

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA DELLE
TELECOMUNICAZIONI

Sviluppo sperimentale di un tomografo a coerenza ottica

Laureando:
Matteo BERNARDELLO

Relatore:
Prof. Luca PALMIERI

Padova, 7 Ottobre 2013
Anno accademico 2012/2013

Sommario

Scopo di questa tesi è descrivere la tecnica Tomografia a Coerenza Ottica (Optical Coherence Tomography, OCT), nonché descrivere i risultati ottenuti da un apparato sperimentale implementato in laboratorio e testato su alcuni campioni.

La tecnica OCT permette di ottenere immagini a due o tre dimensioni di tessuti biologici e non solo, attraverso l'analisi della luce retrodiffusa dal campione.

È stata dimostrata per la prima volta nel 1991 [1], ricavando in vitro immagini della retina umana e di placca aterosclerotica come esempi di imaging in mezzi trasparenti e a bassa diffusione, e in mezzi non trasparenti, ad alta diffusione. La prima tomografia in vivo del disco ottico umano è stata effettuata nel 1993 [1] e da allora i miglioramenti tecnici hanno portato la tecnica OCT ad essere indispensabile nella diagnostica oftalmica. Essa permette infatti l'analisi senza contatto diretto con il tessuto, a lunghezze d'onda invisibili (infrarosso) e in modo rapido; tutti fattori a vantaggio del paziente che non viene minimamente disturbato dall'esame.

Nei primi tre capitoli di questo elaborato si discuteranno i principi fisici che stanno alla base della tecnologia, nonché le metodologie di implementazione della stessa nelle sue principali versioni.

Nel quarto capitolo si descriveranno gli strumenti e i componenti ottici che hanno consentito la realizzazione in laboratorio della tecnica OCT, in una sua particolare configurazione. Con tale apparato sperimentale sono state eseguite diverse misure su alcuni campioni: i risultati e relative considerazioni vengono presentate nel quinto e sesto capitolo.

Infine vengono proposte possibili future applicazioni ed evoluzioni della configurazione attuale.

Indice

1	Tomografia a Coerenza Ottica: Introduzione alla tecnologia	9
2	Principi fisici	13
2.1	Luce Coerente ed Incoerente	13
2.1.1	Tempo e lunghezza di coerenza	14
2.1.2	Coerenza e densità spettrale di potenza	15
2.2	Interferenza e Battimento	16
2.2.1	Interferenza tra onde monocromatiche	17
2.2.2	Interferenza e coerenza	18
2.2.3	Battimento tra onde aventi frequenze diverse	20
2.3	Interferometria	21
2.4	Fasci Gaussiani	21
2.4.1	Parametri descrittivi	22
2.4.2	Trasmissione attraverso una lente	23
3	Tomografia a Coerenza Ottica: Teoria	25
3.1	Generalità e formazione delle immagini	25
3.2	Parametri fondamentali	26
3.2.1	Lunghezze d'onda di lavoro	26
3.2.2	Risoluzione assiale	28
3.2.3	Risoluzione trasversale	28
3.2.4	Sensibilità	30
3.2.5	Velocità di acquisizione	30
3.3	Metodi di implementazione	31
3.3.1	Time Domain OCT	31
3.3.2	Spectral Domain OCT	35
3.3.3	Swept Source OCT	38
3.3.4	OCM	40
3.4	Confronto tra le configurazioni	40
4	Progetto e setup sperimentale	43
4.1	Descrizione dei componenti	43
4.1.1	Lenti	43
4.1.2	Optical Backscatter Reflectometer	44
4.1.3	Dispositivo di traslazione	46
4.2	Setup Sperimentale	47
4.2.1	Configurazione preliminare	48
4.2.2	Configurazione SS-OCT	49
4.2.3	Configurazione SS-OCM	51
4.3	Risultati sperimentali preliminari: focal shift	53

5	Risultati sperimentali SS-OCT	55
5.1	Caratterizzazione del sistema ottico	55
5.2	Campione 1: Cuvetta	57
5.2.1	Misure A-scan	58
5.2.2	Misure B-scan	59
5.3	Campione 2: Zebrafish	63
5.3.1	Zebrafish A	64
5.3.2	Zebrafish B	67
6	Conclusioni	69

Elenco delle figure

1.1	Andamento dell'assorbimento di acqua, tessuto dell'aorta, melanina e ossiemoglobina, in funzione della lunghezza d'onda [23].	9
1.2	Spiegazione schematica della definizione di risoluzione: la minima distanza discriminabile tra i punti A_1 e A_2 è la risoluzione assiale, la minima distanza discriminabile tra i punti T_1 e T_2 è la risoluzione trasversale.	11
1.3	Posizionamento dell'OCT in termini di risoluzione e profondità raggiungibile, rispetto ad altre tecnologie come microscopia confocale, optical coherence microscopy, ultrasuoni.	12
2.1	Esempi di luce a) coerente e b) incoerente.	14
2.2	I grafici mostrano il confronto tra due radiazioni luminose aventi tempi di coerenza diversi e i rispettivi spettri di potenza.	16
2.3	Il modulo dell'onda risultante e quindi l'intensità totale dipende dallo sfasamento ϕ	17
2.4	Intensità totale in funzione dello sfasamento: minimi per multipli dispari di π , massimi per multipli di 2π	17
2.5	Andamento dell'intensità normalizzata in funzione del ritardo τ	20
2.6	Battimento tra due sinusoidi a frequenze diverse.	20
2.7	Configurazioni interferometri a) Mach-Zehnder e b) di Michelson	21
2.8	Sistema di riferimento e fascio gaussiano.	22
2.9	Andamento del raggio di un fascio gaussiano e relativi parametri.	23
2.10	Trasmissione di un fascio gaussiano attraverso una lente sottile.	23
3.1	Schema generale di un sistema OCT	25
3.2	Esempi di A-scan, B-scan, C-scan.	26
3.3	Andamento dell'attenuazione dovuta a 50 mm di acqua, in funzione della lunghezza d'onda; 50 mm di acqua corrispondono circa al percorso di andata e ritorno attraverso l'occhio umano [23].	27
3.4	Confronto tra due immagini della retina umana con risoluzione assiale di $10 \mu\text{m}$ (a sinistra) e $3 \mu\text{m}$ (a destra).	28
3.5	Confronto qualitativo tra focalizzazioni tramite aperture numeriche diverse.	29
3.6	Confronto tra B-scan della retina umana ottenuto mediante procedure ordinarie (a sinistra) e mediante ottica adattiva (a destra) [12].	30
3.7	Schema di un sistema TD-OCT con implementazione in fibra ottica.	31
3.8	Andamento dell'interferenza al variare dell'OPD per onde coerenti (a sinistra) e onde incoerenti (a destra).	33
3.9	Esempio del segnale risultante da un campione che presenta due superfici parzialmente riflettenti: la larghezza di ciascun involuppo è pari alla lunghezza di coerenza.	34
3.10	Schema di un sistema SD-OCT in cui si evidenzia la sorgente a larga banda, la posizione fissa dello specchio di riferimento e l'uso dello spettrometro.	35

3.11	Schematizzazione grafica del procedimento utilizzato per ricavare un A-scan da una singola interfaccia mediante SD-OCT.	37
3.12	Possibile A-scan tramite SD-OCT in cui si evidenziano i contributi utili del campione e i contributi rumorosi.	38
3.13	Segnale chirp e andamento temporale della sua frequenza.	39
3.14	Schema di un sistema SS-OCT.	39
3.15	Immagini della retina umana ottenute con TD-OCT (a sinistra) e SD-OCT (a destra) [15].	41
3.16	Immagini della retina umana prima (a sinistra) e dopo (a destra) compensazione della dispersione [22].	41
4.1	Dimensioni fisiche della lente.	44
4.2	Grafici per focal shift (a sinistra) e rivestimento AR (a destra) per la singola lente.	44
4.3	Fotografia dello strumento OBR.	45
4.4	Fotografia del dispositivo di traslazione.	46
4.5	Fotografia dell'allineamento tra fibra ottica e lenti.	47
4.6	Schema della configurazione preliminare.	48
4.7	Fotografia della parte ottica della configurazione preliminare.	48
4.8	Schematizzazione della configurazione SS-OCT.	49
4.9	Schermata dei parametri del fascio, in mm, per la configurazione SS-OCT.	50
4.10	Schermata dei parametri del fascio, in mm, per la configurazione SS-OCM.	52
4.11	Confronto tra focal shift teorico (azzurro) e sperimentale (rosso).	53
5.1	Schematizzazione della configurazione SS-OCT utilizzata.	55
5.2	Traccia in cui si rilevano le riflessioni prodotte dal sistema ottico.	56
5.3	Cuvetta e coefficiente di trasmissione delle pareti in Suprasil300.	57
5.4	Tracce A-scan su cuvetta.	58
5.5	Posizione della cuvetta per la misura 1 (a sinistra) e per la misura 2 (a destra).	60
5.6	Immagine B-scan su cuvetta verticale.	61
5.7	Immagine B-scan su cuvetta inclinata.	62
5.8	Immagine preliminare ottenuta con cuvetta non inclinata: il campione risulta poco visibile.	63
5.9	Immagine del campione in cui si evidenziano i piani immagine delle misure.	64
5.10	Immagine B-scan su zebrafish A: sezione del corpo.	64
5.11	Ingrandimento su zebrafish A: sezione del corpo.	65
5.12	Ingrandimento su zebrafish A: sezione del corpo e sua interpretazione.	65
5.13	Immagine B-scan su zebrafish A: sezione della testa.	66
5.14	Immagine B-scan su zebrafish A: sezione dell'occhio.	66
5.15	Immagine del campione in cui si evidenzia il piano immagine della misura.	67
5.16	Immagine B-scan su zebrafish B: sezione dell'intero corpo.	67
5.17	Ingrandimento su zebrafish B: sezione dell'intero corpo e sua interpretazione.	68

Elenco delle tabelle

4.1	Parametri principali della configurazione SS-OCT	51
4.2	Algoritmo per ottenere un'immagine B-scan in configurazione SS-OCT . .	51
4.3	Parametri principali della configurazione SS-OCM	52
5.1	Dimensioni cuvetta ottenute da B-scan.	61

Tomografia a Coerenza Ottica: Introduzione alla tecnologia

La tomografia a coerenza ottica, detta anche OCT -Optical Coherence Tomography-, permette di ottenere immagini tomografiche di un piano di sezione delle strutture micrometriche di materiali o sistemi biologici, facendovi incidere una radiazione luminosa e misurando le proprietà della luce retrodiffusa o riflessa, con il vantaggio di non richiedere il contatto fisico con il campione da analizzare.

Questa peculiarità la rende particolarmente adatta ad applicazioni mediche diagnostiche, in cui si richiedono strategie sempre meno invasive e veloci nonché accurate; può quindi essere un'alternativa a biopsie rischiose o impossibili.

L'utilizzo di questa tecnica in ambito medicale è giustificata anche dal fatto che l'interazione tra luce e materia presenta un assorbimento limitato per tessuti e molecole presenti nel corpo umano, costituendo una finestra ottica dai 600 ai 1500 nm efficacemente utilizzabile.

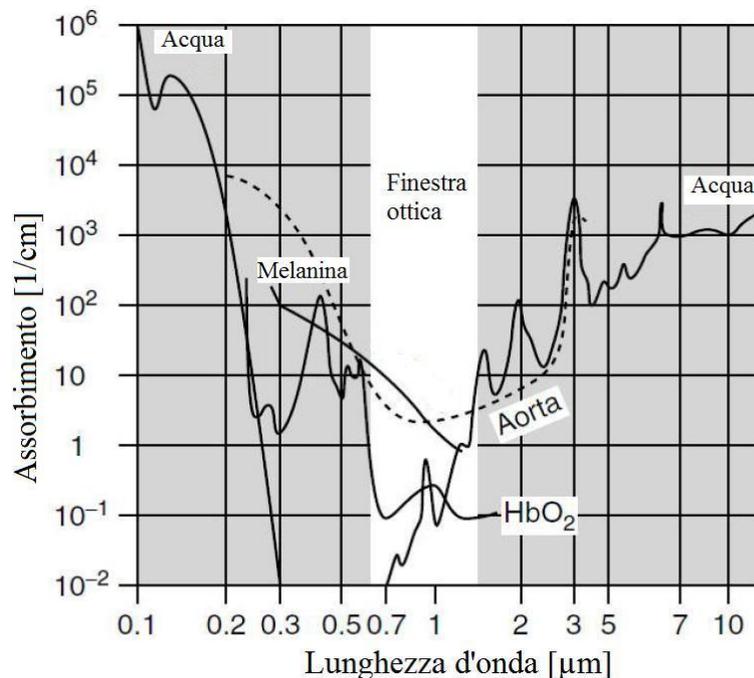


Figura 1.1: Andamento dell'assorbimento di acqua, tessuto dell'aorta, melanina e ossiemoglobina, in funzione della lunghezza d'onda [23].

In particolare, un'importante situazione di uso attuale della tecnica OCT è in ambito oftalmico: nell'analisi della struttura oculare e suoi eventuali difetti dovuti a patologie si richiede infatti una risoluzione dell'immagine micrometrica ad una profondità dell'ordine

dei millimetri. Questa fu anche la prima applicazione clinica dell'OCT [1]: dato che le prime lunghezze d'onda utilizzate (intorno gli 800 nm) risiedono vicino allo spettro visibile, l'occhio (e in generale un mezzo visibilmente trasparente) ben si presta a questo tipo di analisi.

Oltre l'oftalmologia, la tecnica può essere applicata anche a tessuti non trasparenti e, tramite cateteri ed endoscopi, interni al corpo umano, rendendo l'OCT uno strumento prezioso in ambito:

- oncologico, per monitorare lo stato dei tessuti e delle cellule tumorali;
- cardiovascolare, con l'analisi delle placche e delle occlusioni coronariche;
- muscolo-scheletrico, controllo della cartilagine delle articolazioni, tendini e legamenti;
- odontoiatrico, imaging post-intervento di occlusioni e carie.

La profondità raggiungibile è comunque limitata dallo scattering e dall'assorbimento (parametri in funzione della lunghezza d'onda utilizzata) presentato dal tessuto in esame alla radiazione incidente; ciò nonostante si possono ottenere immagini fino a 2-3 mm nella maggior parte dei tessuti.

Date le sue proprietà quindi, la tecnica OCT può essere efficacemente utilizzata in tre scenari generali, che sono:

- quando la biopsia convenzionale è rischiosa o impossibile;
- quando la biopsia è soggetta a possibili errori di prelevamento del campione;
- quando è necessaria una guida quasi real-time in un intervento chirurgico.

Precedentemente all'OCT furono sviluppate anche altre tecniche di imaging con principi fisici simili come ad esempio la tecnica ad ultrasuoni (ecografia), che si differenzia dall'OCT per l'utilizzo delle onde sonore al posto della radiazione luminosa. Quando un'onda sonora o luminosa viene fatta incidere su di un tessuto essa viene riflessa e retrodiffusa dalla struttura in esame; gli echi di ritorno presenteranno proprietà acustiche o ottiche differenti da quelle di partenza, da cui verranno dedotte le dimensioni delle strutture interne, lungo la direzione assiale.

Un possibile metodo di confronto tra le due tecnologie risiede nella valutazione delle risoluzioni spaziali ottenibili nell'immagine finale, suddivise in:

- risoluzione assiale, cioè la risoluzione con cui possono essere discriminati due differenti punti lungo la direzione longitudinale z del campione;
- risoluzione trasversale, cioè la risoluzione con cui possono essere discriminati due punti giacenti sullo stesso piano trasversale xy .

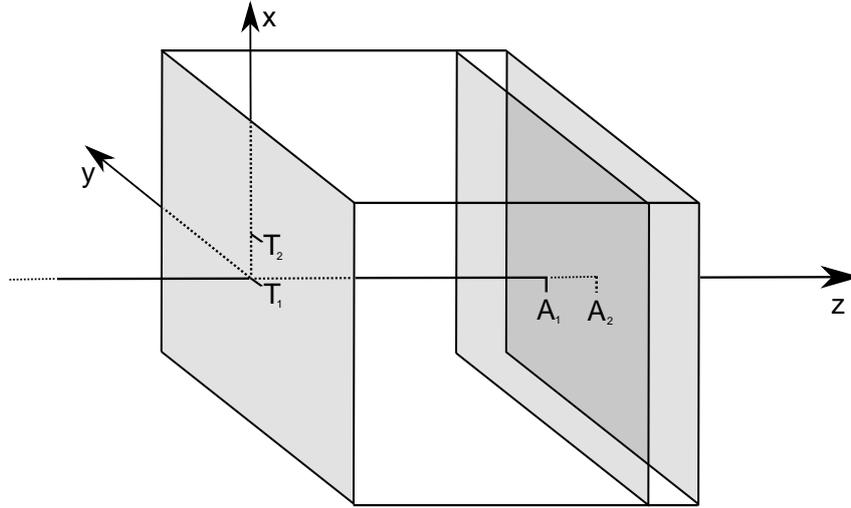


Figura 1.2: Spiegazione schematica della definizione di risoluzione: la minima distanza discriminabile tra i punti A_1 e A_2 è la risoluzione assiale, la minima distanza discriminabile tra i punti T_1 e T_2 è la risoluzione trasversale.

La grande differenza tra OCT e ecografia sta però nel fatto che la luce è circa un milione di volte più veloce del suono e, dato che si devono misurare distanze micrometriche tramite i ritardi temporali delle onde di ritorno, l'OCT necessita di tecniche di rivelazione ultraveloci:

$$\Delta T = \frac{\Delta z}{v_p}$$

in cui ΔT è il tempo impiegato per percorrere la distanza Δz alla velocità di propagazione v_p relativa al mezzo considerato.

Ad esempio, considerando un ambiente acquoso, la velocità del suono è circa 1500 m/s: per la misura di distanze con una risoluzione spaziale di $100 \mu\text{m}$ (tipica nell'ecotomografia) si deve quindi garantire una risoluzione temporale di circa 65 ns. I ritardi temporali degli eco associati alla luce sono invece estremamente più rapidi: per la misura con risoluzione spaziale di $10 \mu\text{m}$ (tipica per OCT) la corrispondente risoluzione temporale deve essere circa 45 fs. In questa scala temporale la rilevazione diretta non è elettronicamente possibile e quindi si necessita di un approccio alternativo come la tecnica interferometrica.

Nel caso degli ultrasuoni la risoluzione assiale è proporzionale alla frequenza utilizzata: utilizzando una sorgente a 10 MHz si ottengono risoluzioni di circa $150 \mu\text{m}$, con la possibilità di raggiungere profondità dell'ordine delle decine di centimetri. Aumentando la frequenza si possono ottenere risoluzioni più accurate ($15 - 20 \mu\text{m}$ utilizzando ultrasuoni a 150 MHz), pagando però con una diminuzione della profondità raggiungibile che si riduce a pochi millimetri. Per confronto, in OCT la risoluzione assiale dipende principalmente dall'intervallo di lunghezze d'onda utilizzate e si possono raggiungere risoluzioni da 1 a $15 \mu\text{m}$.

La risoluzione trasversale invece dipende da come il fascio ottico o sonoro viene focalizzato sul campione: maggiore la focalizzazione, minore sarà la superficie trasversale che interagisce con il fascio e migliore la risoluzione. Essendo più difficile focalizzare il suono rispetto alla luce [1], si ha che l'OCT consente di ottenere risoluzioni trasversali migliori (dai 25 ai $50 \mu\text{m}$) rispetto all'ecografia.

L'utilizzo della tecnica OCT permette dunque l'imaging della morfologia dei tessuti anche

a livello cellulare (le cellule infatti hanno dimensioni micrometriche), limitandosi comunque ad una profondità raggiungibile millimetrica. OCT inoltre va a coprire il gap precedentemente esistente tra le varie tecniche di imaging.

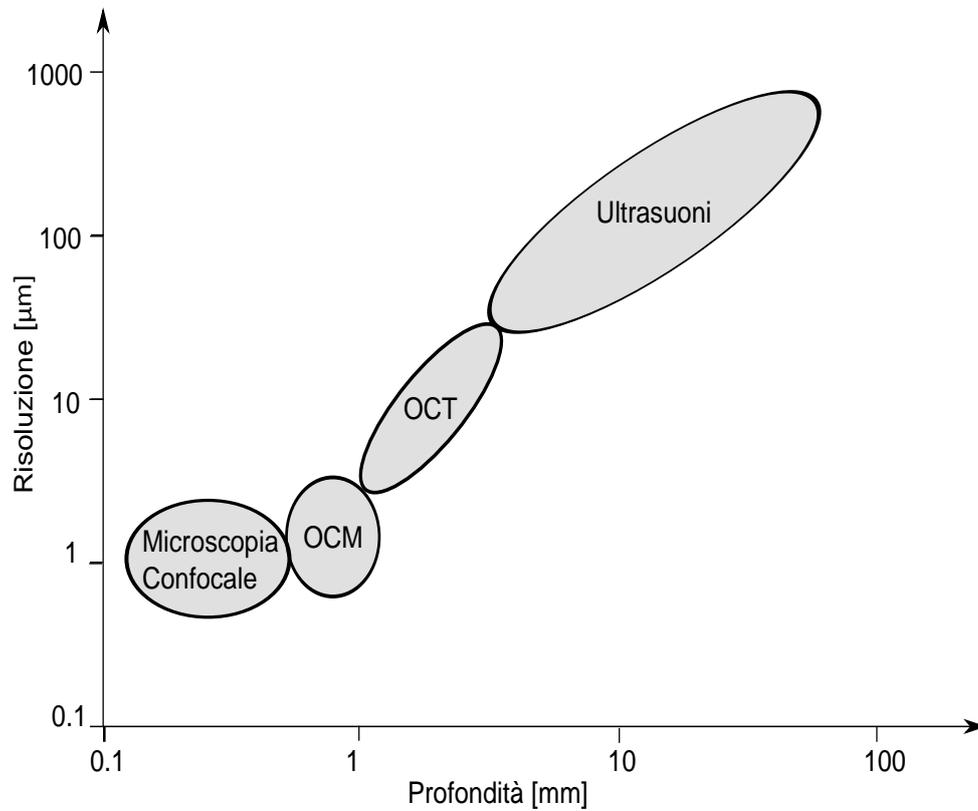


Figura 1.3: Posizionamento dell'OCT in termini di risoluzione e profondità raggiungibile, rispetto ad altre tecnologie come microscopia confocale, optical coherence microscopy, ultrasuoni.

Principi fisici

In questo capitolo si vogliono presentare i principi fisici di elettromagnetismo che stanno alla base della tecnica OCT e che influenzeranno le prestazioni del sistema finale.

Per fare questo si definirà la distinzione tra luce coerente e incoerente presupponendo la conoscenza della natura ondulatoria della luce, necessaria per spiegare fenomeni quali interferenza e battimento. Secondo tale teoria infatti, la luce si propaga sotto forma di onda alla velocità $c \cong 3 \cdot 10^8$ m/s nello spazio libero; ogni altro mezzo omogeneo è caratterizzato dall'indice di rifrazione n , in prima approssimazione costante, che riduce la velocità di propagazione della luce secondo la relazione:

$$v_p = \frac{c}{n}$$

2.1 Luce Coerente ed Incoerente

Si consideri la radiazione luminosa proveniente da una sorgente naturale o da un corpo caldo come una lampadina ad incandescenza. Essa è formata dalle emissioni indipendenti di fotoni derivanti dal decadimento energetico di un gran numero di atomi, ognuno dei quali emette a frequenze e fasi diverse. La loro sovrapposizione produce un andamento irregolare e aleatorio del fronte d'onda risultante, in cui la dipendenza dal tempo e dalla posizione di osservazione non sono note a priori ma possono essere descritte mediante strumenti statistici. Questo tipo di radiazione viene detta incoerente o, in generale, parzialmente coerente.

In opposizione ad essa si ha la luce coerente, che presenta un fronte d'onda la cui dipendenza da tempo e posizione è nota e invariante.

Un esempio di luce coerente è dato da un'onda monocromatica di campo elettrico:

$$E(\mathbf{r}, t) = E(\mathbf{r}) \exp[j(2\pi\nu t + \phi)]$$

Per quest'onda deterministica, l'intensità ottica è definita come:

$$I(\mathbf{r}) = cn\epsilon_0 \frac{|E(\mathbf{r})|^2}{2} \propto |E(\mathbf{r})|^2$$

Nel caso di luce incoerente, il campo elettrico presenta invece fluttuazioni aleatorie e deve essere descritto da un processo aleatorio; l'intensità va quindi definita proporzionalmente alla media temporale:

$$I(\mathbf{r}, t) \propto \langle |E(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle$$

ed essa può essere tempo-indipendente (l'onda è statisticamente stazionaria, la media temporale e quindi l'intensità è costante) o tempo-dipendente.

Si fissi ora la posizione \mathbf{r} di osservazione di un'onda statisticamente stazionaria; dall'equazione precedente la sua intensità è costante $I(\mathbf{r}, t) = I$, mentre le variazioni aleatorie di $E(\mathbf{r}, t)$ sono caratterizzate da una "memoria" del processo aleatorio: entro questo intervallo temporale le fluttuazioni appaiono regolari, mentre sono irregolari esaminando su intervalli più lunghi di tale quantità.

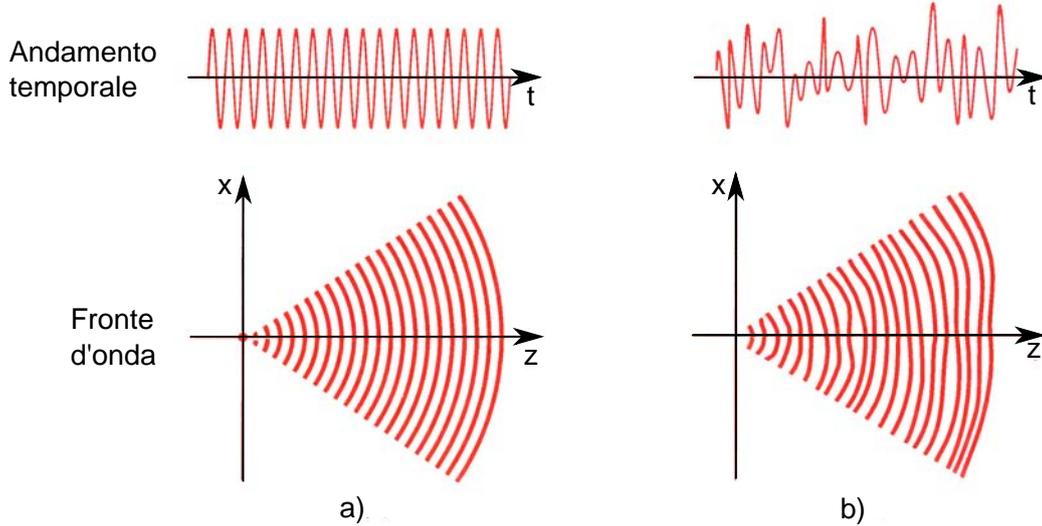


Figura 2.1: Esempi di luce a) coerente e b) incoerente.

2.1.1 Tempo e lunghezza di coerenza

Una misura quantitativa di questo comportamento è data definendo la funzione di autocorrelazione, che descrive l'estensione temporale entro cui le fluttuazioni relative a due istanti diversi e separati da un dato ritardo τ sono tra loro collegate:

$$\begin{aligned}
 G(\tau) &= \langle |E^*(t)E(t + \tau)| \rangle \\
 &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T E^*(t)E(t + \tau) dt
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

e da cui facilmente si ricava:

$$I = G(0)$$

È conveniente definire la versione normalizzata della funzione di autocorrelazione come:

$$\begin{aligned}
 g(\tau) &= \frac{G(\tau)}{G(0)} \\
 0 &\leq |g(\tau)| \leq 1 \\
 |g(0)| &= 1 = \max_{\tau} [g(\tau)]
 \end{aligned}
 \tag{2.2}$$

il cui modulo fornisce una misura del grado di correlazione tra $E(t)$ e $E(t + \tau)$.

Dato che, per luce parzialmente coerente, $|g(\tau)|$ decade monotonicamente all'aumentare

di τ , si può definire un valore τ_c che determini la larghezza dell'involuppo della funzione normalizzata di autocorrelazione; per convenzione si pone:

$$\tau_c = \tau : \left[|g(\tau)| = \frac{|g(0)|}{2} \right] \quad (2.3)$$

Quindi τ_c definisce la larghezza a metà altezza (FWHM, Full Width at Half Maximum) del grado di autocorrelazione e viene detto tempo di coerenza dell'onda luminosa. Per $\tau < \tau_c$ le fluttuazioni sono fortemente correlate ovvero, intuitivamente, entro questo tempo di propagazione il fronte d'onda mantiene le sue proprietà.

Nel caso particolare in cui la luce è considerata essere monocromatica, si ha:

$$|g(\tau)| = |\exp(j2\pi\nu\tau)| = 1 \quad \forall \tau$$

che significa che le variabili $E(t)$ e $E(t + \tau)$ sono completamente correlate per ogni ritardo τ e quindi $\tau_c = \infty$.

Poichè però non esistono onde perfettamente monocromatiche si ha sempre un tempo di coerenza finito; tuttavia, considerando un dato sistema ottico, si può considerare che la luce sia effettivamente coerente in esso se la somma dei ritardi temporali introdotti dal sistema sono inferiori al tempo di coerenza dell'onda che lo attraversa.

Equivalentemente si può definire la lunghezza di coerenza della radiazione come la distanza che viene percorsa dall'onda mantenendo le sue proprietà di regolarità:

$$l_c = \tau_c v_p \quad (2.4)$$

2.1.2 Coerenza e densità spettrale di potenza

Secondo il teorema di Wiener–Khinchin, l'autocorrelazione $G(\tau)$ e la densità spettrale di potenza $S(\nu)$ formano una coppia di Fourier:

$$S(\nu) = FT[G(\tau)] = \int_{-\infty}^{+\infty} G(\tau) \exp(-j2\pi\nu\tau) d\tau \quad (2.5)$$

e quindi, dalle note proprietà della trasformata:

$$I = G(0) = \int_0^{\infty} S(\nu) d\nu$$

La densità spettrale di potenza (PSD, Power Spectral Density) è di larghezza finita $\Delta\nu$, definita come FWHM, centrata attorno ad una frequenza centrale ν_0 ; data la relazione tramite Trasformata di Fourier tra $S(\nu)$ e $G(\tau)$, le rispettive larghezza $\Delta\nu$ e τ_c sono tra loro inversamente proporzionali: più lo spettro è ampio, maggiori saranno le componenti spettrali presenti nella radiazione e minore sarà la sua regolarità, quindi minore il suo tempo di coerenza (e lunghezza di coerenza).

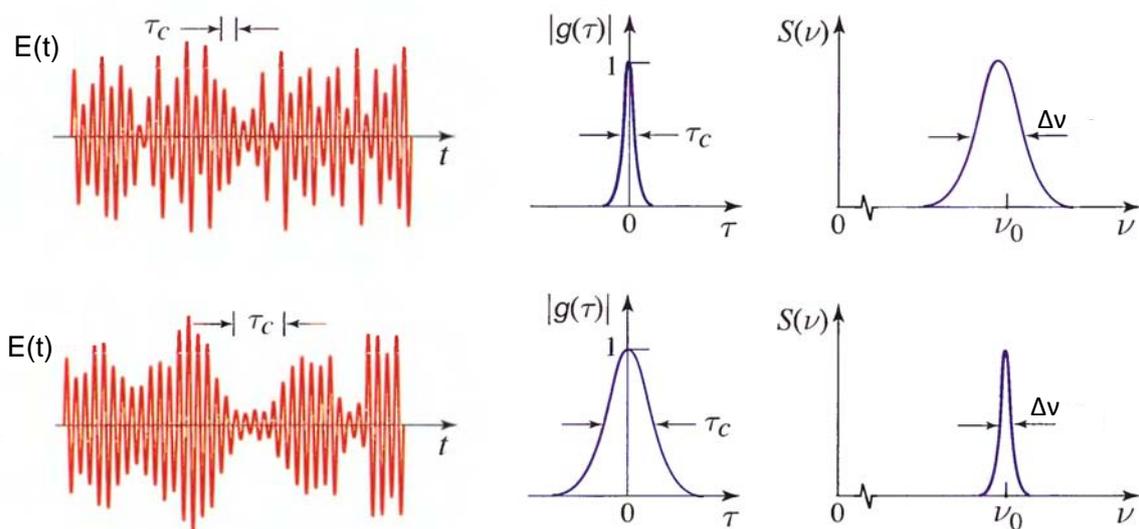


Figura 2.2: I grafici mostrano il confronto tra due radiazioni luminose aventi tempi di coerenza diversi e i rispettivi spettri di potenza.

Le densità spettrali di potenza delle sorgenti luminose attuali sono ben approssimabili tramite una funzione gaussiana. In questo caso si dimostra che la relativa lunghezza di coerenza è data da:

$$l_c = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (2.6)$$

in cui $\Delta \lambda$ è la larghezza spettrale in termini di lunghezza d'onda. Ad esempio, per un LED superluminescente centrato a $\lambda_0 = 820 \text{ nm}$ e con larghezza di banda $\Delta \lambda = 20 \text{ nm}$, la lunghezza di coerenza corrispondente vale $l_c \cong 15 \mu\text{m}$.

Le sorgenti laser invece, essendo a banda molto stretta, emettono luce con una lunghezza di coerenza che può arrivare fino alle centinaia di metri.

Se invece si dispone di una sorgente con densità spettrale di potenza approssimabile da una funzione rettangolare, la relativa lunghezza di coerenza diventa:

$$l_c = \frac{\lambda_{min} \lambda_{max}}{\Delta \lambda} \quad (2.7)$$

in cui λ_{min} e λ_{max} sono gli estremi della finestra rettangolare $\Delta \lambda$.

2.2 Interferenza e Battimento

Quando due o più onde ottiche sono presenti nella stessa porzione di spazio, l'onda totale può essere ricavata mediante il principio della sovrapposizione degli effetti: le ampiezze complesse del campo elettromagnetico si sommano, proprietà derivante dalla linearità dell'equazione delle onde.

Tuttavia l'intensità risultante non risponde a questa semplice legge di addizione ma tiene conto di fattori quali lo sfasamento tra le due onde, la lunghezza di coerenza delle radiazioni e le rispettive frequenze: gli effetti risultanti sono l'interferenza e il battimento.

2.2.1 Interferenza tra onde monocromatiche

Consideriamo due onde monocromatiche: i loro campi elettrici in un certo punto dello spazio \mathbf{r} possono essere descritti dalla relazione che lega l'ampiezza $E_i(\mathbf{r})$, la fase $\phi_i(\mathbf{r})$ e la dipendenza dal tempo t attraverso la frequenza ν , supposta uguale per entrambe:

$$E_i(\mathbf{r}, t) = E_i(\mathbf{r}) \exp [j (2\pi\nu t + \phi_i(\mathbf{r}))] \quad i = 1, 2$$

Sovrapponendo le due radiazioni l'onda totale risultante è anch'essa un'onda monocromatica della stessa frequenza, data dalla somma:

$$E(\mathbf{r}, t) = E_1(\mathbf{r}, t) + E_2(\mathbf{r}, t)$$

In accordo con la definizione data precedentemente, per la quale l'intensità ottica relativa a ciascuna onda è proporzionale al quadrato del modulo del rispettivo campo elettrico, e omettendo per semplicità le dipendenze spaziali e temporali, l'intensità dell'onda totale diventa:

$$\begin{aligned} I &\propto \frac{|E|^2}{2} = \frac{1}{2} [|E_1 + E_2|^2] \\ &\propto \frac{1}{2} [|E_1|^2 + |E_2|^2 + E_1^* E_2 + E_1 E_2^*] \\ &\propto \frac{|E_1|^2}{2} + \frac{|E_2|^2}{2} + \text{Re}[E_1^* E_2] \end{aligned}$$

Sostituendo ora le espressioni dei campi elettrici si ottiene:

$$\begin{aligned} I &\propto \frac{|E_1|^2}{2} + \frac{|E_2|^2}{2} + E_1 E_2 \cdot \text{Re} [\exp (j (\phi_2 - \phi_1))] \\ &\propto \frac{|E_1|^2}{2} + \frac{|E_2|^2}{2} + E_1 E_2 \cos (\phi) \\ &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos (\phi) \end{aligned} \quad (2.8)$$

in cui

$$\phi = \phi_2 - \phi_1$$

Da questa equazione risulta chiaro che l'intensità della radiazione totale non è semplicemente la somma delle singole intensità. È infatti presente anche un ulteriore termine, il termine di interferenza, che può essere positivo o negativo, corrispondente ad un'interferenza costruttiva (aumento dell'intensità totale) o distruttiva (diminuzione dell'intensità totale).

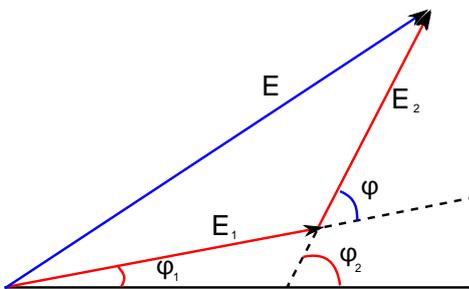


Figura 2.3: Il modulo dell'onda risultante e quindi l'intensità totale dipende dallo sfasamento ϕ .

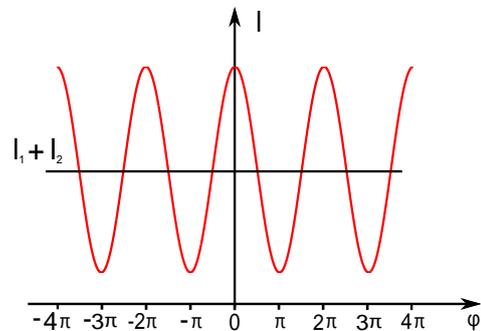


Figura 2.4: Intensità totale in funzione dello sfasamento: minimi per multipli dispari di π , massimi per multipli di 2π .

Nel caso particolare in cui sia $I_1 = I_2 = I_0$, l'equazione (2.8) si semplifica in:

$$\begin{aligned} I &= 2I_0 [1 + \cos(\phi)] \\ &= 4I_0 \cos^2\left(\frac{\phi}{2}\right) \end{aligned} \quad (2.9)$$

portando alle semplici ma notevoli conclusioni per cui:

- se $\phi = 0$ le due onde si sommano in interferenza costruttiva e $I = 4I_0$;
- se $\phi = \pi$ le due onde producono interferenza distruttiva e $I = 0$.

La forte dipendenza dell'intensità ottica dalla fase permette di rilevare con precisione lo sfasamento tra due onde mediante la misura dell'intensità della loro sovrapposizione, principio usato in molti sistemi ottici.

2.2.2 Interferenza e coerenza

Teoricamente l'interferenza, così come appena descritta, è osservabile solo quando la luce è coerente (si erano ipotizzate infatti due onde perfettamente monocromatiche) in quanto, in presenza di luce incoerente (ad ampio spettro), le fluttuazioni casuali di ϕ_1 e ϕ_2 causano uno sfasamento ϕ descrivibile tramite una variabile aleatoria con distribuzione uniforme in $[0, 2\pi]$ e valor medio pari a $E[\phi] = \pi$. Quindi, dalle proprietà statistiche del valore atteso:

$$E[\cos(\phi)] = \int_0^{2\pi} \cos(x) f_p(x) dx = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \cos(x) dx = 0 \quad (2.10)$$

in cui $f_p(x)$ è la funzione densità di probabilità della variabile aleatoria ϕ .

Si ha che mediamente il coseno si annulla ovvero, secondo la (2.8), si annulla il termine di interferenza. Tuttavia si può affermare che l'interferenza può avere luogo "localmente" anche per sorgenti ad ampio spettro, ma solo entro la lunghezza di coerenza associata all'onda luminosa.

Le proprietà statistiche di due onde parzialmente coerenti possono essere descritte attraverso l'estensione delle definizioni (2.1) e (2.2) alla correlazione mutua tra due onde diverse, in una certa posizione \mathbf{r} ad un dato istante t :

$$G_{12} = \langle |E_1^* E_2| \rangle \quad (2.11)$$

$$g_{12} = \frac{G_{12}}{\sqrt{I_1 I_2}} \quad (2.12)$$

Se sovrapposte, l'intensità media della loro somma è:

$$\begin{aligned} I &\propto \frac{1}{2} [\langle |E_1 + E_2|^2 \rangle] \\ &\propto \frac{1}{2} [\langle |E_1|^2 \rangle + \langle |E_2|^2 \rangle + \langle E_1^* E_2 \rangle + \langle E_1 E_2^* \rangle] \\ &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \operatorname{Re}[g_{12}] \\ &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} |g_{12}| \cos(\phi_{12}) \end{aligned} \quad (2.13)$$

in cui ϕ_{12} è la fase del grado complesso di correlazione g_{12} che definisce il termine di interferenza. Dalla (2.13) si può notare che:

- per due onde completamente correlate ($|g_{12}| = 1$) l'equazione si semplifica e si ritrova la (2.8);
- per due onde completamente incorrelate ($|g_{12}| = 0$) l'intensità totale è pari alla somma delle singole intensità ma si annulla il termine di interferenza.
- per due onde parzialmente correlate ($0 < |g_{12}| < 1$) l'intensità normalizzata ha andamento sinusoidale, con ampiezza pari a:

$$V = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} = \frac{2\sqrt{I_1 I_2}}{I_1 - I_2} |g_{12}|$$

detta visibilità, che diventa:

$$V = |g_{12}| \quad (2.14)$$

se $I_1 = I_2 = I_0$.

Se ora, anzichè considerare due onde distinte si considera l'interferenza tra un'onda $E(t)$ e $E(t + \tau)$, sua versione traslata di un ritardo temporale τ , con intensità I_0 si avrà:

$$\begin{aligned} I &= 2I_0 [1 + Re[g(\tau)]] \\ &= 2I_0 [1 + |g(\tau)| \cos(\phi(\tau))] \\ \phi(\tau) &= \arg[g(\tau)] \end{aligned} \quad (2.15)$$

Il termine di interferenza è dunque legato al grado di autocorrelazione $g(\tau)$, ovvero al tempo di coerenza τ_c .

Considerando un'onda piana:

$$E(\mathbf{r}, t) = E_a(t) \exp(j2\pi\nu t)$$

e supponendo che $E_a(t)$ sia una funzione aleatoria (cioè che $E(\mathbf{r}, t)$ rappresenti un'onda parzialmente coerente), la funzione di correlazione con la sua versione traslata sarà:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= G_a(\tau) \exp(j2\pi\nu\tau) & G_a(\tau) &= \langle E_a^*(t) E_a(t + \tau) \rangle \\ g(\tau) &= |g_a(\tau)| \exp[j(2\pi\nu\tau + \phi_a(\tau))] & g_a(\tau) &= |g_a(\tau)| \exp[j\phi_a(\tau)] \end{aligned}$$

Sostituendo l'espressione di $g(\tau)$ nella (2.15) si ottiene:

$$I = 2I_0 [1 + |g_a(\tau)| \cos(2\pi\nu\tau + \phi_a(\tau))] \quad (2.16)$$

che rappresenta il legame tra il ritardo τ e l'intensità del cosiddetto interferogramma, rappresentato in Figura 2.5. La visibilità dell'interferogramma ora varia al variare di τ ed è pari a:

$$V = |g(\tau)| = |g_a(\tau)|$$

Ha quindi il suo picco per $\tau = 0$ (le onde sono tra loro sincronizzate) e decade fino ad annullarsi per $\tau > \tau_c$. L'interferenza quindi accade solo quando il ritardo delle due onde è minore del tempo di coerenza. Se tale ritardo è dovuto ad una differenza spaziale Δl dei percorsi effettuati dalle due versioni dell'onda, l'interferenza si verifica solo quando le lunghezze dei percorsi coincidono entro la lunghezza di coerenza, se e solo se $\Delta l < l_c$.

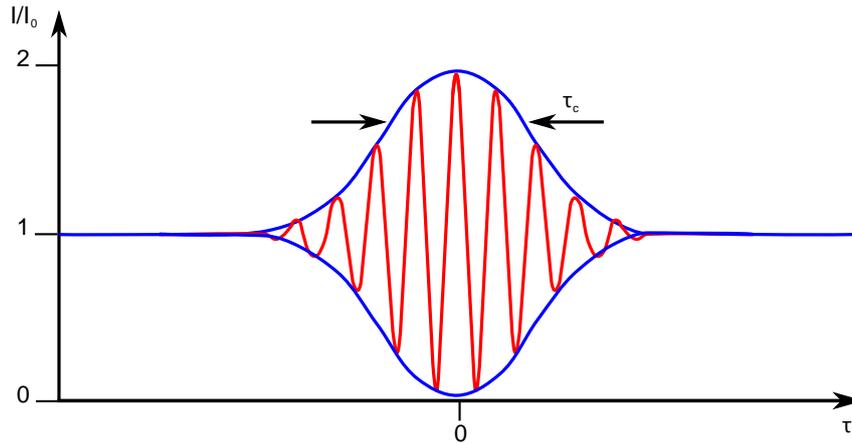


Figura 2.5: Andamento dell'intensità normalizzata in funzione del ritardo τ .

2.2.3 Battimento tra onde aventi frequenze diverse

Consideriamo ora due onde monocromatiche con campi elettrici $E_1(\mathbf{r}, t)$ e $E_2(\mathbf{r}, t)$, frequenze ν_1 e ν_2 e fasi ϕ_1 e ϕ_2 supposte nulle per semplicità.

Seguendo il procedimento precedente, e fissando un punto \mathbf{r} nello spazio, la radiazione ottica ottenuta dalla loro sovrapposizione presenta campo elettrico e intensità pari a:

$$\begin{aligned}
 E(t) &= E_1(t) + E_2(t) \\
 I(t) &\propto \frac{1}{2} [|E(t)|^2 = |E_1(t)|^2 + |E_2(t)|^2 + 2\text{Re}[E_1^* E_2]] \\
 &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos[2\pi(\nu_2 - \nu_1)t]
 \end{aligned} \tag{2.17}$$

L'intensità totale varia quindi con andamento sinusoidale alla frequenza $\nu_{beat} = \nu_2 - \nu_1$, detta frequenza di battimento. Tramite la Figura 2.6 si può visivamente intuire come interferenza costruttiva e interferenza distruttiva si alternino a causa della differenza tra le due frequenze:

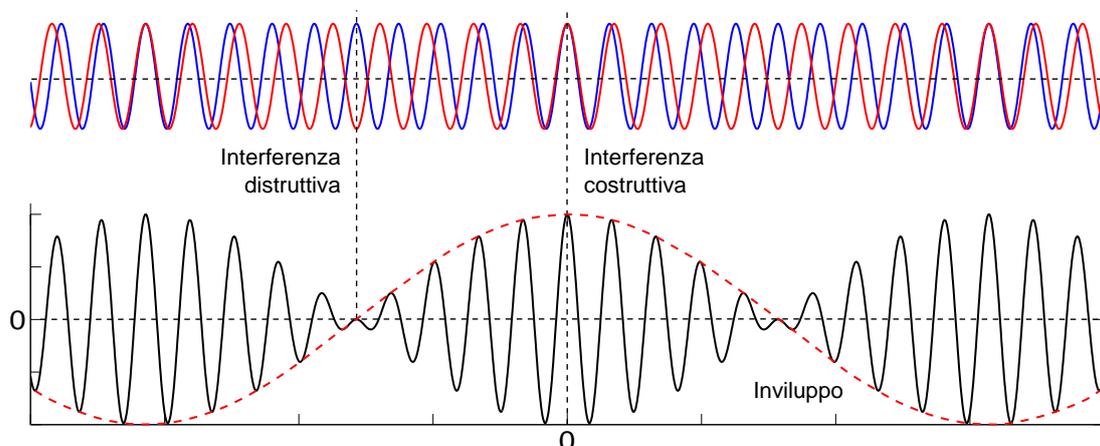


Figura 2.6: Battimento tra due sinusoidi a frequenze diverse.

L'involuppo che si ottiene è effettivamente alla frequenza ν_{beat} e, dato che il fotorivelatore

di area A è sensibile alla potenza ottica:

$$P(t) = \int_A I(\mathbf{r}, t) dA$$

esso rileva un segnale alla frequenza di battimento.

2.3 Interferometria

Nelle sezioni precedenti si è posto l'esempio particolare di interferenza tra un'onda luminosa ed una sua versione traslata di un ritardo temporale τ . Questo può essere ottenuto attraverso un interferometro, cioè un dispositivo ottico che divide la radiazione entrante in due onde, introduce un ritardo relativo facendo percorrere loro due distanze diverse e le dirige verso un altro beam splitter (oppure lo stesso, in base alla configurazione) per misurare l'intensità della loro sovrapposizione.

Esistono varie implementazioni per questo dispositivo e le più comuni in ambito OCT sono l'interferometro Mach-Zehnder e l'interferometro di Michelson:

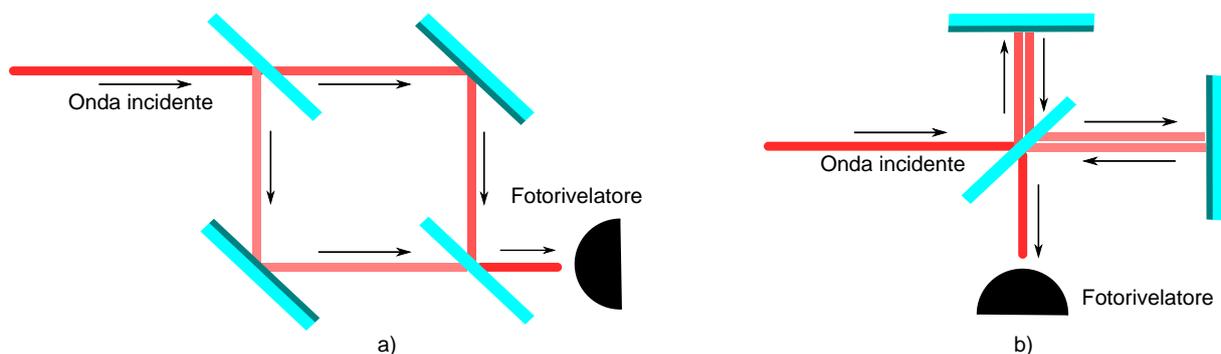


Figura 2.7: Configurazioni interferometri a) Mach-Zehnder e b) di Michelson .

Dato che, come dimostrato nella (2.8), l'intensità risultante dall'interferenza è proporzionale alla fase $\phi = 2\pi d/\lambda$, l'interferometro può essere utilizzato per misurare la differenza di percorso tra le due onde attraverso la misura dell'intensità, ovvero della fase ϕ . Ad esempio, una differenza di distanza tra i due percorsi pari a $d = \lambda/2$ produce uno sfasamento dell'intensità pari a π , sfasamento facilmente osservabile.

2.4 Fasci Gaussiani

Se in prima approssimazione potrebbe sembrare sufficiente caratterizzare la propagazione di un fascio luminoso attraverso lenti e dispositivi ottici tramite l'ottica geometrica (approssimando il percorso con linee rette, i raggi), le applicazioni come OCT necessitano di una descrizione più accurata della radiazione, descrizione fornita dall'ottica gaussiana qui brevemente presentata.

Il fascio gaussiano è una soluzione approssimata dell'equazione di Helmholtz: in esso la potenza è principalmente concentrata in un cilindro che circonda l'asse di propagazione e la distribuzione di intensità viene descritta, in ogni piano trasverso, come una funzione gaussiana centrata nell'asse di propagazione. La larghezza di questa funzione diventa

minima al cosiddetto piano della cintura (o “beam waist”) e diventa maggiore al suo allontanarsi, in entrambe le direzioni, producendo quindi una divergenza del fascio.

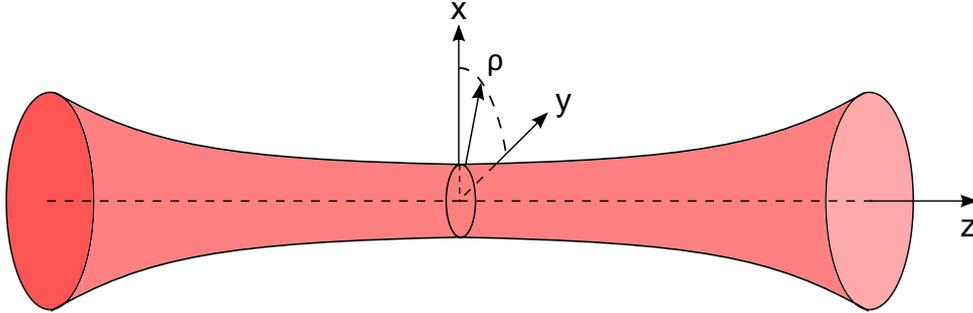


Figura 2.8: Sistema di riferimento e fascio gaussiano.

2.4.1 Parametri descrittivi

L'intensità ottica di un fascio gaussiano è funzione della posizione assiale (lungo \hat{z}) e radiale (lungo $\hat{\rho}$):

$$I(\rho, z) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \cdot \exp \left[-\frac{2\rho^2}{w^2(z)} \right] \quad (2.18)$$

Lungo la direzione di propagazione (fissando $\rho = 0$), l'intensità è esprimibile tramite:

$$I(0, z) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 = \frac{I_0}{1 + (z/z_0)^2} \quad (2.19)$$

Quindi lungo l'asse z l'intensità ha il valore massimo per $z = 0$ e decade gradualmente all'aumentare di z , raggiungendo per $z = z_0$ il valore $\frac{1}{2}I_0$.

Lungo la direzione radiale, cioè per ogni posizione \bar{z} fissata, $I(\rho, \bar{z})$ è una funzione gaussiana il cui massimo viene raggiunto per $\rho = 0$, cioè in corrispondenza dell'asse z , e poi decresce di un valore $1/e^2$ alla distanza radiale $\rho = w(z)$ descritto da:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2} \quad (2.20)$$

Poichè circa l'86% della potenza è contenuta in quest'area, si assume per convenzione che $w(z)$ sia il raggio del fascio alla posizione assiale z . Esso assume il suo valore minimo per $z = 0$:

$$w(0) = w_0 = \text{piano della cintura}$$

e poi aumenta fino a raggiungere nei punti $z = \pm z_0$ il valore $w(\pm z_0) = \sqrt{2}w_0$.

La distanza z_0 viene detta distanza di Rayleigh e il valore

$$2z_0 = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} \quad (2.21)$$

è la profondità di fuoco o parametro confocale del fascio.

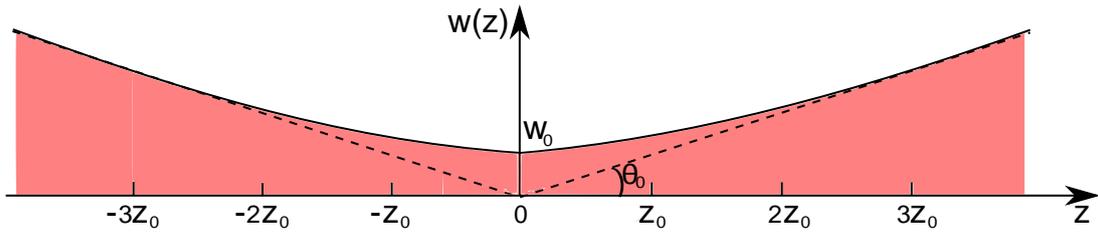


Figura 2.9: Andamento del raggio di un fascio gaussiano e relativi parametri.

Per $z \gg z_0$ la (2.20) si approssima in:

$$w(z) \cong \frac{w_0}{z_0} z = \theta_0 z$$

cioè, a grande distanza, il fascio diverge con un semi-angolo:

$$\theta_0 = \frac{w_0}{z_0} = \frac{\lambda}{\pi w_0} \quad (2.22)$$

Da quest'ultima equazione si evince che diminuendo il waist del fascio w_0 , aumenta la divergenza θ_0 e di conseguenza diminuisce il parametro confocale $2z_0$: come si vedrà in seguito, questa relazione sarà fonte di un importante compromesso relativamente le prestazioni in risoluzione trasversale del sistema OCT.

2.4.2 Trasmissione attraverso una lente

Semplificando la trattazione e le derivazioni delle formule si ha che nell'attraversare una lente posizionata a $z = 0$, il fascio mantiene la sua natura gaussiana: questo significa che l'onda trasmessa è ancora descrivibile dai parametri w'_0, z'_0, θ'_0 , legati ai corrispondenti parametri dell'onda incidente sulla lente, caratterizzata dalla lunghezza focale f

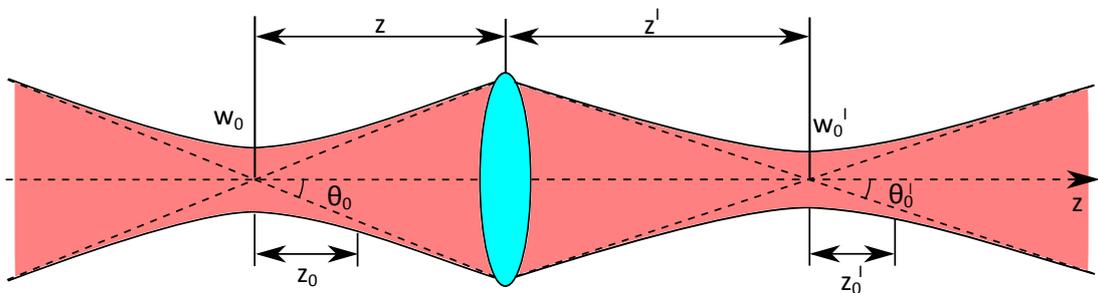


Figura 2.10: Trasmissione di un fascio gaussiano attraverso una lente sottile.

Mentre la larghezza del fascio incidente, in corrispondenza dell'interfaccia d'ingresso della lente, è la stessa del fascio all'interfaccia di uscita, i parametri della radiazione uscenti

sono legati a quelli in ingresso da:

$$w'_0 = Mw_o \quad \text{piano della cintura} \quad (2.23)$$

$$(z' - f) = M^2(z - f) \quad \text{posizione del waist} \quad (2.24)$$

$$2z'_0 = M^2 \cdot 2z_o \quad \text{parametro confocale} \quad (2.25)$$

$$2\theta'_0 = \frac{2\theta_0}{M} \quad \text{divergenza} \quad (2.26)$$

$$M = \frac{M_r}{\sqrt{1 + r^2}} \quad \text{ingrandimento}$$

In cui:

$$M_r = \left| \frac{f}{z - f} \right|$$

$$r = \frac{z_o}{z - f}$$

Sostituendo le espressioni, la posizione $(z' - f)$ può essere scritta come:

$$\frac{z'}{f} - 1 = \frac{z/f - 1}{(z/f - 1)^2 + (z_o/f)^2}$$

Il fascio viene quindi collimato cercando di porre la posizione z' del waist uscente il più lontano possibile dalla lente, ovvero rendendo più piccolo possibile il rapporto z_o/f , quindi utilizzando un fascio incidente con piccola profondità di fuoco o una lente con grande lunghezza focale. Per un dato z_o/f il valore ottimale della posizione z del waist incidente è $z = f + z_o$.

Se invece si pone la lente in corrispondenza del waist incidente, le relazioni (2.23) - (2.26) che caratterizzano il fenomeno si possono semplificare ponendo $z = 0$; il fascio trasmesso è focalizzato con un waist w'_0 alla distanza z' dalla lente pari a:

$$w'_0 = \frac{w_0}{\sqrt{1 + (z_o/f)^2}}$$

$$z'_o = \frac{z_o}{1 + |z_o/f|^2}$$

$$z' = \frac{f}{1 + (f/z_o)^2}$$

Nel caso specifico poi che la profondità di fuoco della radiazione incidente sia molto maggiore della lunghezza focale della lente $z_o \gg f$, il fascio incidente è approssimabile ad un fascio collimato e si hanno le relazioni:

$$w'_0 \cong \frac{f}{z_o} w_0 = \frac{\lambda}{\pi w_0} f \quad (2.27)$$

$$z' \cong f \quad (2.28)$$

Considerando poi che per focalizzare un fascio bisogna garantire la sua intercettazione, il diametro D della lente deve essere almeno il doppio del piano della cintura. Ponendo quindi $D = 2w_0$ e sostituendo nella (2.27) si ottiene che:

$$2w'_0 = \frac{4\lambda}{\pi} F_{\#} \quad (2.29)$$

in cui $F_{\#} = f/D$ è detto F-number della lente.

Tomografia a Coerenza Ottica: Teoria

In questo capitolo verranno affrontate le varie configurazioni possibili per l'implementazione di un sistema OCT, confrontando i parametri che ne determinano le prestazioni e spiegando come i principi fisici precedentemente esposti vengano sfruttati al fine di ottenere il profilo in profondità del campione in esame, nonché un'immagine bidimensionale o tridimensionale.

3.1 Generalità e formazione delle immagini

Sebbene le implementazioni possibili siano diverse, uno schema generale di un sistema OCT può essere il seguente.

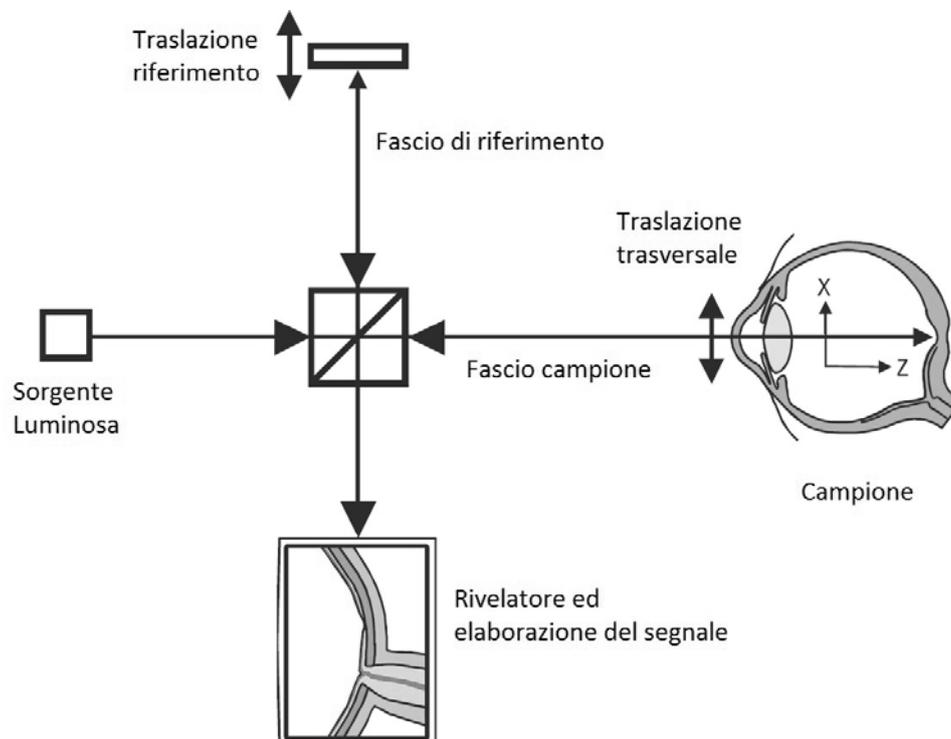


Figura 3.1: Schema generale di un sistema OCT

Il componente principale del sistema è l'interferometro di Michelson (che può essere implementato sia in spazio libero che in fibra, attraverso un accoppiatore direzionale): tramite esso il campo proveniente dalla sorgente luminosa viene diviso tra il ramo di riferimento,

terminato con uno specchio, e il ramo del campione, terminato con l'oggetto da esaminare. I campi E_r ed E_s delle riflessioni generate dai due rami vengono poi ricombinati producendo un segnale di interferenza secondo la (2.16):

$$I \propto \frac{1}{2} [|E_r|^2 + |E_s|^2 + 2E_r E_s |g_{sr}(\tau)| \cos [(\phi_r - \phi_s)]] \quad (3.1)$$

Questo segnale porta le informazioni cercate, riguardanti l'andamento della riflettività del campione lungo l'asse z e ottenendo un profilo delle diverse interfacce presenti all'interno dell'oggetto in esame. Il grafico da esso ottenuto è detto A-scan.

Ripetendo tale procedura per diverse posizioni lungo l'asse trasversale x e unendo i risultati di ogni scansione, si ricava un'immagine bidimensionale detta B-scan. Questo può essere ottenuto sia traslando il campione a diverse posizioni trasversali, sia mediante l'utilizzo di specchi galvanometrici che permettono la deviazione del fascio in un punto diverso della sua superficie.

Attraverso la stessa logica si possono ottenere immagini volumetriche o tridimensionali unendo diversi piani B-scan, acquisiti traslando il fascio incidente o il campione lungo l'altra direzione trasversale y . Il risultato dell'operazione viene detto C-scan.

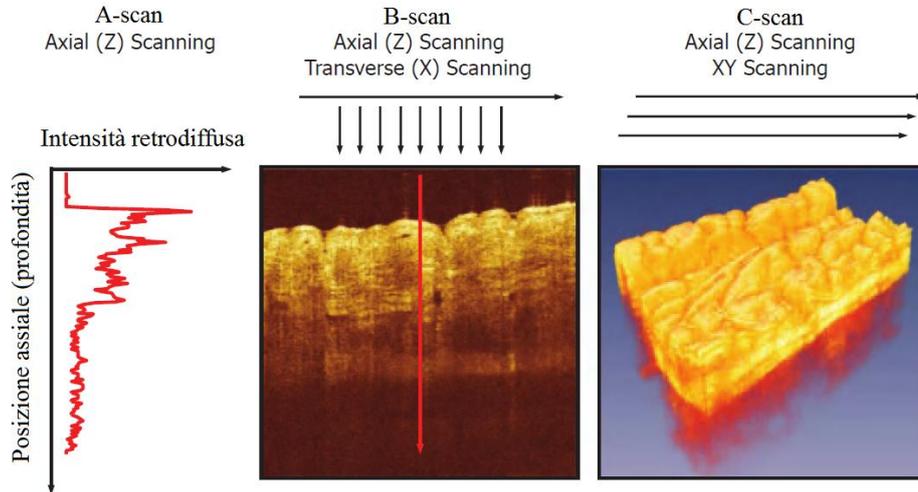


Figura 3.2: Esempi di A-scan, B-scan, C-scan.

Un'altra modalità di formazione dell'immagine è la modalità en-face, ovvero la possibilità di ottenere un piano lungo le direzioni trasversali x e y , ad una determinata profondità z , ovvero un piano frontale del campione.

3.2 Parametri fondamentali

Al fine di poter confrontare le prestazioni di un sistema OCT con quelle di altre tecniche di imaging o confrontare tra loro le varie configurazioni OCT, si devono definire dei parametri caratterizzanti sui quali basare l'analisi.

3.2.1 Lunghezze d'onda di lavoro

La scelta delle lunghezze di lavoro utilizzabili, descrivibili tramite l'intervallo $\Delta\lambda$ attorno alla lunghezza centrale λ_0 , è altamente dipendente dalla natura del campione che si

vuole analizzare. L'interazione luce-materia infatti avviene tramite fenomeni di scattering (diffusione della luce in diverse direzioni aleatorie, effetto maggiore alle piccole lunghezze d'onda) e di assorbimento (acquisizione dell'energia dei fotoni incidenti da parte del materiale, effetto maggiore al crescere della lunghezza d'onda), con un effetto complessivo di attenuazione della potenza incidente in funzione della profondità, limitando anche altre prestazioni come la profondità raggiungibile dalla radiazione.

Per l'utilizzo di OCT in tessuti biologici ricchi di acqua si può scegliere la lunghezza d'onda da utilizzare in base all'assorbimento e definendo così una serie di finestre ottiche:

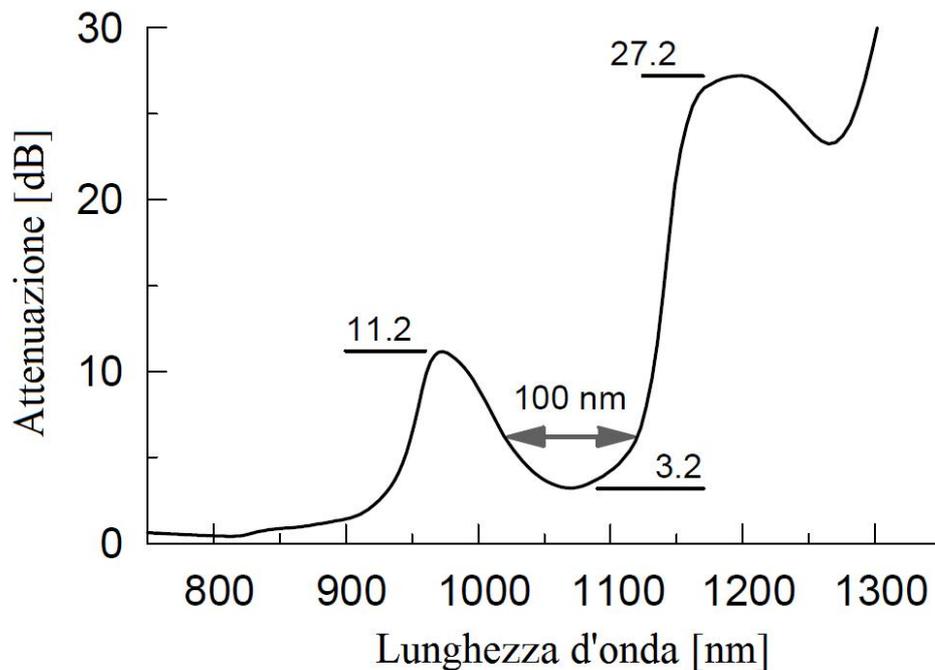


Figura 3.3: Andamento dell'attenuazione dovuta a 50 mm di acqua, in funzione della lunghezza d'onda; 50 mm di acqua corrispondono circa al percorso di andata e ritorno attraverso l'occhio umano [23].

Dalla Figura 3.3 si può vedere come la scelta di lunghezze d'onda comprese tra 750 e 900 nm sia la migliore in ambito oftalmico in quanto l'assorbimento da parte dell'acqua, costituente principale dell'occhio, è ridotto al minimo. I sistemi OCT commerciali a questo fine presentano infatti una lunghezza d'onda centrale attorno a 800 nm. Inoltre, recentemente viene considerata anche la finestra attorno ai 1060 nm per il relativamente basso assorbimento ma soprattutto per il minor scattering rispetto all'intervallo centrato a 800 nm.

Lunghezze d'onda attorno a 1300 nm vengono utilizzate invece per l'imaging di pelle e pareti arteriose in quanto la quantità di acqua presente in questi tessuti è limitata (diminuendo quindi l'assorbimento) così come limitato è lo scattering (perché inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda). Altri valori, dai 1500 ai 1700 nm, potrebbero essere utilizzati per ottenere maggiori profondità in applicazioni in cui l'assorbimento acquoso non è un fattore rilevante.

3.2.2 Risoluzione assiale

Come anticipato nel capitolo introduttivo, la risoluzione assiale determina la capacità di distinguere due diversi punti lungo la direzione longitudinale z ed è uno dei parametri più importanti da considerare.

Essa dipende sostanzialmente dalla sorgente luminosa utilizzata e in particolare è definita come la FWHM (Full Width Half Maximum) della Point Spread Function (PSF), a sua volta data dalla Trasformata di Fourier dello spettro in potenza della sorgente.

Per una sorgente ad ampio spettro, FWHM $\Delta\lambda$, la risoluzione assiale coincide con la lunghezza di coerenza della sorgente; se poi lo spettro di potenza presenta un profilo gaussiano si dimostra che la relativa risoluzione assiale è data da:

$$\Delta z = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{n \Delta\lambda} \quad (3.2)$$

in cui n è l'indice di rifrazione del mezzo considerato.

Per una sorgente invece per cui la forma spettrale è una funzione rettangolare, la risoluzione assiale è definita come:

$$\Delta z = \frac{\lambda_{min} \lambda_{max}}{n \Delta\lambda} \quad (3.3)$$

Essendo la lunghezza di coerenza della sorgente inversamente proporzionale alla banda $\Delta\lambda$, si ha che l'utilizzo di sorgenti a spettro sempre più ampio porta un notevole miglioramento della risoluzione assiale.

Con sorgenti tipiche, quali sono i LED Superluminescenti (SLD), è possibile ottenere una risoluzione assiale di circa $5 \div 10 \mu\text{m}$ in tessuti biologici ($n \cong 1.4$). Con apposite sorgenti è possibile ottenere anche risoluzioni migliori, fino a $1 \mu\text{m}$.

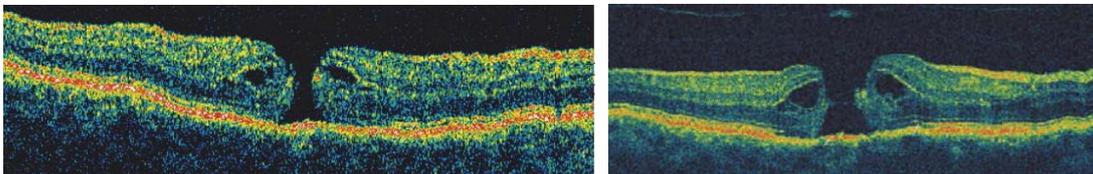


Figura 3.4: Confronto tra due immagini della retina umana con risoluzione assiale di $10 \mu\text{m}$ (a sinistra) e $3 \mu\text{m}$ (a destra).

3.2.3 Risoluzione trasversale

In ambito OCT i meccanismi che determinano risoluzione assiale e risoluzione trasversale sono indipendenti: se la risoluzione assiale è determinata dalla sorgente ottica, la risoluzione trasversale è determinata dalle condizioni di focalizzazione del fascio luminoso sul campione. Essendo infatti definita come la minima distanza con cui si possono distinguere due punti giacenti sullo stesso piano trasversale, tale quantità coincide con il raggio del fascio nel massimo punto di focalizzazione e, considerando un fascio gaussiano, è pari al piano della cintura.

Ricordando quindi la (2.29) la risoluzione trasversale può essere definita come:

$$\begin{aligned} \Delta x &= \frac{\lambda}{\pi w_0} f \\ &\cong \frac{\lambda}{\pi \cdot \text{NA}} \end{aligned} \quad (3.4)$$

in cui w_0 è il raggio del fascio non focalizzato e $NA = 1/(2F_{\#})$ è l'apertura numerica della lente focalizzatrice.

Essendo il fascio focalizzato e incidente sul campione ancora un fascio gaussiano, il suo beam waist è collegato alla profondità di fuoco che, secondo la (2.21), può essere riscritta come:

$$2z_0 = \frac{2n\pi\Delta x^2}{\lambda} \quad (3.5)$$

dove n è ancora l'indice di rifrazione del mezzo considerato.

La relazione (3.5) mette in evidenza il legame tra risoluzione trasversale e profondità di fuoco: utilizzando una lente ad apertura numerica elevata è possibile focalizzare al massimo il fascio sul campione ed avere la miglior risoluzione trasversale. Questo però porta ad una notevole diminuzione della profondità di fuoco, parametro essenziale per ottenere immagini nitide lungo z . Viceversa, facendo uso di una lente a bassa apertura numerica si guadagnerà in profondità di fuoco ma la risoluzione trasversale sarà peggiore.

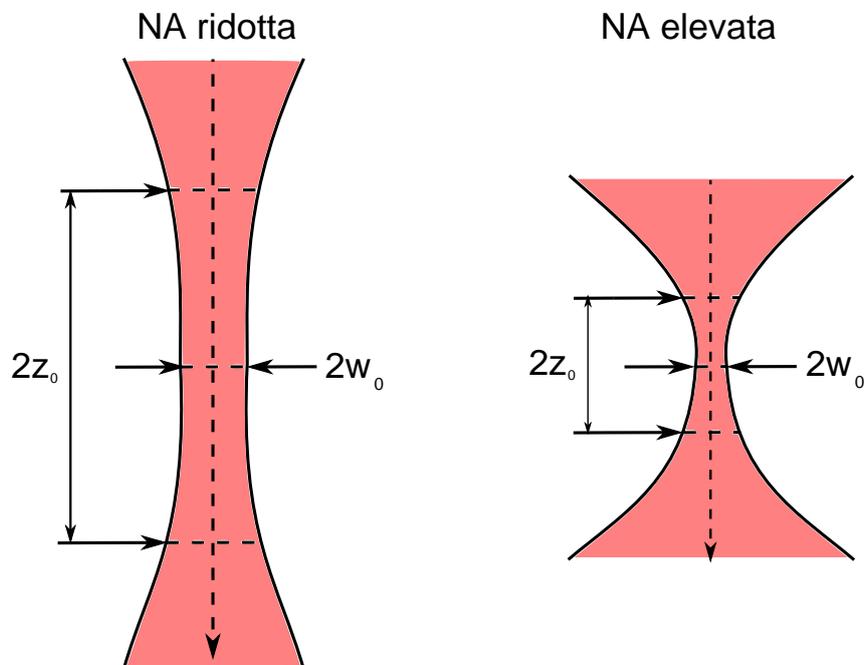


Figura 3.5: Confronto qualitativo tra focalizzazioni tramite aperture numeriche diverse.

Si deve quindi accettare un compromesso tra queste due grandezze: normalmente si preferisce avere una risoluzione trasversale delle decine di μm per avere una profondità di fuoco da 1 a 2 mm.

Sono state comunque sviluppate tecniche che possono in alcuni casi ovviare a tale compromesso: nel focus dinamico ad esempio, si focalizza al massimo lo spot del fascio per ottenere un'immagine nitida solo in un piccolo intervallo spaziale [11]. Nel ricavare il profilo in profondità però il punto di fuoco viene fatto traslare longitudinalmente lungo il campione unendo con opportuni algoritmi le immagini acquisite.

Un'altra tecnica si propone di utilizzare specchi deformabili secondo l'ottica adattiva già sperimentata in campo astronomico, per correggere i fronti d'onda distorti migliorando la nitiditezza dell'immagine finale [12].

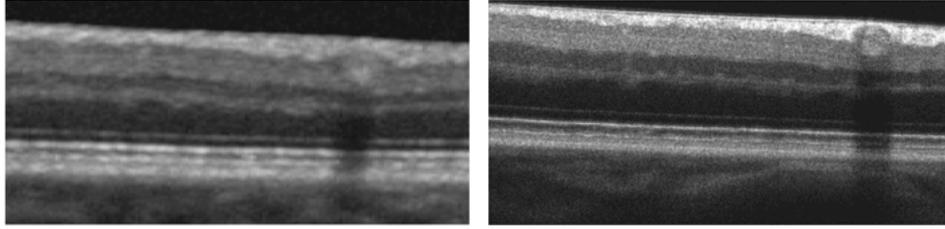


Figura 3.6: Confronto tra B-scan della retina umana ottenuto mediante procedure ordinarie (a sinistra) e mediante ottica adattiva (a destra) [12].

3.2.4 Sensibilità

La sensibilità è definita come il rapporto tra la potenza del segnale generato da uno specchio perfettamente riflettente (riflettività $R = 1$) e quella generata dalla minima riflettività $R_{s,min}$ del campione rilevabile, ovvero la riflessione che genera un segnale di potenza pari alla potenza del rumore. Dato che queste potenze sono proporzionali alle corrispondenti riflettività, vale:

$$S = \frac{1}{R_{s,min}} \quad (3.6)$$

Essa dipende principalmente dall'efficienza di rivelazione e ovviamente dalle sorgenti di rumore presenti nel sistema.

Una grande peculiarità dei sistemi OCT è l'utilizzo di un interferometro, cioè di una misura ad eterodina del segnale di interferenza: dalla (3.1) si può vedere come il termine utile sia proporzionale al prodotto tra i campi dei due rami. Dato che il campo di riferimento può avere un'ampiezza elevata, il segnale normalmente debole proveniente dal campione viene moltiplicato da esso, aumentando l'ampiezza del segnale di interferenza captato dal rivelatore.

Grazie a questa proprietà, i sistemi OCT hanno normalmente una sensibilità di $90 \div 100$ dB, cioè sono in grado di misurare segnali di potenza pari a $10^{-9} \div 10^{-10}$ la potenza ottica incidente.

3.2.5 Velocità di acquisizione

La velocità di acquisizione si riferisce normalmente al tempo impiegato dal sistema a ricavare un profilo in profondità del campione, detto A-scan: una velocità elevata è importante per caratterizzare grandi volumi e può aprire alla possibilità di analisi di fenomeni rapidamente tempo-varianti nonché ridurre le imperfezioni di immagine dovute a inevitabili vibrazioni. Se usato poi in ambito medicale "in vivo", l'OCT deve presentare una velocità adeguata sia per ridurre al minimo la durata dell'esame, sia per evitare che il campione (ad esempio l'occhio umano) si muova durante l'acquisizione.

Un altro vantaggio nell'usare OCT ad alta velocità è l'aumento della massima potenza incidente il campione: essa infatti è sottoposta a norme internazionali che determinano il massimo valore in funzione della lunghezza d'onda e del tempo di esposizione. Diminuendo questo tempo sarà possibile aumentare la potenza e quindi ottenere vantaggi in termini di sensibilità e profondità raggiungibile.

3.3 Metodi di implementazione

Dalla nascita della tecnologia OCT ad oggi sono state studiate e implementate diverse configurazioni, di cui tre sono le principali:

- Time Domain OCT (TD-OCT), la prima sviluppata, in cui si sfrutta una sorgente luminosa ad ampio spettro per ottenere un'interferenza a bassa coerenza (low-coherence interference) al fine di rilevare le varie distanze tra le interfacce interne del tessuto, utilizzando un riferimento mobile;
- Fourier Domain OCT (FD-OCT), in cui l'informazione viene ricavata a partire dallo spettro del segnale di interferenza e il riferimento ha una posizione fissa. Si suddivide a sua volta in:
 - Spectral Domain OCT (SD-OCT), la sorgente utilizzata è ancora una sorgente a banda larga;
 - Swept Source OCT (SS-OCT), in cui la sorgente è un laser (quindi a banda molto stretta) la cui lunghezza d'onda di lavoro viene fatta variare linearmente in un intervallo predefinito $\Delta\lambda$ centrato in λ_0 .

3.3.1 Time Domain OCT

Come anticipato, il sistema TD-OCT sfrutta la low-coherence interference per rivelare la posizione delle diverse interfacce che producono una riflessione della radiazione inviata. Si prenda come riferimento lo schema di Figura 3.7:

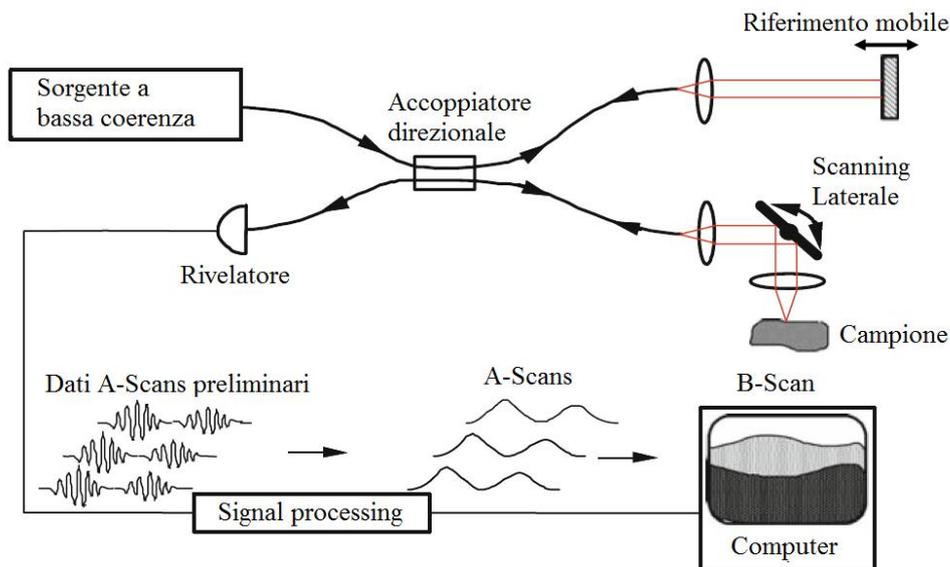


Figura 3.7: Schema di un sistema TD-OCT con implementazione in fibra ottica.

Esso è composto da:

- la sorgente ad ampio spettro, normalmente un LED superluminescente, a bassa coerenza;

- l'interferometro di Michelson, divide in due la radiazione proveniente dalla sorgente per inviarla sia al riferimento che al campione. Inoltre fa interferire i due fasci di ritorno verso il rivelatore;
- un riferimento, normalmente uno specchio, che riflette la radiazione della sorgente all'interno dell'interferometro per confrontarlo con il fascio retrodiffuso dal campione. Questo specchio viene traslato longitudinalmente per una distanza pari alla lunghezza che si vuole analizzare all'interno del campione e definisce la distanza di riferimento l_r ;
- il campione sotto esame, che può essere traslato lungo una direzione trasversale per ottenere un'immagine bidimensionale o lungo entrambe le direzioni trasversali per ottenere un'immagine tridimensionale (in alternativa alla traslazione si possono utilizzare specchi galvanometrici per deviare il fascio); la distanza del campione dall'interferometro è la lunghezza l_s ;
- il rivelatore fotodiodo, trasforma la potenza ottica del fascio risultante dall'interferenza in un segnale elettrico, la fotocorrente $i_{ph}(t)$, al fine di elaborarlo e ottenere le informazioni cercate.

Prima di analizzare l'intero spettro della sorgente si consideri di inviare all'interferometro un'onda monocromatica alla frequenza ν , dunque perfettamente coerente, e di utilizzare come campione un semplice specchio che rifletta tutta la radiazione incidente.

L'interferometro divide in due il fascio proveniente dalla sorgente e lo invia al riferimento e al campione; entrambi riflettono e i fasci che ritornano all'interferometro sono descrivibili tramite:

$$E_r(\mathbf{r}, t) = E_r \cdot \exp[j(2\pi\nu t + \phi_r(\mathbf{r}))] \quad E_s(\mathbf{r}, t) = E_s \cdot \exp[j(2\pi\nu t + \phi_s(\mathbf{r}))]$$

in cui le fasi sono legate alla distanza percorsa dalla relativa onda luminosa:

$$\phi_r(\mathbf{r}) = \beta_r 2l_r = \frac{2\pi}{\lambda_r} 2l_r \quad \phi_s(\mathbf{r}) = \beta_s 2l_s = \frac{2\pi}{\lambda_s} 2l_s$$

dove $\beta_{r,s}$ è la costante di propagazione relativa al mezzo in cui la radiazione si propaga, legata alla lunghezza d'onda $\lambda_{r,s}$, e il fattore 2 è dovuto al considerare il percorso di andata e di ritorno dell'onda, distanza complessivamente doppia rispetto a $l_{r,s}$. Considerando la situazione in spazio libero, le costanti di propagazione nei due rami risultano uguali $\beta_r = \beta_s = \beta$, così come le lunghezze d'onda $\lambda_r = \lambda_s = \lambda$.

Il campo elettrico risultante all'uscita dell'interferometro è la somma dei campi riflessi e l'intensità ad esso associata, ricordando la (2.8), è:

$$\begin{aligned} I &\propto \frac{1}{2} [|E_r|^2 + |E_s|^2 + 2\text{Re}(E_r E_s^*)] \\ &\propto \frac{1}{2} [|E_r|^2 + |E_s|^2 + 2E_r E_s \cos[(\phi_r - \phi_s)]] \\ &= I_r + I_s + 2\sqrt{I_r I_s} \cos\left(2\pi \frac{\Delta l}{\lambda/2}\right) \end{aligned} \quad (3.7)$$

dove Δl è la differenza tra i percorsi compiuti dai due fasci.

Il fotodiodo converte l'intensità ottica in corrente elettrica e, in generale, la sua media temporale è legata al campo elettrico da:

$$I_{ph} = \left\langle \frac{\eta e}{h\nu} \cdot \frac{|E|^2}{2\eta_0} \right\rangle \quad (3.8)$$

dove η è l'efficienza del fotodiode, e è la carica dell'elettrone, $h\nu$ è l'energia di un singolo fotone e η_0 è l'impedenza d'onda. Nel caso di campi monocromatici la (3.8) diventa:

$$I_{ph} = \frac{\eta e}{h\nu \eta_0} \left[\frac{1}{2}|E_r|^2 + \frac{1}{2}|E_s|^2 + E_r E_s \cos \left(2\pi \frac{\Delta l}{\lambda/2} \right) \right] \quad (3.9)$$

da cui si può vedere facilmente la dipendenza dalla differenza Δl tra i percorsi (OPD, Optical Path Difference).

Il termine che descrive l'interferenza è periodico di periodo $\lambda/2$: ogni volta che lo specchio di riferimento viene traslato di questa quantità, il segnale presenta un massimo di intensità ovvero un infinito numero di picchi al variare della OPD Δl , come mostrato in Figura 3.8. Questo sistema, utilizzando una singola onda monocromatica, non può quindi essere sensibile alla profondità.

Se invece la sorgente contiene diverse lunghezze d'onda il suo spettro ha una larghezza $\Delta\lambda$ non trascurabile, allora la configurazione può essere selettiva in profondità: infatti l'equazione (3.9) deve essere applicata per ogni componente monocromatica, quindi presenta periodo diverso a seconda della componente considerata. Questa sovrapposizione, come dimostrato nella (2.10), porta alla cancellazione del segnale complessivo di interferenza al fotodiode per la maggior parte dei valori di Δl .

Tuttavia per $\Delta l = 0$, cioè per distanza relativa tra specchio di riferimento e campione nulla, il termine coseno diventa ininfluenza ad ogni lunghezza d'onda e i segnali corrispondenti alle varie componenti si sommano costruttivamente, dando luogo ad un segnale al fotodiode. Questo fenomeno è dovuto alla cosiddetta "low coherence interference", rappresentata dalla (2.16):

$$I = I_r + I_s + 2\sqrt{I_r I_s} |g_{sr}| \cos \left(2\pi \frac{\Delta l}{\lambda/2} \right) \quad (3.10)$$

in cui g_{sr} è il grado di correlazione tra i campi di riferimento e del campione.

Questo è proprio il principio alla base di TD-OCT: la riflessione avvenuta nel campione viene rilevata solo quando si ha l'interferenza cioè solo quando, nella sua traslazione longitudinale, lo specchio di riferimento si trova ad una distanza pari, entro la lunghezza di coerenza, alla distanza dell'interfaccia che ha causato la riflessione, determinandone così la posizione all'interno del campione.

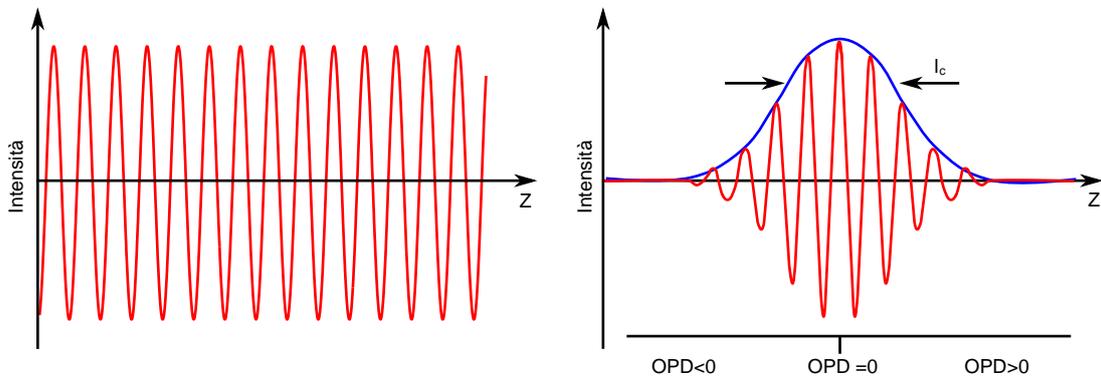


Figura 3.8: Andamento dell'interferenza al variare dell'OPD per onde coerenti (a sinistra) e onde incoerenti (a destra).

In Figura 3.8 si è evidenziato l'involuppo del segnale di interferenza la cui larghezza è

pari alla lunghezza di coerenza l_c della sorgente che, come anticipato nella sezione apposita, è la larghezza dell'involuppo della funzione di autocorrelazione del campo della sorgente.

Questa corrispondenza tra autocorrelazione e segnale di interferenza può essere spiegata anche intuitivamente: se consideriamo che riferimento e campione siano spettralmente uniformi, i campi di ritorno dalle relative riflessioni non si differenziano per la composizione spettrale:

$$E_r(\omega) \approx E_s(\omega) \approx E_{source}(\omega)$$

ma per la distanza compiuta quando giungono alle rispettive riflessioni:

$$E_s(\omega)(l = l_s) \approx E_r(\omega)(l = l_r + \Delta l)$$

e quindi l'interferenza al fotodiodo, proporzionale a

$$Re [E_r(\omega)E_s^*(\omega)] \approx Re [E_{source}(\omega)E_{source}^*(\omega)]$$

non è altro che l'autocorrelazione del campo emesso dalla sorgente, in funzione della differenza complessiva di percorso $2\Delta l$. Di conseguenza la larghezza dell'involuppo del segnale di interferenza è pari alla lunghezza di coerenza della sorgente.

Il teorema di Wiener–Khinchin afferma poi che la densità spettrale di potenza di un segnale corrisponde alla trasformata di Fourier dell'autocorrelazione del segnale stesso: quindi la larghezza dello spettro della sorgente è inversamente proporzionale alla larghezza dell'involuppo dell'autocorrelazione.

Poichè per distinguere due diverse riflessioni interne al campione si deve essere in grado di distinguere i due corrispondenti involuppi del segnale di interferenza (ognuno di larghezza l_c), si ha che la lunghezza di coerenza determina anche la risoluzione assiale del sistema TD-OCT: la sorgente ricopre quindi un ruolo fondamentale nelle prestazioni in termini di risoluzione, maggiore sarà la sua larghezza di banda $\Delta\lambda$, minore sarà l_c e migliore la risoluzione assiale.

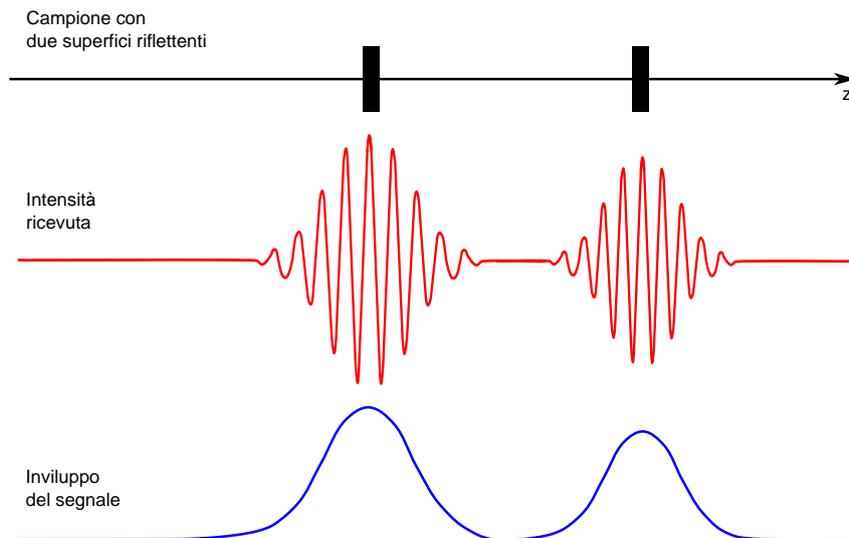


Figura 3.9: Esempio del segnale risultante da un campione che presenta due superfici parzialmente riflettenti: la larghezza di ciascun involuppo è pari alla lunghezza di coerenza.

Per sorgenti con profilo spettrale gaussiano si dimostra che la lunghezza di coerenza, misurata come FWHM (larghezza a metà ampiezza) dell'autocorrelazione, è pari a:

$$l_c = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (3.11)$$

in cui λ_0 è la lunghezza d'onda centrale dello spettro e $\Delta\lambda$ è la FWHM della banda spettrale.

3.3.2 Spectral Domain OCT

Una soluzione alternativa a TD-OCT è SD-OCT, Spectral Domain OCT, in cui l'informazione relativa alla localizzazione delle interfacce di riflessione del campione è codificata nella frequenza del segnale oscillatorio che modula lo spettro della sorgente.

Lo schema, come presentato in Figura 3.10, è molto simile al precedente: si utilizza ancora una sorgente a banda larga (FWHM $\Delta\lambda$) per produrre una radiazione ad alta incoerenza che verrà divisa e inviata al campione ed allo specchio di riferimento; i segnali di riflessione vengono fatti interferire e l'uscita dell'interferometro viene mandata ad uno spettrometro. A questo punto un reticolo di diffrazione separa spazialmente le diverse componenti spettrali, qui rappresentate nel dominio delle pulsazioni ω , che vengono rilevate da un array di sensori CCD al fine di rilevare lo spettro del segnale di interferenza.

Si noti che in questa configurazione la traslazione longitudinale dello specchio di riferimento è eliminata, in quanto l'informazione viene acquisita simultaneamente per ogni riflessione interna, annullando anche fattori come vibrazioni meccaniche o incertezze spaziali presenti in TD-OCT.

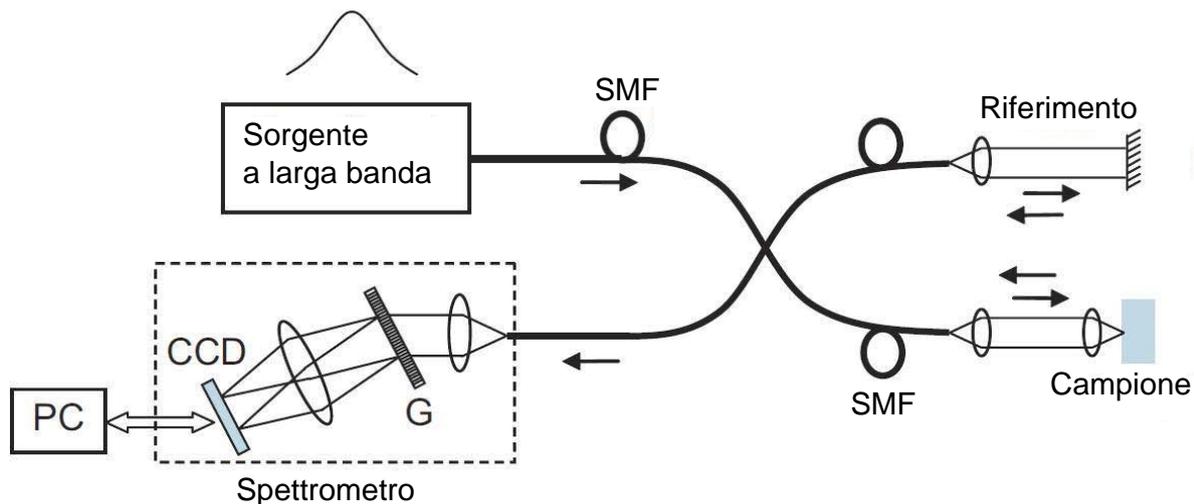


Figura 3.10: Schema di un sistema SD-OCT in cui si evidenzia la sorgente a larga banda, la posizione fissa dello specchio di riferimento e l'uso dello spettrometro.

Si consideri per semplicità iniziale che nel campione si verifichi una sola riflessione alla profondità $z_0 = l_s - l_r$, ovvero che l'OPD relativa sia $\Delta l = |l_s - l_r|$; all'uscita dell'interferometro

l'intensità rilevata dallo spettrometro, ad una fissata pulsazione ω , sarà:

$$\begin{aligned}
I(\omega) &= I_r(\omega) + I_s(\omega) + 2\sqrt{I_r(\omega)I_s(\omega)} \cdot \cos[\phi_s(\omega) - \phi_r(\omega)] \\
&= I_r(\omega) + I_s(\omega) + 2\sqrt{I_r(\omega)I_s(\omega)} \cdot \cos\left(\omega \frac{2\Delta l}{c}\right) \\
&= \left[|a_r|^2 + |a_s|^2 + 2a_r a_s \cos\left(\omega \frac{2\Delta l}{c}\right)\right] S(\omega)
\end{aligned} \tag{3.12}$$

in cui si sono sfruttate le relazioni:

$$\begin{aligned}
\phi_{s,r}(\omega) &= \beta(\omega)2l_{s,r} = \omega \frac{2l_{s,r}}{c} \\
\frac{I_s(\omega)}{|a_s|^2} &\approx \frac{I_r(\omega)}{|a_r|^2} \approx S(\omega)
\end{aligned}$$

Il fattore $2l_{s,r}$ deriva dal considerare sia il percorso di andata che di ritorno dei fasci luminosi, $|a_{s,r}|^2$ sono le ampiezze delle intensità dei segnali provenienti rispettivamente da campione e riferimento, $S(\omega)$ è lo spettro normalizzato della sorgente utilizzata alla pulsazione considerata. In questo modo si è diviso l'ampiezza delle intensità dalla loro dipendenza da ω , ovvero dalla loro forma spettrale. Questa operazione è derivata dalla realistica ipotesi che nel campione non ci siano particolari assorbimenti determinanti variazioni della composizione spettrale.

Il segnale rappresentato dalla (3.12) viene mandato al reticolo di diffrazione in cui si effettua la separazione spaziale delle componenti spettrali. L'intensità registrata è dunque uno spettro in frequenza con andamento sinusoidale, modulata dallo spettro del segnale della sorgente, in cui l'informazione della profondità è contenuta nell'oscillazione: dalla (3.12) si nota infatti che il periodo dell'oscillazione frequenziale, cioè del termine coseno, è pari a:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{c}{2\Delta l}$$

e quindi la sua valutazione può essere effettuata attraverso la Trasformata di Fourier.

La Figura 3.11 mostra graficamente i passi del principio utilizzato per rivelare l'OPD cercata. Si noti che per passare dal segnale $I(\omega)$ al segnale $I_u(\omega)$, detto interferogramma, si è sottratto il termine

$$\left[|a_r|^2 + |a_s|^2\right] S(\omega) = I_r(\omega) + I_s(\omega)$$

in quanto indipendente da τ (o equivalentemente Δl), esso rappresenta quindi una componente "continua".

Sebbene quest'ultimo passaggio sia chiaramente utile, esso può essere considerato superfluo e quindi omesso: il termine $I_r(\omega) + I_s(\omega)$ apparirà allora nel segnale di informazione finale, come un picco centrato a $\tau = 0$ e corrispondente all'autocorrelazione dello spettro della sorgente.

A parte questa componente continua, il segnale finale sarà:

$$FT^{-1}[I_u(\omega)] = G_{sr}(t - \tau) + G_{sr}(-t - \tau) \tag{3.13}$$

in cui la funzione $G_{sr}(t)$ è il prodotto di correlazione tra il campo di riferimento e il campo del campione.

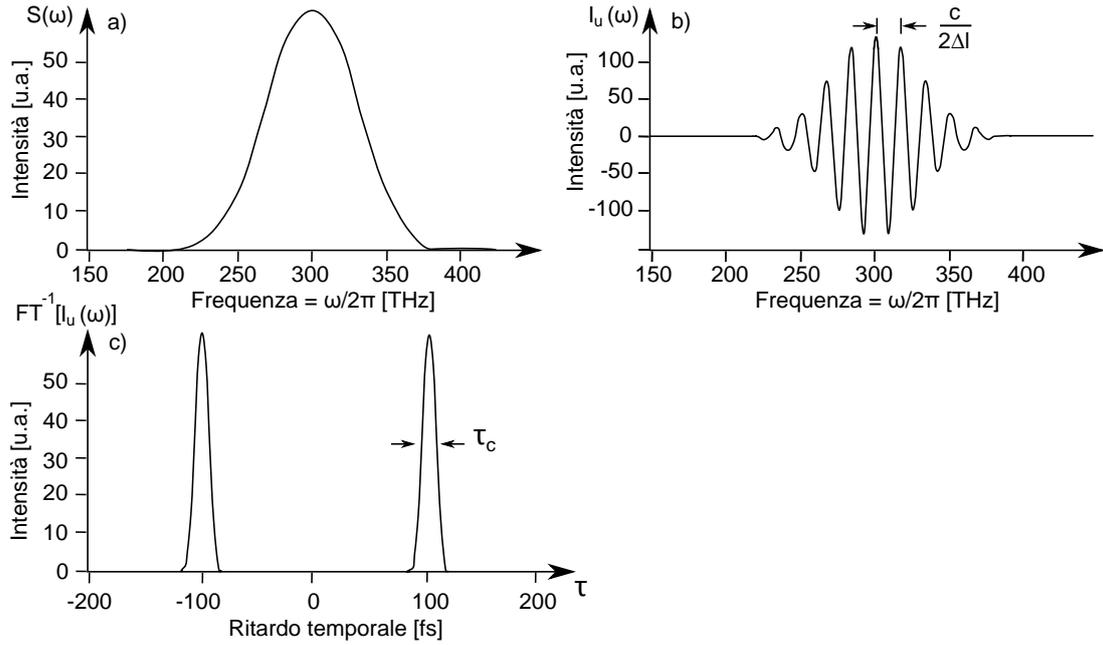


Figura 3.11: Schematizzazione grafica del procedimento utilizzato per ricavare un A-scan da una singola interfaccia mediante SD-OCT.

Come detto precedentemente, assumendo che non ci siano nel campione particolari assorbimenti tali da indurre una sostanziale modifica della forma spettrale, i segnali $I_r(\omega)$ e $I_s(\omega)$ si differenziano per il ritardo relativo τ , direttamente collegato alla OPD Δl , che viene appunto evidenziato dal prodotto di correlazione $G_{sr}(t) \cong G_{source}(t)$.

Nel caso generale in cui si abbia più di una riflessione si avranno interferogrammi spettrali a più componenti: la trattazione matematica comunque non cambia in quanto tramite la Trasformata di Fourier è possibile rivelare ciascuna “componente temporale” e quindi le singole localizzazioni delle riflessioni avvenute.

Dalla Figura 3.11 c) si intuisce che la risoluzione assiale del sistema è data dalla larghezza temporale (o spaziale se si convertono le espressioni in funzione di Δl) della funzione $G_{source}(t)$: essendo questa funzione il prodotto di correlazione tra i due segnali dunque, fondamentalmente, la Trasformata di Fourier inversa dello spettro della sorgente, tale risoluzione assiale coincide ancora con la lunghezza di coerenza l_c della sorgente, equivalentemente al caso TD-OCT. Una migliore risoluzione assiale si ha quindi utilizzando una sorgente con larghezza di banda $\Delta\omega$, o equivalentemente $\Delta\lambda$, elevata.

Si noti inoltre che la (3.13) fornisce anche una versione dell’informazione a ritardi τ negativi: essendo $I_u(\omega)$ un segnale reale, la sua elaborazione tramite Trasformata di Fourier fornisce un segnale Hermitiano creando quindi un’immagine simmetrica del profilo di profondità. Questo, nel caso in cui lo specchio di riferimento sia più lontano dall’interferometro rispetto al campione, produce la sovrapposizione delle due immagini simmetriche impedendo una corretta analisi della struttura in osservazione. Altro fattore di degradazione dell’analisi del profilo assiale del campione è costituito dalle diverse riflessioni non volute che avvengono all’interno degli strumenti di misura, fattore denotato come “coherence noise”. In Figura 3.12 viene mostrato un possibile profilo assiale ottenuto tramite FD-OCT in cui si evidenziano coherence noise, il contributo del termine in continua e il decadimento della sensibilità in relazione alla profondità.

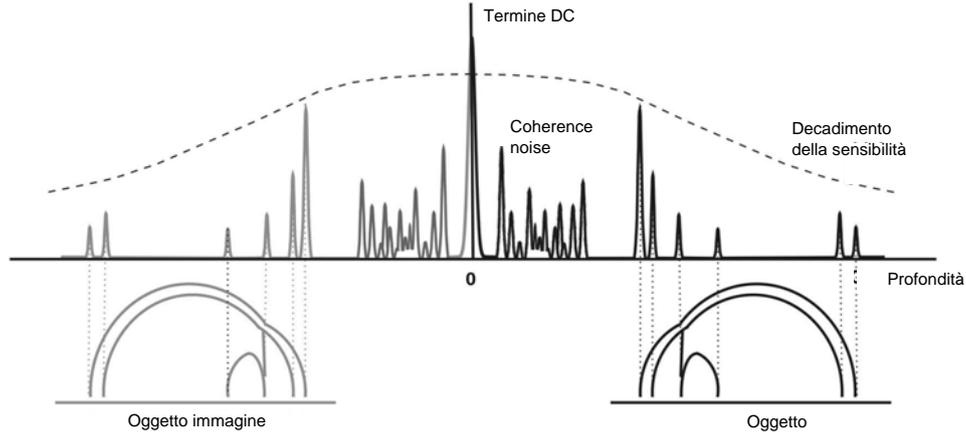


Figura 3.12: Possibile A-scan tramite SD-OCT in cui si evidenziano i contributi utili del campione e i contributi rumorosi.

3.3.3 Swept Source OCT

Un altro esempio di configurazione OCT che sfrutta l'interferometria nel dominio della frequenza è costituito da Swept Source OCT (SS-OCT) che, come SD-OCT, presenta tra i vantaggi una maggiore sensibilità rispetto a TD-OCT.

In questo caso però, i dati di intensità non vengono ottenuti simultaneamente attraverso l'uso di una sorgente ad ampio spettro ed uno spettrometro ma vengono registrati sequenzialmente, illuminando l'interferometro con un laser a banda stretta a frequenza tunabile e rilevando l'intensità in uscita dal sistema attraverso un singolo fotodiodo.

Un ramo dell'interferometro è collegato allo specchio di riferimento, fisso, mentre l'altro ramo è rivolto all'oggetto da esaminare: la luce riflessa da riferimento e campione viene sovrapposta al rivelatore. Poiché la lunghezza di coerenza del laser è molto più grande della OPD, le due onde possono interferire costruttivamente e, dato che i tempi di propagazione nei due rami sono diversi, le radiazioni che giungono simultaneamente al rivelatore sono state immesse nell'interferometro in tempi diversi.

A causa della modulazione (supposta lineare) della lunghezza d'onda della sorgente, queste frequenze differiscono di una quantità proporzionale all'OPD: dopo il fotodiodo verrà visualizzata la frequenza di battimento il cui picco nel dominio spettrale, nel caso di singola riflessione da parte dell'oggetto, porta al rilevamento della posizione del campione rispetto al riferimento.

Il laser tunabile dunque genera un segnale la cui frequenza $\nu(t)$ varia linearmente nel tempo, detto anche segnale "chirp" [2]:

$$\begin{aligned} E_{so}(t) &= E_{so} \cdot \exp [j2\pi\nu(t)t] \\ &= E_{so} \cdot \exp [j\omega(t)t] \end{aligned} \quad (3.14)$$

in cui la pulsazione $\omega(t)$ varia linearmente in un intervallo di lunghezza temporale T :

$$\omega(t) = \omega_{in} + mt \quad (3.15)$$

$$\omega_{in} = \omega(t = 0)$$

$$\omega_{fin} = \omega(t = T)$$

$$m = \frac{d\omega}{dt} = \text{chirp rate} \quad (3.16)$$

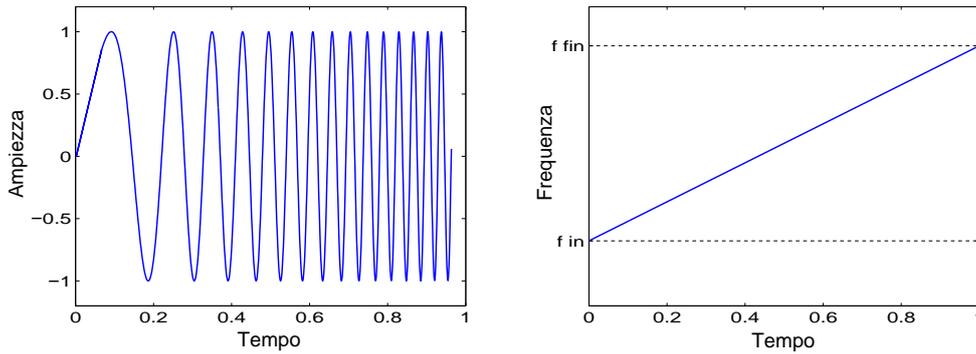


Figura 3.13: Segnale chirp e andamento temporale della sua frequenza.

Si consideri dunque lo schema di Figura 3.14 in cui ancora una volta si considera che il campione, posto ad una distanza l_s dall'interferometro, costituisca una singola riflessione ad una distanza relativa dallo specchio di riferimento (OPL) di lunghezza $\Delta l = |l_s - l_r|$:

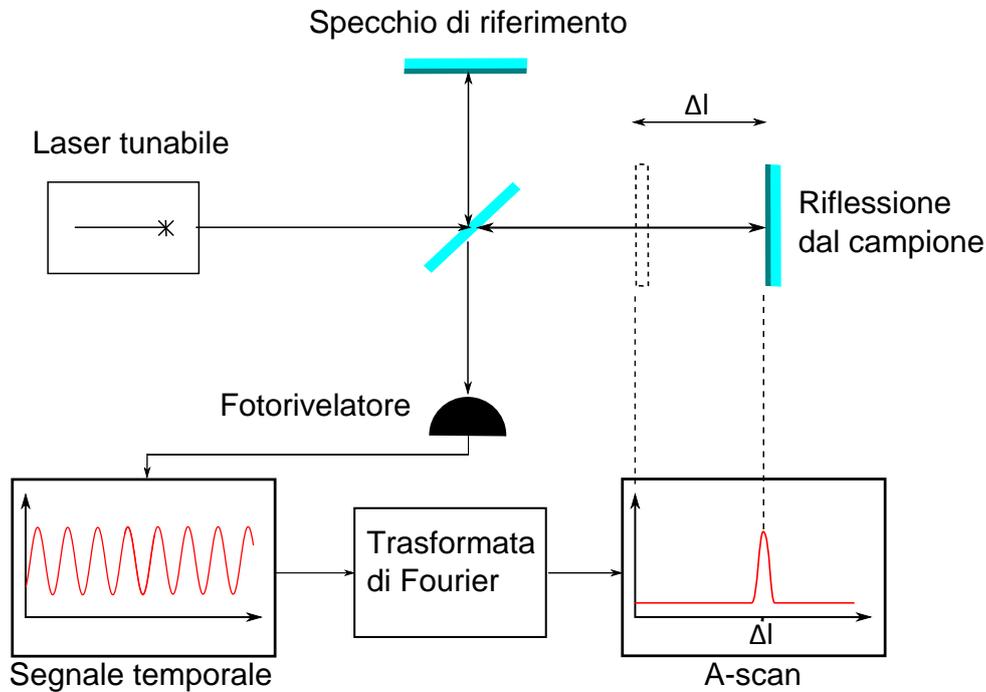


Figura 3.14: Schema di un sistema SS-OCT.

All'istante $t = t_i$ il laser emette la pulsazione istantanea $\omega(t_i)$: l'onda associata a tale frequenza verrà inviata al campione in esame (oltre che allo specchio di riferimento) per essere riflessa e ritornare all'interferometro all'istante $t = t_i + 2t_s$, essendo $2t_s$ il tempo impiegato per compiere un percorso di andata e ritorno di lunghezza $2l_s$.

In questo istante essa collide con l'onda proveniente dallo specchio di riferimento: essendo però la frequenza emessa dal laser variabile nel tempo ed essendo il percorso $2l_r$ per ipotesi minore a $2l_s$, la radiazione di riferimento sarà associata ad una frequenza diversa e in particolare le onde avranno pulsazioni ω_s e ω_r :

$$\omega_s = \omega(t_i)$$

$$\omega_r = \omega(t_i + 2t_s - 2t_r) = \omega(t_i + \tau)$$

in cui il valore τ corrisponde al tempo impiegato per percorrere la distanza OPL Δl in andata e ritorno alla velocità c :

$$\tau = \frac{2\Delta l}{c}$$

All'interferometro, all'istante $t = t_i + 2t_s$, si genera quindi il fenomeno del battimento e, secondo la (2.17), l'intensità risultante sarà un segnale alla pulsazione di battimento:

$$\begin{aligned}\omega_b &= \omega_r - \omega_s = [\omega_{in} + m(t_i + \tau)] - (\omega_{in} + mt_i) \\ &= m\tau \\ &= m \cdot \frac{2\Delta l}{c}\end{aligned}\tag{3.17}$$

dunque un segnale la cui frequenza è direttamente collegata all'OPD. Il fotodiodo genererà quindi un segnale elettrico alla pulsazione ω_b [9, 10].

Essendo l'informazione su Δl contenuta nell'oscillazione di un segnale nel tempo, cioè nella sua frequenza, questa distanza può essere rilevata tramite la Trasformata di Fourier: la posizione del picco risultante sull'asse delle frequenze di battimento ω_b determina tramite la (3.17) il valore di Δl , mentre la sua ampiezza determina la potenza di ritorno della riflessione ovvero il modulo del coefficiente di riflettività dell'interfaccia in esame. Nel caso di più riflessioni dal campione, il segnale di interferenza conterrà più di una frequenza di battimento $\omega_{b,i}$, ognuna di esse collegata alla relativa OPD Δl_i dell' i -esima interfaccia di riflessione. Tramite Trasformata di Fourier sarà nuovamente possibile visualizzare nel dominio della frequenza i relativi picchi e per ognuno determinarne posizione e ampiezza.

3.3.4 OCM

Anche se le tecniche OCT possono fornire immagini con risoluzione assiale molto alta, la risoluzione trasversale spesso non è adatta a rivelare strutture cellulari o sub-cellulari, a causa del compromesso risoluzione-profondità di fuoco.

Una variante della tecnica però, detta OCM -Optical Coherence Microscopy-, prevede di utilizzare la massima risoluzione trasversale del sistema di lenti a discapito della profondità di fuoco. Questo però per produrre immagini en-face, ovvero immagini del piano frontale del campione, ottenendo in esso risoluzioni tali da essere comparabili con altre tecniche di microscopia.

Spostando poi il campione lungo l'asse longitudinale z si può ottenere un altro piano su cui eseguire la scansione e quindi, unendo tali piani, un'immagine tridimensionale di piccoli volumi.

3.4 Confronto tra le configurazioni

Dato che la configurazione TD-OCT è stata la prima ad essere implementata, nel corso degli anni varie migliorie sono state effettuate fino a giungere alle configurazioni nel dominio della frequenza. Si prenda come riferimento il sistema TD-OCT: in esso, ad ogni A-scan, lo specchio viene fatto tralciare per una distanza uguale alla profondità che si vuole (o che si può) raggiungere z_{depth} . Per un dato tempo di scansione T , si intuisce che il sistema offre solo un tempo

$$t_i = \frac{l_c}{z_{depth}} T\tag{3.18}$$

per raccogliere il segnale di interferenza dalla i -esima superficie, cioè la configurazione utilizza solo un numero limitato di fotoni utili nonostante il ricevitore stia sempre acquisendo potenza ottica, limitando la sensibilità complessiva.

Utilizzando le configurazioni nel dominio della frequenza lo specchio è fisso e i segnali relativi all'interferenza a varie profondità vengono acquisiti simultaneamente: questo permette un pieno utilizzo di tutti i fotoni relativi alle singole interfacce, con conseguente aumento della sensibilità. Questo porta anche ad un aumento della velocità di acquisizione raggiungibile dal sistema e di conseguenza a ulteriori possibilità di imaging quali la creazione di video da immagini OCT, per monitorare eventi tempo-varianti.

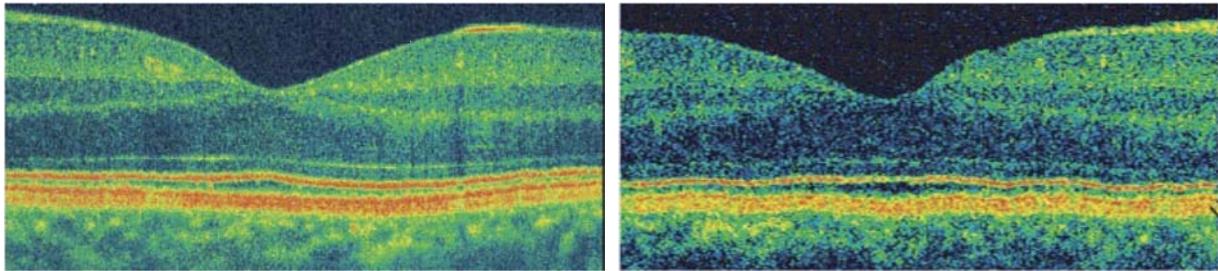


Figura 3.15: Immagini della retina umana ottenute con TD-OCT (a sinistra) e SD-OCT (a destra) [15].

Il metodo SS-OCT cerca di unire la sensibilità raggiunta con SD-OCT con la semplicità hardware di TD-OCT. Infatti mentre in SD-OCT la ricezione del segnale viene affidata ad un array di sensori CCD e uno spettrometro, seguita da elaborazioni numeriche, in SS-OCT viene effettuata tramite un singolo fotorivelatore, trasferendo la complessità del sistema alla sorgente laser che deve spazzolare un ampio intervallo di frequenze. Proprio perché SS-OCT utilizza una sorgente a banda (istantanea) molto stretta, esso è meno esposto all'effetto degradante della dispersione. Nell'utilizzare una sorgente a largo spettro la dipendenza della costante di propagazione dalla lunghezza d'onda, attraverso l'indice di rifrazione del mezzo, si fa maggiormente sentire; di conseguenza lunghezze d'onda diverse viaggiano a velocità diverse con un effetto totale di allargamento dell'effettiva lunghezza di coerenza e conseguente degradazione della risoluzione assiale. Tale dispersione può essere compensata [22], introducendo materiali come vetro BK7 o acqua nel ramo di riferimento oppure applicando appositi algoritmi software.

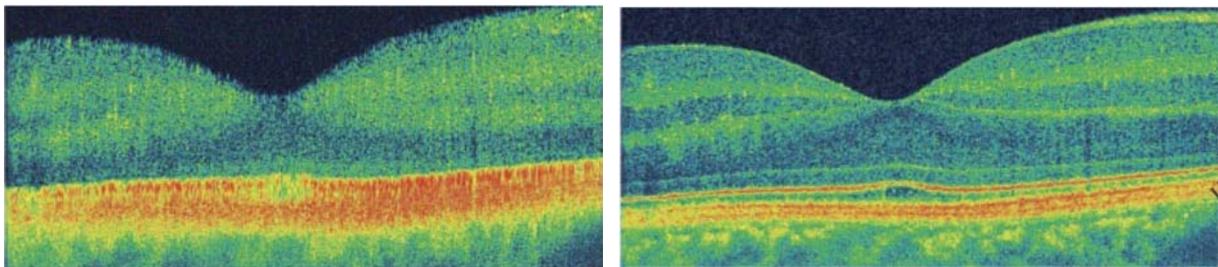


Figura 3.16: Immagini della retina umana prima (a sinistra) e dopo (a destra) compensazione della dispersione [22].

Progetto e setup sperimentale

In questo capitolo si presentano i singoli componenti del setup che permette la realizzazione della tecnica SS-OCT e, potenzialmente, della tecnica SS-OCM. Un componente fondamentale è l'Optical Backscatter Reflectometer 4600 (OBR, Luna Inc.) che, contenendo la sorgente ottica, determina il range di spazzolata in lunghezze d'onda del laser e quindi anche la risoluzione assiale della misura finale.

In particolare questo range è centrato attorno ad una lunghezza d'onda di 1566.75 nm, insolita nei sistemi OCT classici ma obbligata data la disponibilità dello strumento. Tale valore influenzerà la scelta dei componenti e le prestazioni finali raggiungibili.

Inoltre verranno descritte le configurazioni finali e i rispettivi parametri.

4.1 Descrizione dei componenti

4.1.1 Lenti

La scelta per la composizione del sistema ottico è caduta su di una coppia di lenti uguali, AC254-060-C-ML (Thorlabs Inc.), le cui caratteristiche principali per ogni singola lente sono:

- doppietto acromatico;
- diametro $d = 25.4$ mm;
- lunghezza focale nominale $f = 60$ mm;
- apertura numerica $NA = 0.22$;
- materiali N-LAK22/N-SF6HT;
- rivestimento anti-riflessione (AR) per lunghezze d'onda nell'intervallo $\lambda \in [1050 \div 1620]$ nm

Il rivestimento AR gioca un ruolo importante nella scelta delle ottiche in quanto le superfici delle lenti trattate con esso consentono di diminuire la parte di potenza inevitabilmente riflessa dalla superficie stessa, permettendo anche a piccoli segnali di passare attraverso il dispositivo senza considerevoli attenuazioni dovute a riflessioni indesiderate.

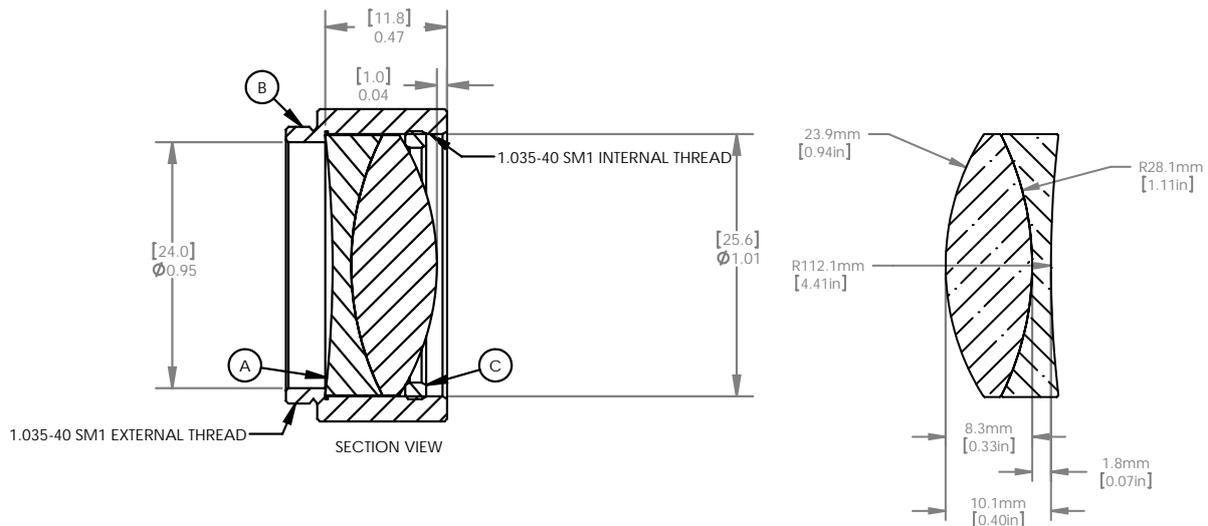


Figura 4.1: Dimensioni fisiche della lente.

Le lenti utilizzate sono inoltre doppietti acromatici, formate cioè da due materiali diversi (vetro N-LAK22 seguito da vetro N-SF6HT) al fine di diminuire l'aberrazione cromatica che si avrebbe utilizzando un singolo elemento. Questo porta ad una diminuzione del cosiddetto "focal shift", la traslazione del punto di fuoco in funzione della lunghezza d'onda incidente di lavoro.

Dato che il sistema che si vuole costruire lavorerà su di un ampio range di lunghezze d'onda, questa proprietà è fondamentale per cercare di mantenere la posizione del waist del fascio incidente sul campione il più costante possibile. Il focal shift per ogni lente, dichiarato dalla casa costruttrice, è visualizzato in Figura 4.2.

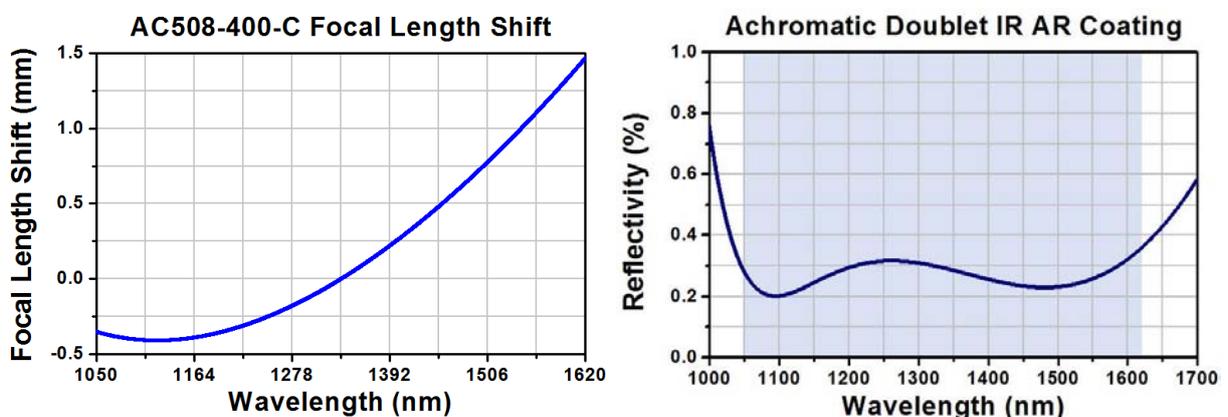


Figura 4.2: Grafici per focal shift (a sinistra) e rivestimento AR (a destra) per la singola lente.

4.1.2 Optical Backscatter Reflectometer

Il dispositivo OBR è stato sviluppato da Luna Technologies Inc. come strumento che utilizza un laser sintonizzabile e la tecnica OFDR per rilevare riflessioni e perdite all'interno di un collegamento in fibra ottica. Semplificando, esso misura i tempi di ritorno del fascio inviato nel dispositivo in esame (DUT, Device Under Test) e li confronta con quelli di ritorno da un riferimento fisso: la loro sovrapposizione causa una variazione della frequenza del segnale risultante rilevata tramite Trasformata di Fourier, variazione proporzionale al

ritardo τ e quindi alla distanza tra riferimento e luogo della riflessione all'interno di DUT. Questa misura temporale viene quindi convertita in misura spaziale tramite la relazione

$$z = \frac{c}{2n}\tau$$

in cui c è la velocità della luce nel vuoto, n è l'indice di rifrazione di DUT, z è la distanza all'interno di DUT in cui ha avuto luogo la riflessione.

Lo strumento fornisce sullo schermo del computer ad esso collegato la traccia in funzione della distanza calcolata, evidenziando le posizioni delle varie riflessioni incontrate.

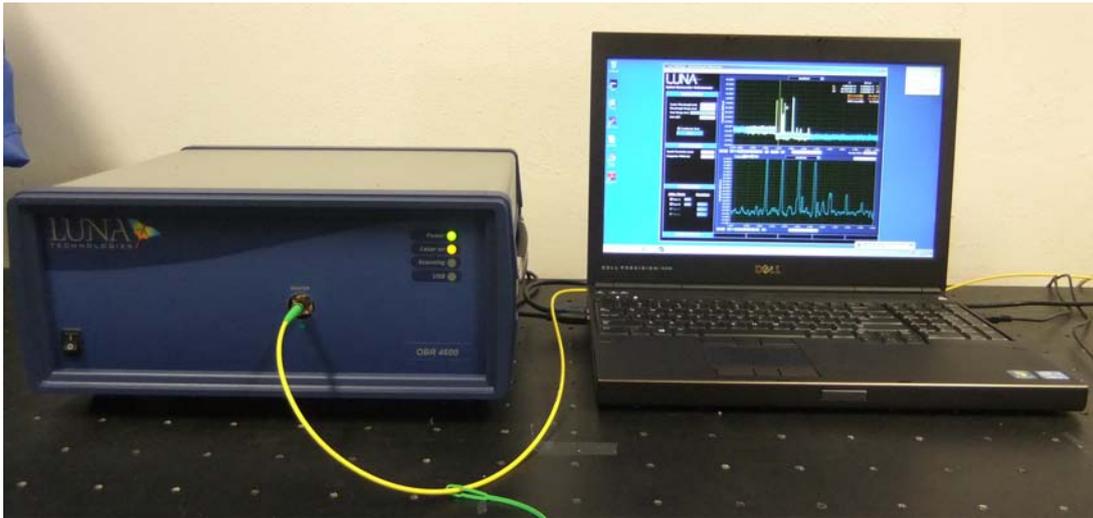


Figura 4.3: Fotografia dello strumento OBR.

L'indice di rifrazione n è quindi un parametro di cui tener conto al fine di interpretare correttamente la misura: se ad esempio si imposta un indice maggiore rispetto a quello dell'aria ($n_{DUT} > n_{aria}$), le distanze mostrate sullo schermo saranno minori in quanto la luce nel mezzo considerato viaggia più lentamente, a parità di tempo percorre quindi una lunghezza spaziale minore.

L'indice di rifrazione gioca un ruolo fondamentale anche nella determinazione della risoluzione assiale che per questo dispositivo è infatti dichiarata essere pari a:

$$\Delta z = \frac{\lambda_{min}\lambda_{max}}{n\Delta\lambda} \quad (4.1)$$

corrispondente cioè ad una potenza costante nel range $\Delta\lambda$ durante la spazzolata.

Normalmente, essendo il dispositivo progettato per l'analisi di fibre ottiche, l'indice di rifrazione è costante lungo tutto il DUT (pari a circa $n_{fo} \cong 1.46$).

Nell'applicazione OCT che si vuole sviluppare invece si interagisce con aria e campioni, i quali possono avere strati interni a diverso indice di rifrazione. Parlando di risoluzione assiale serve quindi un riferimento comune e si pone questo riferimento pari all'indice dell'aria ($n_{aria} = 1$); gli strati del campione avranno sicuramente un indice maggiore e quindi in essi la risoluzione assiale sarà migliore.

Lo strumento è dotato di interfaccia per il controllo da remoto via IEEE 488 (detto anche protocollo GPIB).

4.1.3 Dispositivo di traslazione

Per l'applicazione OCT e per la generazione di un'immagine B-scan è necessario far incidere il fascio laser in posizioni diverse della superficie del campione. Questo può generalmente essere fatto in due modi:

- deviando il fascio tramite uno specchio galvanometrico;
- tenendo fisso il punto di focalizzazione del fascio ma spostando il campione di una quantità pari alla risoluzione trasversale.

Data la maggior semplicità di implementazione e la disponibilità, si è deciso di optare per l'utilizzo di traslatori piezoelettrici al fine di spostare il campione.

In particolare si è utilizzato un dispositivo Burleigh composto da:

- Translation stage TS-100, cioè la struttura su cui montare il campione;
- Attuatori Inchworm, i traslatori che movimentano le parti della struttura;
- Encoder, dispositivi che realizzano la lettura della distanza compiuta dai traslatori;
- Modulo CE-2000, che comanda tutte le altre parti.

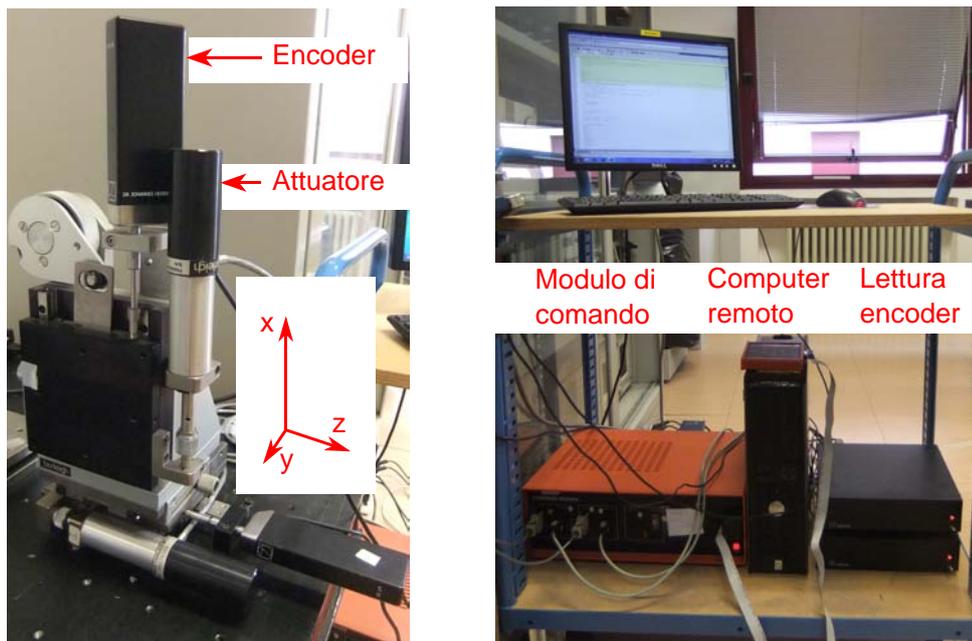


Figura 4.4: Fotografia del dispositivo di traslazione.

Complessivamente questo metodo di traslazione permette un accurato controllo della posizione del campione, potendolo spostare di una distanza massima di 25 mm in modo continuo o a passi di distanze pre-impostate, il cui minimo valore è $0.1 \mu\text{m}$.

Inoltre l'intero apparato è comandabile via GPIB da remoto e quindi è stata possibile la stesura di un codice Matlab per sincronizzare gli spostamenti del campione, le misure effettuate dall'OBR e l'elaborazione numerica dei dati.

4.2 Setup Sperimentale

Oltre ai dispositivi sopra descritti, si è fatto uso anche di elementi ottici e meccanici ausiliari ma molto importanti.

Dato che la radiazione emessa deve incontrare il campione, una parte della propagazione deve aver luogo in condizioni di spazio libero: è quindi necessario garantire un buon accoppiamento fibra ottica/aria ma soprattutto l'accoppiamento inverso aria/fibra ottica, che caratterizza la propagazione del fascio retrodiffuso dal campione, cioè il fascio che porta informazione.

Si è quindi munito il sistema di una bretella in fibra ottica (di lunghezza 2 metri) di cui un capo è trattato con rivestimento anti-riflessione. Questa collega l'OBR con il sistema di lenti, minimizzando la riflessione aria/fibra ottica per la radiazione da esaminare. Il fascio uscente dalla fibra ottica ha diametro iniziale pari a circa quello del nucleo ($8.2 \mu\text{m}$) e di seguito diverge con un'apertura numerica pari a 0.14, ovvero con un semi-angolo planare di circa 8.05° .

Questo fascio divergente verrà collimato dalla prima lente e quindi focalizzato dalla seconda. Per il principio di reversibilità, tale sistema permette anche al fascio retrodiffuso dal campione di rientrare nella fibra ottica per essere in seguito analizzato.

Un aspetto fondamentale che il circuito ottico deve garantire è l'allineamento tra le due lenti, nonché l'allineamento delle stesse con l'uscita in spazio libero della radiazione. In mancanza di tale proprietà, intesa sia come posizionamento delle ottiche su di uno stesso asse longitudinale che come assenza di tilt tra i dispositivi, la valutazione dell'effettiva focalizzazione sul campione sarebbe più difficile, come lo sarebbe anche la determinazione della posizione nel piano trasversale del waist.

L'allineamento è stato ottenuto montando le lenti e l'uscita della fibra ottica in appositi supporti (detti "cage plates"), tra loro collegati con 4 aste. Questo sistema garantisce che l'asse principale del sistema sia al centro di ciascun elemento e che quindi la direzione di propagazione del fascio sia prevedibile e coincidente con esso.

Il tutto, posizionato ad un'altezza di circa 15 cm, è stato fissato ad un piano dotato di supporti anti-vibrazionali, per ridurre gli indesiderati effetti meccanici dovuti all'ambiente circostante.

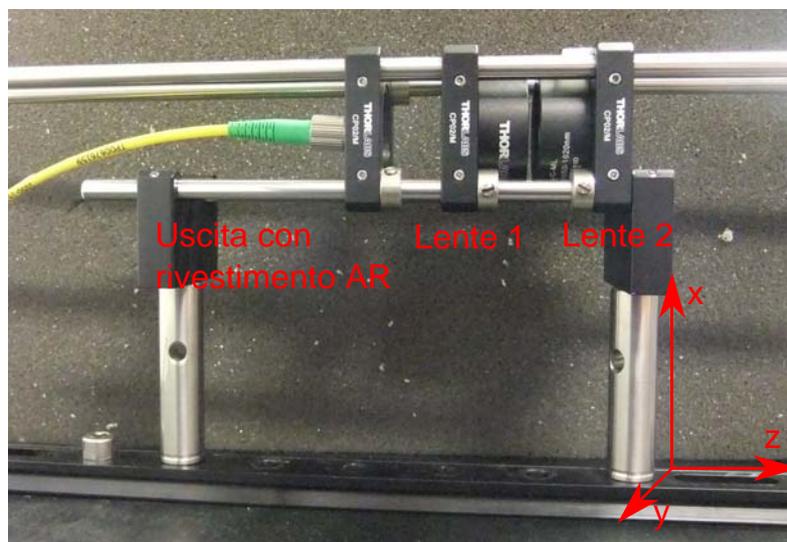


Figura 4.5: Fotografia dell'allineamento tra fibra ottica e lenti.

4.2.1 Configurazione preliminare

La configurazione iniziale è stata usata per effettuare delle misure preliminari sul sistema ottico, principalmente per verificare sperimentalmente il focal shift del sistema di lenti. Per fare ciò si è montato il sistema schematizzato in Figura 4.6.

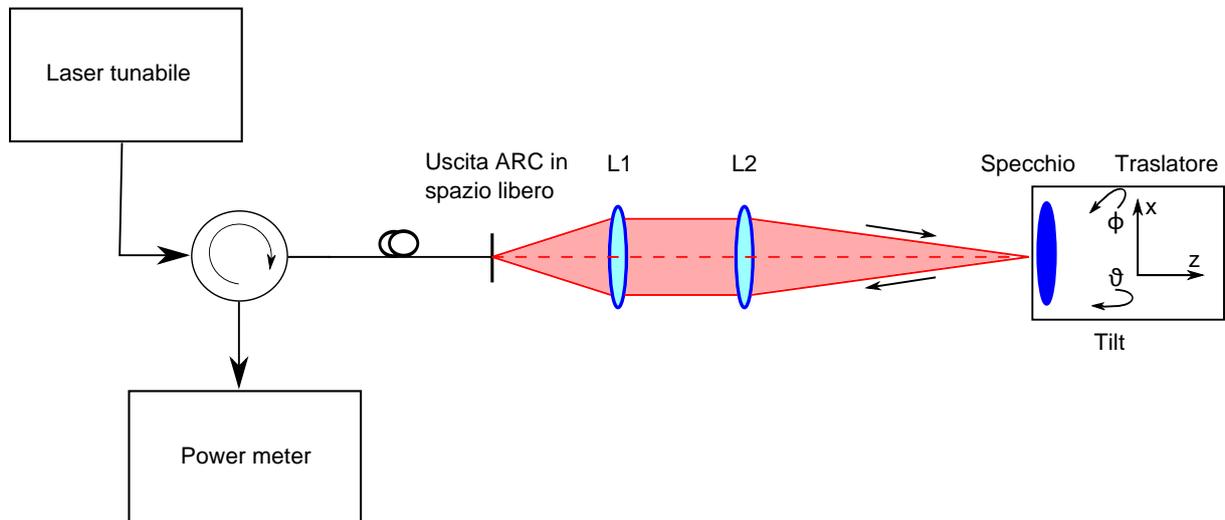


Figura 4.6: Schema della configurazione preliminare.

Tramite l'utilizzo di un laser tunabile (la cui lunghezza d'onda di lavoro è selezionabile in $\lambda \in [1500 \div 1640]$ nm), si invia al sistema di lenti la radiazione che viene fatta focalizzare su di uno specchio. Il fascio riflesso ritorna all'interno della fibra ottica e attraverso il circolatore giunge al power meter, in cui viene misurata la potenza riflessa. Lo specchio è montato su di un traslatore che, manualmente, può effettuare movimenti lungo la direzione assiale z con precisione di $10 \mu\text{m}$.

Inoltre è possibile applicare allo specchio un'inclinazione (tilt) in modo da trovare l'inclinazione migliore (teoricamente pari al piano perpendicolare alla direzione z) ai fini della misura, massimizzando la potenza riflessa letta sul power meter.

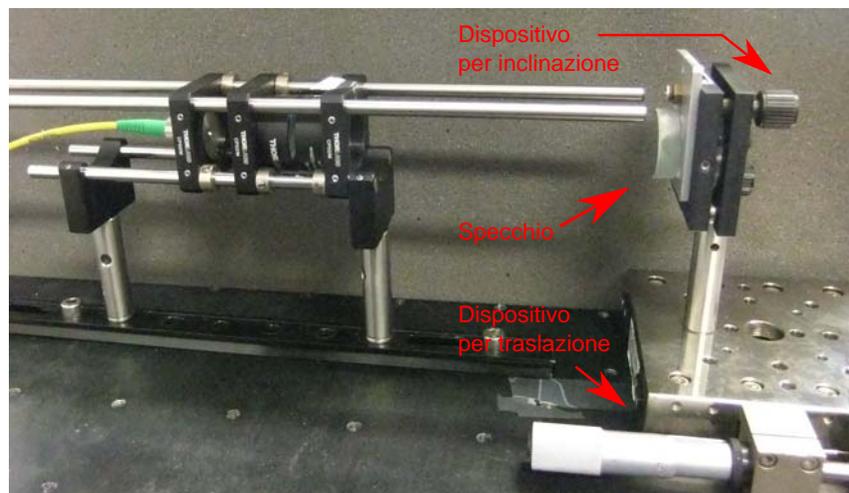


Figura 4.7: Fotografia della parte ottica della configurazione preliminare.

4.2.2 Configurazione SS-OCT

Dopo le misure preliminari si è passati al montaggio della configurazione SS-OCT: tale sistema, schematizzato in Figura 5.1, sostituisce l'OBR al laser tunabile e power meter della configurazione precedente.

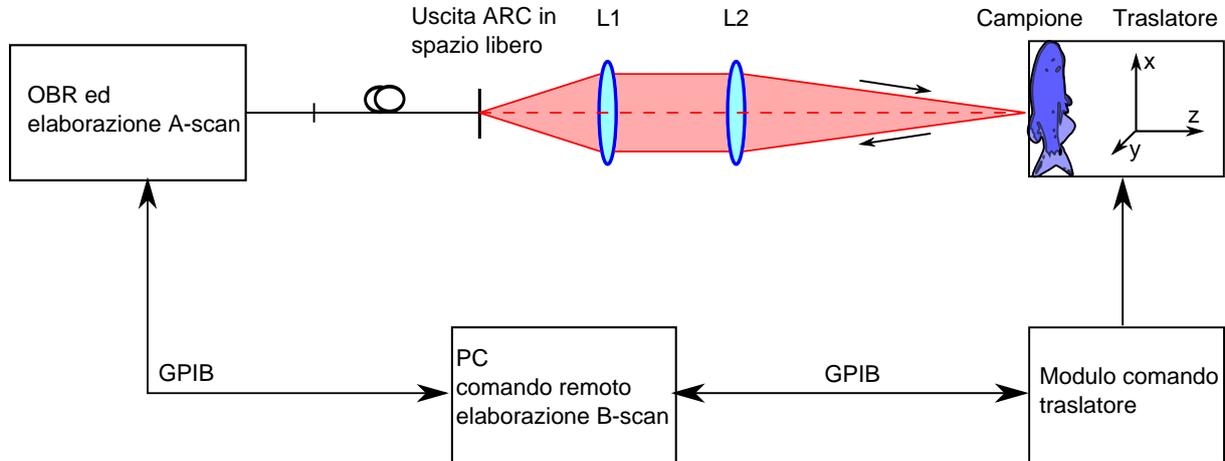


Figura 4.8: Schematizzazione della configurazione SS-OCT.

In questo schema l'OBR genera la radiazione laser la cui lunghezza d'onda è fatta variare in un intervallo $\Delta\lambda$, essa attraversa la bretella di lancio e quindi la fibra ottica. Da qui viene lasciata propagare in spazio libero, collimata dalla prima lente e focalizzata sul campione dalla seconda lente.

Il fascio retrodiffuso dal campione, fascio contenente l'informazione cercata, viene rispedito nel sistema di lenti grazie al quale può ritornare all'interno della fibra ottica e quindi all'OBR, in cui viene effettuata l'elaborazione del segnale ottenendo così la traccia dell'andamento di riflettività in profondità del campione in funzione della distanza z . Questo procedimento costituisce una singola misura A-scan, la cui durata è circa 30 secondi.

Al fine di effettuare una misura di tipo B-scan, si deve movimentare il campione lungo una direzione trasversale, con l'utilizzo del traslatore Burleigh descritto precedentemente. Si è scelto di traslarlo lungo la direzione x : il risultato sarà quindi un'immagine nel piano xz , ovvero una sezione del campione lungo la sua altezza. La durata della misura completa B-scan dipende dalla quantità di singoli A-scan effettuati, e quindi dalle dimensioni del campione che si vuole analizzare.

Tramite un computer, collegato via GPIB sia all'OBR che al sistema di traslazione, si è implementato un codice Matlab: compito di tale programma è quello di sincronizzare ogni partenza dei singoli A-scan con la movimentazione del campione (per automatizzare la traslazione e garantire che ogni scansione corrisponda ad un'altezza diversa) nonché elaborare i dati per rappresentarli in modo utile tramite un'immagine, risultato finale della misura.

I parametri del sistema vengono impostati per poter sfruttare al meglio le potenzialità della configurazione, soprattutto in termini di risoluzione assiale e trasversale. In particolare, la lunghezza d'onda viene fatta variare in un intervallo $\Delta\lambda = [1525 \div 1610.85] = 85.85$ nm, con lunghezza d'onda centrale quindi pari a $\lambda_0 = 1566.75$ nm. Da questa impostazione, richiamando la (4.1), si ha che la larghezza FWHM dell'impulso caratterizzante un punto, ovvero la risoluzione assiale del sistema, è:

$$\Delta z = \frac{\lambda_{min}\lambda_{max}}{n_{aria}\Delta\lambda} \cong 28.61 \mu m \quad (4.2)$$

Si noti che, come precedentemente descritto, si usa come indice di rifrazione di riferimento l'indice dell'aria: la risoluzione assiale appena calcolata è dunque riferita al mezzo aria e, se noto l'indice del campione, la risoluzione in esso sarà $\Delta z_{campione} = \Delta z/n_{campione}$. Normalmente i campioni biologici presentano un indice di rifrazione medio tra 1.3 e 1.5 quindi, a titolo di esempio, la risoluzione sarà tra 22 μm e 19 μm .

L'OBR presenta anche la possibilità di introdurre un guadagno variabile tra 0 e 24 dB nella misura, per riuscire a rilevare anche piccole riflessioni molto piccole. Questo è stato utilizzato in alcune misure e il suo valore sarà specificato nella spiegazione delle stesse.

L'altro parametro di grande interesse è la risoluzione trasversale: come anticipato, essa è indipendente dalla risoluzione assiale e determinata dalle condizioni di focalizzazione, cioè dalla larghezza del fascio incidente il campione. Ritenendo risolti due punti quando il massimo dell'impulso del primo coincide con lo zero dell'impulso del secondo, la risoluzione trasversale corrisponde alla metà del diametro minimo del fascio gaussiano, cioè al raggio del waist.

Con l'aiuto del programma Zemax, la valutazione del waist e della sua posizione rispetto alla lente focalizzatrice si ottiene dalla funzione "Skew Gaussian Beam" di cui si fornisce la schermata in Figura 4.9.

Skew Gaussian Beam Parameters

```
Input Beam Parameters:
Field Position          : 1
Wavelength              : 1.56675  $\mu\text{m}$ 
X Waist size           : 4.10000E-003
Y Waist size           : 4.10000E-003
Start Surface           : 1
Stop Surface            : 7
Start Surf to waist distance: -2.90000E+001
```

X-Direction Fundamental Mode Results:

Sur	Size	Waist	Position	Radius	Divergence	Rayleigh
1	3.52748E+000	3.42446E-003	4.26887E+001	4.26887E+001	8.24453E-002	4.14420E-002
2	3.67622E+000	3.06192E-003	3.68018E+001	3.68018E+001	9.95620E-002	3.06522E-002
3	4.50532E+000	1.13549E-002	1.02579E+002	1.02580E+002	4.38921E-002	2.58534E-001
STO	4.71526E+000	6.18918E-003	-9.54140E+001	-9.54142E+001	4.93787E-002	1.25239E-001
5	4.30508E+000	8.25886E-003	-1.25648E+002	-1.25649E+002	3.42495E-002	2.41044E-001
6	4.24341E+000	1.58220E-002	-1.34625E+002	-1.34626E+002	3.15097E-002	5.01966E-001
IMA	1.57773E-001	1.58220E-002	-4.98023E+000	-5.03082E+000	3.15097E-002	5.01966E-001

Figura 4.9: Schermata dei parametri del fascio, in mm, per la configurazione SS-OCT.

Dalla valutazione tramite Zemax si evidenzia che il raggio di waist del fascio è pari a 15.82 μm e posizionato ad una distanza di 134.63 mm dalla lente focalizzatrice. Tale configurazione si è ottenuta ponendo l'uscita in spazio libero della fibra ottica a 29 mm dalla prima lente, e mantenendo una distanza tra le due lenti di 4.78 mm. La risoluzione trasversale quindi è pari a 15.82 μm .

Tale valore è legato, come spiegato nell'apposita sezione, alla profondità di fuoco che si vuole ottenere (pari al doppio della lunghezza di Rayleigh): dal compromesso deriva una profondità di fuoco di circa 1 mm.

Questa valutazione è stata fatta in riferimento alla lunghezza d'onda centrale λ_0 .

In Tabella 4.1 si riassumono i parametri principali della configurazione.

Parametro	Simbolo	Valore
Intervallo di lunghezze d'onda	$\Delta\lambda$	85.85 nm
Lunghezza d'onda centrale	λ_0	1566.75 nm
Risoluzione assiale	Δz	28.61 μm
Risoluzione trasversale	Δx	15.82 μm
Profondità di fuoco	$2z_0$	1.004 mm
Posizione del fuoco	z'	134.63 mm
Guadagno	G	0 ÷ 24 dB
Distanza fibra ottica - lente 1	d_1	29 mm
Distanza lente 1 - lente 2	d_2	4.78 mm
Distanza lente 2 - campione	d_3	134.63 mm

Tabella 4.1: Parametri principali della configurazione SS-OCT

Algoritmo di formazione B-scan

Data: Risoluzione trasversale e numero di misure da effettuare;
Result: Immagine B-scan;
 Inizializzazione dell'OBR;
 Inizializzazione del traslatore;
 Effettua A-scan alla prima posizione;
 Memorizza dati grezzi A-scan;
for *per tutte le misure* **do**
 Effettua A-scan alla posizione corrente;
 Elabora dati grezzi dell'A-scan precedente;
 Salva dati elaborati dell'A-scan precedente;
 while *lo scan corrente non è completato* **do**
 Aspetta il termine dello Scan corrente;
 end
 Trasla il campione alla posizione successiva;
 Salva i dati grezzi correnti;
 if *è l'ultima misura* **then**
 Elabora dati grezzi dell'A-scan corrente;
 Salva dati elaborati A-scan corrente;
 end
end
 Riporta il campione alla posizione iniziale;
 Visualizzazione dell'immagine dai dati elaborati;

Tabella 4.2: Algoritmo per ottenere un'immagine B-scan in configurazione SS-OCT

4.2.3 Configurazione SS-OCM

La configurazione SS-OCM prevede di allontanare la lente dall'uscita del fascio dalla fibra. In questo modo la radiazione uscente percorrerà una lunghezza maggiore in spazio libero e quindi, data la sua divergenza, raggiungerà la superficie della prima lente con un diametro maggiore rispetto alla configurazione SS-OCT. Il fascio viene quindi collimato e di seguito

focalizzato dalla seconda lente; il beam waist risultante, in accordo con la relazione (2.27), sarà minore, ottenendo una risoluzione trasversale migliore rispetto a SS-OCT. Tuttavia la profondità di fuoco sarà molto limitata, data dal compromesso esposto in precedenza, e quindi la configurazione non sarà adatta ad ottenere immagini B-scan in profondità ma immagini en face lungo il piano frontale.

Skew Gaussian Beam Parameters

Input Beam Parameters:

```
Field Position      : 1
Wavelength         : 1.56675 µm
X Waist size       : 4.10000E-003
Y Waist size       : 4.10000E-003
Start Surface      : 1
Stop Surface       : 7
Start Surf to waist distance: -5.39700E+001
```

X-Direction Fundamental Mode Results:

Sur	Size	Waist	Position	Radius	Divergence	Rayleigh
1	6.56475E+000	2.99900E-003	6.95747E+001	6.95747E+001	9.40770E-002	3.17840E-002
2	6.73459E+000	2.52026E-003	5.54920E+001	5.54920E+001	1.20771E-001	2.07665E-002
3	7.74190E+000	7.63695E-002	-1.18549E+003	-1.18560E+003	6.53015E-003	1.16947E+001
STO	7.71068E+000	2.37350E-003	-5.98350E+001	-5.98350E+001	1.28160E-001	1.84184E-002
5	6.64110E+000	2.78661E-003	-6.53992E+001	-6.53992E+001	1.01200E-001	2.74416E-002
6	6.45831E+000	3.69319E-003	-4.78268E+001	-4.78268E+001	1.34224E-001	2.73498E-002
IMA	6.56321E-002	3.69319E-003	-4.85266E-001	-4.86808E-001	1.34224E-001	2.73498E-002

Figura 4.10: Schermata dei parametri del fascio, in mm, per la configurazione SS-OCM.

In Tabella 4.3 si riassumono i parametri principali della configurazione, da cui si può notare come la risoluzione trasversale sia migliorata a discapito di una profondità di fuoco micrometrica.

Parametro	Simbolo	Valore
Intervallo di lunghezze d'onda	$\Delta\lambda$	85.85 nm
Lunghezza d'onda centrale	λ_0	1566.75 nm
Risoluzione assiale	Δz	28.61 μm
Risoluzione trasversale	Δx	3.69 μm
Profondità di fuoco	$2z_0$	54.70 μm
Posizione del fuoco	z'	47.83 mm
Guadagno	G	0 ÷ 24 dB
Distanza fibra ottica - lente 1	d_1	53.97 mm
Distanza lente 1 - lente 2	d_2	4.78 mm
Distanza lente 2 - campione	d_3	47.83 mm

Tabella 4.3: Parametri principali della configurazione SS-OCM

Tale configurazione sperimentale è stata però finora solo teorizzata, quindi non ancora implementata e testata.

4.3 Risultati sperimentali preliminari: focal shift

Tramite la configurazione descritta e schematizzata nella sezione apposita, si sono eseguite le misure per confermare il focal shift del sistema ottico predetto da Zemax.

Lo specchio è stato posto ad una distanza tale da massimizzare la potenza misurata (in corrispondenza quindi del fuoco) e da qui si è agito per allinearne tramite il dispositivo di tilt, fino a trovarne la miglior inclinazione. Si è quindi passati alla misura del focal shift introdotto per confermare l'andamento teorico previsto.

Questo è stato fatto variando la lunghezza d'onda di lavoro del laser tunabile e per ogni suo valore si è spostato lo specchio tramite il traslatore, fino a massimizzare la potenza riflessa letta sul power meter. In Figura 4.11 si visualizza il confronto tra il focal shift teorico e quello misurato, notando come effettivamente l'andamento predetto da Zemax sia confermato. Le misure sperimentali non sono fitte quanto i valori teorici in quanto i piccoli passi in frequenza non producevano una traslazione del fuoco apprezzabile tramite il traslatore manuale.

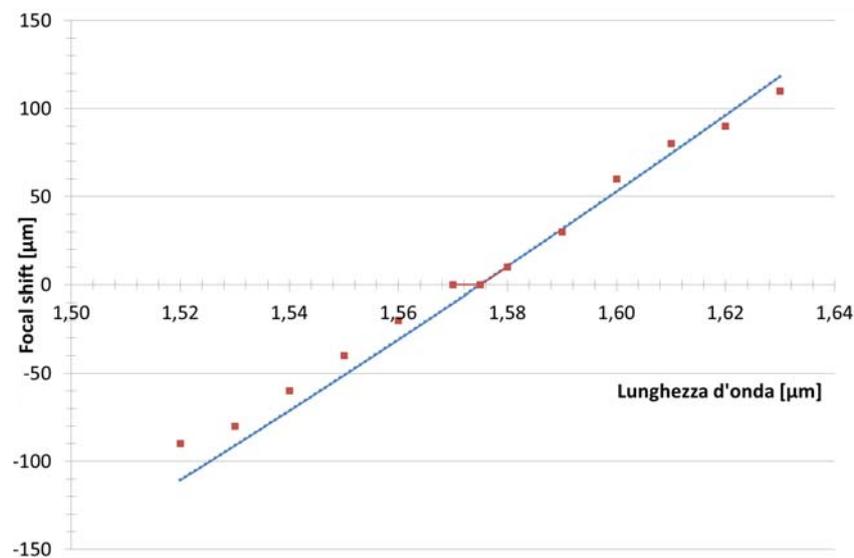


Figura 4.11: Confronto tra focal shift teorico (azzurro) e sperimentale (rosso).

Risultati sperimentali SS-OCT

Tramite la configurazione SS-OCT sono state eseguite misure su campioni diversi. Lo scopo delle misure è quello di ottenere un'immagine bidimensionale (B-scan) della sezione verticale (piano xz) di un dato campione. Dapprima si è utilizzata la configurazione per caratterizzare il sistema stesso, cioè le riflessioni prodotte dalle lenti e dai collegamenti in fibra ottica. Di seguito si sono fatte prove preliminari per caratterizzare un campione con una struttura interna nota e semplice, una cuvetta.

Infine si è applicato il sistema all'imaging biologico, su due campioni di pesce Danio Rerio (detto anche zebrafish per via della pigmentazione a striscie) al fine di ottenere una scansione del bulbo oculare nonché di tutto il corpo. Questi campioni di zebrafish sono stati preparati dalla Prof.ssa Natascia Tiso del Developmental Biology Lab del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova, secondo l'autorizzazione CEASA-progetto 74bis/2012 dell'Università di Padova.

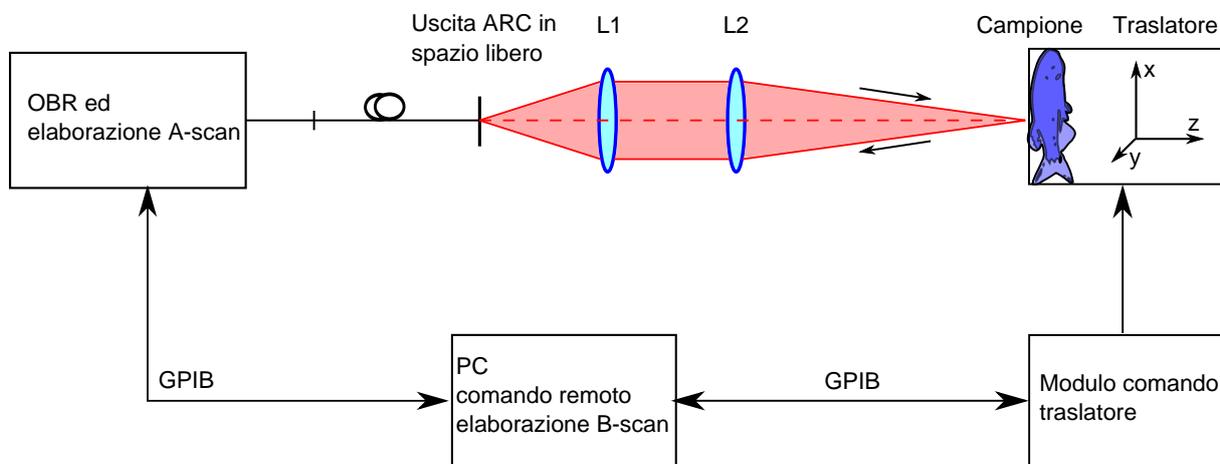


Figura 5.1: Schematizzazione della configurazione SS-OCT utilizzata.

5.1 Caratterizzazione del sistema ottico

La caratterizzazione del sistema ottico avviene tramite l'acquisizione di un semplice A-scan: questa è una traccia che evidenzia la posizione delle riflessioni di ciascuno degli elementi formanti il circuito ottico, tramite la quale si possono misurare con precisione micrometrica le distanze tra essi e quindi modificare il setup per posizionarli con maggior accuratezza.

Un esempio di traccia ottenuta impostando $n_{mis} = 1$ è presentato in Figura 5.2.

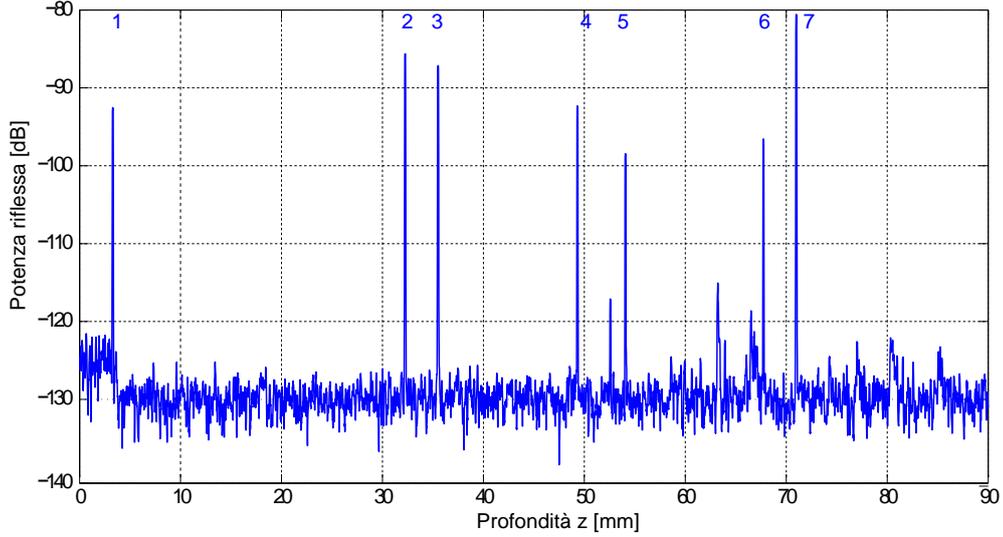


Figura 5.2: Traccia in cui si rilevano le riflessioni prodotte dal sistema ottico.

Dalla traccia si possono notare principalmente 7 picchi:

- il primo picco caratterizza l'uscita del fascio dalla fibra, l'interfaccia fibra/aria. Questo è confermato sia dalla posizione del picco rispetto alla posizione di partenza (nulla) dall'OBR, sia dal cambio del fattore di attenuazione presentato dal mezzo: infatti il livello del rumore di fondo dopo questo picco è minore rispetto a quello precedente, confermando un cambio del mezzo di propagazione;
- il secondo picco è posizionato ad una distanza $\Delta z_{mis}^{1,2} = 28.964$ mm dal primo e la riflessione è dovuta all'interfaccia aria/N-SF6HT della prima lente;
- il terzo picco si trova dopo $\Delta z_{mis}^{2,3} = 3.23$ mm dal secondo e corrisponde alla riflessione dovuta all'interfaccia N-SF6HT/N-LAK22. Questa è una riflessione interna alla lente ed è dovuta al fatto che essa è in realtà un doppietto acromatico: la riflessione dovuta al cambio di indice di rifrazione viene dunque rilevata;
- il quarto picco corrisponde all'interfaccia N-LAK22/aria dopo $\Delta z_{mis}^{3,4} = 13.76$ mm, cioè all'uscita del fascio dalla lente, per andare verso la lente successiva.
- i successivi 3 picchi rappresentano in maniera analoga la seconda lente, ma in ordine inverso dato che è capovolta rispetto la prima lente; la distanza tra le due lenti è $\Delta z_{mis}^{4,5} = 4.73$ mm.

Le distanze misurate però non corrispondono alle distanze reali, a causa della variazione dell'indice di rifrazione lungo il percorso: consideriamo la propagazione del fascio in un mezzo omogeneo con indice n_{mis} , uguale all'indice impostato nell'OBR, e di lunghezza incognita d_{re} . Per attraversarlo il fascio impiegherà un certo tempo τ e quindi la lunghezza può essere facilmente calcolata dallo strumento mediante la relazione:

$$d_{mis} = d_{re} = \frac{c\tau}{n_{mis}}$$

Se ora consideriamo un altro mezzo con indice n_1 ma della stessa lunghezza d_{re} , il fascio impiegherà un tempo $\tau_1 \neq \tau$ per percorrerlo. Lo strumento applicherà nuovamente la relazione precedente ottenendo:

$$d_{mis} = \frac{c\tau_1}{n_{mis}}$$

forndo all'operatore un valore d_{mis} diverso dal precedente, nonostante in realtà la distanza compiuta sia sempre la stessa e pari a:

$$d_{re} = \frac{cT}{n_{mis}} = \frac{cT_1}{n_1}$$

L'errore sta nel fatto di non considerare il cambio d'indice; tale fattore può essere corretto tramite la relazione:

$$d_{re} = d_{mis} \frac{n_{mis}}{n_1} \quad (5.1)$$

Con tale procedimento si possono quindi correggere le distanze rilevate, considerando che l'impostazione dello strumento per questa misura è tale per cui $n_{mis} = 1$:

$$\Delta z^{1,2} = \Delta z_{mis}^{1,2} \frac{n_{mis}}{n_{aria}} \cong 28.964 \frac{1}{1} = 28.964 \text{ mm}$$

$$\Delta z^{2,3} = \Delta z_{mis}^{2,3} \frac{n_{mis}}{n_{N-SF6HT}} \cong 3.23 \frac{1}{1.7624} \cong 1.833 \text{ mm}$$

$$\Delta z^{3,4} = \Delta z_{mis}^{3,4} \frac{n_{mis}}{n_{N-LAK22}} \cong 13.76 \frac{1}{1.6305} \cong 8.439 \text{ mm}$$

$$\Delta z_1^{4,5} = \Delta z_{mis}^{4,5} \frac{n_{mis}}{n_{aria}} \cong 4.73 \frac{1}{1} = 4.73 \text{ mm}$$

Questi valori sono ben confrontabili con i valori di progetto e con le dimensioni delle lenti dichiarate dalla casa costruttrice.

5.2 Campione 1: Cuvetta

Come primo campione si è utilizzato una cuvetta: essa è un contenitore utilizzato per l'analisi di campioni normalmente in analisi spettroscopica. È composta da pareti, in questo caso di quarzo sintetico Suprasil300, che formano un'intercapedine di aria in cui si può posizionare il campione. La curva del coefficiente di trasmissione delle pareti in Suprasil300 è riportato in Figura 5.3.

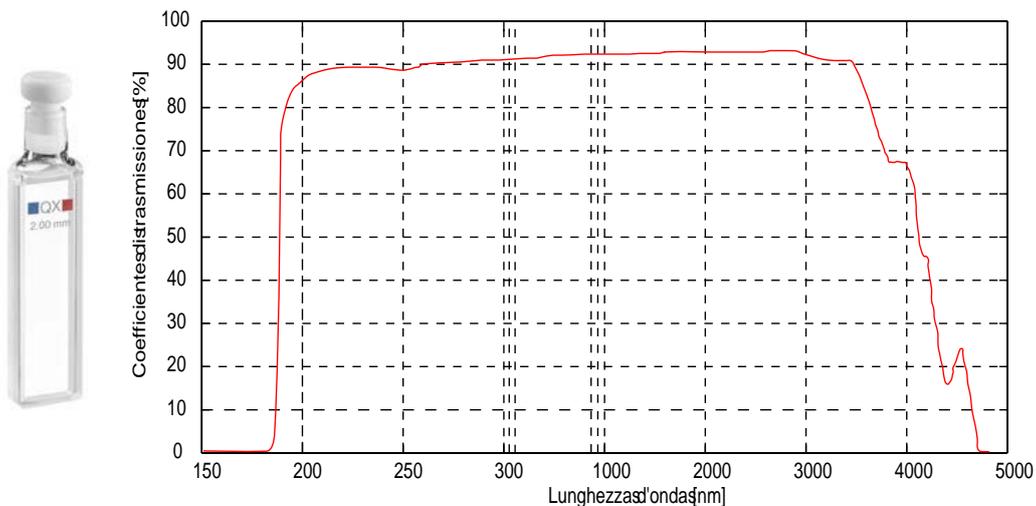


Figura 5.3: Cuvetta e coefficiente di trasmissione delle pareti in Suprasil300.

Si è scelto di usare questa cuvetta come primo campione per la sua struttura semplice e nota: dalla misura ci si aspetta la rilevazione di:

- 4 riflessioni nel caso in cui il fascio attraversi il campione nella sua parte principale, cioè rilevando l'intercapedine;
- 2 riflessioni nel caso in cui il fascio attraversi solo la parte vetrosa, nei pressi cioè della fine del campione.

Dato poi che la struttura è nota, si potrà a posteriori facilmente verificare la correttezza della misura e la coerenza con i risultati aspettati.

5.2.1 Misure A-scan

Prima di effettuare un B-scan si sono eseguiti degli A-scan preliminari, per valutare qualitativamente le posizioni dei picchi e l'effettiva capacità dello strumento di rivelarli; tali misure sono riportate graficamente in Figura 5.4, in cui si è impostato un indice di rifrazione pari a $n_{mis} = 1.5$.

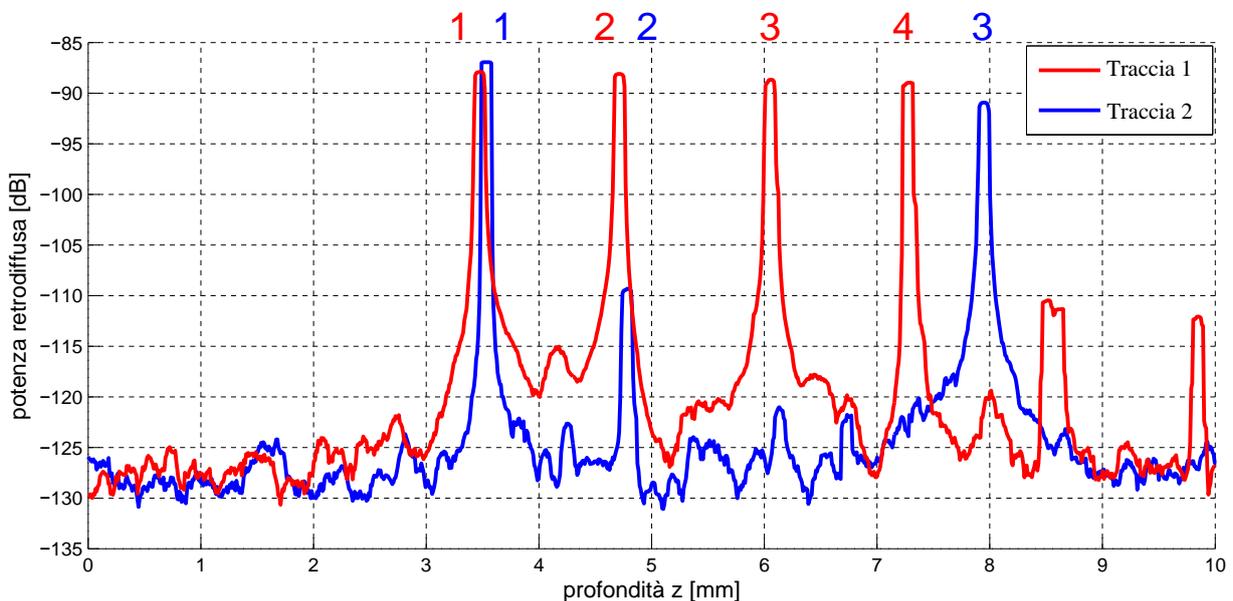


Figura 5.4: Tracce A-scan su cuvetta.

Prendendo in esame la traccia 1 (rossa) di Figura 5.4, si può facilmente vedere che essa si riferisce alla scansione della cuvetta ad un'altezza tale per cui il fascio attraversa l'intero sistema, cioè tutte e quattro le interfacce presentate: tra il primo e secondo picco, così come tra terzo e quarto, la misura è relativa alla parte vetrosa del campione; la parte invece tra secondo e terzo picco di riflessione si riferisce all'intercapedine di aria presente all'interno.

Nella traccia 2 (azzurra), presa ad un'altezza tale per cui la radiazione attraversa solo la parte vetrosa, si evidenziano tre contributi: il primo corrisponde all'interfaccia aria/vetro, comune ad entrambe le tracce; il secondo è probabilmente un termine di disturbo dato dalla seconda interfaccia vetro/aria e dovuto alla divergenza del fascio o a scattering indesiderato; il terzo picco corrisponde alla superficie vetro/aria di uscita dalla cuvetta. Sovrapponendo le due tracce si può inoltre notare che:

- il primo e il secondo picco (indesiderato nella traccia 2) sono leggermente sfasati in posizione: questo è sicuramente dovuto ad una leggera inclinazione della cuvetta che fa sì che misurazioni ad altezze diverse evidenzino tale aspetto. Tuttavia sostanzialmente coincidono.

- l'ultimo picco di entrambe le tracce corrisponde di fatto alla stessa superficie ma viene rilevato in posizioni diverse. Questo è dovuto al fatto che l'OBR misura i ritardi temporali e da questi ricava la posizione spaziale: dato che nella traccia 1 il fascio attraversa anche un tratto di aria, in questo mezzo la radiazione viaggia più velocemente: il ritardo complessivo sarà quindi minore rispetto al ritardo accumulato dal fascio della traccia 2, in cui l'intero percorso è in un mezzo vetroso ad indice più alto.
- nella traccia 1 sono presenti ulteriori picchi non trascurabili dopo l'ultima superficie. Questi sono dovuti a riflessioni multiple interne alla cuvetta di fotoni che quindi giungono in ritardo al sistema di analisi, facendo comparire un'interfaccia fittizia.

Si vuole ora procedere alla misurazione delle distanze tra i picchi per ricavare le dimensioni della cuvetta e confrontarle con le dimensioni teoriche, ricavate dalla misura tramite calibro del campione. Per fare ciò bisogna però correggere l'indice di rifrazione impostato per la misura $n_{mis} = 1.5$ con gli indici dei mezzi incontrati nel percorso, aria ($n_{aria} = 1$) e Suprasil300 ($n_{s300} = 1.4438$), correzione eseguita tramite il metodo spiegato precedentemente:

- Traccia 1:

$$\begin{aligned}\Delta z^{1,2} &= \Delta z_{mis}^{1,2} \frac{n_{mis}}{n_{s300}} \cong 1.249 \frac{1.5}{1.4438} \cong 1.298 \text{ mm} \\ \Delta z^{2,3} &= \Delta z_{mis}^{2,3} \frac{n_{mis}}{n_{aria}} \cong 1.316 \frac{1.5}{1} \cong 1.974 \text{ mm} \\ \Delta z^{3,4} &= \Delta z_{mis}^{3,4} \frac{n_{mis}}{n_{s300}} \cong 1.240 \frac{1.5}{1.4438} \cong 1.289 \text{ mm} \\ \Delta z_1^{tot} &= \Delta z^{1,2} + \Delta z^{2,3} + \Delta z^{3,4} = 4.561 \text{ mm}\end{aligned}$$

- Traccia 2:

$$\Delta z_2^{tot} = \Delta z_{mis}^{1,3} \frac{n_{mis}}{n_{s300}} \cong 4.407 \frac{1.5}{1.4438} \cong 4.578 \text{ mm}$$

Da questi dati si può vedere come la correzione degli indici di rifrazione nelle due tracce portino ad ottenere, come previsto, la stessa dimensione reale della profondità della cuvetta, valore coerente con la misurazione tramite calibro del campione nonché con il valore teorico di 4.5 mm dichiarato dal costruttore (Hellma).

5.2.2 Misure B-scan

Dopo queste misurazioni preliminari, si è passati alla misura della sezione verticale della cuvetta. Questa è stata fatta in due modi, posizionando il campione nelle posizioni presentate in Figura 5.5

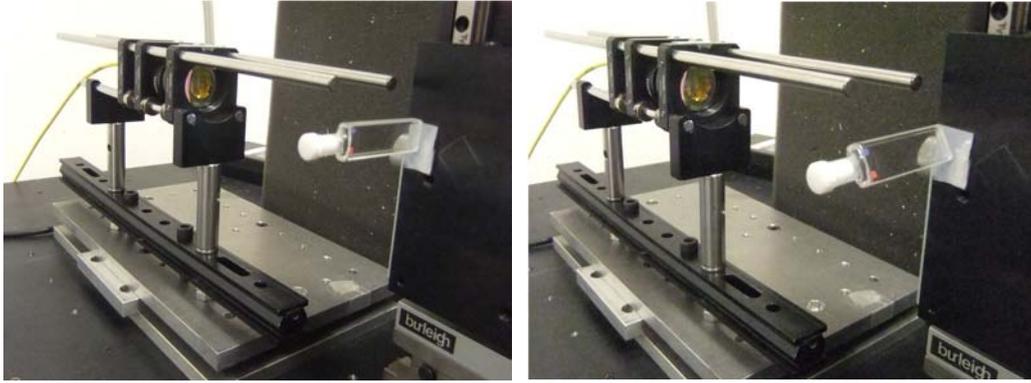


Figura 5.5: Posizione della cuvetta per la misura 1 (a sinistra) e per la misura 2 (a destra).

Misura 1: Cuvetta verticale

Per questa misura la cuvetta è posizionata in modo da presentare un piano perpendicolare al fascio incidente.

La scansione in altezza, totalmente di 17 mm, è stata effettuata con una risoluzione trasversale di $100 \mu\text{m}$, quindi non con la risoluzione migliore. Questo perché la cuvetta è una struttura semplice e le dimensioni da rilevare sono dell'ordine dei millimetri; inoltre aumentando la risoluzione trasversale si è ridotto il numero delle singole misurazioni A-scan, e di conseguenza il tempo di misura comunque notevole, circa 93 minuti:

$$n_{mis} = \frac{17 \text{ mm}}{100 \mu\text{m}} = 170 \text{ misure}$$

Il risultato della misura, cioè l'immagine B-scan ottenuta, è riportata in Figura 5.6, in cui le scale graduate sono espresse in millimetri. Sull'immagine si possono fare diverse considerazioni:

- l'immagine è nitida, effetto dovuto sia al posizionamento quasi perpendicolare delle strutture che quindi massimizzano la potenza della riflessione, sia alla natura stessa del materiale, che introduce un assorbimento minimo;
- l'immagine è visibilmente coerente con la struttura interna della cuvetta. Si possono infatti facilmente dividere la zone in cui si è incontrata l'intercapedine d'aria e le zone inferiore e superiore, in cui si attraversa solo lo strato vetroso;
- l'ultima superficie esterna della cuvetta risulta discontinua. Tale discontinuità però è posizionata proprio in corrispondenza del cambio di zona strutturale del campione: come anticipato nella sezione precedente, questo è dovuto al fatto che in una zona il fascio incontra uno strato d'aria in cui viaggia più veloce rispetto al vetro e quindi l'ultima riflessione risulta più vicina;
- la cuvetta è effettivamente leggermente inclinata, quindi l'immagine conferma le considerazioni effettuate nella sezione precedente relative alla leggera traslazione dei picchi delle tracce A-scan;
- è evidenziata in figura anche un'imperfezione della struttura. Sebbene non si riesca a determinarne con certezza la causa, essa è probabilmente dovuta a vibrazioni o movimenti involuti del campione durante la misura;

- non si vedono, come prevedibile, le pareti che risultano parallele al fascio: sebbene queste fossero non esattamente parallele, l'eventuale radiazione incidente verrebbe riflessa con un angolo molto grande, tale da non permettere il ritorno al sistema di lenti.

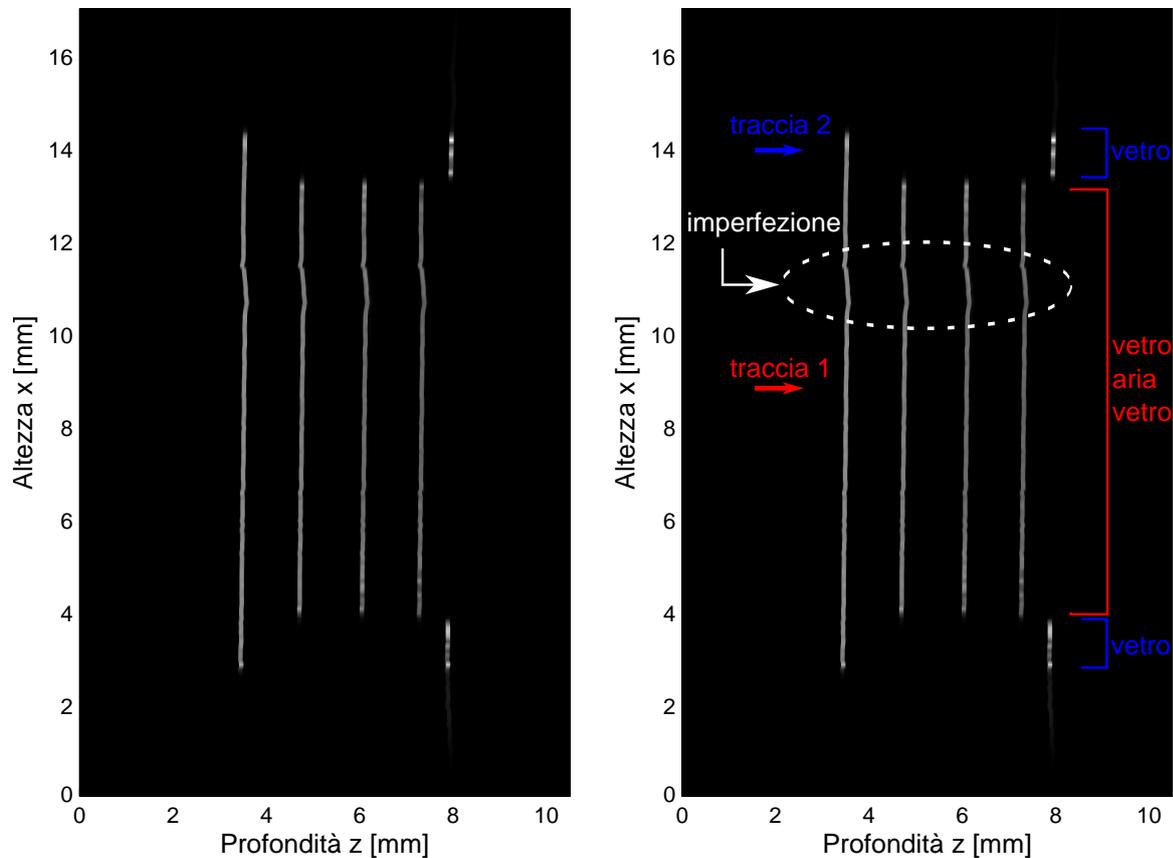


Figura 5.6: Immagine B-scan su cuvetta verticale.

Si può ora passare alla misurazione delle dimensioni fisiche esterne ed interne del campione, considerando che le lunghezze verticali non necessitano della correzione dell'indice di rifrazione dato che sono frutto dell'impostazione del traslatore e non dell'OBR; per ogni misura della Tabella 5.1 si fornisce anche il valore teorico fornito dal costruttore.

Lunghezza	Misurata [mm]	Corretta [mm]	Teorica [mm]
Altezza totale (esterna)	12.5	non necessaria	12.5
Altezza intercapedine	9.5	non necessaria	9.5
Profondità totale (esterna)	4.407	4.578	4.5
Profondità intercapedine	1.316	1.974	2

Tabella 5.1: Dimensioni cuvetta ottenute da B-scan.

Da cui la correttezza della misura.

Misura 2: Cuvetta inclinata

Per visualizzare anche le altre pareti della cuvetta, la si è inclinata di circa 30° rispetto all'asse verticale: in questo modo il fascio incide con un angolo tale per cui una parte della radiazione riesce a tornare all'interno del sistema ottico e quindi ad essere misurata. Tuttavia questa potenza retrodiffusa sarà di certo minore rispetto al caso precedente, proprio

a causa della grande quantità di fotoni deviati non raccolti.

La misura è stata effettuata per ottenere una scansione di 15 mm in altezza ad una risoluzione trasversale di $100\ \mu\text{m}$, per un totale di 150 misure A-scan. La durata totale è stata di 82 minuti.

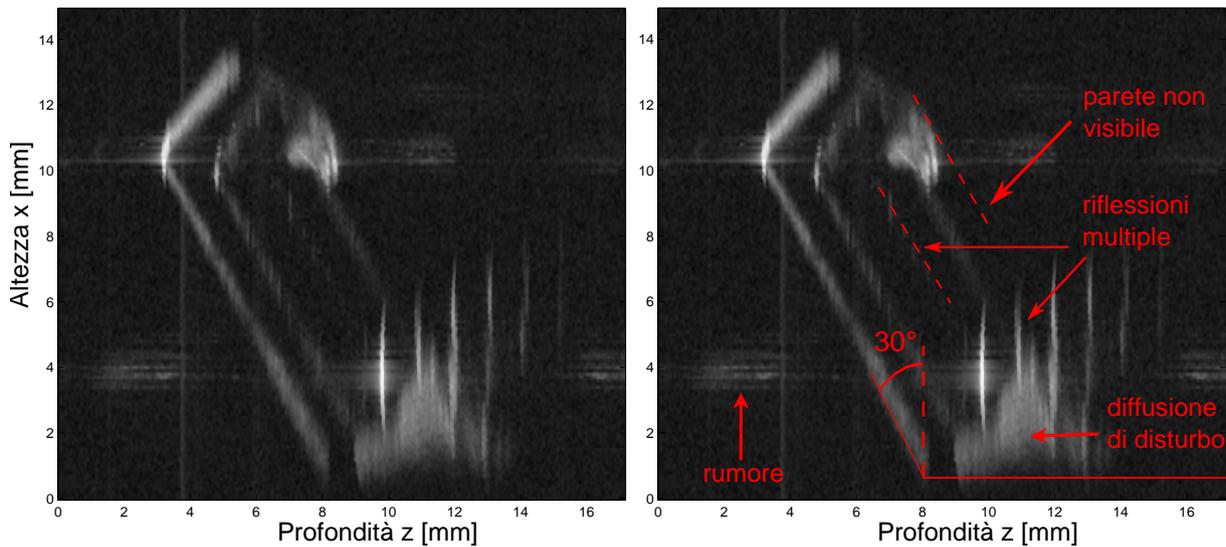


Figura 5.7: Immagine B-scan su cuvetta inclinata.

Si noti come l'immagine sia rumorosa e molto meno nitida rispetto alla precedente: le intensità riportate sono in dB, cioè in scala logaritmica per evidenziare le piccole riflessioni. Infatti, se si fosse visualizzata l'immagine con le intensità in scala lineare, solo i valori più alti sarebbero stati visualizzati, portando ad un'immagine con soli tre punti visibili e non valutabile. Riportando i valori in dB si produce un'immagine apprezzabile pagando però in un aumento della rumorosità, visto che anche riflessioni involute e non appartenenti al campione vengono evidenziate.

Dall'immagine si ricava che:

- la struttura è nel complesso visibilmente coerente con le aspettative e con l'inclinazione del campione;
- le interfacce si fanno sempre meno intense all'aumentare della profondità. Questo è dovuto al fatto che parte della radiazione viene riflessa da ogni superficie e quindi la successiva interagisce con una potenza sempre minore all'aumentare della profondità. Inoltre la radiazione retrodiffusa dall'ultima parete non viene visualizzata, a causa del suo valore troppo basso;
- nella parte inferiore è presente un disturbo notevole in corrispondenza della parte vetrosa compresa tra le due zone di aria. È da considerare che la superficie inferiore è ruvida e trattata in maniera differente dalle pareti (questo per costruzione della cuvetta) e quindi produce una forte diffusione dei fotoni incidenti. Questi fotoni vengono riflessi, per la maggior parte, verso l'alto e rimangono quindi "imprigionati" all'interno della guida d'onda costituita dalla zona vetrosa. Questo crea un gran numero di riflessioni che vengono rilevate dallo strumento, producendo questo disturbo e impedendo una buona visualizzazione della regione;
- sono presenti anche riflessioni multiple, di intensità non trascurabile e probabilmente dovute a riflessioni interne all'intercapedine di aria. Un'ulteriore riflessione inclinata

viene visualizzata al centro della zona d'aria: è anch'essa una doppia riflessione, ovvero il fascio che dalla superficie vetro/aria torna al sistema trova nel suo percorso la prima interfaccia, su cui si riflette nuovamente creando questa parete debole e fittizia.

5.3 Campione 2: Zebrafish

Dopo la cuvetta, si è applicato il sistema a due campioni di Zebrafish, un piccolo pesce ampiamente utilizzato in campi come genetica e biologia dello sviluppo. Nel corso gli esemplari di zebrafish sono diventati un modello per i sistemi biologici per alcune sue proprietà come:

- sono vertebrati, questo li rende molto più vicino all'uomo rispetto ad altri modelli comuni come insetti;
- sono di piccola taglia e quindi facilmente allevabili in grande quantità;
- le uova vengono deposte in grande quantità;
- il loro sviluppo è veloce, passano da singola cellula ad un piccolo pesce in 24 ore;
- gli embrioni si sviluppano all'esterno del corpo della madre;
- gli embrioni sono trasparenti, proprietà che rende facile l'osservamento dello sviluppo dell'organismo.

Proprio per quest'ultimo motivo si è scelto lo zebrafish come campione per l'imaging OCT. La loro trasparenza fa prevedere un buon funzionamento della tecnica senza troppe perdite per assorbimento da parte del tessuto.

In particolare si sono utilizzati due campioni, di 30 e 45 giorni, contenuti in due cuvette di materiale plastico e di dimensioni 12.5x12.5x45 mm, immersi in gel di agarosio all'1% per mantenerli immobili durante l'acquisizione dell'immagine. Per tutte le misure su zebrafish, i parametri utilizzati per la misura sono gli stessi descritti in Tabella 4.1, impostando un guadagno di $G=24$ dB. Inoltre per una corretta visualizzazione si è dovuto inclinare leggermente la cuvetta contenente il campione per eliminare parte della forte riflessione generata dalla parete anteriore, riflessione che impediva la rilevazione dei contributi più deboli dati dallo zebrafish, di interesse.

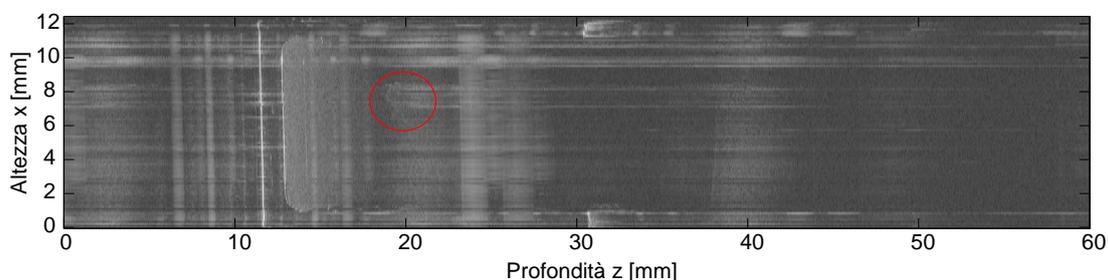


Figura 5.8: Immagine preliminare ottenuta con cuvetta non inclinata: il campione risulta poco visibile.

I campioni di zebrafish sono stati preparati dalla Prof.ssa Natascia Tiso del Developmental Biology Lab del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova, secondo l'autorizzazione CEASA - progetto 74bis / 2012 dell'Università di Padova.

5.3.1 Zebrafish A

Il primo campione biologico su cui si è applicata la configurazione SS-OCT è uno zebrafish adulto di 45 giorni, esemplare la cui pigmentazione è già ben sviluppata, riducendone la trasparenza.

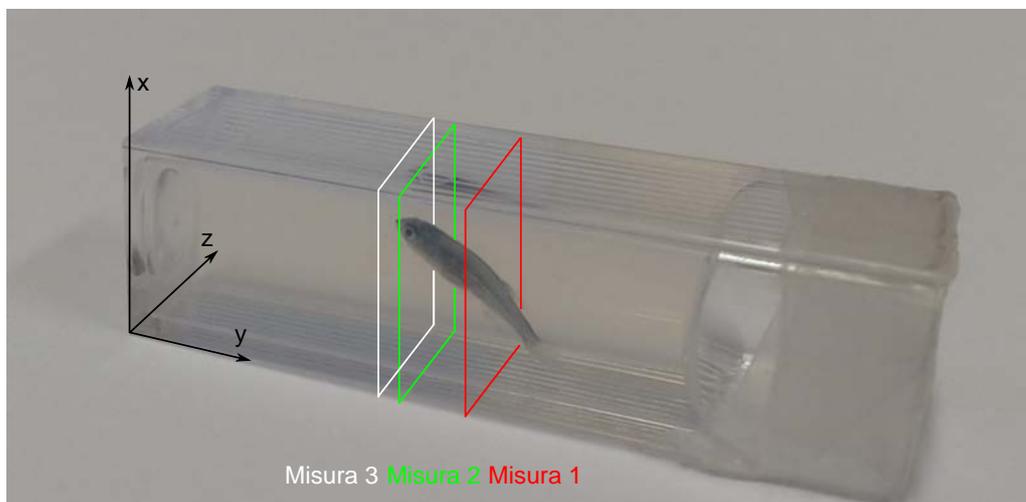


Figura 5.9: Immagine del campione in cui si evidenziano i piani immagine delle misure.

Misura 1: sezione del corpo

La prima misura è stata effettuata in modo da scansionare lungo x la parte centrale del corpo dello zebrafish; si vuole cioè ottenere un'immagine della sua sezione trasversale. Il risultato prodotto è presentato in Figura 5.10 e Figura 5.11, in cui si presenta anche un ingrandimento della parte di interesse. Il tempo totale della misura è di 119 minuti, tempo impiegato per eseguire la scansione in altezza di 3.8 mm.

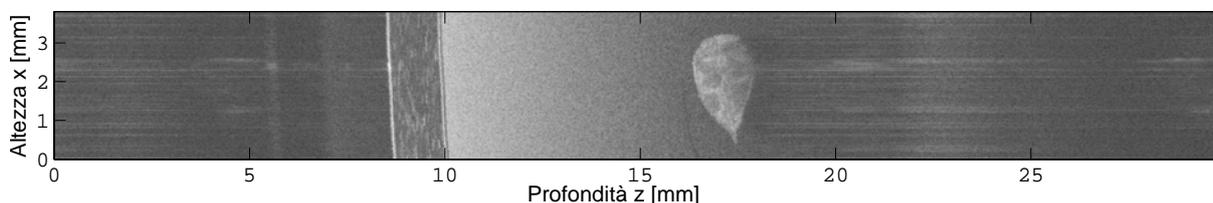


Figura 5.10: Immagine B-scan su zebrafish A: sezione del corpo.

Visibilmente l'immagine è coerente con una sezione del corpo, evidenziando ad esempio nella parte inferiore la pinna dello zebrafish. Sull'immagine poi sono state applicate elaborazioni numeriche tramite Matlab, cercando di migliorarne il contrasto e visualizzare meglio le zone a minor riflettività (zone scure). Su tale immagine è stata effettuata anche una interpretazione anatomica, eseguita dalla Prof.ssa Natascia Tiso (Developmental Biology Lab, Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova).

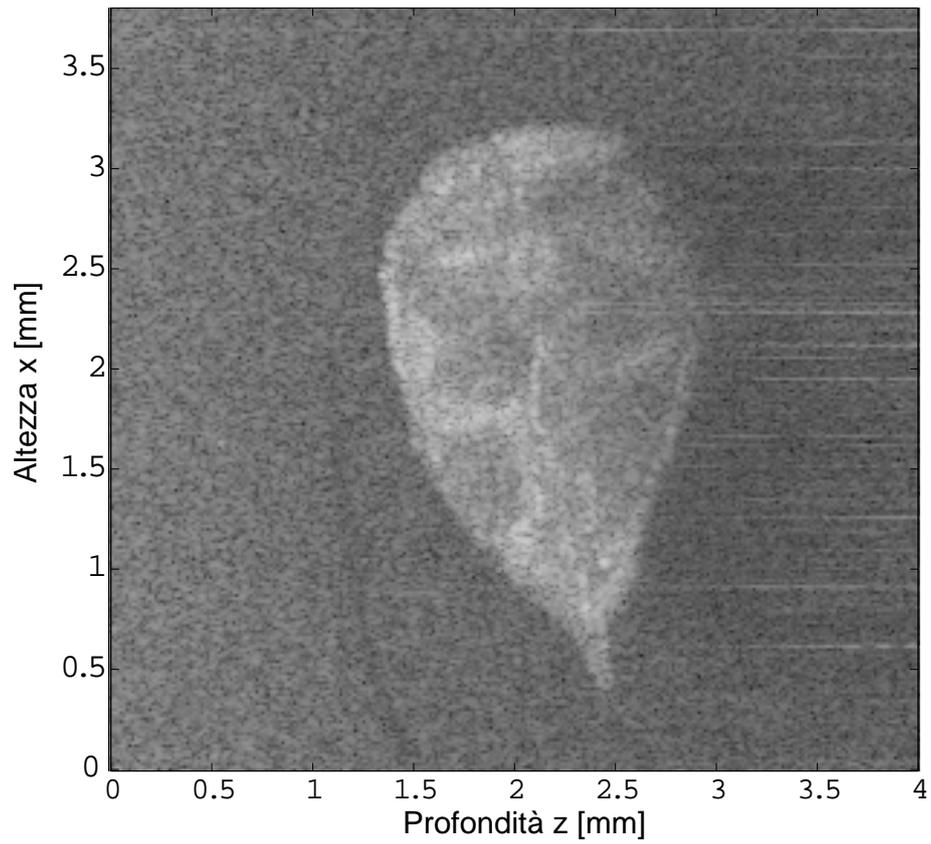


Figura 5.11: Ingrandimento su zebrafish A: sezione del corpo.

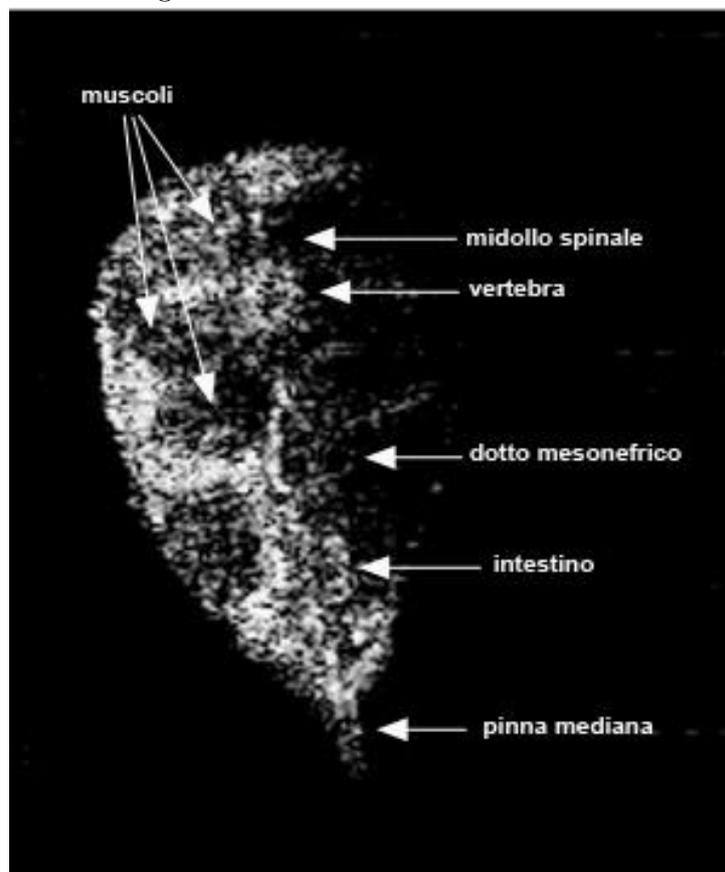


Figura 5.12: Ingrandimento su zebrafish A: sezione del corpo e sua interpretazione.

Misura 2: sezione della testa

Per la seconda misura sullo stesso esemplare, lo si è traslato lungo la direzione y per visualizzare una sezione del capo; la scansione completa è di 4 mm per un totale di 125 minuti. Il risultato non è però in prima approssimazione di grande interesse, dato che l'immagine conferma la minor trasparenza di questa sezione rispetto la precedente. Questo è intuibile dalla scarsa profondità di imaging ottenuta che fa presupporre un maggior assorbimento della radiazione da parte del tessuto in esame.

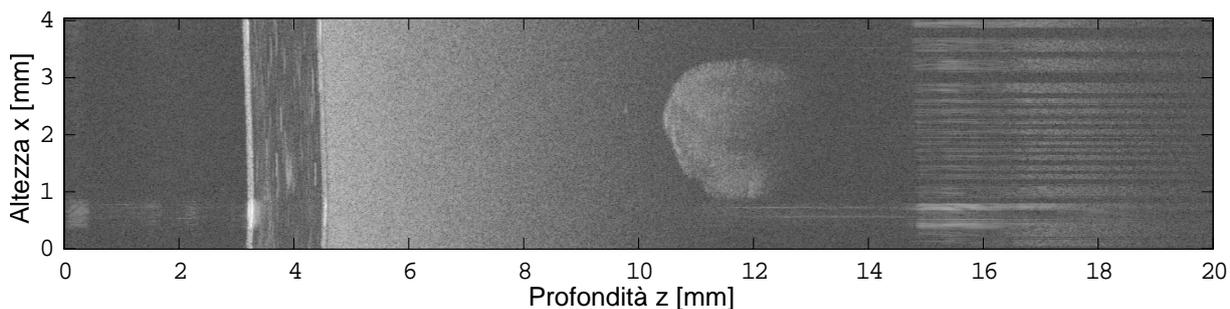


Figura 5.13: Immagine B-scan su zebrafish A: sezione della testa.

Misura 3: sezione dell'occhio

Una terza misura è stata effettuata spostando in y il campione al fine di ottenere un'immagine della sezione trasversale dell'occhio. Lo zebrafish è stato traslato in altezza per 2,4 mm in un tempo di 75 minuti.



Figura 5.14: Immagine B-scan su zebrafish A: sezione dell'occhio.

5.3.2 Zebrafish B

Come secondo esemplare si è preso uno zebrafish più giovane rispetto al precedente, 30 giorni. Visibilmente il grado di sviluppo è inferiore, così come lo è la pigmentazione, risultando quasi trasparente alla luce visibile. Questo campione è stato posizionato anche in modo da poter scansionare tutto il corpo, permettendo una scansione trasversale dell'intero organismo.

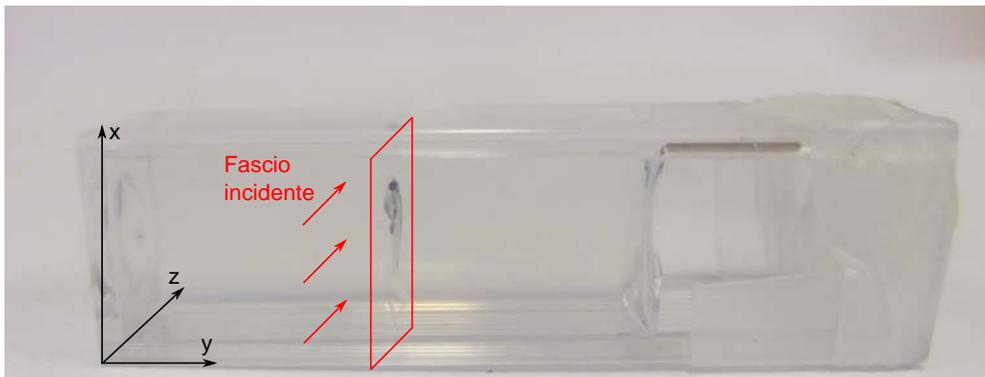


Figura 5.15: Immagine del campione in cui si evidenzia il piano immagine della misura.

Misura 1: sezione dell'intero corpo

Il procedimento comprende una scansione in altezza di 7 millimetri, corrispondenti a 211 minuti di misura. Il risultato è riportato nella figura seguente:

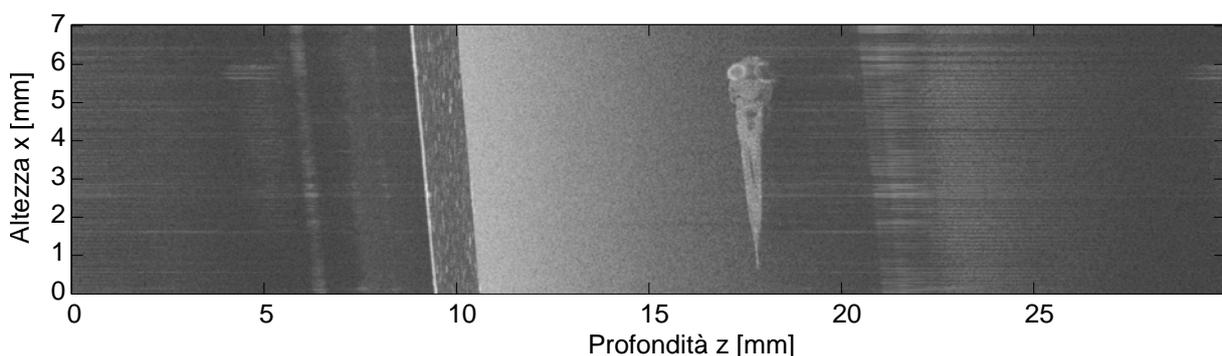


Figura 5.16: Immagine B-scan su zebrafish B: sezione dell'intero corpo.

La misura porta ad un'immagine migliore rispetto le precedenti, qualità dovuta alla maggior trasparenza del tessuto in questione rispetto al campione precedente. Anche per questa interessante immagine si è prodotto un ingrandimento e sulla sua elaborazione numerica è stata eseguita un'analisi anatomica per distinguere le varie parti del corpo: anche tale interpretazione anatomica è stata eseguita dalla Prof.ssa Natascia Tiso (Developmental Biology Lab, Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova).

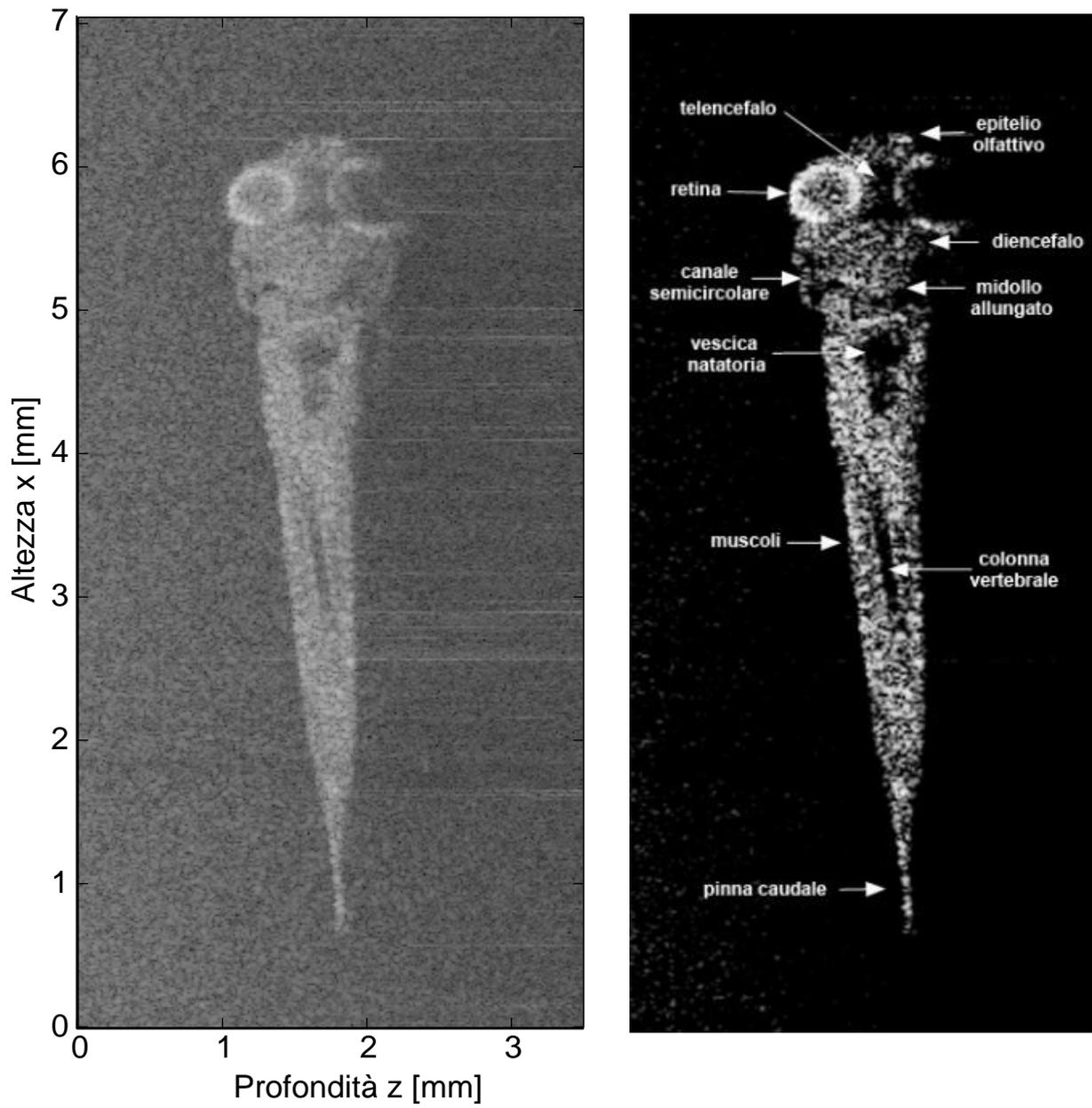


Figura 5.17: Ingrandimento su zebrafish B: sezione dell'intero corpo e sua interpretazione.

Conclusioni

In questo lavoro si è sviluppato sperimentalmente un tomografo a coerenza ottica illustrando i principi fisici alla sua base e testandolo anche su campioni biologici, principale applicazione della tecnologia. Le misurazioni portano ad affermare che il dispositivo può essere utilizzato in questo campo, producendo immagini ad alta risoluzione da cui è possibile ricavare informazioni sulla struttura interna dei campioni.

In particolare si ha un decisivo miglioramento della qualità nell'imaging di campioni visibilmente trasparenti, come dimostrato dal confronto tra i risultati su Zebrafish A e Zebrafish B. Questa trasparenza è però garantita solo negli esemplari giovani di zebrafish, limitando alcuni studi a questi campioni. Una possibilità potrebbe essere l'utilizzo di campioni di zebrafish albini, tipologia che mantiene la trasparenza anche in età adulta, rendendo possibile l'osservazione di fenomeni quali lo sviluppo di organi nonché di cellule tumorali.

Dal lato puramente tecnico delle prestazioni complessive sono invece possibili miglioramenti in termini di risoluzione assiale e di velocità di acquisizione. Per fare ciò si dovrebbe però cambiare la sorgente ottica con un laser tunabile nella finestra dei 1300 nm, più comunemente utilizzata per l'OCT rispetto all'attuale banda, e implementare il ricevitore separatamente.

Infatti la strumentazione utilizzata non è ottimizzata per questa applicazione, in particolare l'OBR che, essendo progettato appositamente per la caratterizzazione di collegamenti in fibra ottica, presenta proprietà non ottime per l'OCT.

Una sperimentazione futura prevede l'adattamento alla configurazione OCM - Microscopia a coerenza ottica- per poter visualizzare un piano frontale del campione ad alta risoluzione trasversale.

Ringraziamenti

Questo lavoro di tesi è frutto del mio impegno ma anche di diverse altre persone, interne ed esterne al mondo accademico, che hanno contribuito sostenendomi, aiutandomi e anche mettendomi alla prova.

Vorrei quindi ringraziare il Prof. Palmieri per la costante attenzione mostrata verso questo progetto, la Dott.ssa Autizi e il Dott. Schenato per l'aiuto in laboratorio, per i consigli e i pareri, il Prof. Galtarossa e l'intero gruppo di ricerca di Fotonica e Campi Elettromagnetici. Oltre al lavoro di tesi è stato interessante e gratificante vedere in prima persona l'impegno e l'attività di ricerca del gruppo.

Inoltre si ringraziano la Prof.ssa Pelizzo, CNR-IFN, per la disponibilità e l'aiuto con il software Zemax e la Prof.ssa Tiso, Dipartimento di Biologia-Developmental Biology Lab, per la preparazione dei campioni di zebrafish e per l'interpretazione anatomica delle immagini prodotte.

Al di fuori del mondo universitario ma sempre ben presente la mia famiglia, in particolare i miei genitori: a loro il ringraziamento di non aver mai limitato le mie scelte e avermi sempre sostenuto nelle decisioni e in esperienze come l'Erasmus, che in sei mesi mi ha insegnato più di tanti anni.

Un ultimo ringraziamento ma non per questo di minor importanza va ai compagni di corso e agli amici, per le risate nei migliori momenti ma soprattutto per l'aiuto nei peggiori. Grazie soprattutto a coloro con cui in questi anni ho passato pomeriggi e nottate, bevute e discussioni animate, per essere stati fonte di ispirazione e aver messo in gioco il proprio pensiero con spirito costruttivo e curiosità.

A tutti, grazie.

Bibliografia

- [1] Fujimoto J.G, Pitris C., Boppart S.A., Brezinski M.E., *Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy*, Nature America - Neoplasia, Vol. 2, 9-25, 2000.
- [2] Haberland U.H.P, Blazek V., Schmitt H.J., *Chirp optical coherence tomography of layered scattering media*, Journal of Biomedical Optics Vol. 3, No. 3, 1998.
- [3] Golubovic B., Bouma B.E., Tearney G.J., Fujimoto J.G., *Optical frequency-domain reflectometry using rapid wavelength tuning of a Cr⁴⁺: forsterite laser*, Optics Letters, Vol. 22, No. 22, 1997.
- [4] Yun S.H., Tearney G.J., de Boer J.F., Iftimia N., Bouma B.E., *High-speed optical frequency-domain imaging*, Optics Express, Vol. 11, No. 22, 2003.
- [5] Chinn S.R., Swanson E.A. , *Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source*, Optics Letters, Vol. 22, No. 5, 1997.
- [6] Yasuno Y. et al. , *Three-dimensional and high-speed swept-source optical coherence tomography for in vivo investigation of human anterior eye segment*, Optics Express, Vol.13, No. 26, 2005.
- [7] Choma M.A., Hsu K., Izatt J.A., *Swept source optical coherence tomography using an all-fiber 1300-nm ring laser source*, Journal of Biomedical Optics, Vol.10 (4), 2005.
- [8] B.H. Lee et al. , *Fiber-based optical coherence tomography for biomedical imaging, sensing, and precision measurements*, Opt. Fiber Technol. 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2013.07.011>.
- [9] Chennu A., *OCT - A literature survey*, Erasmus Mundus MSc in Photonics, MSc. Thesis Project, 2008.
- [10] Jayaraman V. et al., *Design and performance of broadly tunable, narrow line-width, high repetition rate 1310nm VCSELs for swept source optical coherence tomography*, Proc. of SPIE Vol. 8276, 2012.
- [11] Tomlins P.H., Wang R.K., *Theory, developments and applications of optical coherence tomography*, Journal of physics: Applied physics,2005.
- [12] Miller D.T. et al., *Adaptive optics and the eye (super resolution OCT)*
- [13] Schmitt J. M., *Optical coherence tomography (OCT): A Review*, IEEE Journal of selected topics in quantum electronics, Vol. 5, No. 4, 1999.
- [14] Podoleanu A., *Optical coherence tomography*, The British Journal of Radiology, 78, 976-988, 2005.

- [15] Yaqoob Z., Wu J., Yang C., *Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy*, BioTechniques 39, S6-S13, 2005.
- [16] Wojtkowski M., *High-speed optical coherence tomography: basics and applications*, Applied Optics, Vol. 49, NO. 16, 2010.
- [17] Lexer F. et al., *Wavelength-tuning interferometry of intraocular distances*, Applied Optics, Vol. 36, NO. 25, 1997.
- [18] Loeb G., Barton J.K., *Imaging botanical subjects with optical coherence tomography: a feasibility study*, Transactions of the ASAE, Vol. 46 (6), 1751-1757, 2003.
- [19] Kagemann L. et al., *Repeated, noninvasive, high resolution spectral domain optical coherence tomography imaging of zebrafish embryos*, Molecular Vision, Vol. 14, 2157-2170, 2008.
- [20] Salech B.E.A., Teich M.C., *Fundamentals of photonics*, Wiley, Second edition, 2007.
- [21] Bouma B.E., Tearney G.J., *Hanbook of Optical Coherence Tomography*, Marcel Dekker, 2002.
- [22] Drexler W., Fujimoto J. G., *Optical Coherence Tomography- Technology and Applications*, Springer, 2008.
- [23] Marschall S., *Frequency-swept Light Sources for Optical Coherence Tomography in the 1060nm range*, Ph. D. thesis, Technical University of Denmark, 2012.