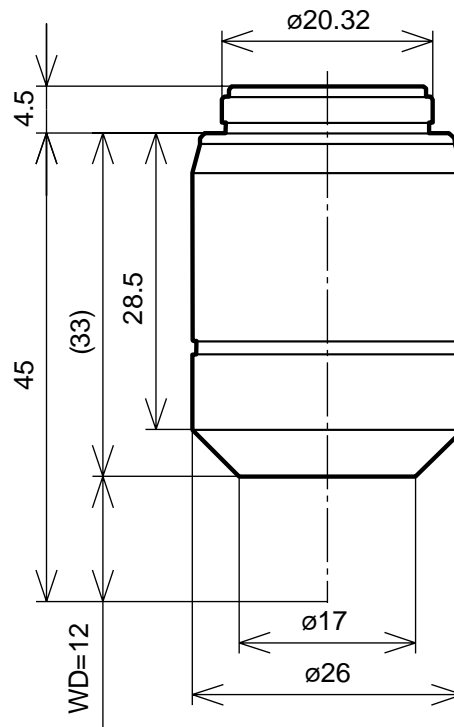
La correzione cromatica di un obiettivo avviene attraverso l'accoppiamento di lenti con differenti dispersioni e indici di rifrazione (vetri Flint e Crown); si veda Smith [53].

L'obiettivo, come per qualsiasi microscopio ottico, è uno dei componenti più importanti del CS5: è il primo elemento che la luce incontra nel suo cammino dalla cornea al rivelatore e determina per una grande parte le prestazioni del sistema complessivo. La scelta di questo cruciale componente è ricaduta sul modello *Olympus LMPlanFl 20x0.40* [11], già in possesso di NT e dotato delle seguenti caratteristiche:

- semi-apocromatico, cioè corretto per l'aberrazione cromatica e sferica su almeno due lunghezze d'onda (rosso e blu) [13];
- planare, ossia corretto per la curvatura di campo;



(a) Componente reale e adattatore per il robot sagittale.



(b) Schema con quote di riferimento.

Figura 4.5: Obiettivo Olympus LMPlanFl 20x0.40.

- distanza di lavoro w_d (*working distance*) maggiorata, cioè la distanza nominale fra il campione e la superficie dell'obiettivo è più lunga della norma ed equivale a 12 mm; ciò permette di mantenere uno spazio di sicurezza fra lo strumento e l'occhio del paziente anche durante le scansioni longitudinali (lungo z) degli strati corneali;
- apertura numerica $NA = 0.4$;
- focale $f_o = 9$ mm;
- distanza parafocale (*parfocal distance*) $pd = 45$ mm, coerente con lo standard internazionale che prevede la possibilità di intercambiare obiettivi diversi sullo stesso strumento senza cambiare la posizione di messa a fuoco [47].

La distanza parafocale è la distanza fra l'innesto dell'obiettivo il suo punto di messa a fuoco.

Per compiere un'analisi coerente delle prestazioni ideali del cs5, è necessario trovare un modello ottico corretto e funzionale dell'obiettivo. In particolare, non disponendo di alcuna informazione da parte della casa costruttrice sul disegno ottico di questo componente, è conveniente rappresentarlo con un modello equivalente parassiale a due lenti, rispettando le caratteristiche tecniche e le dimensioni fisiche del dispositivo reale (figura 4.5b). Le relazioni matematiche di interesse si ricavano dall'ottica parassiale [53]:

$$\begin{cases} \frac{1}{f_o} = \frac{1}{f_{o1}} + \frac{1}{f_{o2}} - \frac{pd - wd}{f_{o1}f_{o2}} \\ \frac{wd}{f_o} = \frac{f_{o2} - (pd - wd)}{f_{o2}} \end{cases}$$

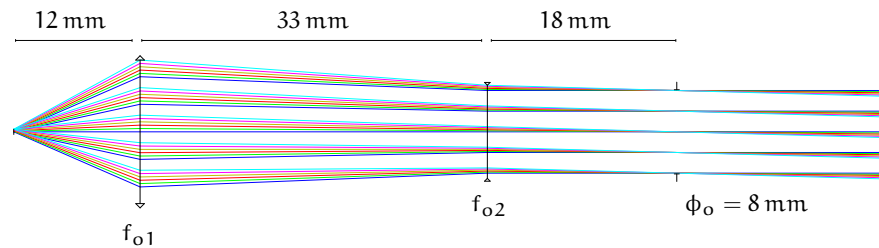


Figura 4.6: Modello parassiale dell'obiettivo Olympus LMPlanFl 20x0.40.

che è un sistema in due incognite che fornisce $f_{o1} = 11 \text{ mm}$ e $f_{o2} = -99 \text{ mm}$. L'obiettivo simulato sulla base dei parametri ottici così ottenuti possiede tutte le caratteristiche richieste: adeguato ingrandimento, correzione all'infinito e dimensioni fisiche congruenti con il dispositivo reale. Si nota che a 18 mm dalla seconda lente parassiale va posizionato un diaframma del diametro di 8 mm, che simula la presenza di un adattatore di collegamento necessario per l'innesto dell'obiettivo in testa al robot sagittale (figura 4.6).

Per completezza è stata eseguita un'analisi ulteriore per determinare la posizione del piano focale posteriore sia dell'obiettivo reale che del suo modello equivalente, al fine di localizzare uno stop telecentrico per il sistema. Sperimentalmente risulta che una sorgente posta in corrispondenza dell'apertura posteriore del componente reale viene mandata fuoco a 22 mm dalla lente frontale. Ciò suggerisce che il piano focale posteriore si trovi all'interno del corpo obiettivo, rendendo superfluo il tentativo di localizzarlo con precisione. Esaminando invece il modello parassiale è facile ricavarne la posizione: per la presenza di una focale negativa esso si colloca fra le due lenti, 18 mm a monte dalla seconda. L'apertura del sistema però, come già puntualizzato, non si trova in tale posizione, bensì a valle di entrambe le lenti per ragioni costruttive.

Queste osservazioni fanno concludere che è impossibile ottenere un sistema telecentrico e che è bene tenerne conto durante il progetto e la gestione del sistema di scansione. Fortunatamente è sufficiente allungare la focale della tube-lens per ridurre l'inclinazione dei fasci collimati che raggiungono l'apertura posteriore dell'obiettivo, neutralizzando così gli eventuali problemi legati a variazioni dell'ingrandimento durante la scansione.

4.1.6 Pinhole ottimale

La scelta del diametro ottimale Δ_{Dopt} del pinhole di rivelazione è una fase critica per il progetto di un microscopio confocale, perché determina le dimensioni dello spot luminoso che investe il campione e dunque il livello di "isolamento" di un punto dell'oggetto da quelli adiacenti.

Come già anticipato, se il pinhole è troppo piccolo la risoluzione ne beneficia ma l'efficienza luminosa cala rapidamente; viceversa, se il pinhole è troppo grande il rapporto segnale-rumore sale ma la risoluzione del sistema si degrada.

Per derivare una formula semplice per Δ_{Dopt} si fa riferimento alla figura 1.22b. La luce rifratta dal campione e raccolta dall'obiettivo viene focalizzata dalla lente di rivelazione (con focale f_D) sul pinhole di rivelazione, di diametro Δ_D non infinitesimo. Assumendo che l'obiettivo sia illuminato in modo uniforme da un fascio collimato che ne riempie completamente l'a-

apertura posteriore, la distribuzione di intensità sul piano immagine è data da

$$I_D(r) = \left[\frac{J_1 \left(\frac{2\pi}{\lambda} n' \sin \alpha' \right)}{\frac{2\pi}{\lambda} n' \sin \alpha'} \right]^2$$

α' : angolo che il raggio marginale forma con l'asse ottico dal lato immagine;

n' : indice di rifrazione dal lato immagine ($n' = n = 1$).

Si sceglie il diametro ottimale del pinhole facendolo corrispondere alla FWHM di $I_D(r)$:

$$\Delta_{Dopt} = \frac{0.5\lambda}{\sin \alpha'}$$

e sfruttando la condizione di Abbe [3] per la lente perfetta si ottiene

$$n \sin \alpha = MP \sin \alpha'$$

$$\sin \alpha' = \frac{NA}{MP}$$

$$\Delta_{Dopt} = \frac{0.5\lambda}{NA} MP \quad (4.1)$$

In questo modo il pinhole permette a circa l'80% della potenza luminosa di raggiungere il rivelatore, mantenendosi al contempo sufficientemente stretto da eliminare la luce proveniente dai piani fuori fuoco.

4.1.7 Sistema ideale

A partire dallo schema ottico essenziale del prototipo (figura 4.7) si ricavano alcune equazioni notevoli che legano fra loro le grandezze di interesse del sistema, elencate in tabella 4.1.

L'ingrandimento totale del sistema risulta

$$MP = \frac{h_D}{h_o} = \frac{\Delta_D}{\Delta_o} = \overbrace{\frac{MP_1}{f_t}} \cdot \overbrace{\frac{MP_2}{f_e}} \quad (4.2)$$

Per sfruttare tutta l'apertura numerica offerta dall'obiettivo, è necessario riempire l'intera apertura posteriore con il fascio di illuminazione. Supponendo che anche lo specchio sia completamente illuminato si ha

$$\frac{\phi_o}{\phi_m} = \frac{f_t}{f_e} \quad (4.3)$$

ossia le due aperture sono coniugate. Nel rispetto del principio di Köhler, si vuole che in corrispondenza di tali piani il fascio di illuminazione risulti collimato.

Sfruttando il fatto che il pinhole di rivelazione, quello di illuminazione e lo spot confocale sul campione sono coniugati, si può scrivere

$$\frac{\Delta_I}{\Delta_o} = \frac{f_t f_I}{f_o f_e}$$

$$M_1 = \frac{f_t}{f_o}$$

corrisponde all'ingrandimento nominale dell'obiettivo solo nel caso di utilizzo di una tube-lens con f_t prevista dal costruttore.

e con l'uso dell'equazione (4.2) si ricava

$$\frac{\Delta_o}{\Delta_D} = \frac{f_o f_e}{f_t f_D}$$

$$\frac{\Delta_I \Delta_o}{\Delta_o \Delta_D} = \frac{\Delta_I}{\Delta_D} = \frac{f_I}{f_D} \quad (4.4)$$

Dividendo l'altezza dell'immagine h_D per il diametro dello spot immagine Δ_D , si ottiene il numero di acquisizioni necessario per "costruire" una riga dell'immagine finale. Il numero di pixel dell'immagine bidimensionale sarà

$$\text{PIX}_{2D} = \left(\frac{h_D}{\Delta_D} \right)^2$$

supponendo un campo oggetto quadrato. Il rivelatore ha a disposizione un tempo $1/f_{2D}$ per acquisire PIX_{2D} campioni e si ottiene quindi

$$f_D = \left(\frac{1/f_{2D}}{\text{PIX}_{2D}} \right)^{-1} = \text{PIX}_{2D} \cdot f_{2D}$$

A partire dalle relazioni appena ricavate è ora possibile dimensionare il sistema, selezionando i valori più adatti da assegnare alle focali delle lenti e alle aperture dei pinhole. Per la scelta delle focali, e dunque dell'ingrandimento del microscopio, vanno tenuti in considerazione alcuni vincoli dimensionali di massima:

- la focale f_t dev'essere maggiore di 160 mm, per consentire l'inserimento del robot sagittale a valle dell'obiettivo;
- è preferibile che il percorso ottico totale non superi all'incirca i 800 mm per esigenze di compattezza dell'apparato complessivo;
- le focali di tutte le lenti non devono essere inferiori ai 20 mm, per permettere l'inserimento di accessori lungo il percorso ottico e facilitare il montaggio del prototipo;
- l'adozione di misure "da catalogo" per le focali permette di attingere ai prodotti offerti dai grandi produttori di ottiche internazionali, come Thorlabs [26] e Edmund Optics [35], con un notevole risparmio di tempo e di costi.

*Lenti con focale
corta hanno in
genere aperture
ridotte*

Tenendo conto di questi vincoli si scelgono:

$$f_t = 200 \text{ mm}$$

$$f_e = 25 \text{ mm}$$

$$f_D = 36 \text{ mm}$$

Il rapporto di $1/8$ fra f_e ed f_c è dettato dalla necessità di avere $\phi_m = 1 \text{ mm}$, per motivi legati alle dimensioni dello specchio risonante (vedi 4.1.8).

Definizione	Simbolo	Unità	Valori numerici		
			445	660	840
Lunghezza d'onda	λ	nm	445	660	840
Apertura numerica	NA		0.4		
Diametro del piano focale posteriore dell'obiettivo	ϕ_o	mm	8		
Diametro dello specchio risonante	ϕ_m	mm	1		
Altezza dell'oggetto	h_o	mm	500		
Altezza dell'immagine intermedia	h_e	mm	11.1		
Altezza dell'immagine finale	h_D	mm	16		
Diametro dello spot illuminato sul campione	Δ_o	μm	0.556	0.825	1.05
Diametro del pinhole confocale di rivelazione	Δ_D	μm	17.8	26.4	33.6
Diametro del pinhole confocale di illuminazione	Δ_I	μm	49.4	73.3	93.3
Focale dell'obiettivo	f_o	mm	9		
Focale della tube-lens	f_t	mm	200		
Focale della lente di scansione	f_e	mm	25		
Focale della lente di rivelazione	f_D	mm	36		
Focale della lente di illuminazione	f_I	mm	100		
Frame-rate	f_{2D}	Hz	50		
Numero di pixel dell'immagine finale	PIX _{2D}		899 ²	606 ²	476 ²
Frequenza minima richiesta al rivelatore	f_D	MHz	40.4	18.4	11.5

Tabella 4.1: Definizione dei parametri del prototipo: valori numerici imposti e ricavati.

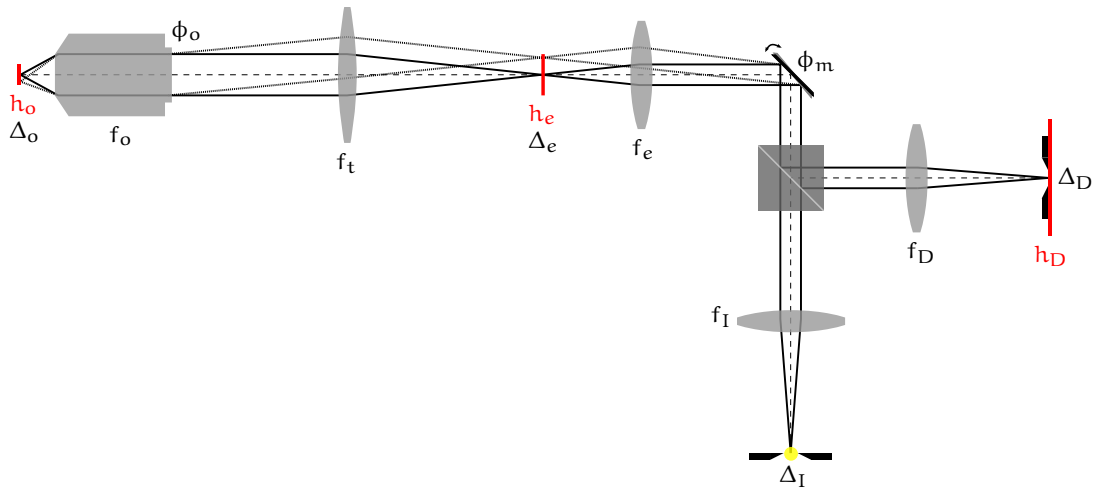


Figura 4.7: Schema essenziale del prototipo Nidek Confoscan 5

L'ingrandimento del sistema si ottiene tramite l'equazione (4.2):

$$MP = \overbrace{22.2}^{MP_1} \times \overbrace{1.44}^{MP_2} = 32$$

$$h_e = MP_1 \cdot h_o = 11.1 \text{ mm}$$

$$h_D = MP \cdot h_o = 16 \text{ mm}$$

Apparentemente non sussiste alcun vincolo sull'ingrandimento del sistema : la geometria confocale rende irrilevante la dimensione dell'immagine finale complessiva, che in questocaso avrebbe un'area di $16 \times 16 \text{ mm}^2$; ciò che viene effettivamente immaginato del sistema è infatti un singolo spot confocale per volta, delle dimensioni di qualche decina di micron appena. In definitiva l'area di rivelazione non costituisce un limite all'ingrandimento del sistema.

In realtà avere MP_1 troppo elevato significa, a parità di focale f_e , dover inclinare maggiormente i fasci luminosi di imaging delle zone più esterne del campo oggetto (figura 4.7). Questo vuol dire che l'angolo di tilt richiesto allo specchio risonante può crescere oltre il massimo consentito dalla sua struttura meccanica. In aggiunta a questo problema c'è il fatto che i raggi più inclinati attraversano aperture maggiori, complicando l'abbattimento delle aberrazioni.

A partire dall'equazione (4.1) e dalla conoscenza di MP si calcolano il diametro ottimale $\Delta_D = \Delta_{Dopt}$, da assegnare al pinhole di rivelazione, e il diametro Δ_o dello spot illuminato sul piano oggetto.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 4.1 per le tre lunghezze d'onda di interesse (vedi 4.1.2).

4.1.8 Specchio risonante

Come anticipato, l'utilizzo di uno specchio MEMS risonante permette di avere frame-rate elevati a scapito della linearità di scansione e dell'area uti-

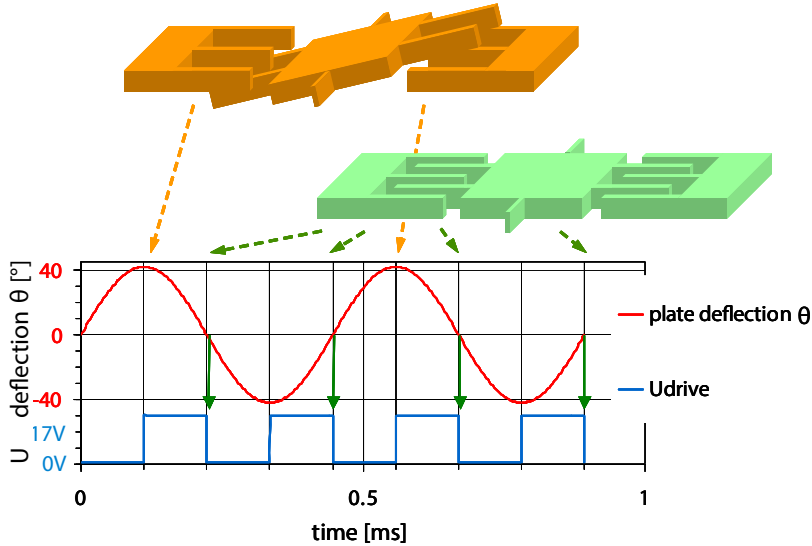


Figura 4.8: Principio di funzionamento di uno specchio risonante ad attuazione elettrostatica [52]; la deflessione massima è raggiunta quando i fronti di discesa degli impulsi di pilotaggio sono sincronizzati con l'istante di attraversamento dello zero dell'oscillazione sinusoidale (risonanza).

le riflettente. Questo secondo aspetto si rivela importante perché impone, secondo l'equazione (4.3), un vincolo minimo sulla focale f_e . Infatti:

$$f_e = \frac{\phi_m}{\phi_o} f_t$$

Uno specchio con area molto piccola obbligherebbe ad avere f_e molto corta, e dunque la lente di scansione sarebbe troppo vicina allo specchio, o alternativamente una focale f_t molto lunga, con il rischio di ottenere un sistema complessivo davvero ingombrante.

Con il proposito di determinare il miglior compromesso fra dimensioni e velocità, sono stati presi contatti con il Fraunhofer IPMS, che ha fornito le caratteristiche salienti dei propri specchi ad attuazione elettrostatica (tabella 4.2). Il produttore consiglia l'utilizzo del modello circolare con area minore, perché è l'unico sufficientemente rapido in base alle specifiche imposte. Si può infatti verificare facilmente come lo specchio ellittico raggiunga frame-rate inadatti all'imaging corneale in tempo reale: la scansione di una riga richiede $1/1600 \text{ Hz} = 625 \mu\text{s}$ e, ipotizzando in modo ottimistico la creazione di un'immagine di 400×400 pixel, il tempo per ottenere una singola acquisizione bidimensionale completa equivale a $625 \mu\text{s} \cdot 400 = 0.25 \text{ s}$, ossia una frequenza di 4 Hz.

In generale il frame-rate raggiungibile con un determinato specchio è dato da:

$$f_{2D} = \frac{f_m}{\sqrt{\text{PIX}_{2D}}}$$

dove f_m è la frequenza di scansione attorno all'asse di risonanza (fast axis).

Per quanto riguarda la non linearità della scansione con questo tipo di specchi, è bene sottolineare che l'inclinazione θ dello specchio e la sua velocità angolare ω dipendono in modo armonico dal tempo e sono grandezze sfasate di $\pi/2$: l'angolo θ è massimo quando ω è minima e viceversa. In questo modo

		Unità	Specchio ellittico		Specchio sferico	
Asse di scansione			risonante	statico	risonante	statico
Frequenza di scansione	Hz		1600	10	23200	50
Ampiezza di scansione nominale	°		17	10	10	7
Ampiezza di scansione massima	°		20	12	11	10
Lunghezza	mm		3.6		1.2	
Larghezza	mm		2.6		1.2	
Dimensioni del chip	mm ²		7 × 11		5.312 × 11.508	
Tensione di pilotaggio	V		150	150	110	150

Tabella 4.2: Specifiche tecniche degli specchi risonanti prodotti da Fraunhofer IPMS.

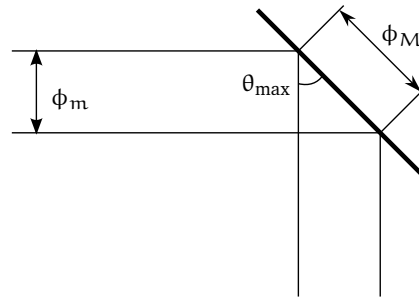


Figura 4.9: Schema geometrico per il calcolo dell'angolo massimo assoluto di inclinazione dello specchio risonante.

lo specchio accelera e decelera gradualmente e può muoversi con frequenze molto elevate (figura 4.8).

Generare immagini con questo tipo di scansione presenta notevoli problemi in termini di sincronia fra dato raccolto e coordinate del pixel sull'immagine. Usando un tempo di acquisizione costante, ciò che si ottiene è un'immagine stirata e sovraesposta ai bordi, poiché in quelle regioni del campione il fascio si muove più lentamente.

Una soluzione semplice è posizionare un diaframma di campo in corrispondenza dell'immagine intermedia del sistema, limitando così l'intervallo di scansione alla sola porzione in cui l'andamento dell'oscillazione è quasi lineare. In questo modo si sacrifica circa il 30% della capacità di tilt dello specchio attorno all'asse di risonanza. Fortunatamente il comportamento non lineare dello specchio è prevedibile e può essere corretto con soluzioni hardware e software [40].

Quando un fascio colpisce uno specchio inclinato l'area illuminata su di esso è un'ellisse con asse maggiore proporzionale all'angolo di inclinazione.

Una volta selezionato lo specchio circolare da 1.26 mm di diametro si desidera calcolare l'angolo ottimale di inclinazione dello specchio risonante, cioè quell'angolo che assicura il minimo ingombro meccanico complessivo mantenendo al contempo l'intero fascio di illuminazione all'interno della superficie riflettente del dispositivo MEMS. A questo punto diventa chiara la scelta di avere $\phi_m = 1$ mm; ciò infatti concede un po' di margine per poter inclinare lo specchio senza perdere luce.

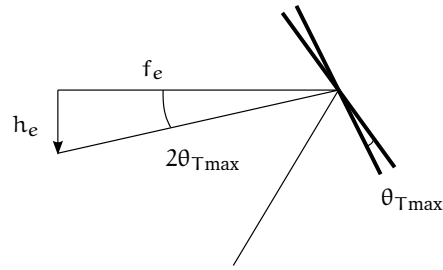


Figura 4.10: Schema geometrico per il calcolo dell'angolo massimo relativo di inclinazione dello specchio risonante.

Osservando la [figura 4.9](#) si nota che fra il diametro dello specchio ϕ_M e il diametro del fascio incidente su di esso ϕ_m vale la relazione geometrica

$$\phi_m = \phi_M \cos(\theta_{\max})$$

$$\theta_{\max} = \arccos\left(\frac{\phi_m}{\phi_M}\right) = 37.47^\circ$$

dove θ_{\max} è il massimo angolo di tilt dello specchio per il quale il fascio incidente bagna lo specchio senza perdite di luce.

In [figura 4.10](#) sono invece mostrati i parametri usati per il calcolo del massimo tilt di scansione $\theta_{T\max}$. Si ha

$$\frac{h_e/2}{f_e} = \tan(\theta_{T\max})$$

$$\theta_{T\max} = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{h_o}{2f_o} \frac{\phi_o}{\phi_m}\right)$$

ottenuta sfruttando l'equazione (4.2) e l'equazione (4.3).

Da questi risultati è possibile ottenere l'angolo di deflessione a riposo θ_o :

$$\theta_o = \theta_{\max} - \theta_{T\max} = 31.21^\circ$$

Per semplicità si sceglie $\theta_o = 30^\circ$, lasciando un piccolo margine sull'area illuminata dello specchio.

4.2 IL SOFTWARE ZEMAX®

Zemax® è un programma di progettazione ottica per Microsoft Windows, venduto dalla compagnia americana *Radiant Zemax* e molto diffuso in ambito industriale. Viene utilizzato per progettare e analizzare sistemi di imaging e di illuminazione, obiettivi fotografici, microscopi e telescopi.

Il codice software effettua il ray-tracing del sistema ottico calcolando la propagazione dei raggi attraverso di esso; può simulare accuratamente il comportamento di elementi ottici come lenti semplici, lenti asferiche, lenti con indice di rifrazione anisotropo, specchi ed elementi ottici diffrattivi, fornendo svariati strumenti di valutazione delle prestazioni, come *spot-diagrams* e *ray-fan plots* [42]. Il programma dispone inoltre di un potente algoritmo di ottimizzazione in grado di valutare e selezionare, in base ad una funzione di merito definita dall'utente, i sistemi ottici più validi fra quelli ottenuti modificando in maniera casuale i parametri variabili del sistema di partenza.

È prevista sia una modalità sequenziale, ossia il ray-tracing standard, che una modalità non sequenziale, per l'analisi dei sistemi di illuminazione.

Per una trattazione completa delle potenzialità offerte da questo software, si veda il Manuale Zemax® [41].

Un coating è un sottile rivestimento depositato sulla superficie di una lente per modificarne le caratteristiche di interfaccia, ad esempio per renderla anti-riflesso.

Zemax[®] può inoltre modellare l'effetto dei *coating* ottici sulle superfici dei componenti, valutare gli effetti delle tolleranze sulle prestazioni ottiche dei sistemi e include un database di lenti tratte dai cataloghi commerciali più conosciuti (Zabase[™]).

4.3 PROGETTAZIONE DEL PERCORSO DI IMAGING

Il processo di progettazione (*design*) di una lente o di un sistema ottico complesso non è mai semplice, né lineare: sono necessari ripetuti tentativi ed errori, innumerevoli ottimizzazioni e rivisitazioni dell'idea originale per arrivare ad un risultato soddisfacente. Inoltre la soluzione finale spesso rappresenta un compromesso fra diverse necessità contrastanti, determinato da svariati vincoli di tipo fisico, ottico e meccanico.

Si tenta ora di descrivere la procedura di massima che è stata utilizzata per progettare le ottiche di interesse, osservando che spesso ha subito delle variazioni dipendenti dal caso particolare in esame:

1. definizione delle caratteristiche desiderate per la lente, come focale effettiva, entità delle aberrazioni, posizione all'interno del percorso ottico, etc.;
2. verifica di funzionamento del sistema con un equivalente parassiale;
3. sostituzione della lente parassiale con un modello preesistente (attinto dal catalogo Zabase di Zemax[®] e debitamente riscaldato) o, in alternativa, inserimento manuale dei parametri delle superfici che costituiscono la lente;
4. definizione dei vincoli meccanici e costruttivi come aperture, composizioni, spessori massimi e minimi;
5. conversione delle specifiche e dei vincoli in operandi da inserire nella funzione di merito, facendo attenzione al peso assegnato a ciascun operando e alla quantità di parametri variabili presenti nel Lens Editor;
6. ottimizzazione del sistema;
7. valutazione dei risultati;
8. eventuale modifica di vincoli e schema ottico e riottimizzazione;
9. sostituzione, se possibile, della lente ottenuta con una lente da catalogo simile.

Il tempo di ottimizzazione sale esponenzialmente con il numero di variabili presenti; per questo è consigliato, ove possibile, l'uso dei pick-up.

Il design si può ritenere concluso quando lo spot immagine generato dal sistema ha dimensioni comparabili o, meglio, cade tutto all'interno del disco di Airy, definito secondo il criterio di Rayleigh vedi 1.1.1: in tal caso il sistema si definisce *diffraction-limited*, cioè le sue prestazioni sono limitate dalla sola diffrazione. Spesso per questioni di tempo o per la complessità del sistema non è possibile raggiungere un così grande livello di correzione delle aberrazioni ed è necessario scendere a compromessi.

I parametri da inserire manualmente possono essere spessori e curvature calcolati per via teorica ma anche, più spesso, possono essere ricavati da un tripletto di Cooke opportunamente ridimensionato.

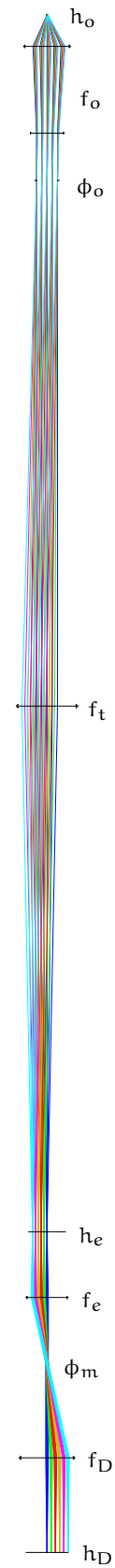


Figura 4.11: Schema ottico del cs5 realizzato con lenti parassiali; lo specchio è stato omissso per mostrare le dimensioni dell'immagine finale. In presenza dello specchio, grazie al suo tilt controllato, tutti i campi a diverse altezze vengono mandati a fuoco nello stesso punto sull'asse ottico, dove sono collocati il pinhole di rivelazione e il rivelatore.

In genere nel corso del progetto e delle ottimizzazioni vanno tenute presenti alcune norme di uso pratico, che trovano fondamento nella teoria dell'ottica geometrica e sono volte a semplificare, quando possibile, il design di una lente [20]:

- vanno evitati angoli di inclinazione elevati fra i raggi incidenti e la normale alla superficie di incidenza per ridurre l'entità delle aberrazioni;
- rapporti apertura-focale troppo grandi conducono a lenti meccanicamente irrealizzabili o comunque non corrette a sufficienza;
- per lo stesso motivo vanno evitate le superfici con rapporto troppo alto fra apertura e raggio di curvatura;
- lenti singole con focale molto elevata danno un contributo trascurabile al potere convergente dei un sistema e possono essere rimosse, a meno che non abbiano una funzione di correzione cromatica grazie ad una particolare composizione del vetro;
- quando le curvature di due superfici consecutive sono molto simili e appartengono a singoletti diversi, si può tentare di cementarle creando un doppietto;
- l'uso di superfici asferiche è indicato solo in casi molto critici, perché può neutralizzare aberrazioni altrimenti ineliminabili con lenti sferiche, ma comporta un notevole aumento dei costi di produzione.

Nello sviluppo delle ottiche del prototipo cs5 sono stati mantenuti dei vincoli meccanici sulla struttura delle lenti con lo scopo di permetterne il montaggio e l'allineamento. Ciascun singoletto prevede un raggio di apertura maggiorato di 1 mm per offrire una superficie d'appoggio ai supporti che lo tengono in posizione. La presenza dei *distanziali* impone invece che la distanza fra due lenti non sia inferiore a 1.5 mm al bordo e 0.5 mm al centro.

Il distanziale è un sottile anello di materiale plastico che si pone fra due lenti per mantenerle alla giusta distanza.

Inoltre è essenziale che ciascun singoletto abbia, per ragioni costruttive, uno spessore superiore ad 1 mm e inferiore a 15 mm. Per quanto concerne la composizione del vetro, ci si limita al catalogo Schott e ai vetri con costo relativo inferiore a 3.

Completata la fase di studio teorico del sistema (vedi 4.1), si procede ora con la descrizione dei passi che hanno portato allo sviluppo del percorso ottico di formazione dell'immagine. Innanzi tutto è stata verificata la correttezza dei calcoli teorici simulando con Zemax[®] un sistema formato da lenti parassiali con le focali selezionate, senza riscontrare problemi di sorta. Poi si è proceduto a sostituire ciascuna lente parassiale con un tripletto preliminare, da ottimizzare in base alle esigenze.

È importante segnalare che l'oggetto del sistema viene considerato piano, mentre in realtà la cornea umana possiede una sua curvatura e un suo indice di rifrazione, in grado di alterare i percorsi luminosi di formazione dell'immagine. Questi aspetti verranno trattati separatamente in seguito (vedi 4.3.2).

TUBE-LENS Questa lente si occupa, assieme all'obiettivo, dalla formazione dell'immagine intermedia e deve avere una focale complessiva di 200 mm. La distanza focale anteriore dev'essere sufficientemente lunga da consentire l'inserimento del robot sagittale. Considerata la lunga focale, questa lente non ha comportato particolari difficoltà di progetto ed è stato possibile sostituirla facilmente con il doppietto acromatico 49-364-INK prodotto dalla Edmund Optics (figura 4.12), con focale nominale di 200 mm.

Campo (μm)	Angolo ($^\circ$)
50	1.27269
100	2.54630
150	3.82174
200	5.09993
250	6.38141

Tabella 4.3: Calcolo dell'angolo di inclinazione dello specchio risonante: dati ricavati.

È stato verificato che con lievi spostamenti della lente lungo l'asse ottico si può ottimizzare il fuoco di una particolare lunghezza d'onda. Ciò è molto importante in fase prototipale perchè rende possibile "accordare" il sistema alla corretta λ con semplici traslazioni delle ottiche.

LENTE DI SCANSIONE Questo punto del sistema ottico è particolarmente critico perchè determina il modo in cui la luce che forma l'immagine intermedia viene raccolta e collimata sullo specchio di scansione. Per far sì che sussista una relazione lineare fra l'angolo di inclinazione dello specchio e la posizione dello spot confocale sul campione, si deve progettare la lente di scansione in modo da renderla una lente *f-theta*, ossia una lente per cui vale la relazione lineare $h = f \cdot \theta$ fra l'altezza dell'immagine h e l'angolo θ che il raggio principale incidente forma con l'asse ottico [53].

Quanto appena affermato si applica anche alla tube-lens, ma non ne influenza il design perchè la focale molto lunga e gli angoli di inclinazione ridotti approssimano bene la condizione di parassialità. Nel caso in esame, invece, la focale desiderata è di 25 mm e gli angoli in gioco ben più ampi.

Dunque, tenendo conto di queste considerazioni, sono stati impostati opportuni operandi per far sì che i fasci collimati prodotti dalla lente incidessero sullo specchio con angoli proporzionali. Dopo innumerevoli ottimizzazioni e molti tentativi di sostituzione con lenti da catalogo, si è giunti alla configurazione riportata in figura 4.13: una coppia di doppietti acromatici *Edmund Optics 49-343-INK* con focale nominale di 50 mm disposti simmetricamente e adatti a tutte le λ di interesse.

Si nota che la distanza focale posteriore *FFL (Front Focal Length)* del sistema è ridotta a poco più di 20 mm. Ipotizzando possibili problemi di ingombro dovuti alla presenza dello specchio risonante, sono state condotte alcune ulteriori ottimizzazioni per valutare l'effetto dell'inserimento di una lente negativa nel sistema, al fine di aumentare la *FFL* senza modificare la focale effettiva. Lo studio non ha portato a soluzioni significative (figura 4.14 e figura 4.15), ma fortunatamente il produttore dello specchio risonante ha fornito a NT le caratteristiche del package e assicurato che le sue dimensioni ridotte non influenzano la geometria del sistema ottico.

SPECCHIO DI SCANSIONE La scansione dello specchio risonante è stata simulata grazie al Multi-Configuration Editor offerto da Zemax[®]: sono state predisposte sei configurazioni, ciascuna con un campo oggetto di diversa altezza, da 0 μm a 250 μm a passi regolari di 50 μm . Da una rapida ottimizzazione si sono ottenuti gli angoli di tilt che indirizzano ciascun fuoco in corrispondenza del rivelatore d'immagine. La relazione che lega angoli e campi è pressoché lineare, con coefficiente di proporzionalità pari a 25.54 $^\circ/\text{mm}$ (tabella 4.3).

In una lente perfetta la relazione fra focale e angolo di inclinazione è
 $h = f \cdot \tan \theta$.

LENTE DI RIVELAZIONE Il progetto di questa lente risulta particolarmente semplice perché il fascio che incide su di essa è pressoché collimato e con un diametro di 1 mm solamente. La condizione di parassialità è ben verificata grazie all'intervento dello specchio risonante, che devia ciascun fascio in modo tale che il suo raggio principale coincida con l'asse ottico del sistema. Dopo un breve ciclo di ottimizzazioni è stato possibile selezionare la lente *Edmund Optics 49-316-INK*, con focale nominale di 36 mm (figura 4.16).

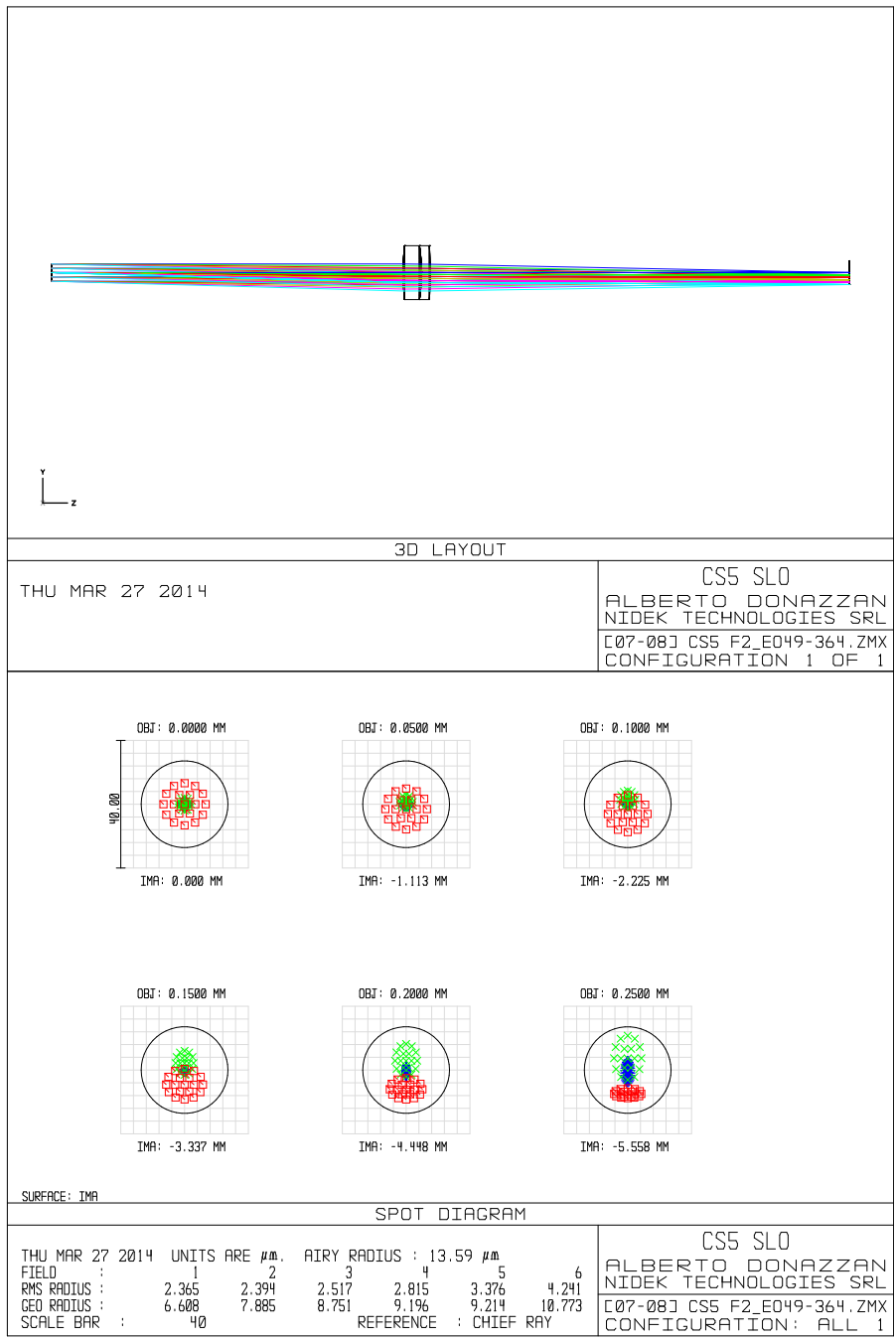


Figura 4.12: Layout e spot-diagram della tube-lens progettata: il doppietto acromatico *Edmund Optics 49-364-INK* focalizza tutti i campi ad altezze proporzionali e mantiene le aberrazioni al di sotto del limite di diffrazione (ciclonferenze in nero).

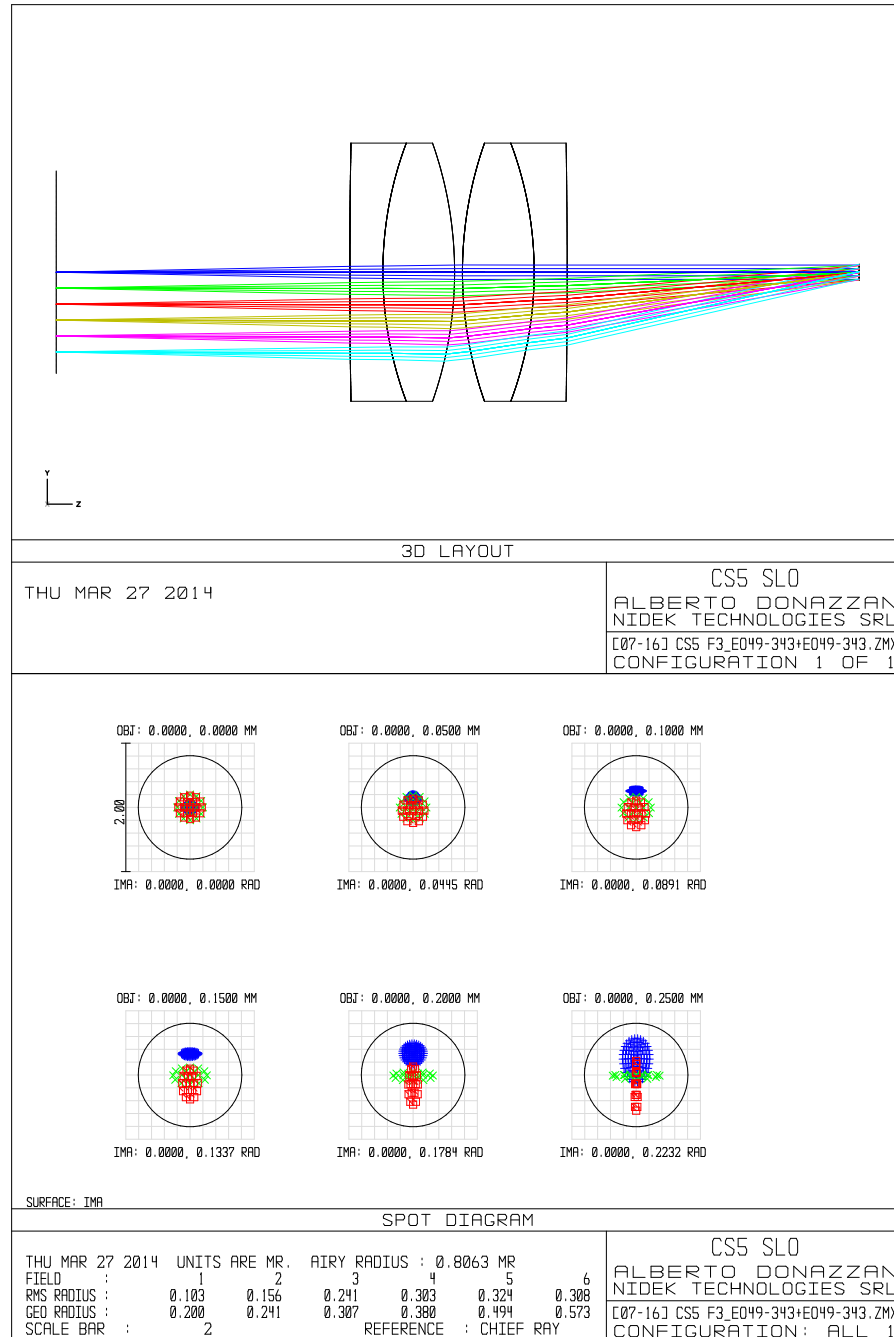


Figura 4.13: Layout e spot-diagram della lente di scansione progettata: la coppia di doppietti acromatici *Edmund Optics 49-343-INK* porta sullo specchio fasci ben collimati con angoli di inclinazione proporzionali alle altezze dei campi (comportamento f -theta); si nota che lo spot-diagram utilizza come unità di misura i milli-radiani (m r) perché lo spazio immagine del sistema è afocale.

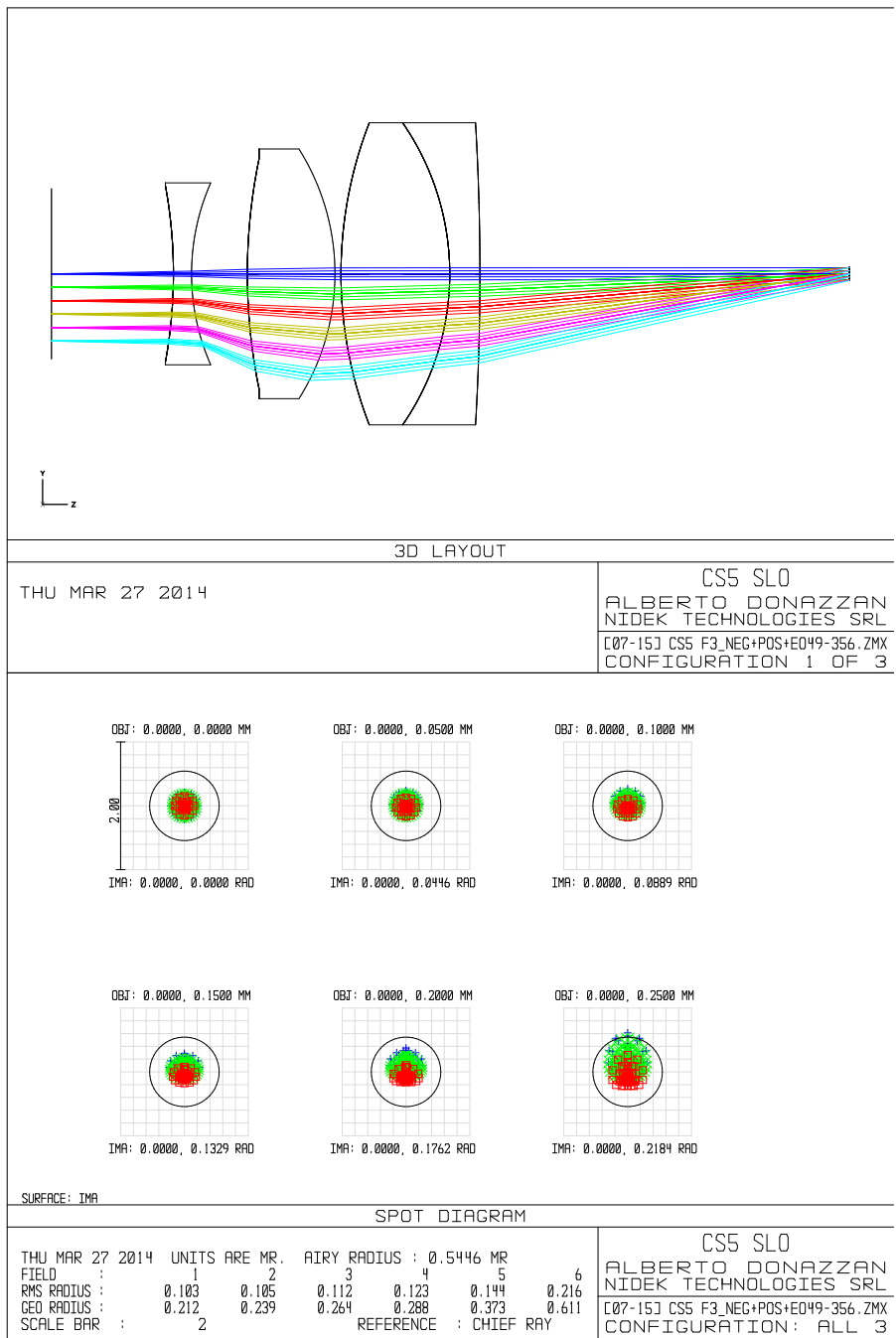


Figura 4.14: Layout e spot-diagram della lente di scansione ottimizzata con l'inserimento di una lente negativa per tentare di allungare la BFL.

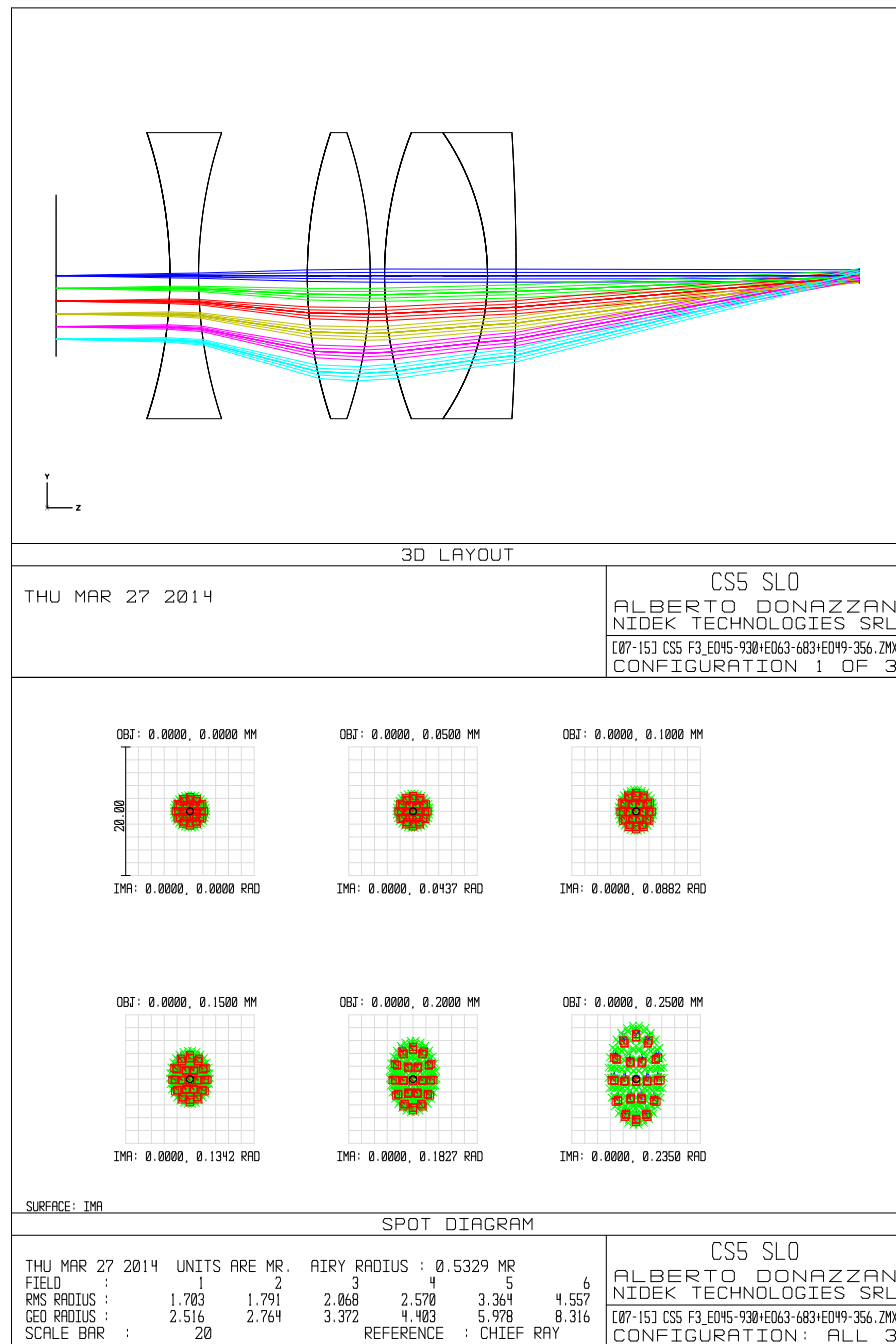


Figura 4.15: Layout e spot-diagram della lente di scansione ottimizzata con l'inserimento di una lente negativa da catalogo, per tentare di allungare la BFL.

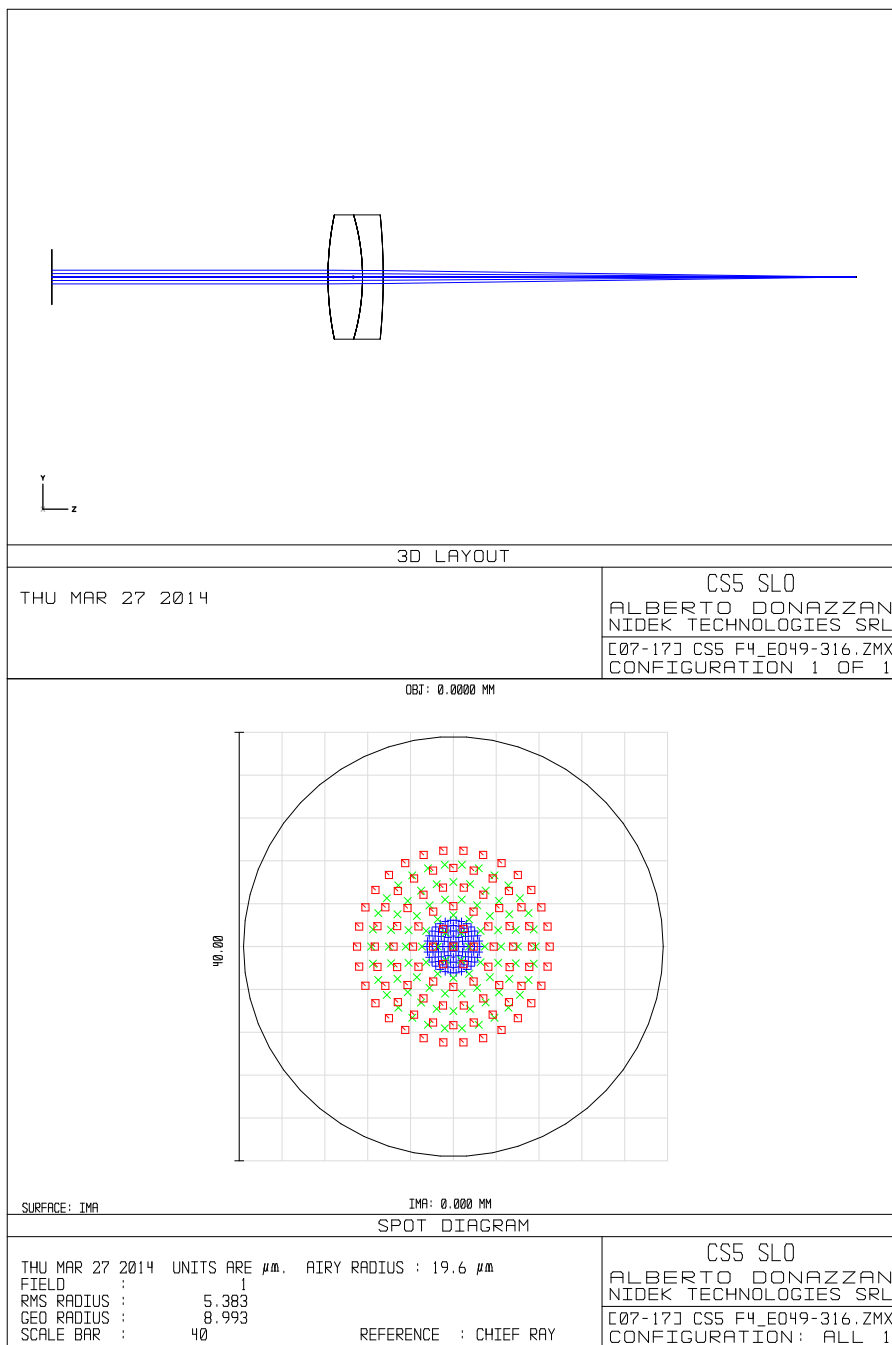


Figura 4.16: Layout e spot-diagram della lente di rivelazione progettata: il doppietto acromatico *Edmund Optics 49-316-INK* focalizza il fascio collimato proveniente dallo specchio sul pinhole di rivelazione.

4.3.1 Sistema con lenti reali

Il percorso di imaging definitivo vede, in aggiunta a quanto già esposto, la presenza del beam-splitter. Questo dispositivo viene rappresentato da un semplice cubo di vetro crown standard (BK7) e, come ci si aspetta, non influenza le prestazioni del sistema perché è inserito in una regione in cui il fascio luminoso che crea l'immagine è pressoché collimato. Ciò consente di dilatare a piacere lo spazio fra specchio e lente di rivelazione per poter inserire le ottiche di polarizzazione (vedi 4.4.4).

Per rispettare il principio Köhler e poter identificare con facilità i piani focali di apertura del sistema è sorta la necessità di calcolare le distanze focali anteriori (FFL) e posteriori (BFL, *Back Focal Length*) di ciascuna delle lenti progettate, al fine di far combaciare esattamente con tali valori le distanze di separazione fra i diversi piani focali del sistema. Sfortunatamente Zemax® non mette a disposizione alcuno strumento per il calcolo immediato di FFL e BFL. Si è provveduto così alla creazione di due macro ZPL [41] che svolgessero tale compito integrandosi nella funzione di merito del sistema. Il codice elaborato è riportato in [appendice A](#).

Infine le misure ottenute per le diverse distanze fra gli elementi hanno dovuto subire un arrotondamento al decimo di millimetro, in accordo con i limiti di tolleranza delle meccaniche che manterranno in sede tutto il sistema (vedi 4.5.1). Dopo aver sostituito manualmente i valori definitivi, è stato verificato che le prestazioni del sistema non risultassero peggiorate.

Lo schema ottico del percorso di imaging definitivo è riportato in [figura 4.17](#): il sistema risulta diffraction-limited ed è completamente componibile con lenti da catalogo, permettendo di ridurre notevolmente i costi prototipali. Il percorso ottico si estende per 714.9 mm, rispettando la specifica sul massimo ingombro.

4.3.2 Effetti della curvatura corneale

Come anticipato, la composizione e la struttura della cornea possono influenzare le prestazioni del microscopio alterando il percorso ottico compiuto dai raggi che vanno a formare l'immagine. Per valutare i problemi legati all'interazione dello strumento con l'occhio del paziente si è aggiunto nella simulazione il modello di una cornea comprensivo delle interfacce superficiali (lente-obiettivo, aria, epitelio, stroma, endotelio). I valori di curvatura e spessore utilizzati corrispondono a quelli riportati in letteratura [53]: la superficie epiteliale ha un raggio di curvatura di 8 mm mentre quella endoteliale ha un raggio di curvatura di 6.7 mm; lo spessore fra le due vale 0.52 mm ed è riempito da un mezzo con indice di rifrazione pari a 1.38.

Dalle analisi sul sistema così modificato emerge un lieve peggioramento delle prestazioni, evidenziato dall'aumento delle dimensioni dello spot (a tal proposito si confrontino la [figura 4.17](#) e la [figura 4.18](#)).

Sono stati condotti alcuni tentativi di correzione del sistema, sia alterando la tube-lens ([figura 4.19](#)), sia introducendo delle lenti per la curvatura di campo nell'adattatore della lente-obiettivo ([figura 4.20](#)). L'esito negativo di queste ottimizzazioni fa pensare che l'unico modo per ottenere effettivi miglioramenti sia la modifica dell'obiettivo. Quest'ultima opzione è economicamente improponibile e d'altra parte è bene ricordare la natura confocale del sistema sotto esame: un allargamento dello spot sul piano immagine incide sull'efficienza ma non intacca la risoluzione, grazie alla presenza dei pinhole che limitano ad un solo punto per volta il campo oggetto inquadrato.

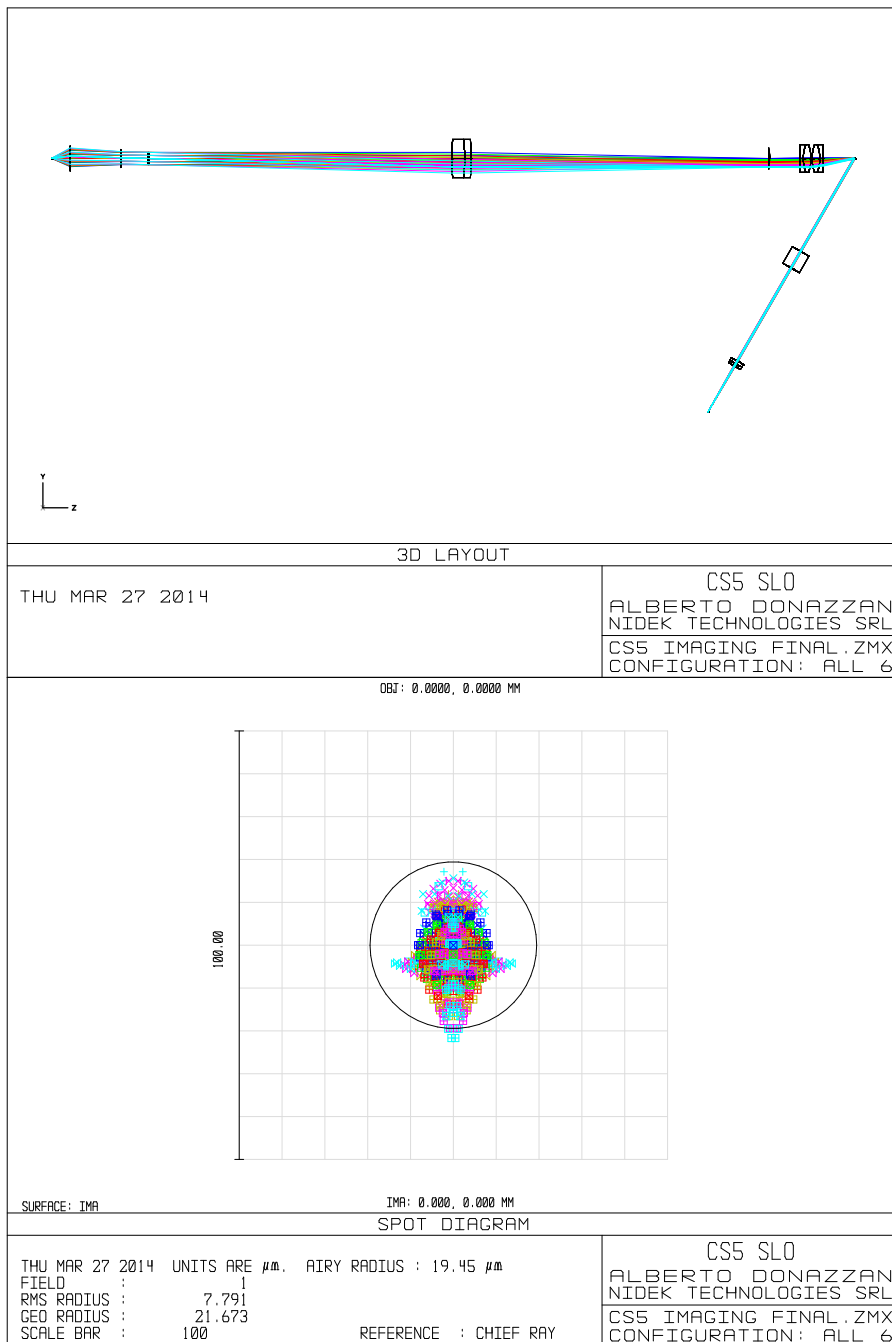


Figura 4.17: Layout e spot-diagram del percorso di imaging complessivo; si nota che il sistema risulta diffraction-limited.

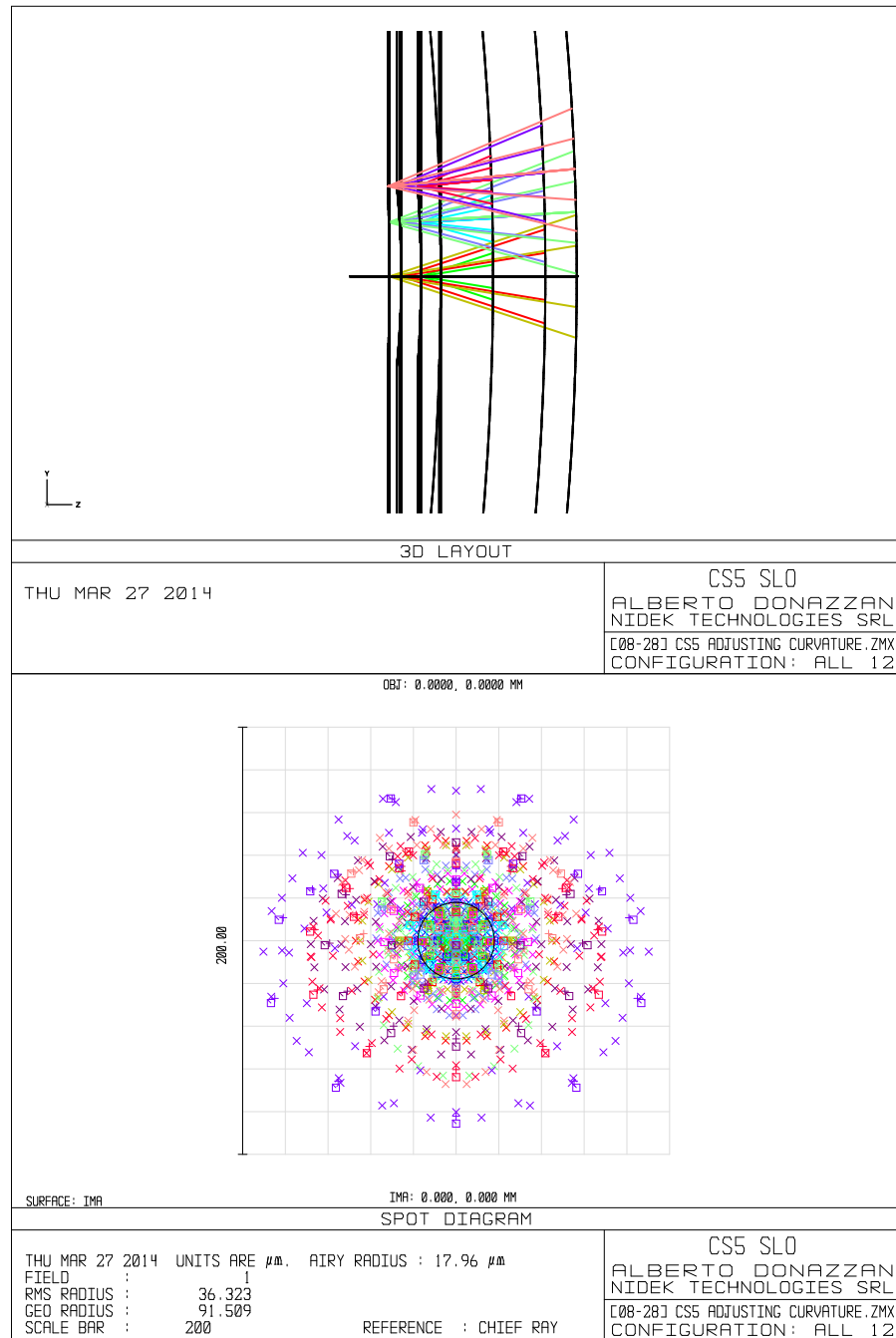


Figura 4.18: Layout del modello corneale realizzato in multi-configurazione e spot-diagram del percorso di imaging complessivo; si nota che il sistema non risulta più diffraction-limited a causa della curvatura e della composizione degli strati corneali.

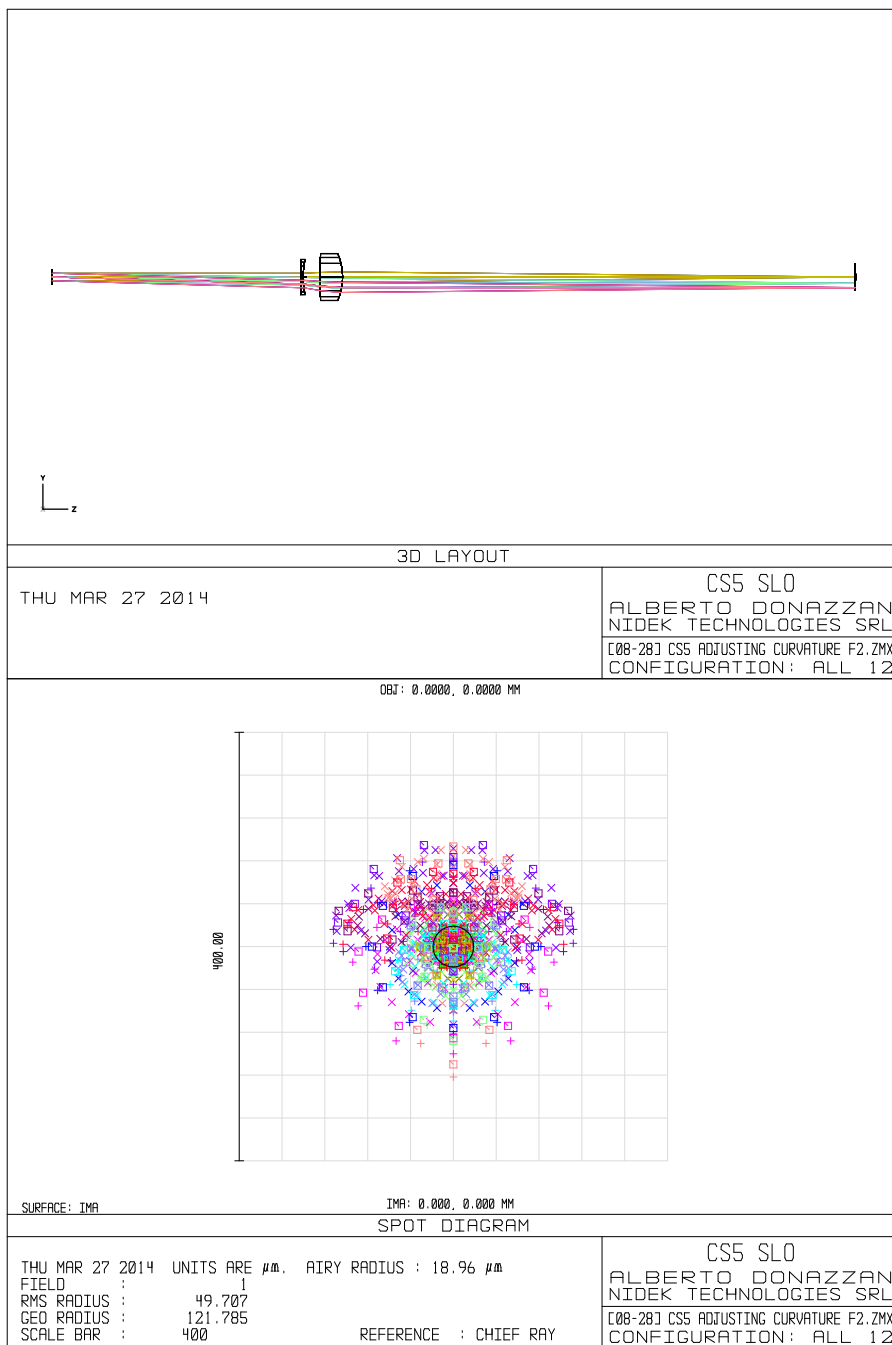


Figura 4.19: Layout della tube-lens, ottimizzata per la correzione della curvatura corneale, e spot-diagram del sistema complessivo; si nota come il sistema non sia più diffraction-limited.

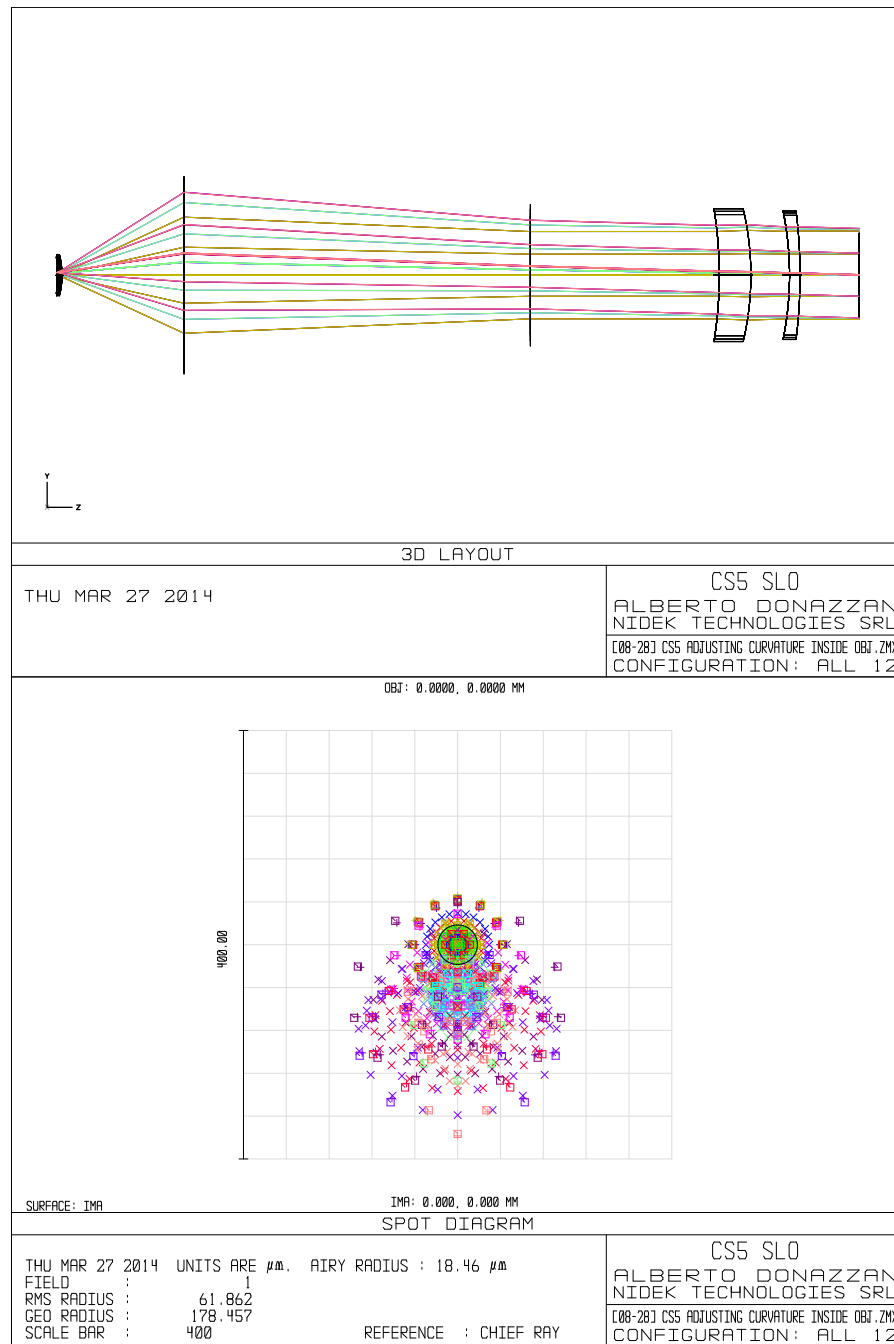


Figura 4.20: Layout delle lenti per la curvatura di campo ottimizzate: le prestazioni del sistema non raggiungono il limite diffrattivo. Si nota che l'inserimento delle lenti di correzione in tale posizione è guidata dal principio per cui una lente posta vicino ad un piano focale non modifica significativamente il processo di formazione dell'immagine sul piano stesso. In questo modo perciò si può modificare il percorso di imaging senza alterare quello di illuminazione.

4.4 PROGETTAZIONE DEL PERCORSO DI ILLUMINAZIONE

Richiamando l'equazione (4.4) è facile verificare che

$$\Delta_I = \frac{f_I}{f_D} \Delta_D$$

e, scegliendo per f_I un valore standard di 100 mm, il diametro del pinhole di illuminazione risulta completamente determinato e dipendente dalla lunghezza d'onda impiegata (tabella 4.1). Scegliere la focale in modo indipendente e ricavare la misura del pinhole è un approccio non casuale; lenti con focale non convenzionale sono difficili da trovare o costose da produrre; viceversa un pinhole è facilmente personalizzabile nel diametro desiderato e comodamente intercambiabile, in accordo con la λ di emissione della sorgente.

Si sottolinea che per ottenere un sistema confocale è di primaria importanza posizionare il pinhole in corrispondenza del piano focale anteriore della lente di illuminazione. A tale proposito si rivelano molto utili le macro ZPL programmate per il calcolo di FFL e BFL.

Sono state prese in considerazione diverse configurazioni di illuminazione, critiche e non, valutandone l'efficacia e l'efficienza, nonché gli effetti collaterali sul percorso di imaging.

4.4.1 LED/LASER accoppiato in fibra

È stata condotta un'analisi approfondita sulla possibilità di usare come sorgente per il sistema una fibra ottica con lente di collimazione, perché consentirebbe di disaccoppiare fisicamente la sorgente del resto del sistema ottico. Un telescopio di adattamento provvede a ridurre il diametro del fascio collimato per non perdere troppa luce sul pinhole. Le ottiche considerate per questa soluzione sono:

- *Thorlabs FC/PC-FC/PC Fiber Patch cable M67L02* [23], fibra ottica multimodo con indice a gradino, diametro del core ϕ_F di 25 μm e $\text{NA} = 0.1$;
- *Edmund Optics Fiber Collimator 47-218* [31], collimatore per fibra ottica con focale $f_c = 11$ mm e fascio in uscita di diametro $\phi_c = 2$ mm.

In ogni caso le conclusioni a cui si giunge hanno valenza generale per qualsiasi schema di illuminazione simile.

La configurazione in esame (figura 4.21) rispetta il principio di Köhler fin tanto che la sorgente e lo specchio risonante appartengono a piani focali coniugati. In questa situazione l'unico modo per illuminare correttamente lo specchio, e contemporaneamente non perdere luce nell'attraversamento del

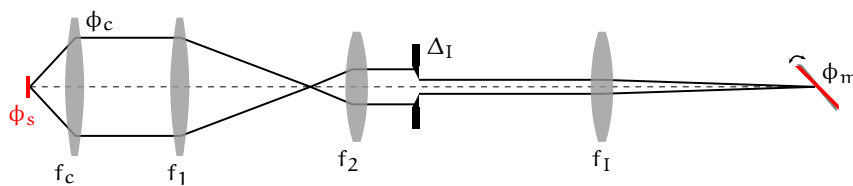


Figura 4.21: Schema geometrico dell'illuminazione Köhler con fibra.

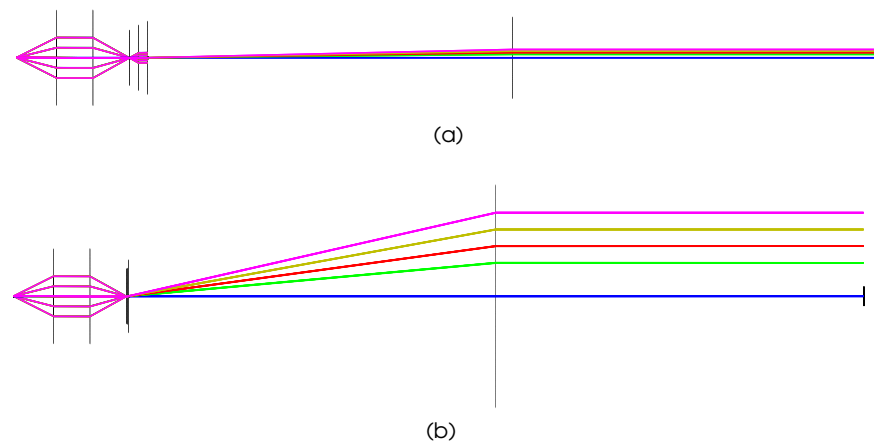


Figura 4.22: Nell'illuminazione con fibra, per rispettare il principio di Köhler si deve accettare un compromesso: (a) perdere luce sul pinhole, oppure (b) perdere luce sullo specchio.

pinhole, è far sì che le focali f_1 e f_2 del telescopio soddisfino le seguenti equazioni:

$$\phi_m = \frac{f_I f_1}{f_2 f_c} \phi_s$$

$$\Delta_I = \frac{f_2}{f_1} \phi_c$$

La prima impone il corretto ingrandimento fra sorgente e specchio, mentre la seconda determina il fattore di riduzione che il telescopio deve apportare al fascio per consentire la propagazione indisturbata attraverso il pinhole.

Dalle due equazioni si ricava facilmente

$$\frac{f_2}{f_1} = \frac{\Delta_I}{\phi_c} = \frac{f_I \phi_s}{f_c \phi_m} \quad (4.5)$$

che con i dati a disposizione non è mai verificata. Questa è la dimostrazione del fatto che un sistema così concepito porta inevitabilmente ad un serio compromesso: perdere molta luce sul pinhole (figura 4.22a) oppure illuminare lo specchio con un fascio di diametro sovradimensionato (figura 4.22b). La prima soluzione è certamente preferibile perché non introduce luce diffusa nel percorso di imaging, ma in entrambi i casi si è di fronte ad un sistema complesso (4 lenti) e inefficiente.

Osservando l'equazione (4.5) si capisce come l'uguaglianza sia molto difficile da verificare: in genere il rapporto f_I/f_c è grande mentre quello Δ_I/ϕ_c è molto piccolo. Poiché ϕ_m è fisso, per pareggiare i conti serve un valore di ϕ_s molto ridotto. Avere un core di diametro ridotto, però, rende estremamente inefficiente l'accoppiamento fra sorgente e fibra, e semplicemente sposta il problema più a monte senza risolverlo.

Considerando invece una configurazione con illuminazione critica è possibile semplificare notevolmente il sistema e sostituire il pinhole di illuminazione con l'uscita stessa della fibra. Sorvolando sul fatto che l'uscita di una fibra multimodo non è mai uniforme, si cerca di analizzare l'efficacia di questo approc-

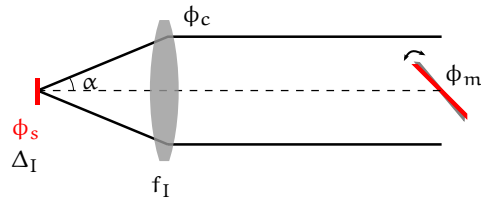


Figura 4.23: Schema geometrico dell'illuminazione con fibra nel caso critico.

cio. Con veloci calcoli geometrici (figura 4.23) e sfruttando l'equazione (4.4) si ricava un vincolo sulla focale della lente di illuminazione:

$$\frac{\phi_m}{2} \frac{1}{f_I} = \tan \alpha \tag{4.6}$$

$$\frac{\phi_m}{2 \tan(\arcsin NA)} = f_I = \frac{\Delta_I}{\Delta_D} f_D$$

che, ancora una volta, non può essere verificata con i dati a disposizione. Resta inoltre ancora insoluto il problema dell'accoppiamento fra sorgente e fibra.

In definitiva, l'uso della fibra ottica come sorgente di luce per il prototipo CS5 è sconsigliato. Si procede quindi con lo studio di altre configurazioni.

4.4.2 QI Optiq iFLEX-IRIS

L'azienda Qioptiq offre un dispositivo LASER molto promettente che incorpora nello stesso package un sistema di ottiche in grado di offrire un'ampia apertura di uscita ($\phi_s = 0.7 \text{ mm}$) e una bassissima divergenza ($NA \leq 0.6 \cdot 10^{-3}$). Queste caratteristiche lo rendono particolarmente appetibile perché permette di rispettare il principio di Köhler attraverso una semplice geometria a due lenti (figura 4.24).

Si calcola infatti che per illuminare correttamente lo specchio deve valere

$$\begin{aligned} \frac{f_I}{f_1} &= \frac{\phi_m}{\phi_s} \\ f_1 &= \frac{\phi_s}{\phi_m} f_I \end{aligned} \tag{4.7}$$

mentre per non perdere luce nell'attraversamento del pinhole si vuole

$$\begin{aligned} \frac{\Delta_I}{2} &= f_1 \tan(\arcsin NA) \\ f_1 &= \frac{\Delta_I}{2 \tan(\arcsin NA)} \end{aligned} \tag{4.8}$$

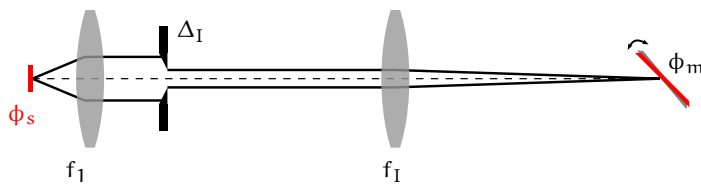


Figura 4.24: Schema geometrico dell'illuminazione Köhler con sorgente Qioptiq.

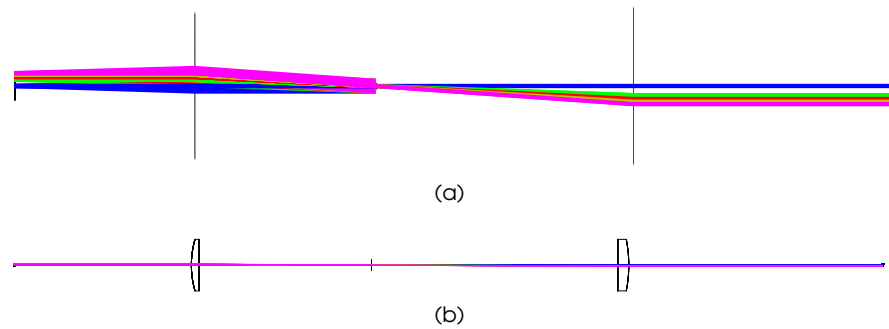


Figura 4.25: Illuminazione Köhler con LASER Qioptiq: (a) schema con lenti parassiali, riscalato per maggior chiarezza, e (b) layout con lenti *Edmund Optics 45-503* e *45-708*.

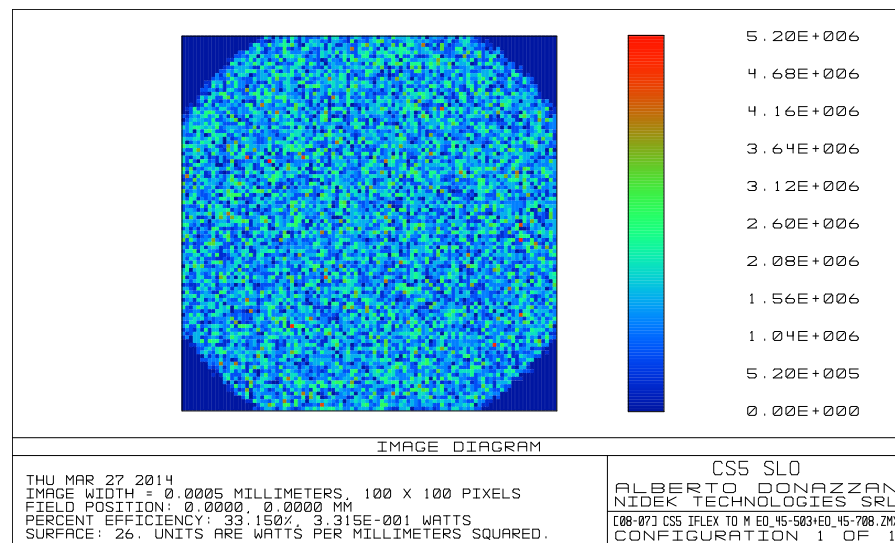


Figura 4.26: Simulazione dell'immagine creata dalla sorgente Qioptiq sulla cornea; si nota che il fascio non forma alcuna immagine perché risulta collimato, fornendo illuminazione uniforme nel rispetto del principio di Köhler.

Sfruttando le due equazioni appena ricavate risulta

$$f_1 = \frac{\phi_s}{\phi_m} f_I = \frac{\Delta_I}{2 \tan(\arcsin NA)}$$

Il vincolo non è verificato in modo esatto per i valori di ϕ_s e NA della sorgente considerata, ma suggerisce che non si è molto lontani dalla condizione ideale grazie alla bassissima divergenza del fascio in uscita.

Per la luce a 445 nm l'equazione (4.8) fornisce $f_1 = 49.9$ mm, mentre prevedendo di perdere luce sul pinhole, tramite equazione (4.7) si ottiene $f_1 = 70$ mm.

Dopo aver simulato un sistema parassiale per verificare i calcoli eseguiti (figura 4.25a), è stata progettata una soluzione semplice ed economica con i due singoletti *Edmund Optics 45-503* e *45-708* (figura 4.25b).

L'efficienza del sistema ottenuto supera il 30% (figura 4.26) e, considerata la potenza di emissione della sorgente e la presenza del beam-splitter, si può ritenere un valore più che sufficiente per garantire un'illuminazione adeguata della cornea.

Si nota che questa soluzione è specifica per la sorgente Qioptiq e si può applicare solo a sorgenti con divergenza di uscita molto ridotta. A tal proposito

si segnala la sorgente *Edmund Optics VHK Circular Beam Visible Laser Diode 54-021* [33], con caratteristiche simili al LASER Qioptiq, emissione a 670 nm, costo di circa un decimo, ma potenza di soli 4.9 mW.

Purtroppo il dispositivo prodotto da Qioptiq è molto costoso e difficilmente può essere inserito nel preventivo di spesa del prototipo cs5.

4.4.3 Nichia NDB7352 con lenti di collimazione

Lo studio di un percorso di illuminazione basato sulla sorgente prodotta da Nichia è giustificato dal fatto che il dispositivo è già in possesso di Nidek Technologies e, pur esibendo alta NA, può costituire una soluzione prototipale interessante. Il LASER in questione infatti, grazie all'elevata potenza di emissione, può illuminare a sufficienza la cornea anche attraverso un sistema molto inefficiente.

Considerati i problemi legati al rispetto del principio di Köhler con sorgenti ad alta divergenza (vedi 4.4.1), la configurazione adottata è in illuminazione critica e prevede il posizionamento del LASER, opportunamente collimato, direttamente a monte del pinhole di illuminazione (figura 4.27). Come prevedibile, il diametro del fascio che illumina il pinhole è molto maggiore del necessario, comportando grandi perdite di luce.

D'altra parte, in questo modo il pinhole di illuminazione agisce come un filtro spaziale e genera a valle un cono di luce con divergenza e distribuzione di intensità dettate dalla diffrazione:

$$\sin \alpha = NA = 1.22 \frac{\lambda}{\Delta_I}$$

A questo punto ci si trova davanti ad una situazione analoga a quella già vista nel caso di illuminazione critica con fibra, per cui è necessario verificare l'equazione (4.6). Poiché date le caratteristiche del sistema ciò non è possibile, un diaframma di diametro $\phi_I = \phi_m = 1$ mm viene posto fra la lente di illuminazione e lo specchio per "ripulire" il fascio dalla luce in eccesso e dagli ordini di diffrazione superiori.

Si osserva che, trascurando l'ulteriore figura di diffrazione generata dal diaframma, il fascio che incide sullo specchio ha intensità uniforme, facendo dimenticare i problemi legati al mancato rispetto del principio di Köhler (vedi 1.1.4).

L'approccio appena descritto è stato simulato preventivamente con una lente parassiale, poi sostituita col doppietto acromatico *Edmund Optics 49-364*-

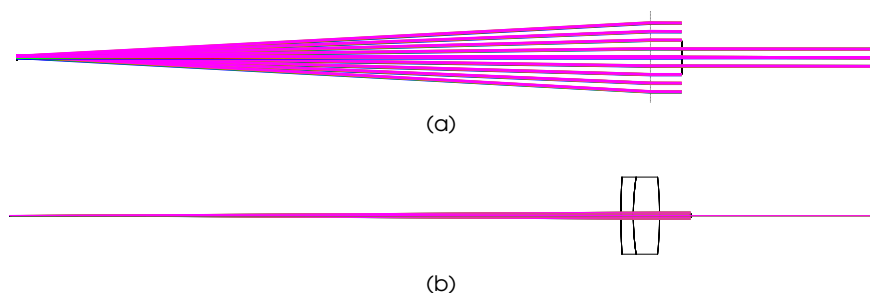


Figura 4.27: Illuminazione con LASER Nichia in configurazione critica (nel layout la sorgente corrisponde al pinhole e davanti alla lente è posto un secondo diaframma): (a) schema con lente parassiali, riscaldato per maggior chiarezza, e (b) layout con lente *Edmund Optics 49-364*.



Figura 4.28: Setup di misura della sorgente LASER Nichia NDB7352.

INK (focale nominale di 200 mm) in previsione dell'utilizzo di un pinhole di circa $100\ \mu\text{m}$ di diametro (figura 4.27).

Sfruttando il banco ottico e le lenti disponibili presso NT si è proceduto a verificare sperimentalmente l'efficacia e l'efficienza dell'assetto studiato. Il sistema messo a punto consiste brevemente in:

- sorgente LASER Nichia con collimatore custom progettato da NT;
- coppia di specchi inclinabili su due assi per consentire l'allineamento;
- pinhole da $100\ \mu\text{m}$ montato su un traslatore;
- lente di illuminazione con focale di 200 mm;
- lente di scansione con focale di 50 mm;
- tube-lens con focale di 400 mm.

Si nota che il rapporto fra le focali di tube-lens e lente di scansione vale sempre $1/8$, garantendo il corretto fattore di ingrandimento fra diametro dello specchio e apertura posteriore dell'obiettivo.

In figura 4.28 è riportata una foto del setup durante le misure.

È stata verificata l'effettiva uniformità del fascio che investe l'obiettivo, nonché il suo diametro, corrispondente agli 8 mm previsti. Nonostante il diaframma, si nota la presenza di alcune frange di diffrazione dovute al diaframma stesso, che aumentano lievemente l'area illuminata sul piano focale posteriore della tube-lens.

Dopo queste osservazioni preliminari, l'inserimento di un misuratore di potenza a valle della tube-lens ha permesso la raccolta di alcuni dati utili per la valutazione dell'efficienza del sistema. Come si vede dai grafici riportati in figura 4.29, la potenza che giunge alla cornea è ben superiore a quanto necessario, nonostante la scarsa efficienza del sistema di illuminazione adottato.

Durante le operazioni di allineamento è stato notato che il collimatore progettato da NT risulta poco stabile e non allineato con l'uscita della sorgente, probabilmente a causa di una scorretta valutazione delle tolleranze meccaniche sulla vite che mantiene la lente di collimazione in sede. Si prevede dunque l'acquisto di un collimatore da catalogo Thorlabs con innesto appositamente studiato per la sorgente Nichia [22].

BFL e FFL sono definite in riferimento al verso di propagazione della luce: in questo caso l'obiettivo si trova a valle della tube-lens e non viceversa.

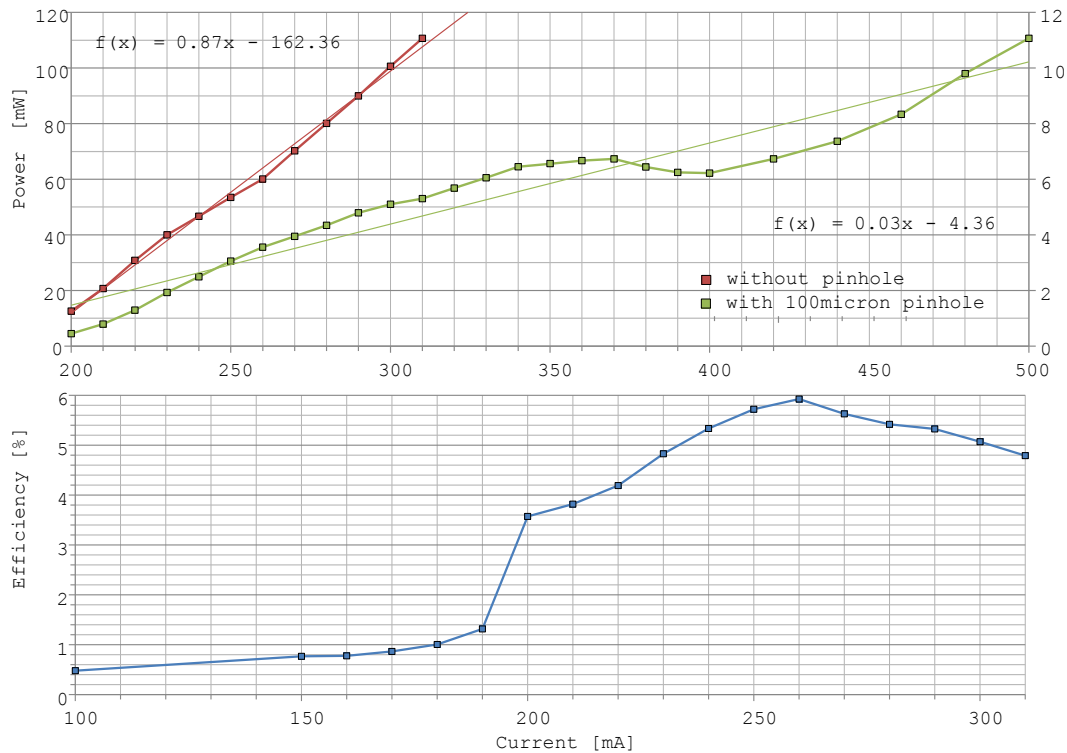


Figura 4.29: Misure di potenza ottica trasmessa ed efficienza del LASER Nichia usato in illuminazione critica.

4.4.4 Polarizzazione

Si è visto come in un sistema confocale la maggior parte della luce diffusa fuori fuoco venga efficacemente attenuata dalla presenza dei pinhole congiunti. Dunque, a livello teorico, il riflesso epiteliale dovrebbe riuscire a raggiungere il rivelatore solo quando il sistema mette a fuoco esattamente sull'epitelio.

Per evitare anche questo caso si può pensare di polarizzare la luce della sorgente e poi porre un filtro davanti al rivelatore in grado di eliminare tutta la luce che non ha subito variazioni nella polarizzazione lungo il percorso ottico: in questo modo si elimina solamente la componente riflessa dalla cornea, mentre la componente diffusa e diffratta torna all'obiettivo priva di polarizzazione e riesce a raggiungere il rivelatore attraversando il filtro (figura 4.30). È doveroso tenere conto di un inevitabile calo dell'efficienza del sistema causato dall'introduzione degli elementi polarizzanti.

La scelta ricade sulla polarizzazione circolare, considerate la difficoltà di allineamento per un sistema con polarizzazione lineare.

Sono stati scelti i seguenti componenti:

- *Thorlabs Zero-Order Quarter-Wave Plate* [28], lamina $\lambda/4$ sintonizzata a 445 nm;
- *Edmund Optics Left-Handed Plastic Circular Polarizer* [34], polarizzatore circolare levogiro in materiale plastico con trasmissività del 42 %;
- *Edmund Optics Non-Polarizing Cube Beamsplitter* [32], beam-splitter cubico non polarizzato con trasmissività del 45 % e coating antiriflesso.

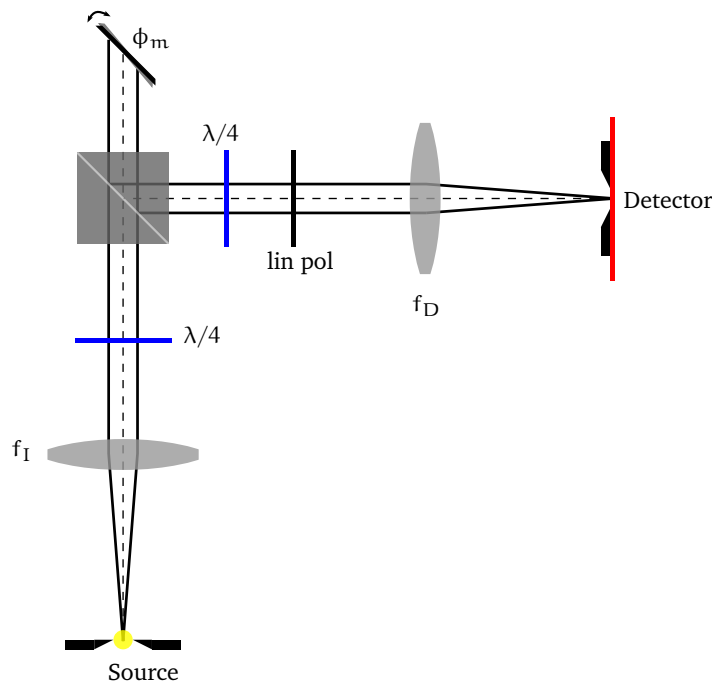


Figura 4.30: Schema del sistema di illuminazione completo: la polarizzazione circolare è ottenuta grazie ad una lamina $\lambda/4$ che converte la polarizzazione lineare del LASER; il filtro (polarizzatore circolare) è invece costituito da una lamina $\lambda/4$ seguita da un polarizzatore lineare opportunamente orientato.

4.5 COSTRUZIONE DEL PROTOTIPO DA BANCO OTTICO

Al termine della fase di progettazione ottica è seguito un periodo di valutazione del miglior modo per costruire fisicamente il sistema, allinearlo e testarlo con facilità, tenendo sempre in considerazione i costi di realizzazione.

Il sistema modulare che si è rivelato più promettente in termini di costi e flessibilità è il cosiddetto *Cage-System*, prodotto da Thorlabs, di cui si dà una breve descrizione.

4.5.1 Cage system

Il cage-system è un sistema optomeccanico modulare da banco ottico basato su quattro barre in acciaio sulle quali vengono montate le ottiche, che così mantengono un comune asse di allineamento [25]. In commercio esistono centinaia di moduli, accessori e componenti di raccordo pensati per la creazione dei più complessi setup ottici. La presenza delle barre rigide assicura stabilità al sistema e consente di variare le distanze tra le ottiche mantenendo



Figura 4.31: Esempio di applicazione del cage-system Thorlabs.

un allineamento perfetto (figura 4.31).

Thorlabs segnala che con i montaggi per lenti in catalogo si ha una tolleranza di $\pm 1/10$ mm sulla posizione xy delle ottiche [27].

Lo strumento di analisi delle tolleranze offerto da Zemax[®] ha permesso di capire che le prestazioni del sistema progettato non peggiorano in caso di lievi disallineamenti. Ciò che cambia leggermente è la posizione xy degli spot, ma questo non rappresenta un problema perchè sia i pinhole che la sorgente sono dotati di opportuni traslatori di precisione.

Grazie al software SolidWorks[®] è stato possibile assemblare virtualmente il prototipo, verificare l'inter-compatibilità fra i diversi componenti e stabilire quali elementi dovessero essere fatti realizzare su misura.

In definitiva tutti i componenti di supporto per le ottiche sono stati selezionati dal catalogo Thorlabs, ad eccezione del montaggio per il beam-splitter, già in possesso di NT, e dei seguenti componenti, che dovranno essere fatti produrre appositamente:

- distanziale per la lente di scansione e tubi di alloggiamento delle lenti da 25 mm di apertura;
- piastre forate di supporto al LASER e al cage-system;
- gabbia di supporto dello specchio risonante con raccordi per il fissaggio ad angolo di 30° ;
- pinhole da 1 mm di diametro.

In figura 4.32 e figura 4.33 è mostrato il prototipo da banco ottico che verrà assemblato e testato.

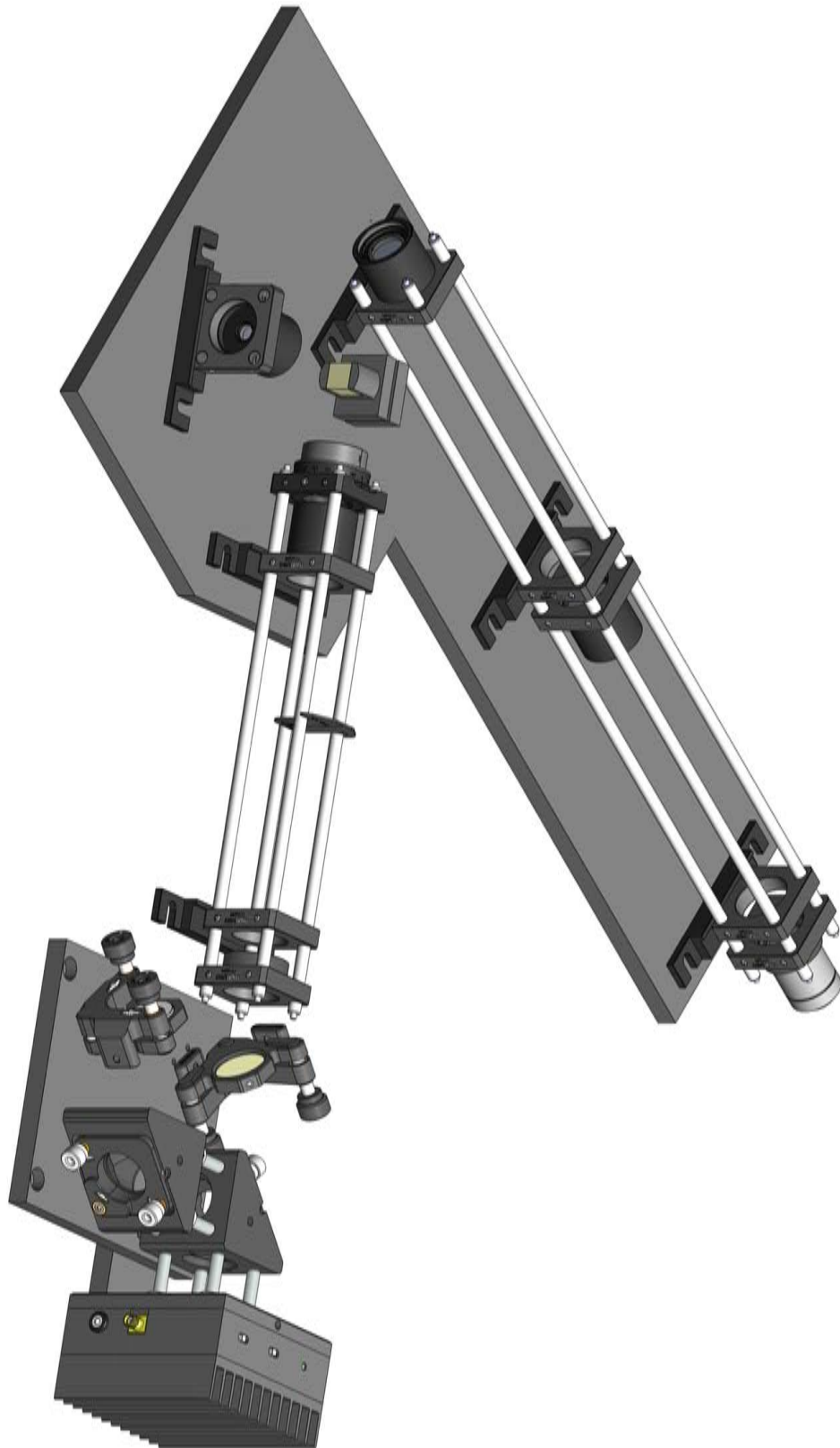


Figura 4.32: Modello 3D del prototipo da banco ottico Confoscan 5.

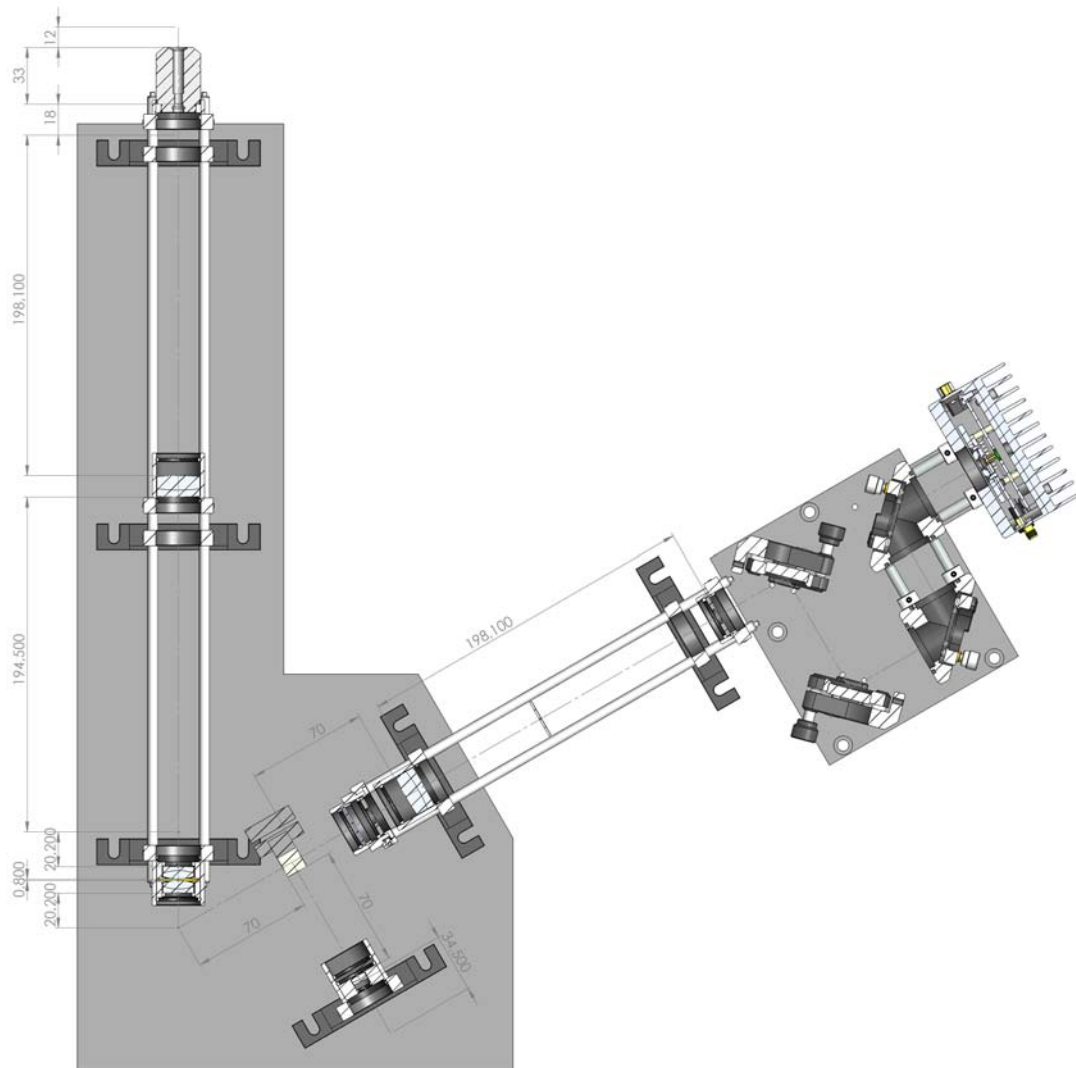


Figura 4.33: Proiezione ortogonale sul piano orizzontale del prototipo da banco Confocan 5, con quote di riferimento; il disegno seziona i componenti all'altezza dell'asse ottico.

4.6 CONCLUSIONI

Lo studio teorico dei principi base della microscopia, e della microscopia confocale in particolare, ha permesso la caratterizzazione di un prototipo del Nidek Confoscan 5 basato su una sorgente LASER e uno specchio MEMS riso- nante. La presenza dei pinhole confocali, se da una parte ha complicato il progetto del sistema di illuminazione, che risulta poco efficiente, dall'altra do- vrebbe permettere di raggiungere risoluzioni assiali e laterali ben superiori a quelle consentite con l'approccio slit-scanning del suo predecessore CS4.

Lo sviluppo del prototipo è stato condotto fino alla fase di assemblaggio virtuale dei componenti, a cui è seguito l'acquisto. Attualmente il progetto è in fase di approvvigionamento, a cui seguiranno l'assemblaggio del prototipo vero e proprio, una fase di allineamento accurato e il test del sistema, per verificarne le effettive prestazioni, sia con dei target di riferimento sia con occhi suini *ex vivo*.

Il lavoro di tesi ha permesso di acquisire dimestichezza con il software di simulazione Zemax[®] e apprendere le basi del *Computer-Aided Design* (CAD) con SolidWorks[®], nonché di imparare ad affrontare le problematiche legate alla progettazione di un sistema complesso.

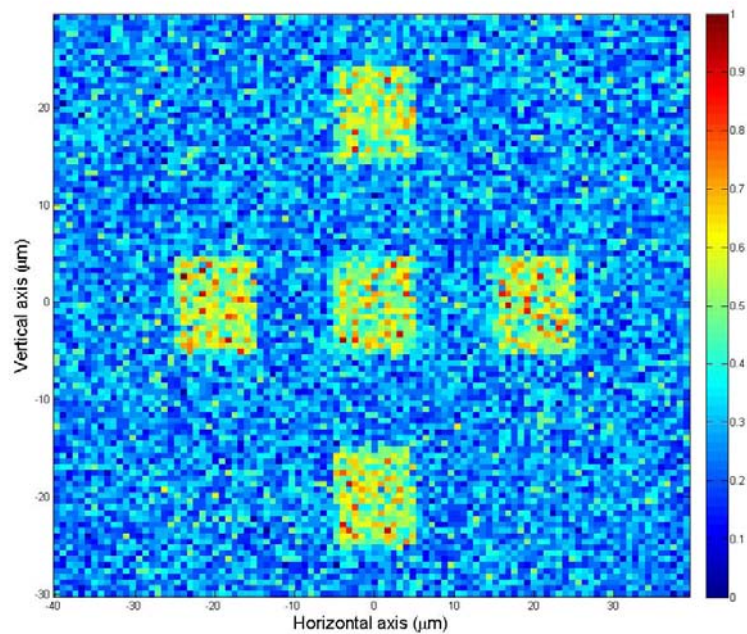


Figura 4.34: Immagine raccolta con il microscopio confocale progettato, in base ad una simulazione Zemax[®] non sequenziale: il sistema ottico è in grado di distinguere chiaramente un pattern di riflettori quadrati ($10\ \mu\text{m}$ di lato) anche in presenza di uno strato luminoso uniforme ad una profondità di soli $10\ \mu\text{m}$ dal piano di messa a fuoco. Si può dunque concludere che il CS5 realizza, almeno a livello teorico, gli obiettivi che si proponeva di raggiungere.



CODICE ZPL MACRO

A.1 MACRO ZPL PER IL CALCOLO DELLA BFL

```
1 ! Macro to calculate BFL
! RAYTRACEX x, y, z, l, m, n, surf, wavelength

4 h=0.01

wav = SYPR(200)

7
! Needs data1 e data2: number of start and stop surfaces
start = PVHX()
10 stop = PVHY()

RAYTRACEX 0,h,0,0,0,1,start-1,wav
13 y = RAYY(stop)
cosy = RAYN(stop)
u = TANG(ACOS(cosy))

16
! Check for divergent rays --> negative BFL!
IF (RAYY(stop+1)>y)
19     u=-u
    ENDIF

22 BFL=y/u

PRINT y
25 PRINT cosy
PRINT u
PRINT BFL

28 OPTRETURN 0, BFL
SOLVERETURN BFL
```

A.2 MACRO ZPL PER IL CALCOLO DELLA FFL

```
! Macro to calculate FFL

3 ! Needs data1 e data2: number of start and stop surfaces
start = PVHX()
stop = PVHY()

6
!find primary wavelength number
wav = SYPR(200)

9
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
! Declare some buffer variables
12 K = stop-start+1
DECLARE R, DOUBLE, 1, K
DECLARE T, DOUBLE, 1, K
15 DECLARE F, DOUBLE, 1, K
TY$=""
G$=""

18
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
! Save Surfaces' parameters
21 FOR m, start, stop, 1

    ! Save surface TYPE
24 TY = SPRO(m,0)
temp$ = $buffer()
TY$ = TY$+temp$+", "

27
    ! Save surface CURVATURE
R(m-start+1) = SPRO(m,2)
30
    ! Save surface THICKNESS
T(m-start+1) = SPRO(m,3)
33
    ! Save surface GLASS
G$ = G$+$GLASS(m)+", "
36
    ! Save FOCAL LENGTH if paraxial
IF (temp$ $="PARAXIAL")
39     F(m-start+1) = SPRX(m,10,1)
```

```

      ENDIF
42 !stampa di controllo
!PRINT TY$, " ",R(m-start+1)," ",T(m-start+1)," ",G$
45 NEXT
!estrapola valori da array e stringhe
48 !Tyscan$ = $GETSTRINGC(TY$, 1)
!Rscan = R(1)
!stampa di controllo
51 !PRINT Tyscan$, " ",Rscan
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
54 ! Reverse the saved system
FOR m, start, stop, 1
57     ! Reverse surface TYPE
    Tyscan$ = $GETSTRINGC(TY$, K+start-m)
    SURP m, 0, Tyscan$
60     ! Reverse surface CURVATURE
    SURP m, 2, -R(K+start-m)
63     ! Reverse surface THICNESS and GLASS
    IF (K+start-m-1!=0)
66         SURP m, 3, T(K+start-m-1)
        Gscan$ = $GETSTRINGC(G$, K+start-m-1)
        SURP m, 4, Gscan$
69     ELSE
        SURP m, 3, T(m-start+1)
        Gscan$ = $GETSTRINGC(G$, m-start+1)
72     SURP m, 4, Gscan$
    ENDIF
75     ! Reverse FOCAL LENGTH if paraxial
    IF (Tyscan$ $=="PARAXIAL")
78         SURP m, 10, F(K+start-m), 1
    ENDIF
NEXT
81 UPDATE
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
! Raytrace to find FFL, that now is BFL of the reversed system
h=0.01
87 RAYTRACEX 0,h,0,0,0,1,start-1,wav
y = RAYY(stop)
cosy = RAYN(stop)
90 u = TANG(ACOS(cosy))
! Check for telescopic system --> infinite FFL!
93 IF (u==0)
    FFL=1e10
ELSE
96     ! Check for divergent rays --> negative FFL!
    IF (RAYY(stop+1)>y)
        u=-u
99     ENDIF
    FFL=y/u
ENDIF
102 UPDATE
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
! Reverse back the saved system
FOR m, start, stop, 1
108     ! Reverse surface TYPE
    Tyscan$ = $GETSTRINGC(TY$, m-start+1)
111     SURP m, 0, Tyscan$
114     ! Reverse surface CURVATURE
    SURP m, 2, R(m-start+1)
117     ! Reverse surface THICNESS
    SURP m, 3, T(m-start+1)
120     ! Reverse surface GLASS
    Gscan$ = $GETSTRINGC(G$, m-start+1)
    SURP m, 4, Gscan$
123     ! Reverse FOCAL LENGTH if paraxial
    IF (Tyscan$ $=="PARAXIAL")
126         SURP m, 10, F(m-start+1), 1
    ENDIF
NEXT
129 !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
! Return results
132 FORMAT 3.15
PRINT "y=",y
PRINT "cosy=",cosy
135 PRINT "u=",u
PRINT "FFL=",FFL
138 OPTRETURN 0, FFL
SOLVERRETURN FFL

```

BIBLIOGRAFIA

- [1] Cobolt AB. *Cobolt 05-01 Series*.
URL: <http://www.cobolt.se/coboltflamenco660nmlaser.html>
- [2] W. B. Amos e J. G. White. «How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research». In: *Biology of the Cell* 95.6 (2003), pp. 335–342.
- [3] Max Born e Emil Wolf. *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. 7^a ed. Cambridge University Press, 1999.
- [4] Chris Brandmaier, Kenneth R. Spring e Michael W. Davidson. *Reflected Light DIC Microscopy*.
URL: <http://www.microscopyu.com/articles/dic/reflecteddic.html>
- [5] Mel Brenner et al. *Water Immersion Objectives*.
URL: <http://www.microscopyu.com/articles/optics/waterimmersionobjectives.html>
- [6] I. C. Chang. «Acousto-Optic Devices and Applications». In: *Handbook of Optics: Devices, Measurements and Properties*. 2^a ed. Vol. 2. McGraw-Hill, 1995, pp. 12.1–12.54.
- [7] Timothy R. Corle e Gordon S. Kino. *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. Academic Press, 1996.
- [8] Excelitas Technologies Corp. *C30659 Series – 900/1060/1550/1550E Si and InGaAs APD Preamplifier Modules*.
URL: http://www.excelitas.com/Downloads/DTS_C30659.pdf
- [9] Excelitas Technologies Corp. *C30659-UV-1 UV Avalanche Photo Diode Preamplifier Module*.
URL: http://www.excelitas.com/downloads/DTS_C30659-UV-1.pdf
- [10] Nichia Corp. *Blue Laser Diode NDB7352*.
URL: <http://www.nichia.co.jp/en/product/laser.html>
- [11] Olympus Corp. *LMPLFL Long Working Distance M Plan Semi-Apochromat*.
URL: <http://www.olympus-ims.com/it/microscope/lmplfln/>
- [12] Olympus Corp. *Microscope Components Guide*. 2005.
- [13] Michael W. Davidson. *Introduction to Microscope Objectives*.
URL: <http://www.microscopyu.com/articles/optics/objectiveintro.html>
- [14] Michael W. Davidson e Mortimer Abramowitz. «Optical Microscopy». In: *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*. Vol. 2. Wiley, 2002, pp. 1106–1140.
- [15] Michael W. Davidson e Thomas J. Fellers. *Conjugate Planes in Optical Microscopy*.
URL: <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasconjugate.html>
- [16] Winfried Denk, James H. Strickler e Watt W. Webb. «Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy». In: *Science* 248 (1990), pp. 73–76.
- [17] Nathan Efron. «Contact lens-induced changes in the anterior eye as observed in vivo with the confocal microscope». In: *Progress in Retinal and Eye Research* 26.4 (2007), pp. 398–436.

- [18] Peter Evennett. *Abbe's Diffraction Experiments Pt. 3* by Peter Evennett.
URL: <http://www.youtube.com/watch?v=CbPoi9bie1I>
- [19] Helmut Ferner e Jochen Staubesand. *Sobotta - Atlante di Anatomia Umana Vol. 1: Testa, Collo e Arto superiore*. 4^a ed. Urban & Schwarzenberg, 1982.
- [20] Joseph M. Geary. *Introduction to lens design: with practical ZEMAX examples*. 7^a ed. Willmann-Bell, 2002.
- [21] Heidelberg Engineering GmbH. *Rostock Cornea Module Technology*.
URL: <http://www.heidelbergengineering.com/international/products/hrt/hrt-cornea/technology/>
- [22] Thorlabs GmbH. *C390TME-A Mounted Geltech Aspheric Lens*.
URL: <http://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=C390TME-A>
- [23] Thorlabs GmbH. *M67L02 FC/PC-FC/PC Fiber Patch Cable*.
URL: <http://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=M67L02>
- [24] Thorlabs GmbH. *MLS203-1 Fast XY Scanning Stage User Guide*.
URL: <http://www.thorlabs.com/thorcat/20900/MLS203-1-Manual.pdf>
- [25] Thorlabs GmbH. *MLS203-1 Fast XY Scanning Stage User Guide*.
URL: <http://www.thorlabs.com/thorcat/20900/MLS203-1-Manual.pdf>
- [26] Thorlabs GmbH. *Optical lenses online Catalog*.
URL: http://www.thorlabs.de/navigation.cfm?guide_id=2087
- [27] Thorlabs GmbH. *Optomechanics Selection Guide*.
URL: http://www.thorlabs.hk/images/Catalog/V21/V21_1_Optomechanics.pdf
- [28] Thorlabs GmbH. *WPQ10M-445 Zero-Order Quarter-Wave Plate*.
URL: <http://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=WPQ10M-445>
- [29] Joseph W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. 2^a ed. McGraw-hill, 1995.
- [30] K. Hane e M. Sasaki. «Micro-Mirrors». In: *Comprehensive Microsystems*. A cura di Yogesh B. Gianchandani, Osamu Tabata e Hans Zappe. Vol. 3. Elsevier Science, 2008, pp. 1–63.
- [31] Edmund Optics Inc. *47-218 Fiber Collimator w/ FC Connector*.
URL: <http://www.edmundoptics.com/optics/optical-lenses/aspheric-lenses/fiber-optic-collimator-focuser-assemblies/47-218>
- [32] Edmund Optics Inc. *49-003 Non-Polarizing Cube Beamsplitter*.
URL: <http://www.edmundoptics.com/optics/beamsplitters/cube-beamsplitters/broadband-non-polarizing-cube-beamsplitters/49-003>
- [33] Edmund Optics Inc. *54-021 VHK Circular Beam Visible Laser Diode*.
URL: <http://www.edmundoptics.com/lasers/laser-diode-modules/continuous-wave-laser-diode-modules/vhk-circular-beam-visible-laser-modules/54-021>
- [34] Edmund Optics Inc. *88-098 Left-Handed Plastic Circular Polarizer*.
URL: <http://www.edmundoptics.com/optics/polarizers/circular-polarizers/circular-polarizers/88098>
- [35] Edmund Optics Inc. *Optical lenses online Catalog*.
URL: <http://www.edmundoptics.com/optics/optical-lenses/>
- [36] InPhenix Inc. *IPSDD080X Super-Luminescent LED Device (840nm)*.
URL: http://www.inphenix.com/pdfdoc/SLED_Device_840.pdf
- [37] Hamamatsu Photonics K. K. *HPK MEMS Mirrors*.
URL: http://www.hamamatsu.com/sp/hpe/HamamatsuNews/HamaNews_0113.pdf
- [38] Hans G. Kapitzka. *Microscopy from the very beginning*. 2^a ed. Carl Zeiss Jena GmbH. 1994.

- [39] August Köhler. «Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke». In: *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für Mikroskopische Technik* 10.4 (1893), pp. 433–440.
- [40] Jeffrey M. Larson, Stanley A. Schwartz e Michael W. Davidson. *Resonant Scanning in Laser Confocal Microscopy*.
URL: http://www.microscopyu.com/articles/confocal/resonant_scanning.html
- [41] Radiant Zemax LLC. *Zemax® 13 Optical Design Program User's Manual*. Lug. 2013.
- [42] Radiant Zemax LLC. *Getting started using Zemax®*.
URL: https://www.radiantzemax.com/downloads/Getting_Started_With_Zemax_version2.1.pdf
- [43] Nidek Co. Ltd. *Corporate Information*.
URL: <http://www.nidek-intl.com/company/history/history.html>
- [44] Marvin Minsky. «Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope». In: *Scanning* 10 (2000), pp. 128–138.
- [45] Marvin Minsky. *Microscopy apparatus*. US Patent 3,013,467. Dic. 1957.
- [46] Mitra Mitra Tavakoli, Parwez Hossain e Rayaz A. Malik. «Clinical applications of corneal confocal microscopy». In: *Clinical Ophthalmology* 2.2 (2008), pp. 435–445.
- [47] Douglas B. Murphy e Michael W. Davidson. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. 2^a ed. Wiley, 2012.
- [48] Stephen W. Paddock. «Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy». In: *Molecular Biotechnology* 16.2 (2000), pp. 127–149.
- [49] Lorenzo Pantieri e Tommaso Gordini. *L'arte di scrivere con L^AT_EX*. 2011.
- [50] James B. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3^a ed. Springer, 2010.
- [51] Qioptiq. *iFLEX-iRIS Diode laser systems with fiber delivery*.
URL: <http://www.qioptiq.com/iflex-iris-miniaturized>
- [52] Harald Schenk et al. «Single crystal silicon micro mirrors». In: *Physica Status Solidi* 6.3 (2009), pp. 728–735.
- [53] Warren J. Smith. *Modern Optical Engineering: The Design of Optical Systems*. 4^a ed. McGraw-hill, 2007.
- [54] Kenneth R. Spring e Michael W. Davidson. *The Microscope Optical Train*.
URL: <http://www.microscopyu.com/articles/optics/components.html>
- [55] Nidek Technologies Srl. *Research & Development Information*.
URL: <http://www.nidektechnologies.it/CorporateAll.htm>
- [56] Wes Wallace, Lutz H. Schaefer e Jason R. Swedlow. *Resolution Criteria and Performance Issues in Optical Microscopy*.
URL: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconresolution.html>