# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Biomedica Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

# Progettazione di un prototipo per l'illuminazione multi-angolare nell'imaging fotoacustico

Relatore

**Candidato** 

Prof.ssa Kristen M. MEIBURGER

Jacopo MASSARA

<u>Correlatori</u>

Ing. Giulia ROTUNNO Ing. Silvia SEONI

Anno accademico 2022/2023

I

### Abstract

La presente tesi si concentra sull'applicazione pratica dell'imaging fotoacustico (PA - Photoacoustic), attraverso l'ottimizzazione di un sistema di illuminazione multiangolare e l'impiego di un holder personalizzato realizzato mediante stampa 3D. L'obiettivo principale è ampliare le potenzialità dell'imaging PA, migliorando la qualità delle immagini e aumentando il Rapporto Segnale-Rumore (SNR – signal to noise ratio), al fine di favorire possibili applicazioni cliniche.

L'imaging fotoacustico combina i vantaggi dell'ottica e degli ultrasuoni, consentendo la visualizzazione di strutture biologiche con alta risoluzione spaziale e buona profondità di penetrazione. Tuttavia, per ottenere immagini di elevata qualità, è fondamentale ottimizzare la configurazione di illuminazione durante la fase di acquisizione dati. A tal fine, si è adottato uno schema di illuminazione multi-angolare, che consente di esplorare diverse proiezioni e angoli di incidenza della luce, migliorando la discriminazione dei dettagli delle strutture analizzate.

Per garantire una sperimentazione accurata, sono stati sviluppati due holder personalizzati attraverso la tecnologia di stampa 3D, i quali assicurano un posizionamento stabile e ripetibile del campione durante le acquisizioni. Questo approccio versatile e adattabile ha dettato una progettazione su misura degli holder, fornendo maggiore flessibilità.

Durante gli esperimenti, sono stati utilizzati strumenti all'avanguardia, come il Phocus Mobile SE ed il Verasonics Vantage 256, rispettivamente per illuminare i campioni ed acquisire i dati ad ultrasuoni che sono stati utilizzati per ricostruire le immagini fotoacustiche. I test comparativi tra i diversi schemi di illuminazione multi-angolare prima e dopo il processing hanno confermato significativi miglioramenti in termini di qualità delle immagini e rapporto SNR.

I test sono stati eseguiti utilizzando l'ambiente di programmazione MATLAB, che ha permesso di elaborare i dati acquisiti e ottenere immagini dettagliate. Inoltre, per garantire una sperimentazione realistica, i test sono stati condotti su dei fantocci preparati in prima persona, permettendo di simulare condizioni biologiche simili a quelle reali.

Le potenziali applicazioni cliniche dell'imaging fotoacustico con uno schema di illuminazione multi-angolare ottimizzato per mezzo di un holder personalizzato sono, dunque, promettenti. Principalmente, questa tecnica offre opportunità avanzate per la diagnosi precoce di patologie, la monitorizzazione terapeutica e la comprensione approfondita dei tessuti biologici.

In conclusione, i risultati ottenuti rappresentano un contributo significativo alla ricerca in questo campo, aprendo nuove possibilità per l'applicazione clinica di questa promettente tecnica. L'unione tra la PAT, la stampa 3D, l'uso di MATLAB e l'approccio della multi-illuminazione offre un'innovativa soluzione che può portare a importanti progressi nell'imaging biomedico, migliorando accuratezza e affidabilità delle immagini.

Alle mie Nonne

## Ringraziamenti

Giunto al termine di questo lungo percorso, ricco di alti e bassi, non posso che dire grazie a tutti coloro che mi hanno sostenuto e affiancato fino ad oggi, 13 dicembre 2023, giorno in cui ho tagliato il traguardo. Un grazie a tutti voi:

Alla prof. Meiburger che mi ha permesso, prima, di appassionarmi alla materia e in particolar modo alle immagini mediche e, poi, di svolgere un progetto di tesi su un argomento così interessante. Un ringraziamento va anche alle dottorande Silvia e Giulia che mi hanno aiutato in differenti fasi del lavoro con la loro grande disponibilità.

A chi ha reso questi anni di lezioni, progetti e studio più leggeri e divertenti. Un grazie enorme va quindi a voi, Nicolas, Ludovico, Francesca, Mattia, che non siete semplici colleghi ma degli amici su cui contare.

Agli amici di una vita che con poche parole, ma quelle giuste, sono sempre stati in grado di sostenermi e farmi sentire ben voluto e mai solo, permettendomi di andare avanti nei momenti di difficoltà. Non serve che vi nomini perché sapete meglio di me quanto siete importanti.

A Chiara, la persona con cui ho condiviso la maggior parte dei miei anni, che con il suo essere solare, la sua irrazionalità, la sua pazzia e la sua grandezza d'animo mi ha sempre completato donandomi i momenti di gioia e spensieratezza di cui ho avuto bisogno in questi anni impegnativi.

Alla mia famiglia il ringraziamento più importante e speciale di tutti, perché senza di loro non sarei qui. Grazie a Mamma che mi è sempre stata accanto insegnandomi a non mollare mai e a lottare per i miei obiettivi perché i sacrifici vengono ripagati. Grazie a Papito che ha creduto in me più di chiunque, facendomi sentire, con il suo grande affetto, sempre all'altezza e mai inferiore a nessuno. Grazie al mio Papà che mi ha dimostrato di esserci, giorno per giorno da sempre, sostenendomi e trasformando i chilometri di distanza in pochi centimetri. Un grande grazie va anche alle mie Nonne a cui dedico questo progetto di tesi perché voglio ripagarvi del bene che mi avete sempre donato. Grazie a tutta la mia famiglia.

Infine, un grazie va a me stesso perché con la mia dedizione, la costanza, l'organizzazione e l'impegno son riuscito ad arrivare all'obiettivo finale che mi auguro possa essere l'inizio di una vita di successi e felicità.

# Indice

INTRODUZIONE ALL'EFFETTO FOTOACUSTICO		
1.1 PAI: QUANDO LUCE E SUONO SI FONDONO NEL FOTOACUSTICO	1	
1.2 LA STORIA DELLA FOTOACUSTICA	3	
Dalla scoperta di Bell agli sviluppi futuri nell'imaging biomedico	3	
La fotoacustica nel XX secolo	4	
Le prime applicazioni biomedicali	5	
<b>1.3</b> BASI TEORICHE DELLA FOTOACUSTICA	8	
I principi fisici dell'effetto fotoacustico	8	
Le proprietà del PAI	11	

STATO DELL'ARTE	14
2.1 LE TIPOLOGIE DI IMAGING FOTOACUSTICO	14
Tomografia fotoacustica – PAT	
Microscopia fotoacustica – PAM	
Endoscopia fotoacustica – PAE	
Spettroscopia fotoacustica	
Flussimetria doppler	
Termometria fotoacustica	
2.2 LE SORGENTI LUMINOSE	24
Laser Phocus Mobile SE	
2.3 SISTEMI MULTI-ANGOLARI	
Soluzione 1	
Soluzione 2	
Soluzione 3	

MATERIALI E METODI	
3.1 SISTEMA DI ACQUISIZIONE	
3.2 PROGETTAZIONE PROTOTIPO	
Dispositivo precedente	
Supporti ideati	
Verifica sperimentale delle soluzioni	
Osservazioni sulla progettazione	

3.3 PROGETTAZIONE FANTOCCI E VALIDAZIONE	51
Le acquisizioni	
I fantocci	
Phantom realizzati e immagini acquisite	
RISULTATI	75
4.1 ELABORAZIONE DELLE IMMAGINI	76
4.2 DISCUSSIONE DEI RISULTATI OTTENUTI	
CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI	96
APPENDICE	98
BIBLIOGRAFIA	

### **Capitolo 1**

### Introduzione all'effetto fotoacustico

#### 1.1 PAI: quando luce e suono si fondono nel fotoacustico

Nel vasto panorama delle tecniche di imaging biomedico, l'imaging fotoacustico (PAI) si pone come una tecnica intrigante e promettente. Questa metodologia, attraverso la sinergia tra onde luminose e acustiche, ha aperto nuove prospettive nella pratica clinica, consentendo diagnosi accurate ed un monitoraggio efficace [1].

Si tratta di un approccio medico che offre una serie di vantaggi: l'imaging fotoacustico è eseguito con un metodo non invasivo, dai costi contenuti, a bassa energia, libero dall'uso di agenti esogeni e basato sull'impiego di radiazioni non ionizzanti, che lo rendono pratico e sicuro. Inoltre, la capacità di penetrare nei tessuti con una discreta profondità, rispetto alle tecniche tradizionali, conferisce ad esso un ruolo di spicco nel campo dello screening tumorale. Ulteriore aspetto da non trascurare poiché risulta essere vantaggioso nell'identificazione di piccole lesioni nei tessuti, è la notevole risoluzione spaziale [2].

Tra le altre applicazioni emergono l'analisi dell'irrorazione sanguigna, la valutazione delle funzioni cerebrali, la possibilità di visualizzare strutture anatomiche complesse e perfino di sondare le proprietà dei materiali.

L'imaging fotoacustico è in continua evoluzione, tanto che con ulteriori sviluppi e raffinamenti potrebbe aprirsi a nuove frontiere. L'obbiettivo predominante è la realizzazione di sistemi robusti ma al tempo stesso versatili, facili da usare e in grado di sviluppare immagini di alta qualità.



Figura 1: Immagine fotoacustica che rivela la struttura dei vasi sanguigni retinici [46]

#### **1.2 La storia della fotoacustica**

#### Dalla scoperta di Bell agli sviluppi futuri nell'imaging biomedico

L'effetto fotoacustico, noto anche come effetto fototermico o effetto termoelettrico, rappresenta una delle pietre miliari nella comprensione delle interazioni tra la luce e la materia.

La scoperta di questo fenomeno è riconducibile al XIX secolo, quando Alexander Graham Bell osservò l'effetto della radiazione ottica sull'aria [3]. Il fisico tedesco notò che, quando un materiale assorbiva rapidamente l'energia luminosa, poteva subire variazioni termiche locali, provocando onde sonore udibili. Questo fenomeno, che Bell nominò effetto "foto-fonico" o "radiofonico", rivelò una nuova via per la conversione dell'energia luminosa in energia acustica, aprendo la strada all'effetto fotoacustico.

È sulla base di questa osservazione che Bell e il suo assistente Charles Sumner Tainter raggiunsero un risultato straordinario nel campo della comunicazione: attraverso un esperimento, riuscirono a trasmettere messaggi vocali senza fili per circa duecentotredici metri, sfruttando la luce come mezzo di trasmissione.

Bell presentò al mondo questa innovazione, il 27 agosto 1880, con l'introduzione del "Photophone" [4, 5], un dispositivo all'avanguardia che utilizzava il principio dell'effetto fotoacustico e che, come si evince dalla schematizzazione in *Figura 2*, si componeva di due unità principali: trasmettitore e ricevitore.



Figura 2: Rappresentazione schematica del Foto-telefono di A.G.Bell nelle sue componenti [4]

Il trasmettitore consisteva in un disco di vetro sottile e riflettente, posto su un telaio e connesso ad un tubo flessibile terminante in un'imboccatura di gomma. Sul disco veniva proiettata la luce solare che, dopo essere riflessa, veniva indirizzata verso il ricevitore. Questa seconda componente, dotata di uno specchio parabolico, aveva il compito di catturare la luce riflessa proveniente dal trasmettitore. Al punto di focalizzazione della luce, si trovava una cella di selenio in grado di rilevare la luce e convertirla in segnali elettrici: parlando nel dispositivo, la pressione delle onde sonore sulla membrana di gomma induceva una vibrazione che influenzava la luce riflessa, determinandone fluttuazioni di intensità; proprio queste variazioni luminose venivano convertite dalla cella. A questo punto, i segnali elettrici venivano tradotti in suoni da un circuito telefonico.

L'effetto "sonoro" indotto dalla luce suscitò grande entusiasmo nella comunità scientifica dell'epoca, tanto che molti scienziati iniziarono a condurre ulteriori ricerche sperimentali e teoriche sul fenomeno.

Nel periodo compreso tra il 1880 e il 1881, vennero eseguite sperimentazioni al fine di esplorare il fenomeno fotoacustico. Tra gli studiosi che si dedicarono alla ricerca, si possono annoverare Rayleigh, Mercadier e Preece. Rayleigh, in particolare, concepì una teoria che delineava l'origine del segnale sonoro come una conseguenza delle vibranti oscillazioni di una piastra soggetta a un riscaldamento non uniforme [6]. Contestualmente, Mercadier e Preece [7], condussero ricerche approfondite su un'ampia varietà di materiali, suggerendo che la generazione del suono fosse riconducibile all'espansione e alla contrazione dell'aria che circonda la superficie dell'oggetto sottoposto a riscaldamento. Anche figure quali Röntgen [8] e Tyndall [9] contribuirono a tali indagini, dimostrando che il fenomeno non si limitava ai solidi, ma si manifestava altresì nei gas e nei liquidi.

#### La fotoacustica nel XX secolo

Con l'inaugurarsi del XX secolo, l'interesse per questo fenomeno subì una decrescente attenzione, conseguentemente alle notevoli sfide connesse alle misurazioni quantitative e alle limitazioni della percezione uditiva umana. Tuttavia, durante il periodo della Prima Guerra Mondiale, sporadiche e circoscritte ricerche, principalmente riconducibili al settore militare, si focalizzarono sullo sviluppo di sistemi di trasmissione dati fondati sull'effetto fotoacustico.

Successivamente a cinque decenni di oblio, fu il 1938 a segnare il rinascimento del foto-telefono grazie al contributo di Veingerov [10]. Egli introdusse un approccio tecnologico volto all'analisi infrarossa dei gas, mediante l'impiego di microfoni e sorgenti IR. Tale dispositivo consentiva la misurazione delle variazioni di pressione indotte dall'impulso luminoso. In tale contesto, emerse il concetto di "effetto optoacustico".

Nelle fasi successive, l'idea di utilizzare la luce quale mezzo di trasmissione informativa continuò a progredire, trovando nuova vita con l'avvento dei laser negli anni '60. Tale evoluzione, infatti, rinvigorì l'analisi dei gas, consentendo la rilevazione di concentrazioni estremamente ridotte grazie alla straordinaria potenza offerta da tale tecnologia.

Il 1968 vide l'elaborazione di spettrofoni a illuminazione laser ad opera di Kerr e Atwood [11], seguiti nel 1971 da Kreuzer. Questo marcò una pietra miliare nella storia dell'effetto fotoacustico, aprendo la strada a ulteriori sviluppi nell'analisi dei gas e nelle tecnologie di comunicazione ottica a elevata capacità di trasmissione.

Negli anni '70, presso i Bell Laboratories, emerse un interesse nei confronti delle applicazioni su campioni solidi e liquidi, che erano stati trascurati in favore delle ricerche sui gas. In particolare, Rosencwaig fu un protagonista di spicco in questo ambito, sia introducendo il termine "fotoacustico" sia eseguendo una serie di esperimenti che ne illustravano le possibili implicazioni, spaziando dalla spettroscopia di materiali biologici come citocromi ed emoglobine, alla microscopia di sostanze inorganiche [12].

#### Le prime applicazioni biomedicali

Le prime indagini nell'ambito biomedico riguardanti la generazione di onde acustiche attraverso l'assorbimento di impulsi luminosi brevi, hanno preso avvio nel 1964, quando Amar e i colleghi eseguirono esperimenti *in-vivo* sugli occhi di un coniglio [13]. Utilizzando un laser a rubino, Amar affermò che tale procedura non provocò alcun danno alla retina e che, durante ogni impulso, l'oscillogramma del rilevatore rivelava una successione di transitori acustici. Inoltre, Amar condusse anche studi su campioni umani *ex-vivo*.

Nel 1981, Bowen emerse come uno dei pionieri nell'applicazione del metodo fotoacustico per la generazione di immagini A-mode dei tessuti molli. Egli concepì

l'idea di impiegare diverse forme di radiazione per generare onde termo-acustiche, con l'obiettivo di rivelare dettagli e proprietà altrimenti inosservabili. Bowen e i suoi collaboratori condussero esperimenti che dimostrarono in maniera sperimentale la generazione di segnali termoacustici attraverso l'applicazione di correnti elettriche ai tessuti. Inoltre, essi presentarono i primi segnali ottenuti *in-vivo* da un braccio umano [14].

Le prime rappresentazioni bidimensionali furono conseguite da Olsen, il quale, in collaborazione con Lin, acquisì segnali da un modello di mano sottoposta a microonde. Parallelamente, Cross e i suoi ricercatori esplorarono le risposte acustiche dell'aorta di un cadavere quando esposta a radiazione laser visibile e ultravioletta mediante brevi impulsi.

Negli anni '90, ulteriori sperimentazioni *in-vivo* furono condotte da Chen e colleghi [15], i quali svilupparono una sonda ad ultrasuoni con un laser Nd:YAG, per ottenere immagini di un dito umano. In questo decennio, l'evoluzione del settore subì una notevole accelerazione, culminando nel 1994 con il raggiungimento dell'immagine di una soluzione lipidica internamente contrassegnata da un liquido di contrasto, mediante l'applicazione di una tecnica laser optoacustica.



Figura 3: Linea temporale raffigurante scoperte ed eventi significativi della storia della fotoacustica [4]

L'effetto fotoacustico ha quindi attraversato un variegato susseguirsi di fasi, dall'epoca della sua scoperta al suo declino e successiva rinascita, per giungere a rappresentare, grazie alle scoperte illustrate nella *Figura 3*, una tecnica innovativa ed efficace in svariate applicazioni mediche [16, 17]. Tra queste, spiccano la diagnosi precoce di patologie, l'analisi dettagliata dei tessuti biologici e le investigazioni emodinamiche.

#### **<u>1.3 Basi teoriche della fotoacustica</u>**

#### I principi fisici dell'effetto fotoacustico

L'imaging fotoacustico (PA) è una modalità di imaging biomedico che ha visto una crescita esponenziale negli ultimi decenni. Questa modalità ibrida, basata sulla rilevazione di ultrasuoni generati attraverso l'illuminazione laser, combina la specificità spettroscopica dell'imaging ottico con l'elevata risoluzione spaziale dell'imaging ecografico [1]. Emerge per i molteplici vantaggi in ambito medico in quanto permette di ottenere informazioni dettagliate sulla composizione e sulla morfologia dei campioni, con una buona profondità di penetrazione.

Il segnale trae origine dal fenomeno della fotoacustica, che si verifica quando un materiale assorbe energia luminosa e la converte in energia acustica. Tale effetto, come illustrato schematicamente nella *Figura 4*, si sviluppa grazie all'irradiazione del tessuto con impulsi laser di durata nell'ordine dei nanosecondi. Successivamente, i cromofori tissutali assorbono la luce innescando un processo di conversione dell'energia ottica in energia termica. Il mezzo, dunque, subisce un incremento termico a cui consegue la così detta espansione termo-elastica. Successivamente a tale evento, segue la conversione da energia termica a meccanica; infatti, si verifica un aumento di pressione, localmente alla zona irradiata, con conseguente emissione del segnale acustico a bassa intensità. Queste onde acustiche, anche nominate onde di pressione, possono essere ricevute con trasduttori a ultrasuoni per poi essere elaborate in modo da formare l'immagine finale e dettagliata delle strutture interne.



Figura 4: Sequenza degli eventi caratterizzanti l'imaging fotoacustico [47]

Esaminando il fenomeno da una prospettiva termodinamica e acustica, ciò che si verifica è la generazione e successiva propagazione di un'onda di pressione [17]. Quest'ultima, in un secondo momento, viene convertita in un segnale elettrico, la cui morfologia dipende dai tempi di rilevamento dell'onda meccanica per mezzo del trasduttore ultrasonografico. Tale considerazione, permette di comprendere che l'immagine fotoacustica rappresenta essenzialmente la distribuzione di pressione indotta dall'interazione tra fascio luminoso e tessuto.

Specificatamente, al fine di garantire la formazione di questa onda acustica, è fondamentale che i sistemi PAI siano costituiti da laser capaci di emettere impulsi intermittenti di breve durata, generalmente inferiori a 10 ns. La scelta di fonti luminose di questo tipo è cruciale per instaurare le condizioni di confinamento termico e delle sollecitazioni al fine di ottenere una variazione di pressione legata in modo proporzionale unicamente all'assorbimento ottico [17, 18, 19].

Dal punto di vista analitico, è possibile descrivere questa situazione mediante l'utilizzo dell'equazione seguente:

$$p_o(r) = \Gamma H(r)$$
 (equazione 1)

Il termine  $\Gamma$  è detto coefficiente di Grüneisen, cioè una costante adimensionale termodinamica che suggerisce quanto la conversione dell'energia termica in pressione è efficace [17]. Il valore che assume è definito dall'equazione 2:

$$\Gamma = \frac{\beta c^2}{c_p} \qquad (equation e 2)$$

dove  $\beta$  è il coefficiente termico di espansione del volume, *c* è la velocità del suono nel mezzo mentre  $C_p$  è la capacità termica specifica del tessuto a pressione costante. Invece, il termine H(r) definisce la distribuzione di energia ottica assorbita ed è data dal prodotto tra il coefficiente di assorbimento locale  $\mu_a(r)$  e la fluenza ottica  $\varphi_0(r, \mu_a, \mu_s, g)$  alla quota r = 0, dove  $\mu_s$  è il coefficiente di scattering mentre g è un fattore di anisotropia, moltiplicato per un termine esponenziale.

$$H(r) = \mu_a(r)\varphi_0(r, \mu_a, \mu_s, g)e^{-\mu_{eff}(r)} \qquad (equazione 3)$$

 $\mu_{eff}(r)$  è il coefficiente di estinzione dei tessuti ed è funzione dei coefficienti di assorbimento e di scattering [20-22]:

$$\mu_{eff}(r) = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s)} \qquad (equation e 4)$$

Volendo quindi esplicitare l'equazione 1, si ottiene:

$$p_o(r) = \frac{\beta c^2}{c_p} \mu_a(\mathbf{r}) \varphi_0(\mathbf{r}, \mu_a, \mu_s, \mathbf{g}) e^{-\mu_{eff}(r)} \quad (equatione \ 5)$$

Come si evince da quest'ultima equazione, la pressione  $p_o$  dipende da parametri meccanici, termodinamici e ottici. Tuttavia, nel contesto dell'imaging fotoacustico, si osserva che le proprietà termodinamiche e meccaniche rimangono pressoché invariate e dunque, l'elemento determinante per l'ottenimento del contrasto nelle immagini fotoacustiche risiede nell'assorbimento ottico dei materiali, oltre che nelle loro proprietà di diffusione [20]. Conseguentemente si ha una grande variabilità in funzione della lunghezza d'onda impiegata nel sistema di illuminazione.

Per tali motivazioni, le immagini PA vengono denominate "absorption based" e si prestano perfettamente alla visualizzazione di strutture e caratteristiche anatomiche che contengono un'abbondanza di cromofori endogeni, in quanto risultati diversi sono facilmente ottenibili andando unicamente a modulare la lunghezza d'onda a cui è impostata la sorgente [17]. A riguardo, la variazione del coefficiente di assorbimento  $\mu_a$  di alcuni importanti cromofori in funzione della lunghezza d'onda è mostrata in *Figura 5*:



Figura 5: Spettri del coefficiente di assorbimento di cromofori endogeni umani [17]. In rosso l'emoglobina ossigenata (HbO2), in blu l'emoglobina deossigenata (HHb), in nero l'acqua (H2O), in nero tratteggiato la melanina, in marrone e in rosa il tessuto lipidico, in verde e giallo rispettivamente collagene ed elastina.

Un'immagine fotoacustica si configura come un'affascinante variante dell'immagine ecografica e si distingue per la sua capacità di rilevare con precisione sostanze quali emoglobina, lipidi, acqua e altri cromofori in grado di assorbire luce. Questo tratto conferisce a tale metodologia un'eccezionale specificità diagnostica, una notevole profondità di penetrazione ed una risoluzione spaziale scalabile. Tali attributi prestano l'imaging PA a un'ampia varietà di applicazioni nella medicina clinica, nella ricerca preclinica e nella biologia di base [23]. In particolare, è uno strumento diffuso per lo studio del cancro, delle malattie cardiovascolari, delle anomalie del microcircolo e di altre condizioni patologiche.

#### Le proprietà del PAI

Come affermato in precedenza, la qualità delle immagini ottenute attraverso la tecnica fotoacustica è sostanzialmente influenzata dai fenomeni di assorbimento ottico. Nello specifico, i fattori predominanti sono i coefficienti di assorbimento  $(\mu_a)$  e di scattering  $(\mu_s)$ , i quali possono determinare limitazioni significative per le proprietà delle immagini ottenute tramite questa tecnica. Tra le più critiche da considerare, emergono la profondità di penetrazione e la risoluzione spaziale.

#### PROFONDITA' DI PENETRAZIONE

Nei tessuti biologici, la profondità di penetrazione è accuratamente descritta dal coefficiente di attenuazione efficace, presentato nell'*equazione 4* che è di seguito richiamata:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s)}$$

Quando la luce attraversa i tessuti umani, essendo questi un mezzo di scattering omogeneo, inizia a diffondersi in modo casuale una volta raggiunta la profondità di penetrazione. Questo comportamento è strettamente legato all'interazione tra la luce e le strutture interne del mezzo; precisamente al suo aumentare, cui consegue un incremento di profondità, l'irradianza luminosa diminuisce secondo un andamento esponenziale. L'irradianza rappresenta l'intensità di luce in una regione specifica ed è direttamente proporzionale al coefficiente  $\mu_{eff}$ .

In particolare, il reciproco del coefficiente di attenuazione efficace,  $\frac{1}{\mu_{eff}}$  fornisce un'indicazione della profondità alla quale la luce può penetrare prima di essere significativamente attenuata.

A titolo d'esempio, un sistema di imaging con fascio luminoso nella regione spettrale 600-900 nm associato a parametri di riferimento con valori realistici, garantisce una profondità di penetrazione di circa 8 mm.

In generale, l'attenuazione della luce durante la sua propagazione è un aspetto critico, tanto che l'intensità luminosa diminuisce di un fattore quattro per ogni centimetro di profondità.

Parallelamente, se a tale limitazione si associa un'attenuazione acustica dell'onda piana di circa, ad esempio, 0.75 dB/(cm MHz) ad una frequenza di 10 Hz, si raggiunge una perdita di almeno un ordine di grandezza per centimetro.

Queste limitazioni rappresentano una sfida di rilievo nel campo dell'imaging fotoacustico. Tuttavia, attraverso un'accurata scelta della lunghezza d'onda, dei parametri del trasduttore, l'ottimizzazione della distribuzione della luce e l'elaborazione del segnale, si è dimostrato come si possano ottenere profondità di alcuni centimetri. Tramite differenti studi *in-vivo* si sono raggiunte profondità di circa 4 cm [24] mentre ricerche *in-vitro* hanno permesso di mappare tessuti fino a 12 cm.

#### **RISOLUZIONE SPAZIALE**

La risoluzione spaziale costituisce la capacità di vedere come distinti oggetti piccoli e ravvicinati. Si configura come una proprietà essenziale nell'ambito dell'imaging fotoacustico, e la sua efficacia è correlata a variabili quali la frequenza dell'onda sonora, la sopra citata profondità di penetrazione, il fenomeno dell'attenuazione acustica e, altresì, alle caratteristiche del sistema di acquisizione impiegato.

In situazioni reali, l'attenuazione acustica è un parametro influente che promuove una limitazione dell'ampiezza di banda del segnale PA: questo fatto si traduce nell'avere una gamma di frequenze definita e conseguentemente una risoluzione spaziale massima. Generalmente, frequenze più alte portano ad una risoluzione spaziale migliore anche se, d'altro canto, subendo un'attenuazione maggiore impongono un inferiore limite in profondità, oltre il quale la capacità di risolvere dettagli è minima.

L'elenco seguente mette in evidenza alcuni dati numerici di riferimento quanto alla relazione tra profondità di penetrazione e risoluzione spaziale ottenibile:

- Penetrazione di alcuni cm: risoluzione spaziale dell'ordine del mm;
- Penetrazione di alcuni mm: risoluzione spaziale dell'ordine dei  $100 \mu$ m;
- Penetrazione di 100  $\mu$ m: risoluzione spaziale dell'ordine dei 10  $\mu$ m.

Negli studi, al fine di ottenere una buona risoluzione spaziale, usualmente si adoperano come sorgente luminosa impulsi attorno alle decine di nanosecondi in modo tale da avere una banda larga, che possa raggiungere frequenze di qualche megahertz [17].

# **Capitolo 2 Stato dell'arte**

Nel presente capitolo, vengono esposte le principali tecniche relative all'Imaging Fotoacustico (PAI), nonché una dettagliata analisi dei dispositivi e delle tecnologie attualmente disponibili. L'obiettivo principale consiste nell'offrire una solida base di studio su cui improntare sviluppi futuri finalizzati all'ottimizzazione delle acquisizioni fotoacustiche. Questo processo mira a consolidare e promuovere ulteriormente il campo dell'Imaging Fotoacustico, al fine di garantire una frontiera sempre più intrigante e avanzata nel contesto dell'imaging biomedico e delle applicazioni correlate.

#### 2.1 Le tipologie di imaging fotoacustico

Nel contesto dell'Imaging Fotoacustico (PAI), l'ottenimento di immagini fotoacustiche impiega diversi metodi, sebbene condividano uno schema operativo di base. Fondamentalmente, questo approccio si basa su un sistema costituito da una sorgente di fasci luminosi e da un sistema di rilevamento acustico, entrambi connessi a un generatore di segnali di trigger che coordinano l'attivazione sequenziale dell'impulso luminoso e dell'acquisizione acustica. In una fase successiva, le immagini fotoacustiche vengono elaborate attraverso un'apposita interfaccia di calcolo.

Diverse tecniche si sono evolute per soddisfare esigenze specifiche di imaging e diagnostica [17].

Tra le principali emergono:

- Tomografia fotoacustica (PAT)
- Microscopia fotoacustica (PAM)
- Endoscopia fotoacustica (PAE)
- Spettroscopia fotoacustica
- Flussimetria Doppler
- Termometria

Di seguito, si procede con un'analisi dettagliata per ciascuna delle tecniche sopra elencate.

#### Tomografia fotoacustica – PAT

La Tomografia Fotoacustica (PAT) è una tecnica di imaging che integra con successo l'ottica e l'acustica per la generazione di immagini tridimensionali ad alta risoluzione di tessuti biologici. Tale approccio può essere considerato come uno dei metodi di imaging più tradizionali e versatili attualmente a disposizione, e trova applicazione in una vasta gamma di campi, come l'imaging cerebrale, la diagnosi del cancro o il monitoraggio dell'angiogenesi [17].

Come illustrato schematicamente nella *Figura 4*, la PAT sfrutta fasci di luce per generare onde sonore a varie profondità all'interno dei tessuti biologici, permettendo successivamente la ricostruzione tridimensionale della distribuzione di assorbimento della luce in tali tessuti mediante l'applicazione di algoritmi di retroproiezione.

In questa tecnica, la rilevazione viene comunemente effettuata secondo diverse geometrie di scanner, come mostrato nella *Figura 6*. Queste geometrie comprendono un'implementazione planare, una configurazione sferica e un'applicazione di tipo cilindrico.



Figura 6: geometrie di rilevamento nella PAT: (a) sferica [26], (b) cilindrica [27], (c) planare [28]

Ognuna delle tipologie illustrate presenta vantaggi e limitazioni specifiche, consentendo agli operatori di adattare la metodologia PAT alle esigenze di imaging dei tessuti biologici.

Gli scanner planari [28] si caratterizzano per la notevole versatilità e la capacità di fornire accesso a una vasta gamma di obiettivi anatomici. Questi dispositivi trovano particolare utilizzo quando è necessario esplorare tessuti situati in prossimità della superficie corporea, come nel caso dell'analisi della microvascolarizzazione cutanea. D'altro canto, trovano applicazioni altrettanto rilevanti nell'indagine di strutture più profonde, come le ossa e i polmoni.

Diversamente, le geometrie di rilevamento sferiche e cilindriche, caratterizzate dalla necessità di un maggior numero di punti di osservazione, presentano un campo applicativo più limitato rispetto agli scanner planari. Le geometrie sferiche [26], ad esempio, trovano applicazione nell'ottenimento di immagini dettagliate della mammella, rivestendo un ruolo cruciale nella diagnosi di patologie mammarie. Al contrario, le geometrie cilindriche [27] si rivelano fondamentali per condurre analisi dell'encefalo, consentendo la rilevazione di eventi epilettici, il monitoraggio della crescita tumorale e l'identificazione di cambiamenti cerebrovascolari.

Nella figura seguente, sono presentate le immagini ricostruite corrispondenti a ciascuna tipologia di rilevamento.



(a)





Figura 7: (a) Rete vascolare mammaria acquisita con scanner a geometria di rilevamento sferica [26]. (b)
Vascolarizzazione corticale superficiale di un topo, rilevata con scanner PAT cilindrico [27]. (c) Immagine
PAT in-vivo di una vena, acquisita usando un dispositivo con configurazione planare [28].

A seguire, è presentata una schematizzazione finalizzata a riassumere le caratteristiche principali di ciascuna delle geometrie di rilevamento precedentemente descritte.

#### Scanner sferici:

- Ottima risoluzione spaziale (250 µm)
- Buona penetrazione (fino a 4 cm)
- Apertura angolare maggiore rispetto agli altri due (fino a  $4\pi$ )
- Utilizzano acqua per favorire l'accoppiamento acustico
- Qualità massima per oggetti sferici
- Sorgente sferica in cui è inserito il target



Figura 8: Rappresentazione di uno scanner a geometria di rilevamento sferica [17].

#### Scanner cilindrici:

- Buona risoluzione spaziale (200 µm)
- Tempi di scansione elevati (fino a qualche ora)
- Apertura angolare pari a  $2\pi$
- Alto contrasto



Figura 9: Rappresentazione di uno scanner a geometria di rilevamento cilindrica [17].

Scanner planare:

- Risoluzione spaziale anisotropa
- Profondità di penetrazione di decine di millimetri
- Apertura angolare dipendente dalla geometria del target
- Adopera una sonda ecografica standard



Figura 10: Rappresentazione di uno scanner a geometria di rilevamento planare [17].

#### Microscopia fotoacustica – PAM

La Microscopia Fotoacustica (PAM) è una tecnica di imaging di alta precisione che consente di visualizzare strutture biologiche su scala microscopica. È ampiamente utilizzata in biologia cellulare e nel monitoraggio delle malattie oculari [17]. Tale metodo ad alta risoluzione si suddivide in due principali categorie, in relazione alla definizione della risoluzione spaziale:

- "Acoustic Resolution Photoacoustic Microscopy" (AR-PAM): in questa modalità, si fa uso di un rilevatore di ultrasuoni focalizzato, e le risoluzioni spaziali assiale e laterale sono determinate dalla fisica della propagazione e del rilevamento degli ultrasuoni. La AR-PAM si distingue per la sua capacità di fornire immagini ad alta risoluzione in profondità nei campioni biologici.
- "Optical Resolution Photoacoustic Microscopy" (OR-PAM): in contrapposizione, nella OR-PAM, viene impiegato un raggio laser focalizzato che, mentre si propaga nel tessuto, definisce la risoluzione spaziale in un singolo piano, di solito quello laterale. Questa tecnica è principalmente associata all'analisi di strutture superficiali, poiché la profondità di penetrazione è limitata a causa dello scattering ottico.

La scelta tra OR-PAM [30] e AR-PAM [29] dipende dall'applicazione specifica e dalla profondità del campione da studiare. La OR-PAM è particolarmente adatta per l'imaging di superficie; infatti, è comunemente utilizzata per l'analisi di tessuti come la retina o vasi sanguigni superficiali. Al contrario, la AR-PAM trova impiego nell'analisi di organi interni o di strutture complesse, come il cervello.

Al fine di chiarire il funzionamento di queste due tipologie di dispositivi, di seguito sono presentate immagini esplicative.



Figura 11: Schema di funzionamento (a) AR-PAM, (b) OR-PAM [17].

#### Endoscopia fotoacustica – PAE

L'Endoscopia Fotoacustica (PAE) emerge come una tecnologia che consente l'osservazione di aree interne del corpo umano, attraverso l'utilizzo di sonde endoscopiche avanzate. Queste sonde endoscopiche miniaturizzate rappresentano un'innovazione nell'ambito dell'imaging medico, consentendo l'accesso ai tessuti interni attraverso orifizi naturali o dalla superficie cutanea [32]. Tale versatilità apre le porte a una vasta gamma di applicazioni cliniche, che spaziano dall'analisi delle malattie coronariche alla valutazione del cancro e delle patologie gastrointestinali. Un aspetto notevole che contribuisce alla completezza delle analisi, offrendo un quadro clinico dettagliato, è la capacità di condurre l'ecografia intravascolare (IVUS) simultaneamente all'endoscopia fotoacustica.

La PAE si basa sull'utilizzo di trasduttori acustici piezoelettrici e di fibra ottica. La rotazione a 360° di queste sonde endoscopiche permette di acquisire immagini endocavitarie ad alta risoluzione. Tuttavia, è importante sottolineare che le sfide da affrontare sono molteplici, e tra queste emerge la necessità di miniaturizzare i dispositivi, che devono avere dimensioni dell'ordine di circa 250 µm.

La *Figura 12* che segue illustra lo schema di funzionamento e la tipologia di acquisizione eseguibile attraverso questa tecnica avanzata [31].



Figura 12 [17]: (a) Immagine fotoacustica intravascolare ottenuta con PAE ad una lunghezza d'onda di 1230 nm, (b) Schema di funzionamento dell'endoscopia fotoacustica

#### Spettroscopia fotoacustica

La Spettroscopia Fotoacustica è una tecnica che sfrutta la capacità intrinseca di diversi composti di assorbire la luce a specifiche lunghezze d'onda. Questa tecnica trova applicazione sia nell'ambito delle analisi chimiche che nella caratterizzazione dei tessuti biologici. In generale, la spettroscopia fotoacustica offre molteplici vantaggi in campo medico.

Oltre al notevole miglioramento del contrasto nelle immagini, ottenuto attraverso l'acquisizione di dati a diverse lunghezze d'onda e l'analisi spettroscopica, questa metodologia si rivela fondamentale quando è necessario quantificare le concentrazioni di cromofori nei tessuti biologici. Ad esempio, la conoscenza delle concentrazioni di emoglobina ossigenata (HbO2) e deossigenata (HHb) consente di estrapolare informazioni sulla saturazione dell'ossigeno nel sangue. Inoltre, la spettroscopia fotoacustica viene ampiamente impiegata come strumento per rilevare e quantificare l'accumulo di agenti di contrasto [17].

Una delle sfide principali associate a questa tecnica è rappresentata dall'interferenza spettrale che può verificarsi quando più cromofori sono presenti nella stessa regione di interesse. Per isolare e quantificare con precisione le diverse componenti presenti è necessario ricorrere a complessi approcci di post-processing basati su fattori di correzione empirici o modelli matematici non lineari.

#### Flussimetria doppler

La Flussimetria Doppler è una tecnica avanzata utilizzata per misurare con precisione la velocità del flusso sanguigno nei vasi, principalmente i microvasi. In particolare, sfrutta l'effetto fotoacustico per rilevare le variazioni di frequenza Doppler delle onde acustiche generate dai globuli rossi in movimento.

La Flussimetria Doppler Fotoacustica (PDA) si distingue dal tradizionale Doppler ultrasonico in quanto non si basa su fenomeni di riflessione, bensì utilizza direttamente le onde sonore generate dai globuli rossi in movimento. Questo offre un notevole vantaggio in termini di rapporto segnale-rumore (SNR), garantendo la possibilità di rilevare e quantificare le velocità del flusso sanguigno in maniera accurata [33].

Nel contesto delle applicazioni biomediche, questa metodologia offre significative opportunità di studio, in particolare quanto alla caratterizzazione dei vasi tumorali. La PDA, infatti, si presenta come uno strumento essenziale per indagare su caratteristiche come tortuosità e irregolarità dei vasi tumorali, che spesso determinano flussi caotici e variabili, nonché anomalie nell'ossigenazione del sangue.

Tuttavia, è importante notare che la Flussimetria Doppler Fotoacustica presenta alcune sfide da affrontare [34]. Tra le principali vi sono la difficoltà nel quantificare con precisone la velocità del flusso e la penetrazione ottica limitata che segna negativamente l'applicabilità in profondità.



Figura 13: Principio di funzionamento alla base della Flussimetria Doppler Fotoacustica [33].

#### Termometria fotoacustica

La Termometria Fotoacustica rappresenta una tecnica biomedica di rilievo che, sfruttando le variazioni di temperatura generate dall'assorbimento di luce laser monitora con precisione le condizioni termiche dei tessuti o dei campioni biologici. Questo approccio si basa sul coefficiente di Grüneisen, il quale consente la rilevazione delle variazioni di temperatura tramite le variazioni nella pressione acustica generate dal riscaldamento [17].

Le applicazioni della Termometria Fotoacustica si estendono in diversi ambiti, con particolare rilevanza nell'area della termoterapia [35]. Qui, il calore prodotto da sorgenti laser viene impiegato per distruggere tessuti patologici, tra cui tumori, e dunque la possibilità di monitorare in tempo reale la variazione termica assume un ruolo chiave. Infatti, ciò consente di determinare con esattezza quali parti del tumore hanno raggiunto la temperatura necessaria per distruggere selettivamente le cellule malate. Questa informazione è fondamentale per regolare i parametri del trattamento in modo da massimizzare l'efficacia e minimizzare il danno ai tessuti circostanti.

Da sottolineare che la capacità di mappare con precisione la temperatura attraverso la Termometria Fotoacustica trova impiego anche nel monitoraggio della terapia ad ultrasuoni focalizzati ad alta intensità (HIFU).

#### 2.2 Le sorgenti luminose

Nel contesto dell'imaging fotoacustico, i ricercatori si affidano principalmente a due categorie di sorgenti luminose, ossia i laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e i LED (Light Emitting Diode) [36, 37]. Entrambe queste tipologie di sorgenti sono basate su dispositivi a semiconduttore in grado di generare radiazioni luminose, ma si distinguono nettamente per le loro caratteristiche di emissione, l'efficienza energetica, il principio di funzionamento e le applicazioni specifiche.



Figura 14 [37]: (a) Diodo laser. (b) Diodo LED.

Nella tabella seguente, si esaminano in dettaglio le differenze tra le caratteristiche di queste due sorgenti luminose, sottolineando come influenzino direttamente l'applicabilità e l'efficacia delle tecniche di imaging fotoacustico.

SPECIFICHE	LASER	LED
Principio di lavoro	Emissione stimolata	Elettro-luminanza, emissione spontanea
Velocità di risposta	Veloce (real-time imaging)	Lenta
Natura del fascio	Coerente, monocromatico e collimato	Incoerente
Costo	Moderato, elevato	Inferiore
Durata impulsi	Breve ( $< 10 \text{ ns}$ )	Duraturi
Ingombro	Maggiore	Minimo, ottima portabilità

Tabella 1: Riassume le specifiche delle due tipologie di sorgente luminosa

#### Laser Phocus Mobile SE

Nel panorama della ricerca scientifica, nonostante i significativi progressi nel campo dei diodi emettitori di luce (LED), i laser tradizionali mantengono ancora un'ampia diffusione nell'ambito dell'imaging fotoacustico [36]. Da un lato, tra i vantaggi offerti dai LED, va menzionata l'alta frequenza di ripetizione, che rende questi dispositivi particolarmente adatti per applicazioni che richiedono una rapida acquisizione dati. Tuttavia, i LED sono caratterizzati da svantaggi significativi, tra cui una minore energia d'impulso e, di conseguenza, una potenza inferiore rispetto ai laser tradizionali. In aggiunta, la minore focalizzazione del fascio luminoso associata ai LED può influire sulla precisione dell'immagine risultante. Inoltre, si osserva una riduzione della qualità dell'immagine in relazione alla diminuzione del rapporto segnale-rumore (SNR) e della risoluzione.

Un ulteriore svantaggio rilevante dei LED è la limitata gamma di lunghezze d'onda emesse, il che rende difficile l'implementazione dell'imaging fotoacustico multispettrale. Questo limite risulta essere critico in contesti come il campo medico, dove la capacità di distinguere strutture con diversi profili di assorbimento ottico, come nel caso dei tessuti umani, è di importanza fondamentale per la diagnosi e la caratterizzazione.

Tenendo conto delle considerazioni fatte, le sorgenti laser tradizionali continuano a essere preferite in molte applicazioni di imaging fotoacustico. Nel presente progetto di tesi, è stata impiegata la sorgente laser Phocus Mobile SE della ditta OPOTEK [42, 43].



Figura 15: Laser Phocus Mobile SE di OPOTEK utilizzato negli studi [42].

A seguire viene fatto un quadro generale delle specifiche fondamentali di tale sorgente. Precisamente, questo strumento si distingue per la sua versatilità nella generazione di fasci luminosi a diverse lunghezze d'onda, comprese tra 690 nm e 950 nm, con un picco di energia di 55 mJ a 750 nm.

Per quanto riguarda la frequenza di ripetizione degli impulsi laser è stata settata a 20 Hz, mentre la durata temporale di ciascun impulso varia tra 5 e 7 nanosecondi. Invece, il diametro del fascio laser è di 6 mm, con una divergenza di 10 mrad.

In generale, il laser OPOTEK offre la possibilità di attivare la lampada, che gioca un ruolo fondamentale nell'interazione con il campione, generando impulsi luminosi intermittenti per eccitare gli elettroni. Inoltre, il dispositivo dispone di un Q-switch interno, che influisce sulla potenza del laser, apportando variazioni significative nelle condizioni sperimentali.
#### 2.3 Sistemi multi-angolari

Nel contesto dell'imaging fotoacustico, è fondamentale perseguire diversi obiettivi e soddisfare specifiche richieste al fine di massimizzare l'efficacia di questa tecnica. Tra i fattori di maggior interesse emergono la capacità di condurre l'imaging in tempo reale e la qualità dell'immagine ottenuta, i cui parametri chiave includono la risoluzione e la profondità di penetrazione del fascio laser. Quest'ultima è direttamente correlata alla capacità di osservare dettagliatamente i tessuti biologici in esame. In altre parole, è di cruciale importanza valutare attentamente come l'energia ottica si attenua e si diffonde nei tessuti, soprattutto quando si analizzano strutture biologiche complesse caratterizzate da coefficienti di assorbimento e diffusione differenti. Questa complessità rende ardua l'illuminazione di bersagli situati in profondità, e pertanto uno degli obiettivi principali della ricerca scientifica è la progettazione e la realizzazione di soluzioni che permettano l'illuminazione multi-angolo, allo scopo di raggiungere profondità maggiori nei tessuti biologici in esame.

Il principio sottostante a questo tipo di illuminazione implica la generazione di molteplici punti focali, utilizzando una gamma prestabilita di angoli di incidenza, al fine di acquisire i segnali fotoacustici [38]. L'obiettivo primario è massimizzare la probabilità di concentrazione dell'energia ottica sui bersagli, tenendo conto delle diverse traiettorie seguite dai fotoni attraverso un mezzo con dispersione ottica e acustica. In altre parole, attraverso la variazione dell'orientamento della luce incidente, si creano diverse traiettorie ottiche, aumentando così la probabilità di interazione tra i fotoni e i bersagli per periodi di tempo prolungati, con conseguente miglioramento della qualità dell'output acquisito.



Figura 16: Principio alla base dell'illuminazione multi-angolare [38].

La figura soprastante illustra chiaramente che nell'illuminazione multi-angolo, l'immagine fotoacustica risultante è il prodotto della combinazione delle immagini acquisite da diverse angolazioni. Questo approccio consente di ottenere una rappresentazione completa e dettagliata del bersaglio, sfruttando le informazioni provenienti da diverse prospettive angolari, migliorando così la qualità e la completezza delle immagini fotoacustiche finali.

Considerando l'obiettivo qui menzionato, è utile esaminare alcune delle soluzioni attualmente impiegate nella ricerca scientifica. Fondamentalmente, per raggiungere lo scopo, è necessario sviluppare supporti in grado di consentire la movimentazione dei laser e la variazione dell'angolo del fascio luminoso. Questi supporti, in aggiunta, devono essere strettamente integrati con il trasduttore ultrasonografico poiché la coesione tra questi componenti è fondamentale al fine di ottenere un posizionamento preciso e una sincronizzazione ottimale tra l'illuminazione laser e la raccolta dei segnali fotoacustici.

## Soluzione 1

Un possibile supporto [38], illustrato nella *Figura 17*, è composto da diversi elementi chiave, tra cui un semi-guscio flessibile adattabile alla sonda, due maniglie fissate al semi-guscio utili ad allacciare i laser ed una molla di torsione che collega le due componenti precedentemente menzionate.

Per fornire dati quantitativi, quando le caratteristiche della molla permettono angolazioni comprese tra 33° e 47°, si otterranno rispettivamente distanze focali tra i 5 cm e i 2 cm in profondità.

Un ulteriore dettaglio evidenziato nella figura sottostante riguarda l'espansione dell'area focale (FOV) nel caso dell'imaging multi-angolare. Questo risultato è il frutto della combinazione di parametri come la distanza focale e l'apertura numerica (NA), finalizzata a migliorare la focalizzazione e, di conseguenza, l'intensità luminosa fornita, con l'obiettivo di massimizzare la qualità dell'immagine ottenuta.



Figura 17 [38]: (A) Illustrazione delle componenti di base del supporto. (B) Schema riassuntivo delle profondità di analisi con un sistema di illuminazione fisso (scenario 1) ed uno multi-angolare (scenario 2)

Un problema di questo sistema, poiché richiede un movimento manuale delle impugnature, è rappresentato dall'instabilità durante la fase di acquisizione che porta a una carenza di ripetibilità nelle misurazioni. Dal momento che il sistema manca di una struttura ben definita, è difficile eseguire acquisizioni successive con angolazioni identiche e ciò, dunque, rende problematico stabilire un riferimento accurato mettendo a rischio la precisione dei risultati degli studi, che rischiano di essere casuali, poco affidabili e non ripetibili. Questo aspetto mette in luce l'importanza di sviluppare soluzioni di supporto più stabili e controllate per garantire una maggiore affidabilità e robustezza nelle acquisizioni fotoacustiche.

#### Soluzione 2

Una seconda soluzione [39] è stata sviluppata per affrontare le limitazioni del sistema precedente, ovvero l'instabilità durante le acquisizioni. Questo nuovo approccio si basa sull'utilizzo di supporti dotati di motori appositamente progettati per il controllo angolare. Come evidenziato nella *Figura 18*, tale soluzione è costituita da un supporto per il trasduttore, un sistema di trasmissione e due motori. In termini di componenti di sistema, la soluzione impiega un laser a stato solido, un oscillatore ottico parametrico che consente la generazione di fasci luminosi a lunghezze d'onda variabili e un fascio di fibre ottiche triforcato. Due estremità di quest'ultimo fascio illuminano il campione e sono collocate in prese mobili che permettono la regolazione dell'angolo, mentre la terza estremità è connessa al sensore di un misuratore di energia, consentendo la valutazione in tempo reale della fluenza del laser.

Questo approccio rappresenta un miglioramento significativo rispetto alla soluzione precedente poiché l'uso di motori appositamente progettati per il controllo angolare

fornisce maggiore stabilità durante le acquisizioni fotoacustiche, consentendo misurazioni più accurate e ripetibili.



Figura 18 [39]: (Sx) Illustrazione delle componenti di base del supporto. (Dx) Schematizzazione del movimento angolare eseguibile

Tuttavia, con questa soluzione, emergono alcune problematiche legate all'ingombro e alla sicurezza dell'holder, siccome deve ospitare i motori responsabili della generazione di illuminazioni da diverse angolazioni. Queste criticità potrebbero potenzialmente tradursi in ostacoli che portano ad impraticabilità clinica. In particolare, l'ingombro significativo causato dalla presenza dei motori potrebbe rendere difficile l'utilizzo di questa soluzione in contesti clinici dove lo spazio è limitato. Inoltre, è essenziale considerare le questioni legate alla sicurezza, al fine di evitare potenziali rischi per il personale medico e per i pazienti durante l'uso di questo sistema. Pertanto, nonostante questo holder offra vantaggi in termini di controllo angolare, è necessario affrontare alcune sfide che introduce.

## Soluzione 3

Nel panorama attuale delle tecnologie per l'imaging fotoacustico, è disponibile una terza soluzione progettata per realizzare acquisizioni multi-angolari [40]. In questa configurazione, l'illuminazione è affidata a LED e la regolazione dell'angolazione avviene attraverso un sistema di cerniere solidamente ancorato al trasduttore. Questo sistema è costituito da due supporti identici, ognuno dei quali composto da tre componenti distinte.

Dal punto di vista operativo, la variazione dell'angolazione desiderata è ottenuta tramite la regolazione delle viti che collegano le componenti. Questo consente una

flessibilità angolare che spazia da 0° a 90°, fornendo un ampio intervallo di angoli di illuminazione per l'acquisizione fotoacustica.

Tale approccio rappresenta un significativo progresso poiché consente l'acquisizione multi-angolare in modo efficiente e preciso, utilizzando LED per l'illuminazione e migliorando la versatilità e la praticità nell'ambito dell'imaging fotoacustico.



Figura 19 [40]: (Sx) Illustrazione della struttura del supporto a diverse angolazioni. (Dx) Esempio applicativo

Per quanto riguarda le restrizioni di questa soluzione, in primo luogo, va sottolineata la presenza di un'instabilità intrinseca, che rende il sistema non ripetibile in modo affidabile. Ciò si traduce in una limitata possibilità di ottenere misurazioni precise e coerenti.

Inoltre, si evidenzia una limitazione significativa quando vengono impiegati laser al posto dei LED, poiché la natura di questo supporto di dimensioni ridotte è relativamente poco robusta e non adeguata a gestire la potenza e la complessità dei laser.

Pertanto, è fondamentale considerare attentamente queste limitazioni nella valutazione dell'efficacia di questa soluzione per l'imaging fotoacustico multiangolare.

# Capitolo 3 Materiali e Metodi

Uno degli obiettivi fondamentali di questa tesi di ricerca è la realizzazione di un prototipo che sia in grado di fornire illuminazione da diverse angolazioni, con l'obiettivo di ottenere immagini di maggior qualità e raggiungere maggiori profondità di imaging. Questa esigenza deriva dalla necessità di analizzare il fantoccio sotto esame nella sua completezza.

Al fine di soddisfare questa sfida, sono stati sviluppati due supporti specifici progettati per acquisizioni fotoacustiche multi-angolari, superando così alcune delle limitazioni riscontrate nei supporti attualmente in uso. Le principali restrizioni da affrontare comprendono l'instabilità del sistema, l'ingombro eccessivo, la mancanza di robustezza e il potenziale impatto negativo sulla praticabilità clinica.

Nel corso del progetto, è stata data particolare attenzione alla progettazione per garantire la massima sicurezza, la ripetibilità delle misurazioni, la versatilità, il contenimento dei costi, la facilità di trasporto e la compatibilità con i sistemi di acquisizione e illuminazione. Inoltre, la progettazione ha tenuto in considerazione la necessità di ridurre al minimo la distanza tra il punto di emissione del fascio luminoso e il fantoccio utilizzato per la validazione del sistema, al fine di limitare la dispersione di luce e migliorare la qualità dei risultati ottenuti.

In sintesi, questo lavoro si propone di sviluppare soluzioni innovative per l'imaging fotoacustico multi-angolare, affrontando sfide tecniche cruciali per migliorare la precisione e l'efficacia delle acquisizioni.

Nel presente progetto di tesi, sono state progettate e realizzate due soluzioni di supporto innovative, note come Soluzione A e Soluzione B. La progettazione e la

realizzazione di tali supporti sono state effettuate attraverso l'utilizzo dei software CAD quali AutoCAD e Solidworks, seguite dalla produzione tramite l'utilizzo della stampante 3D Form3 di Formlabs. Questo avanzato dispositivo di stampa 3D è stato scelto per la sua capacità di supportare risoluzioni che variano da 25 micron a 100 micron, dimostrandosi pertanto un candidato ideale per la creazione di componenti strutturali altamente dettagliati e precisi, necessari per garantire i movimenti richiesti nei supporti.

Per quanto concerne la scelta del materiale, si è optato per la resina Clear V4 di Formlabs, in virtù delle sue proprietà funzionali che si sposano perfettamente con le esigenze specifiche dell'ambito dell'imaging fotoacustico. Questa resina è particolarmente indicata per la realizzazione di componenti stampate con la robustezza e la resistenza necessarie per affrontare le condizioni di lavoro tipiche di questa tecnica. Inoltre, la sua natura rigida consente la levigatura fino a ottenere la lucentezza e la trasparenza desiderate, agevolando inoltre la giusta adattabilità e scorrevolezza con eventuali componenti metallici integrati, come viti o perni di rotazione [41].

In generale, le proprietà della resina Clear V4, sia nel suo stato grezzo che dopo il processo di polimerizzazione post-stampa, sono sintetizzate e confrontate nella tabella sottostante, al fine di fornire una panoramica completa delle caratteristiche del materiale utilizzato.

	Grezza <sup>2</sup>	Dopo polimerizzazione post-stampa <sup>3</sup>
Proprietà elastiche		
Carico di rottura a trazione	38 MPa	65 MPa
Modulo di elasticità	1,6 GPa	2,8 GPa
Allungamento a rottura	12%	6%
Proprietà di resistenza a flessione		
Modulo di flessione	1,3 GPa	2,2 GPa
Proprietà d'impatto		
Resistenza all'urto Izod	16 J/m	25 J/m
Proprietà termiche		
Temperatura di distorsione termica a 1,8 MPa	43 °C	58 °C
Temperatura di distorsione termica a 0,45 MPa	50 °C	73 °C

Tabella 2: Riassume le proprietà della resina Clear V4

## 3.1 Sistema di acquisizione

Nel contesto di questo progetto di tesi, si sono impiegati come apparato sperimentale una sorgente luminosa laser OPOTEK Phocus Mobile SE e un trasduttore Verasonics L11-5V per acquisire immagini fotoacustiche. Tale tecnologia offre notevoli vantaggi nell'ambito delle analisi biomediche, permettendo una visualizzazione dettagliata dei tessuti attraverso l'interazione tra onde ottiche e acustiche.

Gli holder sono stati progettati appositamente per adattarsi alle dimensioni e alla geometria delle strumentazioni presenti nei laboratori di ricerca. Il laser OPOTEK Phocus Mobile SE è stato impiegato come sorgente luminosa, generando impulsi laser ad alta energia e frequenza variabile per eccitare i campioni. Il trasduttore Verasonics L11-5V è stato utilizzato come sonda ultrasonografica di acquisizione, consentendo la rilevazione delle onde acustiche generate dalle interazioni fotoacustiche.

La sonda Verasonics L11-5V [44, 45], rappresentata in *Figura 20*, ha un'impugnatura bombata e dimensioni quali altezza di 12 cm, profondità di 1 cm e larghezza intorno ai 5 cm. In fase di progettazione le misure sono state prese al millimetro utilizzando un calibro.



Figura 20: Trasduttore L11-5V

Per quanto concerne il generatore della sorgente luminosa [42, 43], si compone di un tubo metallico che dopo essersi biforcato termina in due estremità squadrate, come si osserva in *Figura 21*. Queste ultime vengono vincolate al supporto sonda-laser tramite dei fissatori specificatamente progettati e stampati.





Figura 21: Laser OPOTEK Mobile Phocus SE

## 3.2 Progettazione prototipo

## Dispositivo precedente

I supporti progettati e stampati si apprestano ad essere due possibili versioni successive di una soluzione ideata in precedenza (*Figura 22*) che non è adatta ad eseguire imaging multi-angolare.

Il dispositivo attualmente in uso è stato progettato esclusivamente per sostenere la sonda ultrasonografica. L'uso di velcri per fissare la sonda e mantenerla nella posizione desiderata si è dimostrato pratico, grazie alla loro capacità di adattarsi perfettamente alla superficie della sonda stessa. Tuttavia, va sottolineato che la stabilità del trasduttore potrebbe essere compromessa nel caso in cui la presa del velcro si indebolisca, potenzialmente causando danni sia al dispositivo stesso che al fantoccio in esame.

Inoltre, considerando che tale supporto deve essere fissato tramite un perno al braccio magneticamente vincolato alla base (*Figura 22*), il peso ridotto, per via della minimizzazione delle componenti di cui si forma, è sicuramente un aspetto vantaggioso.

D'altro canto, emergono problematiche quando si valuta e si esegue il posizionamento delle sorgenti luminose poiché non essendovi un fissatore integrato nel supporto, queste risultano essere non solidali alla sonda e il loro punto di applicazione è soggetto a instabilità e a eventuali spostamenti deleteri durante la fase di acquisizione. Tale aspetto negativo, può tradursi, durante le analisi, in un eventuale problematica in termini di sicurezza, la quale va totalmente evitata.



Figura 22: Supporto attualmente in uso e base strutturale con braccio regolabile

Questo tipo di supporto offre notevoli vantaggi in termini di peso ridotto, costo contenuto e facilità d'uso. Tuttavia, se l'obiettivo primario è l'acquisizione di immagini fotoacustiche multi-angolari per conseguire maggiori precisione e dettaglio nell'immagine finale, tale soluzione risulta essere meno ottimale. Alla luce di queste considerazioni, si sono sviluppati due supporti di fondamentale importanza per il nostro progetto di tesi, i quali saranno presentati nei paragrafi successivi.

## Supporti ideati

## Soluzione A

Questa prima soluzione si compone di elementi sia stampati sia metallici. A seguire una tabella che elenca le parti di cui si compone il supporto con le rispettive quantità.

PARTI STAMPATE	Q.tà
Guscio perno	1
Corpo centrale	1
Braccetto	1 (sx)
Braccetto con lancetta	1 (dx)
Fissatore laser	2
ELEMENTI METALLICI	
Barra filettata	1
Cilindri di rotazione	2
Perni di rotazione	2
Viti	6
Dadi esagonali	6

Tabella 3: Riassume le componenti della soluzione A

Il supporto in questione è costituito da un guscio che avvolge il trasduttore ultrasonografico, garantendone una posizione stabile durante le acquisizioni. Il corpo centrale presenta una scanalatura verticale che funge da guida per la rotella di controllo della barra filettata, limitando i gradi di libertà e agevolando il movimento desiderato. Il meccanismo barra-cilindri filettati accoppiato con i bracceti laterali, costituisce l'elemento centrale del dispositivo ed è responsabile del controllo del movimento angolare richiesto per le sorgenti luminose. I dispositivi di fissaggio sono essenziali per ancorare saldamente le due sorgenti luminose alla struttura, rendendole solidali rispetto alla sonda ultrasonografica.

In termini di dimensioni, il volume massimo occupato da questo tipo di supporto è di circa 16,5 x 6 x 11 cm.

Successivamente, è presentata un'illustrazione completa del supporto in cui è possibile osservare chiaramente una distinta categorizzazione dei componenti essenziali del dispositivo, in modello CAD.

In particolare, nella *Figura 23* i laser sono distinti con un colore blu mentre il trasduttore è stato evidenziato in verde. I braccetti, che svolgono un ruolo cruciale ai fini del funzionamento del sistema, sono invece identificati in giallo. I fissatori, utili per stabilizzare i laser sui braccetti di rotazione, sono stati raffigurati in

marrone e sono ben rappresentati in *Figura 26*. Le componenti in rosso e arancione costituiscono il guscio per la sonda: la parte rossa rappresenta il corpo centrale di questo elemento, mentre l'altra consente di fissare il sistema al braccio meccanico rappresentato nella *Figura 22*.

Inoltre, si notano i due cilindri filettati di rotazione anch'essi colorati in rosso.







Figura 23: Modello CAD della soluzione A - (a): Assonometria in cui i laser sono inclinati di 55°. (b) Vista frontale in cui i laser sono inclinati di 20° rispetto alla verticale

Durante il processo di acquisizione, è importante conoscere l'inclinazione con cui il fascio luminoso incide sul fantoccio, al fine di garantire una riproducibilità delle acquisizioni e ottenere risultati di elevata precisione nell'imaging fotoacustico. A tale scopo, si è integrato sul corpo centrale del supporto un goniometro angolare che consente di misurare con precisione l'angolazione dei laser rispetto alla verticale, come si osserva in *Figura 24*.

Il goniometro presenta un range di misura di 35°, con posizioni intermedie a intervalli di 5°. Precisamente permette di operare con angoli compresi tra 20° e 55°, consentendo una flessibilità adeguata e garantendo una maggiore probabilità che i fotoni incidano sul target, a fronte di molteplici acquisizioni. La disponibilità di queste misurazioni precise dell'angolazione dei laser rappresenta un elemento fondamentale per garantire la ripetibilità e l'affidabilità delle misure.



Figura 24: Goniometro angolare presente sul corpo centrale (rosso). La foto ritrae i laser inclinati di 55° rispetto alla verticale

Essendo che questo sistema è caratterizzato da una struttura compatta in cui le diverse componenti sono vincolate tra loro, il movimento simultaneo e parallelo dei due laser è una caratteristica intrinseca. La rotazione della barra filettata comporta una variazione di inclinazione sia nel braccetto destro che in quello sinistro del dispositivo, risultando dunque nell'identica angolazione per entrambi i laser. In altre parole, con questo tipo di sistema, non è possibile ottenere angolazioni diverse per i laser destro e sinistro. Il qui citato movimento è garantito dai cilindretti filettati

rappresentati in *Figura 25*, i quali rotando permettono alla barra e di conseguenza ai braccetti di muoversi. Il principio di funzionamento è basato sulla peculiarità della barra di essere metà filttata destrorsa e metà sinistrorsa. Rispettivamente le due porzioni sono accoppiate con i cilindri di rotazione che si distinguono anche esse per la tipologia di filettatura in modo che si abbia coerenza tra le parti.

Questa caratteristica conferisce al meccanismo un elevato grado di stabilità, garantendo misurazioni precise e altamente ripetibili nel corso del tempo. Tuttavia, va notato che questa stabilità può comportare una minore o difficoltosa maneggevolezza, soprattutto considerando le dimensioni limitate del supporto. Il movimento della barra filettata potrebbe risultare meno fluido in queste condizioni, sebbene ancora sufficientemente controllabile per consentire una procedura di esame sicura. Questa considerazione è particolarmente rilevante per superare eventuali ostacoli pratici associati all'applicazione clinica del sistema.



Figura 25: Rappresentazione del meccanismo braccetto-barra filettata-cilindretto



Figura 26: Rappresentazione CAD del fissatore per il laser

#### Soluzione B

Nel corso della fase di progettazione, è stato sviluppato un secondo supporto con l'obiettivo di facilitare l'acquisizione di immagini fotoacustiche multi-angolari, in alternativa al precedente. Questa soluzione presenta un notevole vantaggio pratico in termini di maneggevolezza e facilità d'uso, grazie alle sue dimensioni leggermente superiori rispetto al supporto precedentemente descritto. Inoltre, è caratterizzata da una maggiore resistenza e robustezza, il che è traducibile in una maggiore affidabilità durante le operazioni di montaggio. D'altro canto, va notato che questo vantaggio comporta un leggero incremento di peso rispetto alla soluzione precedente. Segue una tabella utile a riassumere le componenti della "Soluzione B":

PARTI STAMPATE	Q.tà
Guscio sonda	1
Corpo centrale con gradi	1
Ghiera mobile	2
Manopola	2
Fissatore laser	2
Perno strutturale	1
ELEMENTI METALLICI	
Viti	8
Dadi esagonali	8

Tabella 4: Riassume le componenti della soluzione B

Analogamente al progetto sopra presentato, il secondo design è costituito da un guscio che stabilizza il trasduttore, ancorato al corpo centrale del supporto. Quest'ultimo è a sua volta vincolato a un braccio meccanico utilizzato per posizionare l'intero sistema in posizione operativa.

Per quantificare gli angoli di inclinazione, il supporto presenta tacche incise sul corpo centrale, rappresentando l'intervallo 20° - 55° rispetto alla verticale, con incrementi di 5°.

I laser sono solidamente ancorati al sistema tramite un fissatore laser e una ghiera mobile su entrambi i lati del dispositivo. La regolazione dell'angolo di inclinazione, e quindi la capacità di effettuare imaging multi-angolare, è indipendente per i lati destro e sinistro e può essere eseguita mediante manopole poste sul retro del supporto. Allentando la presa, è possibile spostare la manopola lungo una traiettoria definita da un'apposita asola incorporata e stampata sul corpo centrale, che funge da guida.

La Soluzione B, a differenza della A, consente inclinazioni separate per i due laser. Questa caratteristica la rende particolarmente adatta per applicazioni di analisi non convenzionali.

In termini di dimensioni, il volume massimo occupabile è di circa  $17,5 \ge 7 \ge 12$  cm. Nella figura seguente, è presentata un'illustrazione complessiva del supporto.





Figura 27: Modello CAD della soluzione B - (a): Assonometria in cui i laser sono inclinati di 20°(destro) e 55° (sinistro). (b) Vista frontale della medesima situazione

In *Figura 27* è possibile osservare le componenti che formano questa seconda tipologia di supporto per imaging fotoacustico multi-angolare. In blu sono rappresentati i due laser mentre è il trasduttore ad essere illustrato in verde.

Come nella precedente soluzione il guscio per la sonda L11-5V è costituito da due elementi separati, i quali sono mostrati in arancione e in rosso. In particolare l'elemento colorato in rosso è il corpo centrale che funge da elemento chiave poiché presenta sia la gradazione utile ai fini dell'inclinazione, sia l'asola che funziona come una guida utile a garantire la rotazione rispetto ad uno stesso centro di rotazione desiderato.

In giallo sono presentate le ghiere mobili che unite alle componenti marroni servono per fissare il laser e tenerlo saldo durante il lavoro, come si può chiaramente osservare dalla *Figura 27 (a)*.

Le due manopole, invece, sono distinguibili con il colore viola mentre il fantoccio 3D di prova è di color lilla.

La figura seguente evidenzia chiaramente come la progettazione del supporto sia stata appositamente pensata per fare in modo che il punto di applicazione del fascio laser, ad entrambe le angolazioni limite, non si trovi mai esternamente al fantoccio, bensì sia sempre a contatto con esso in modo tale che venga meno un'eventuale dissipazione dei fotoni esternamente all'oggetto di studio. Evitare questa circostanza garantisce una maggiore diffusione dei fotoni nel phantom e dunque un notevole incremento di probabilità che essi colpiscano il target. A ciò consegue una maggiore qualità delle singole immagini acquisite in partenza.



Figura 28: Wireframe 2D nel punto di applicazione del fascio luminoso. In verde la sonda, in lilla il fantoccio ed in blu i laser

Aggiuntivamente, nel momento in cui il setup di lavoro fosse particolare e dovesse essere necessario avere i laser più o meno distanti rispetto al fantoccio 3d, il sistema è stato progettato in modo tale che i laser possano essere fissati nella posizione più adeguata, al fine di garantire l'ambiente di lavoro più ottimale possibile. Come illustrato in *Figura 29*, la porzione di laser imputata al fissaggio può essere fatta scivolare garantendo una più o meno elevata distanza tra punto di applicazione del fascio e target di lavoro.



Figura 29: Rappresentazione del laser nel punto di fissaggio – il margine di scorrimento del laser è di circa 10 mm

Per quanto concerne il goniometro angolare, in questa soluzione è di facile lettura in quanto sono presenti delle scanalature, rappresentanti le tacche, sulla porzione superiore del corpo centrale. Per determinare il fissaggio ad una certa angolazione desiderata è sufficiente far allinare tali tacche con quella presente su ciascuna ghiera mobile. La situazione è illustrata nella figura che segue.



Figura 30: Rappresentazione del goniometro angolare. In tal caso il blocco ghiera-manopola e di conseguenza il laser, è stato fissato a 20° di inclinazione

# Verifica sperimentale delle soluzioni

## Soluzione A





Figura 31: Prototipo A in fase di utilizzo

Tenendo in considerazione il progetto CAD e l'effettiva implementazione del dispositivo, emergono alcune aree di miglioramento per la soluzione A. Precisamente possono essere superate limitazioni nei seguenti termini:

- Goniometro angolare: risulta essere effettivamente molto ridotto mostrando una certa instabilità. Dunque, una soluzione sarebbe quella di riprogettare il

goniometro in modo da aumentarne lo spessore, riducendo il rischio di rottura;

- Maneggevolezza: è attualmente limitata dalla dimensione delle guida verticale per la rotella di controllo della barra, la quale andrebbe incrementata leggermente al fine di evitare sfregamenti che possano ostacolare il movimento.

In generale, sono dei limiti facilmente superabili applicando delle piccole accortezze in fase di stampa o levigatura della parte prodotta in questione. Infatti, dal punto di vista del funzionamento pratico, il supporto ha dimostrato una coerenza con l'idea di riferimento in fase di progettazione meccanica. Pertanto è considerabile come un holder per imaging fotoacustico multi-angolare funzionante e utilizzabile.

Anche dal punto di vista della robustezza e stabilità complessive del sistema, i risultati sono ottimi e per tale ragione le resine plastiche sono considerabili un materiale con proprietà ottime in questo campo di utilizzo.

## Soluzione B



Figura 32: Prototipo B in fase di utilizzo

Per quanto concerne questo holder, ha fornito ottimi risultati in termini di funzionalità ed una buona adattabilità alla strumentazione di lavoro. Dal punto di vista funzionale questa alternativa ha garantito una facilità di utilizzo nettamente superiore, nonostante la gestione del movimento dei laser sui due lati sia separata. Un'accortezza che è necessario avere è in fase di montaggio in quanto per come è strutturato il supporto potrebbe essere difficoltoso accoppiare vite e dado di chiusura. Tuttavia, una volta completata questa fase, la presa è ottima ed i laser rimangono stabili.

L'asola che funge da guida per il composto manopola-ghiera è l'unico elemento considerabile in parte limitante poiché la scorrevolezza non è ottimale essendo ricurvo e i pezzi stampati imprecisi al decimale. Nonostante ciò, il movimento richiesto è pienamente soddisfatto.

#### Osservazioni sulla progettazione

Entrambe le soluzioni A e B sono state oggetto di stampa e sottoposte a test funzionali e di adattabilità. In entrambi i casi, i risultati hanno dimostrato un alto grado di affidabilità e versatilità operativa. Di conseguenza, è possibile selezionare una delle due soluzioni in base ai requisiti specifici del campo di applicazione, alla comodità d'uso e al target di studio prescelto. La soluzione B, con le sue ottime caratteristiche di maneggevolezza e robustezza, può essere particolarmente indicata in situazioni in cui la facilità di utilizzo e la resistenza sono fondamentali, pur tenendo conto del suo peso leggermente superiore. In opposizione, la soluzione A è sicuramente più adatta se si vuole avere un'inclinazione delle sorgenti laser identica.

Altro aspetto da osservare poichè di fondamentale rilevanza è la sicurezza. Questa occupa una posizione centrale nella progettazione del supporto multi-angolare per l'imaging fotoacustico, specialmente quando si opera con sorgenti luminose ad alta potenza come i laser e apparecchiature mediche sensibili. Questi dispositivi emettono radiazioni laser che, se non adeguatamente controllate, possono costituire un serio pericolo per la salute umana, causando ad esempio danni oculari o cutanei.

Dunque, per prevenire situazioni di rischio, il supporto deve essere dotato di sistemi di bloccaggio stabili che mantengano fermo il suo posizionamento durante l'uso. Ciò è particolarmente importante quando si manipolano sorgenti laser potenti, poiché anche piccoli movimenti accidentali del supporto possono causare un cambiamento significativo nell'area in cui il laser è focalizzato. I sistemi di bloccaggio devono essere progettati per resistere a vibrazioni, urti o spostamenti involontari che potrebbero verificarsi durante l'operazione. Sono queste le ragioni per cui si è deciso di realizzare due soluzioni che, a differenza del dispostivo attualmente in uso, abbiano un fissatore per i laser apposito, il quale garantisce un posizionamento dei laser dove desiderato, senza possibilità di incorrere in movimenti che potrebbero inficiare la sicurezza degli operatori, oltre che ad un peggioramento dei risultati dal punto di vista delle analisi.

Infine, è importante sottolineare che questi supporti sono stati progettati su misura per la sonda Verasonics L11-5V e i laser Opotek utilizzati all'interno del contesto del PolitoBIOMedLab. Pertanto, non sono compatibili con altre tipologie di trasduttori o sorgenti luminose. Tuttavia, è possibile apportare modifiche e ristampare solo la geometria del guscio e dei fissatori per i laser, consentendo così l'utilizzo dei progetti con strumentazione diversa, qualora necessario.

Questa flessibilità di adattamento alle specifiche esigenze dell'applicazione e la possibilità di personalizzazione delle soluzioni A e B le rendono strumenti versatili e adatti a una vasta gamma di contesti di ricerca e diagnostici.

#### 3.3 Progettazione fantocci e validazione

Il processo di validazione, è fondamentale ai fini di valutare l'efficacia delle soluzioni sviluppate per eseguire l'imaging fotoacustico multi-angolare. Questa procedura richiede l'esecuzione di acquisizioni accurate su phantom appositi per test *in-vitro*. I phantom, in questo contesto, sono strutture progettate per simulare condizioni di studio e testare le prestazioni dell'apparecchiatura. In particolare i fantocci possono essere visti come delle matrici aventi al loro interno dei punti notevoli, detti target di imaging, di cui idealmente si conoscono composizione e ubicazione.

Nella letteratura scientifica [48 - 51], sono stati impiegati phantom tridimensionali di vario tipo, spesso costituiti da alloggiamenti riempiti con materiali, che emulino i tessuti umani, come idrogeli e agar, alcol polivinilico, gel di poliacrilammide, cera gel, cloruro di polivinile plastisol o anche resine e siliconi.

Nel presente studio, si sono realizzati dei phantom tenendo in considerazione il posizionamento delle sorgenti laser e del trasduttore, poiché questi parametri sono strettamente legati alle soluzioni progettate ai fini di agevolare la variazione angolare, richiesta durante l'imaging fotoacustico.

La configurazione sperimentale è schematizzata in dettaglio nella figura seguente, che illustra la disposizione precisa dei componenti e delle sorgenti luminose utilizzate per il nostro studio.



Figura 33: Setup sperimentale impiegato durante le acquisizioni per eseguire imaging fotoacustico

A scopo di validazione delle soluzioni proposte, sono stati sviluppati diversi phantom contenenti materiali e target variabili al fine di creare un dataset diversificato per la successiva fase di elaborazione delle immagini. Questo approccio ha consentito di esaminare le prestazioni delle soluzioni in una gamma di scenari rappresentativi.

## Le acquisizioni

Le immagini sono state acquisite sfruttando l'efficacia della sonda ultrasonografica Verasonics L11-5V, disponibile presso il laboratorio, abbinata al sistema di acquisizione Verasonics Vantage 256.

Per migliorare le prestazioni della sonda, è stato applicato un rivestimento di gel ecografico sull'area in cui risiede l'array di cristalli piezoelettrici. Questa scelta ha comportato un vantaggio significativo, riducendo notevolmente la presenza di aria tra il fantoccio e l'array, il che a sua volta ha comportato una minore dispersione di fotoni al di fuori del phantom.

Per condurre una valutazione completa delle soluzioni, sono state effettuate acquisizioni con tutte le tipologie di fantocci realizzati. In particolare, è stato eseguito un primo set di prove utilizzando la soluzione A, seguito dalle acquisizioni utilizzando l'holder B. Questa procedura ha consentito di esplorare in dettaglio le prestazioni delle soluzioni in relazione ai diversi scenari di imaging. Precisamente, le acquisizioni sono state eseguite tutte su phantom e non su tessuti biologici o sulla pelle.

Nello specifico, sono state eseguite due tipologie di imaging in questa fase, una incentrata sull'analisi di una precisa porzione del fantoccio ed un'altra basata sulla scansione dell'intero volume di interesse.

Come obiettivo principale del nostro studio, si è condotta principalmente un'analisi di imaging multi-angolare, eseguendo e valutando acquisizioni effettuate su un punto specifico di un fantoccio, variando attentamente l'angolo di inclinazione delle sorgenti luminose. Questo approccio ha consentito di esplorare dalla superficie fino in profondità le caratteristiche e la struttura tridimensionale del campione con l'obiettivo di ottenere una visione più dettagliata delle sue proprietà. Inoltre, la fase di acquisizione ha consentito di sperimentare ulteriormente conducendo esperimenti mirati di imaging sull'intero volume del fantoccio. In questa configurazione, si è mantenuto l'angolo di illuminazione costante facendo però variare la posizione complessiva della sonda e del laser. Questo approccio ha permesso di scandagliare l'intero volume di interesse del campione rivelandosi cruciale nell'ottenimento di informazioni fondamentali sulla composizione, la densità e la struttura interna del campione, contribuendo in modo significativo alla ricerca.

## I fantocci

I fantocci sono definiti come oggetti artificiali di fondamentale importanza nel contesto della diagnostica medica, poiché offrono la possibilità di creare ambienti di lavoro simulati che rispecchiano in modo accurato le condizioni presenti nell'organismo umano. Questi phantom sono progettati con cura, tenendo conto di parametri geometrici e materiali ben definiti, cosicchè le loro proprietà ottiche e acustiche siano del tutto affini a quelle dei tessuti reali [52].

Generalmente i fantocci si compongono di un contenitore che ospita bersagli o obiettivi specifici su cui vengono condotti test e analisi. La selezione accurata del materiale di fondo è essenziale, poiché questo deve emulare con precisione le caratteristiche del tessuto circostante l'obiettivo di studio.

Durante il processo di progettazione e creazione dei fantocci, si considerano vari aspetti, tra cui [48]:

- la complessità dei fenomeni fisici e biologici coinvolti e da simulare;
- i tempi di produzione;
- i costi associati;
- la compatibilità con la strumentazione di imaging;
- la possibilità di riutilizzo;
- la robustezza strutturale.

Inoltre, si presta particolare attenzione al grado di tossicità dei materiali utilizzati, garantendo un ambiente di lavoro sicuro per gli operatori e riducendo al minimo il potenziale impatto sulla salute.

I phantom sono strumenti di primaria importanza nel contesto medico, in quanto consentono una sintonizzabilità biologica. Questo aspetto è cruciale, poiché consente di effettuare test e simulazioni realistiche prima dell'applicazione clinica. I fantocci vengono ampiamente impiegati come simulatori e strumenti di validazione, consentendo la valutazione di parametri critici come la risoluzione, la sensibilità e la profondità di penetrazione dei sistemi di imaging in uso. Inoltre, vengono anche utilizzati con lo scopo di disporre di immagini utili ai fini di convalidare algoritmi di ricostruzione e analisi, come si vedrà nel quinto capitolo relativo all'elaborazione di immagini.

Dunque, in altre parole, i fantocci svolgono un ruolo fondamentale nel garantire che le tecnologie di imaging siano affidabili ed efficaci prima di essere utilizzate nella pratica clinica, contribuendo così alla sicurezza e all'efficacia delle procedure diagnostiche e terapeutiche.

#### I FANTOCCI IN AGAR

L'agar è un polisaccaride estratto dalle pareti cellulari delle alghe marine rosse che si è affermato come materiale versatile nelle applicazioni scientifiche e industriali. Generalmente è utilizzato come gelificante naturale e possiede caratteristiche sia positive che negative, le quali definiscono le possibilità di utilizzo.

Tra le caratteristiche positive, l'aspetto più vantaggioso dell'agar è il suo costo accessibile, che lo rende ampiamente disponibile per una vasta gamma di applicazioni. Aggiuntivamente, la sua stabilità temporale discreta combinata con una fabbricazione relativamente semplice è un ulteriore vantaggio, poiché le proprietà dell'agar non si deteriorano rapidamente nel tempo.

Un'altra caratteristica fondamentale dell'agar è la sua capacità di adattarsi alle esigenze specifiche grazie alla facilità con cui le sue proprietà possono essere modificate. Infatti, si riesce a emulare differenti tipologie di tessuti, andando semplicemente ad integrare l'agarosio con altre sostanze che ne modifichino la composizione e dunque le proprietà.

Inoltre, l'agarosio è una sostanza che, in ambiente acquoso, manifesta proprietà di transizione di fase in risposta a variazioni termiche. In particolare, esso diventa solubile in acqua portata a bollore e, dopo essere miscelato, mentre la soluzione si raffredda, attorno a temperature di 40°C, gelifica. Questo fenomeno è connesso alla formazione di legami idrogeno tra le catene polimeriche dell'agarosio, che si

organizzano in una struttura tridimensionale intrappolando l'acqua e le altre molecole presenti.

L'agar gelificato presenta una buona stabilità termica, mantenendo la sua struttura fino a temperature intorno agli 85-90°C, prima di ritornare allo stato liquido.

Nonostante le sue numerose qualità positive, l'agar presenta alcune limitazioni. Innanzitutto, la sua resistenza meccanica variabile lo rende inadatto per applicazioni in cui è richiesta una grande robustezza strutturale. Nello specifico, questo parametro varia in base alla concentrazione stessa dell'agar: soluzioni attorno all'1% si caratterizzano per una consistenza morbida e fragile, quelle di circa il 2% mostrano un comportamento più elastico e una maggiore resistenza, mentre concentrazioni al 5% conferiscono al gel una notevole durezza e rigidità. Può essere utile e interessante eseguire delle acquisizioni su fantocci realizzati con concentrazioni differenti, sia di agar puro sia combinato con altre sostanze, così da avere un dataset variegato.

Inoltre, tra gli aspetti negativi emerge anche il suo alto tasso di evaporazione che può rappresentare un ostacolo nel caso di applicazioni in cui è necessario mantenere un elevato contenuto di umidità. Infine, l'agar può introdurre un eventuale confine acustico, influenzando la propagazione del suono attraverso di esso e peggiorando eventualmente la qualità delle immagini ottenute, se la sua concentrazione è eccessiva.

Le suddette considerazioni, hanno determinato la scelta di realizzare buona parte dei fantocci, per questo progetto di tesi, in agar. Per valutare le differenti circostanze son stati realizzati molteplici phantom, di cui alcuni integranti altre sostanze in aggiunta all'agar, come ad esempio lievito di birra, ma tutti contenenti target di imaging, dai più semplici ai più articolati.

#### I FANTOCCI IN PAA

Il gel di poliacrilamide (PAA) costituisce un materiale di crescente interesse nell'ambito della tecnologia di imaging fotoacustico, grazie alla sua struttura porosa e alle particolari proprietà che agevolano la trasmissione delle onde sonore, minimizzando l'attenuazione, estendendo la profondità di penetrazione, e ottimizzando la qualità delle immagini fotoacustiche. Questo materiale presenta una serie di vantaggi in relazione all'acquisizione di immagini, tra i quali emergono i seguenti [48]:

- <u>Robustezza meccanica</u>: questa caratteristica intrinseca del materiale consente di acquisire immagini precise, prive di distorsioni o deformazioni, garantendo l'integrità strutturale del fantoccio.
- <u>Stabilità temporale</u>: il gel di poliacrilamide manifesta una notevole stabilità temporale, superiore a quella dell'agar. Ciò comporta un mantenimento delle proprietà nel corso del tempo per i phantom a base di PAA, permettendo di ottenere risultati attendibili e ripetibili.
- <u>Processo di fabbricazione agevole e rapido</u>: la produzione del gel di poliacrilamide si distingue per la sua semplicità e rapidità, con la possibilità di eseguire il processo a temperature moderate.
- <u>Elevata sintonizzazione ottica</u>: questo gel offre un'importante sintonizzazione ottica, dimostrando una notevole capacità di assorbire luce a specifiche lunghezze d'onda.

Tuttavia, è importante sottolineare alcune sfide connesse all'impiego di tale materiale, tra cui:

- <u>Complessità nella sintonizzazione acustica</u>: il gel di poliacrilamide può manifestare problematiche quanto alle proprietà acustiche, le quali possono però essere gestite tramite l'incorporazione di additivi solidi alla soluzione prodotta.
- <u>Elevata velocità del suono</u>: questa caratteristica può comportare delle complicazioni nell'ottimizzazione dell'immagine, che possono essere mitigate ricorrendo all'uso di additivi liquidi.

In sintesi, il gel di poliacrilamide emerge come un materiale promettente nell'ambito dell'imaging fotoacustico, grazie alle svariate qualità positive.

## Phantom realizzati e immagini acquisite

In questa sezione, vengono esposte le diverse tipologie di phantom sviluppate in fase sperimentale. Inoltre, è condotta un'analisi delle loro caratteristiche costruttive, seguita dalla presentazione delle immagini acquisite. Durante questa fase, verranno evidenziate le differenze tra le varie acquisizioni, accompagnate da una spiegazione delle motivazioni che possono averle generate.

Questa analisi si propone di offrire una visione completa delle condizioni sperimentali simulate attraverso i phantom, mettendo in evidenza l'importanza delle scelte di progettazione nel contesto dell'imaging fotoacustico.

Nello specifico sono stati realizzati molteplici phantom e su di essi son state eseguite le acquisizioni. A seguire un quadro completo per ciascun fantoccio.

# FANTOCCIO 1



Figura 34: fantoccio in Agar contenent target di inchiostro colorato – (a): vista prospettica; (b): vista dall'alto; (c): vista laterale.

#### <u>Realizzazione</u>

La procedura di preparazione può essere sintetizzata come una sequenza di molteplici fasi. In primo luogo, si avvia il riscaldamento della quantità desiderata di acqua, successivamente si inserisce il materiale con cui si è deciso di realizzare il fantoccio, in tal caso agar puro. La soluzione è mantenuta in costante agitazione fino a quando inizia a sobbollire, e, una volta raggiunte temperature di circa 100° C, si procede al raffreddamento graduale. L'agar inizierà a gelificare al raggiungimento di temperature intorno ai 40° C.

Prima di versare la soluzione nell'apposito contenitore destinato a ospitare il fantoccio, è fondamentale eseguire una fase preliminare di eliminazione delle eventuali bolle d'aria presenti sulla superficie della soluzione, quando questa si trova ancora in fase liquida. Questa fase è di cruciale importanza poiché limita notevolmente potenziali artefatti andando a garantire una qualità superiore in quanto i fotoni riescono a diffondere senza alcun tipo di ostacolo.

In questo caso specifico il fantoccio è stato realizzato impiegando una percentuale di Agar dell'1% rispetto al volume totale della soluzione. Nel pratico, sono stati disciolti 5 g di Agar in 500 mL di acqua.

Il fantoccio è stato sottoposto a un periodo di riposo al fine di favorire la completa gelificazione. Successivamente, si sono inseriti i target oggetto di studio. Tali bersagli consistevano in tre penne di diversi colori, precisamente blu, rosso e verde, posizionate a profondità variabili comprese tra 5 mm e 15 mm all'interno del fantoccio.

Va osservato che avendolo realizzato con una percentuale di Agar bassa, il fantoccio è risultato essere di una consistenza non sufficientemente resistente nel caso di contatto con strumenti metallici come le due sorgenti luminose utilizzate in laboratorio. Questa problematica la si evince facilmente osservando la vista superiore, (b), della *Figura 34*. Emergono infatti due "solchi" in corrispondenza della regione di appoggio in cui i laser hanno esercitato pressione. Pertanto, l'utilizzo ripetuto di un fantoccio contenente solo l'1% di agar può portare a significative difficoltà nel processo di acquisizione dei dati.

#### <u>Immagini</u>

Le acquisizioni relative a questo fantoccio sono state eseguite sfruttando l'intero spettro di angolazioni messe a disposizione dai supporti progettati. In tal modo,

sono state rilevate otto immagini totali corrispondenti agli angoli compresi nel range 20°-55°. Qui di seguito, sono mostrate le più rilevanti, sia in termini di buona qualità che quelle affette da artefatti e minor chiarezza nell'identificazione del target a causa del rumore.



Figura 35: immagini fotoacustiche acquisite sul fantoccio di Figura 34 – (a): 55°; (b): 45°; (c): 35°; (d): 25°.

L'analisi delle immagini sopra riportate rivela l'importanza cruciale di disporre di uno strumento in grado di effettuare acquisizioni multi-angolari. Le immagini ottenute con angolazioni dei laser ridotte rispetto alla verticale, dunque nel caso delle figure (c) e (d), si caratterizzano per una rilevazione soddisfacente dei target più superficiali, tuttavia, perdono traccia del bersaglio al centro e posizionato maggiormente in profondità. La ragione di questa mancanza può essere attribuita al fatto che con tali angolazioni dei laser, il target centrale risulta essere, rispetto alla traiettoria percorsa dai fotoni, nascosto dai due obbiettivi laterali. A ciò consegue che i fotoni tendano a essere assorbiti prima di riuscire a colpire il target profondo. La *Figura 35 (b)* rappresenta l'immagine catturata durante l'uso dei laser con un'inclinazione di 45°, quindi seguendo una traiettoria più orizzontale per i fotoni. In questa configurazione, è possibile iniziare ad intravedere la penna posta al centro, nonostante la qualità ancora non sia sufficientemente buona. Per agevolarne il riconoscimento, si è delimitata con una cornice azzurra la porzione di immagine ad esso corrispondente.

D'altra parte, l'immagine (a) fornisce una distinzione tra oggetto e sfondo eccellente, nonostante la presenza di numerosi artefatti circostanti i target e di molteplici effetti di riflessione nelle parti centrale e inferiore dell'immagine. L'identificazione delle tre penne è nitida e coerente in termini di posizionamento rispetto alla loro reale allocazione nel fantoccio.

In sintesi, è evidente che, se non fosse stato possibile eseguire acquisizioni da differenti angolazioni, ci sarebbe stato il rischio di non riuscire a identificare un possibile bersaglio d'interesse. Per il raggiungimento di questa finalità, i supporti progettati si sono dimostrati fondamentali.

Per concludere, la possibilità di disporre di un dataset diversificato, sebbene riferito alla medesima situazione di studio, e associato al processo di elaborazione e processing delle immagini, offre la possibilità di raggiungere un risultato unificato e migliorativo. Come sarà esaminato nel capitolo cinque, è possibile ottenere una figura in cui, grazie al contributo di immagini come la (a), si riescono ad osservare tutti i bersagli, e contemporaneamente, grazie a immagini come la (d), si riducono notevolmente gli artefatti circostanti i bersagli.

# FANTOCCIO 2



Figura 36: ulteriore fantoccio in Agar contenent target di inchiostro colorato – (a): vista prospettica; (b): vista dall'alto; (c): vista laterale.

## <u>Realizzazione</u>

Questo secondo fantoccio è stato prodotto in maniera analoga al precedente, presentando un'unica variazione nella disposizione dei target. Dunque, nella sua realizzazione è stata impiegata una soluzione contenente l'1% di Agar, che, dopo la fase di gelificazione, ha consentito l'inserimento dei bersagli nella seguente disposizione:



Volendo fare delle considerazioni, similmente a ciò che è stato detto per il caso 1, il fantoccio risulta essere suscettibile al danneggiamento da parte di strumenti metallici a causa della sua consistenza che risulta essere morbida e fragile. Questa caratteristica la si evince osservando la *Figura 36 (b)*, che mostra la presenza di solchi superficiali, oppure guardando la *Figura 36 (c)* in cui è chiaramente visibile la formazione di una crepa nella parte inferiore del phantom.

#### <u>Immagini</u>

Su questo secondo fantoccio, sono state eseguite solamente due acquisizioni, utilizzando i laser inclinati agli estremi del range di angolazione disponibile. In particolare, i fasci luminosi sono stati posizionati a un angolo di 25° rispetto alla verticale in un caso, e di 55° nell'altro.

Lo scopo di questa analisi condotta sul secondo fantoccio era quello di valutare le differenze nei risultati ottenuti quando la disposizione dei bersagli varia leggermente rispetto alla situazione del primo caso. I risultati ottenuti sono presentati nella figura seguente.



Figura 37: immagini fotoacustiche acquisite sul fantoccio di Figura 36 – (a): 25°; (b): 55°.

Le immagini fotoacustiche acquisite e qui presentate illustrano con successo l'identificazione dei bersagli in entrambe le situazioni. Tuttavia, nella figura (b) è possibile notare la presenza di artefatti nella zona circostante il bersaglio più profondo, i quali saranno risolti attraverso le successive fasi di elaborazione dei dati.
## FANTOCCIO 3





Figura 38: ulteriore fantoccio in Agar con target biforcato contenente colorante nero – (a): target di imaging; (b): vista dall'alto; (c): vista laterale.

### <u>Realizzazione</u>

Il fantoccio tre è stato realizzato utilizzando tubi in plastica opportunamente tagliati e uniti in modo da creare biforcazioni finalizzate a emulare un target su cui eseguire imaging di volume. Sono stati riempiti con colorante nero e le loro estremità sono state sigillate con colla per evitare fuoriuscite.

Una caratteristica distintiva di questo phantom è la sua concentrazione di Agar al 2%, che li rende notevolmente più resistenti rispetto ai fantocci precedentemente presentati, garantendo infatti l'integrità superficiale. Per modificare le proprietà ottiche dei fantocci, è stato aggiunto come additivo il lievito di birra. Questo componente svolge un ruolo chiave nel rendere gli oggetti di studio più simili al contesto reale, aumentando la difficoltà di diffusione dei fotoni.

Il processo di realizzazione dei fantocci prevede stratificazioni sequenziali. Inizialmente, è stata colata una quantità di soluzione per formare il fondo del fantoccio. Successivamente, si è atteso che questa soluzione si solidificasse parzialmente per posizionare il target biforcato a una profondità di circa 10 mm senza che affondasse fino alla base dell'alloggiamento. Nell'ultima fase, è stata versata un'ultima colata per coprire completamente il bersaglio e posizionarlo alla profondità desiderata, regolando la quantità di soluzione in base alle esigenze dello studio.

Volendo fare un quadro di osservazioni rilevanti e potenzialmente deleterie, tra esse si può sottolineare una marcata perdita di colorante nella porzione centrale del fantoccio che, però, può essere considerata come un ulteriore peculiarità atta a modificare le proprietà ottiche e acustiche del fantoccio, rendendo lo studio più articolato.

In secondo luogo, potrebbe verificarsi una scorretta distribuzione del colorante nel tubo biforcato, come si vede nell'immagine (a) in cui vi sono dei millimetri nei quali non è presente, che potenzialmente potrebbero inficiare sulla rilevazione del target.

In ultimo, la realizzazione stratificata potrebbe generare problemi ai bordi delle varie stratificazioni, i quali si cercano di ridurre con il processing, in particolare applicando la tecnica di *smoothing*.

## <u>Immagini</u>

Questo fantoccio più articolato sia nei materiali che lo compongono sia sotto l'aspetto bersagli di studio, è stato utilizzato per eseguire due tipologie di acquisizione. Si è proceduto sia con l'imaging multi-angolare, come nei casi precedenti, sia con l'imaging di volume.

La prima tipologia è stata testata in corrispondenza di una zona di phantom dove il target era biforcato, invece, la seconda si è sviluppata secondo un susseguirsi di acquisizioni da una porzione a target singolo per giungere fino alla zona in cui si aveva la diramazione, così da osservare lo spostamento della strumentazione lungo una porzione di phantom per 11 mm a passi di 1 mm.

Inizialmente verranno presentati i risultati per l'imaging multi-angolare, che è stato effettuato fissando le sorgenti a 20°, 30°, 40° e a 50° rispetto alla verticale. Le immagini acquisite sono mostrate nella figura seguente.





(b)



Figura 39: immagini fotoacustiche acquisite sul fantoccio di Figura 38 – (a): 50°; (b): 40°; (c): 30°; (d): 40.

A seguire, sono invece presentate alcune delle immagini ottenute col processo di imaging volumetrico. Analizzandole è evidente come si passi dalla porzione lineare del target a quella biforcata.

Delle undici immagini componenti il dataset, ne vengono riportate in seguito alcune tra le più significative, facendo un parallelismo tra acquisizione ultrasonografica e fotoacustica.





Figura 40: immagini PA e US acquisite sul volume del fantoccio -(a): posizione iniziale; (b): spostamento di 3 mm rispetto ad (a); (c): spostamento di 6 mm rispetto ad (a); (d): spostamento di 10 mm rispetto ad (a).

Osservando le immagini in sequenza dall'alto al basso, si nota come la biforcazione da una distanza iniziale di circa 5.3 mm si riduce sempre più fino alla completa fusione in un unico target rappresentante la parte di bersaglio lineare, come raffigurato in *Figura 38 (a)*.

Nelle prime tre viste, il target viene riprodotto nella medesima posizione mentre, nell'ultima figura il target è notevolmente spostato sulla sinistra. Si passa dal posizionamento iniziale e reale nel fantoccio, a circa 50/10 mm sulla scala assi delle figure, ai -10/-15 mm. La ragione di questo può essere dettata da un brusco spostamento subito dal fantoccio mentre veniva variata la posizione del complesso sonda-laser nella direzione trasversale.

Dunque, questa sessione di imaging si è dimostrata efficace dal punto di vista dell'obbiettivo, ossia valutare il target nel punto di biforcazione, ma si è rilevata in parte inefficiente dal punto di vista del posizionamento, a seguito di un errore dell'operatore.

Volendo eseguire un parallelismo tra immagini ultrasonografiche e fotoacustiche, si evince come vi sia coerenza nei risultati eccetto che nel caso delle immagini (c). In questa circostanza si può notare come vi sia corrispondenza in termini di biforcazione del target, ma d'altra parte nell'immagine US il target viene rilevato leggermente più a sinistra. Precisamente, nella PA, si ha la biforcazione in posizione 0.1 mm e 5.1 mm, mentre nella US la si trova in -0.3 mm e 0.2 mm. Sotto il punto di vista del corretto rilevamento del bersaglio, esso è dimostrato dal divario spaziale dei due tubi della biforcazione che in entrambe le casistiche è di 5 mm.

## FANTOCCIO 4



Figura 41: – (a): Fantoccio in PAA; (b): Stampo per i target

## **Realizzazione**

Questa tipologia di fantoccio, più articolata in fase di preparazione e maggiormente precisa quanto al posizionamento dei target, è stata sviluppata per eseguire delle acquisizioni che fossero più realistiche delle precedenti e che permettessero di stabilire con certezza se i prototipi garantiscono un processo di ottenimento delle immagini accurato, non andando a distorcere il posizionamento reale dei bersagli di imaging.

Il fantoccio è stato prodotto in gel di poliacrilammide (PAA), con l'integrazione di additivi aventi la finalità di modificare le proprietà ottiche e acustiche del phantom, rendendole maggiormente affini a quelle reali.

Dal punto di vista strutturale, invece, si compone di un alloggiamento, di connettori e di tappi. Tutte queste componenti sono state disegnate su AutoCAD e successivamente stampate con la resina siliconica adoperata anche per i prototipi A e B. Quanto ai target di imaging, per essere preparati, oltre ai materiali e ai composti utili, è stato necessario realizzare degli stampi, anch'essi in resina, al fine di ottenere dei bersagli con forma e dimensione definite.

Per comprendere al meglio ciascuna di queste componenti stampate, a seguire ne è presentata un'illustrazione. Nella figura di sinistra, in verde i tappi, in blu i connettori, in viola l'alloggiamento, in giallo i target ed in azzurro i fili. Invece, l'immagine a destra mostra le due componenti, femmina e maschio, che costituiscono lo stampo per realizzare i bersagli di imaging.



Figura 42: componenti utili per la realizzazione del fantoccio 4 - (a): alloggiamento, tappi e connettori; (b): stampo dei target

Le componenti sopra citate hanno delle funzioni precise. L'alloggiamento serve per contenere al suo interno la soluzione preparata che verrà inserita in un'unica colata. La Figura (b) mostra gli stampi che servono per ottenere dei target di una forma ben precisa, in questo caso una successione di cilindri di diametro crescente. I canali che si osservano servono per posizionare il filo, e per inserire la siringa ed iniettare all'interno il preparato dei target. Quanto al filo, in acciaio, ha lo scopo di essere inserito nei connettori in modo tale da, dopo averlo teso, riuscire a posizionare i bersagli nella posizione desiderata e ben nota a priori. Una volta allocati i target, i tappi servono per tenere il filo in tensione. Al termine del processo di preparazione,

quindi una volta gelificato il fantoccio, il filo verrà estratto per evitare artefatti in fase di acquisizione.

A seguire è presentato, nel dettaglio, il processo di produzione del phantom che si articola in più fasi. In primo luogo, si miscelano acqua deionizzata, Tween20, glicole etilenico e olio di silicone; nel caso del target va aggiunta la nigrosina (0.1% e 0.01%) per modificarne le proprietà ottiche. Tale soluzione è stata sonicata e degassata in una camera a vuoto. Successivamente si sono aggiunti l'acrilammide ed il TEMED; nel caso del Target-TMM anche il carbomero940 che funge da addensante. Al termine, prima di inserire le soluzioni nello stampo target e nell'alloggiamento si aggiunge alla soluzione il persolfato di ammonio (APS) che avvia la polimerizzazione del gel di poliacrilammide (PAA).

Per concludere, dal punto di vista teorico, la struttura e la composizione di questo fantoccio dovrebbero garantire, in fase di acquisizione, una precisone elevata ed un migliore dettaglio. Specificatamente, essendo il target un tutt'uno con la matrice di fondo, se non per la composizione, ci si aspetta che vengano meno eventuali artefatti o problemi di riflessione, come al contrario avveniva nel caso dei fantocci sopra descritti a causa del tubo in plastica contente l'inchiostro.

La sezione successiva presenta le immagini acquisite su tale fantoccio ai differenti angoli di illuminazione.

## <u>Immagini</u>



Figura 43: immagini acquisite trasversalmente sul fantoccio in PAA – (a): angolazione sorgenti a 20°;
(b): angolazione sorgenti a 30°; (c): angolazione sorgenti a 40°; (d): angolazione sorgenti a 50°;

Le immagini acquisite e sopra presentate raffigurano la vista trasversale dei target inseriti in questo fantoccio in PAA. Essendo una situazione di studio simile a quella delle analisi *in-vivo*, si riscontrano considerevoli difficoltà nella visualizzazione dei target posti alle profondità più elevate. Le motivazioni alla base di questi risultati possono essere ricondotte all'inserimento di additivi caratterizzati da proprietà ottiche e acustiche significative in termini di assorbimento e diffusione di luce e suono.

Inoltre, è possibile osservare come vi sia una importante variazione dei risultati in relazione all'orientamento dei laser. In particolare, all'aumentare dell'angolo di incidenza si ha un incremento della profondità di penetrazione.

Di seguito è mostrata la disposizione dei target internamente al fantoccio e dunque quella che idealmente dovrebbe essere l'immagine visualizzata a seguito delle acquisizioni.



Figura 44: disposizione dei target nel fantoccio in PAA

Si può facilmente dedurre come i limiti in termini di potenza della sorgente luminosa, le barriere ottiche e acustiche dettate dalle proprietà dei materiali e le specifiche della sonda siano i fattori che più influiscono sulla qualità del risultato e su quanto esso si distacchi dalla situazione ideale. In secondo luogo, sono state eseguite le acquisizioni anche frontalmente. I risultati ottenuti in questa circostanza sono riportati di seguito.



Figura 45: immagini acquisite frontalmente sul fantoccio in PAA - (a): angolazione sorgenti a 20°; (b): angolazione sorgenti a 30°; (c): angolazione sorgenti a 40°; (d): angolazione sorgenti a 50°;

Si osserva come la colonna di target di sinistra sia maggiormente identificabili rispetto a quella di destra. Questo risultato si verifica in quanto i bersagli sono stati realizzati con composizioni differenti. In particolare, quelli di sinistra presentano una concentrazione di nigrosina di circa 0.01% mentre quelli di destra dello 0.1%. I bersagli di destra, dunque, assorbendo più luce risultano essere più difficili da identificare nell'immagine generata.

## Capitolo 4 Risultati

L'obbiettivo della tesi è l'innovazione delle tecniche di imaging fotoacustico attualmente esistenti, andando ad applicare il cosiddetto "imaging fotoacustico multi-angolare". Questa tecnica ha la finalità di migliorare la qualità delle immagini acquisite riuscendo a mappare nel miglior modo possibile la sezione di tessuto in cui vi è il target da analizzare.

La richiesta di sviluppare un holder che permetta di eseguire il movimento dei laser rispetto ad un unico centro di rotazione è relativa alla necessità di avere più immagini, precise e dettagliate, di uno stesso target nelle pressoché medesime condizioni di acquisizione. Sono proprio queste immagini ad essere adoperate in fase di elaborazione per arrivare alla visualizzazione di un'unica immagine risultante dalla fusione delle singole immagini alle varie angolazioni.

Questa fase del progetto è centrata sulla stesura di uno script che permetta di raggiungere l'obbiettivo suddetto. Il codice è scritto in linguaggio Matlab e consiste nel prendere ciclicamente ciascuna immagine acquisita sul fantoccio, andando a sezionarla in fasce orizzontali che verranno progressivamente integrate nell'immagine fusa finale e unite l'una all'altra. Eventuali artefatti o problemi ai bordi vengono affrontati e migliorati mediante l'impiego di tecniche di post-processing adeguate.

A seguire, verrà effettuata un'analisi approfondita della pipeline utilizzata per l'elaborazione delle immagini acquisite. In particolare sarà fornita una spiegazione dettagliata delle varie sezioni. Successivamente, saranno presentate immagini a supporto per illustrare in modo evidente i vantaggi dell'imaging multi-angolare nell'ambito della riduzione degli artefatti e dunque nell'incremento della qualità. Particolare attenzione sarà posta sulla differenza tra le immagini prima e dopo l'applicazione della tecnica e delle fasi di elaborazione. Nello specifico, il fine è evidenziare l'efficacia di tale approccio adoperando sia un riscontro di tipo visivo sia attraverso l'analisi di metriche quantitative quali, ad esempio, il rapporto segnale rumore.

### 4.1 Elaborazione delle immagini

In questo sotto-capitolo verrà analizzata nello specifico una pipeline riferita al codice Matlab utilizzabile per elaborare le immagini fotoacustiche acquisite. Più precisamente, l'insieme delle operazioni sarà richiamato e commentato in ogni sua porzione, dopo aver presentato un flowchart riassuntivo del codice.



Figura 46: Flowchart codice di elaborazione multi-angolare

A seguire, la pipeline di elaborazione dati divisa in sezioni e commentata.

```
Inizio
|
|-- INIZIALIZZAZIONI
| |-- Pulizia workspace
| |-- Chiusura figure
| |-- Lettura e caricamento dataset
| |-- Calcolo altezza fasce orizzontali
| |-- Inizializzazione immagine vuota
```

Queste prime righe di codice hanno la finalità di leggere e inizializzare gli strumenti necessari ai fini dell'elaborazione di immagini. In particolare, il codice inizia con la lettura del dataset e il caricamento della prima immagine per ottenere le dimensioni di base utili per inizializzare un'immagine vuota denominata "immagine\_fusa" che verrà adoperata per la fusione delle immagini successive. Inoltre, viene calcolata l'altezza delle fasce orizzontali, attualmente impostata al 10% dell'altezza totale dell'immagine. Questo step è fondamentale poiché nella fase seguente si processeranno le immagini acquisite ma, non nella loro completezza bensì lavorando su fasce orizzontali successive e adiacenti.

```
-- PROCESSING

|-- Ciclo su immagini nel dataset

| -- Lettura immagine corrente

| -- Verifica dimensioni

| -- Divisione in fasce orizzontali

| -- Fusione fasce nell'immagine composita

|-- Normalizzazione immagine composita

|-- Applicazione smoothing (filtro mediano)

|-- Conversione immagine a tipo uint8

|-- Visualizzazione immagine composita smoothed
```

Le righe di codice sopra riportate affrontano l'elaborazione e la fusione di un insieme di immagini al fine di creare un'immagine composita che appaia uniforme e priva di imperfezioni.

Innanzitutto, lo script inizia con la lettura di un dataset di immagini precedentemente caricato da una directory specifica. Subito dopo, verifica con attenzione se le dimensioni di tutte le immagini caricate coincidono con quelle della prima immagine nel dataset. Questo controllo è di fondamentale importanza poiché garantisce un'elaborazione coerente e senza errori.

A questo punto le immagini vengono divise in fasce orizzontali, ciascuna con un'altezza definita dalla variabile "altezza\_fascia". Questa suddivisione consente una gestione separata delle diverse sezioni delle immagini, preparando il terreno per la fase successiva.

La fase di elaborazione vera e propria implica la sovrapposizione e la somma delle fasce orizzontali ad un'immagine composita. Questo processo viene iterato per ciascuna immagine nel dataset di riferimento, all'interno di un ciclo "for". Il risultato di questa operazione è un'immagine in cui le diverse regioni di ciascuna immagine vengono fuse insieme.

Dopo la fase di fusione, il codice include una sezione dedicata alla normalizzazione dell'immagine composita, garantendo che i valori dei pixel siano bilanciati e coerenti tra loro. Questo passaggio è cruciale per ottenere un'immagine uniforme e senza discrepanze visive.

Infine, si applica un filtro mediano alla "immagine\_fusa" per ottenere un effetto di "smoothing". In altre parole, questo passaggio è utile per evitare o ridurre artefatti a cavallo tra le diverse fasce orizzontali.

In conclusione, il codice qui presentato svolge un ruolo fondamentale nella creazione di immagini composite, contribuendo a ottenere un risultato finale privo di imperfezioni, dall'aspetto uniforme e con una limitazione nel termine di rumore. Il risultato finale è presentato utilizzando il comando "imshow".

| |-- POST-PROCESSING: Stretching istogramma | |-- Applicazione stretching all'immagine smoothed | |-- Visualizzazione immagine stretchata |

In queste righe di codice, viene eseguita un'ulteriore fase di elaborazione delle immagini, mirata a migliorare la visibilità dei dettagli e a enfatizzare specifici obiettivi di imaging attraverso l'applicazione del processo di stretching dell'istogramma. L'obbiettivo è quello di rendere ancor più luminosi i pixel che già presentano un'intensità significativa, e viceversa per quelli più scuri. Per ottenere questa modifica, viene impiegato il comando "imadjust" il cui scopo è regolare l'intensità dei pixel nell'immagine di input, nominata "immagine fusa smoothed." L'intensità della modifica è determinata dai parametri settati ed in particolare, il vettore [0.5 0.9] precisa l'intervallo dei valori di pixel nell'immagine di input che verrà regolato. Il primo valore (0.5) rappresenta il "valore di ingresso minimo", mentre il secondo valore (0.9) rappresenta il "valore di ingresso massimo". Invece, il secondo vettore di parametri, [0 1], specifica l'intervallo dei valori di pixel nell'immagine risultante dopo l'operazione di regolazione. In particolare, il primo valore (0) rappresenta il "valore di uscita minimo", mentre il secondo valore (1) rappresenta il "valore di uscita massimo". In altre parole, questa riga di codice applica una trasformazione all'immagine, regolando i valori dei pixel in modo che le intensità dei pixel originali compresi nell'intervallo tra il 50% e il 90% siano mappate nell'intervallo [0, 1] nell'immagine risultante. I parametri possono essere variati in relazione al dataset su cui si lavora, andando a trovare il giusto intervallo per garantire una qualità ritenuta soddisfacente.

In seguito all'aumento del contrasto e della visibilità delle aree d'interesse nell'immagine, il risultato ottenuto viene presentato visivamente sullo schermo.

In questa sezione di codice, si effettua il calcolo del Rapporto Segnale-Rumore (SNR) in decibel (dB) per ciascuna immagine di riferimento.

$$SNR = \frac{Pot_s}{Pot_r} = \frac{\mu_s - \mu_r}{\sigma_r}$$

 $SNR_{dB} = 10 * \log_{10} SNR$ 

```
(equazione 6 – equazione 7)
```

L'obiettivo principale di questa operazione è valutare quanto efficacemente il segnale di interesse si distingue dal rumore di fondo, allo scopo di quantificare la qualità dell'immagine in esame.

Per raggiungere questa finalità, si stabilisce una soglia, la cui funzione è classificare i pixel dell'immagine in due categorie: "target" (ossia i pixel associati al segnale di interesse) e "sfondo" (i pixel relativi al rumore). In particolare, i pixel con un'intensità superiore alla soglia vengono etichettati come "target," mentre quelli con un'intensità inferiore vengono identificati come "sfondo."

La distinzione tra "target" e "sfondo" è di cruciale importanza in quanto il calcolo dell'SNR si basa sulla valutazione di due componenti fondamentali. Il primo è la potenza del segnale, che è correlata alla media dei valori dei pixel etichettati come "target." Il secondo è la potenza del rumore, che è associata alla deviazione standard dei valori dei pixel etichettati come "sfondo."

In sintesi, questo procedimento consente di ottenere un valore numerico che esprime quanto ben il segnale di interesse si distingua dal rumore nell'immagine, fornendo così una misura oggettiva della qualità dell'immagine stessa.

| |-- CALCOLO PARAMETRI SIGNIFICATIVI: SNR su ROI (scelte manualmente) | |-- Inizializzazione array risultati SNR | |-- Ciclo su immagini permettendo selezione ROI manuale | | |-- Calcolo e visualizzazione SNR per ciascuna ROI |

Nella precedente porzione di codice, il Rapporto segnale-rumore (SNR) non viene calcolato sull'intera immagine, ma piuttosto su Regioni di Interesse (ROI) selezionate manualmente dall'utente direttamente sull'immagine. La metodologia di calcolo dell'SNR è analoga a quella descritta nella sezione di codice precedente. Tuttavia, è necessario prestare particolare attenzione alla selezione di un valore di soglia specifico per ciascuna immagine, poiché uno universale potrebbe condurre a risultati non numerici, ossia "NaN".

La ragione principale di tale esito risiede nella possibilità che la deviazione standard del rumore, indicata come "deviazione\_sfondo", sia uguale a zero. Questo scenario si verifica quando tutti i pixel all'interno della ROI selezionata manualmente vengono classificati come pixel di target, ovvero quando hanno un valore maggiore o uguale alla soglia. Ciò si traduce nell'assenza di rumore all'interno della ROI. Per affrontare questa situazione e ottenere risultati coerenti, è necessario regolare il parametro della soglia in modo appropriato in modo che funzioni correttamente. Allo stesso tempo, è possibile adattare la selezione della ROI in modo da includere un numero maggiore di pixel, così da garantire la presenza di pixel di sfondo all'interno della ROI.

```
|
|-- CALCOLO PARAMETRI SIGNIFICATIVI: Profilo verticale immagine
processata (mean e max)
    |-- Inversione ordine righe dell'immagine
    |-- Ottieni dimensioni immagine
    |-- Ottializzazione vettore per profilo verticale
    |-- Inizializzazione vettore per profilo verticale
    |-- Calcolo profilo verticale
    |-- Plot profilo verticale
    |
Fine
```

In questa sezione di codice, è stato sviluppato un metodo per valutare in maniera oggettiva l'accuratezza e la coerenza delle immagini processate rispetto ai target di riferimento. L'obiettivo principale è fornire una prova visiva del corretto posizionamento dei punti di interesse, che dovrebbero corrispondere ai pixel con le intensità luminose più elevate. Inoltre, vogliamo verificare che la profondità degli oggetti rilevati sia coerente con il "risultato visivo" fornito dall'immagine.

Per raggiungere questi obiettivi, si è calcolata una curva nominata "profilo verticale", che rappresenta graficamente l'intensità luminosa dei pixel lungo le diverse righe dell'immagine. Questo profilo verticale può essere ottenuto calcolando la media delle intensità dei pixel per ciascuna riga o individuando il valore massimo di intensità in ogni riga.

È un metodo efficace per determinare se i target d'interesse sono correttamente allineati con l'oggetto di riferimento nel fantoccio in studio. In caso di discrepanze, questo strumento ci consente di valutare l'intensità delle differenze e di identificarne la causa.

Dunque, questo approccio permette di porre l'attenzione sui dettagli rilevanti e di ottenere una sorta di "zoom" sulla zona d'interesse, fornendo un contributo significativo alla validità e all'affidabilità dello studio.

## 4.2 Discussione dei risultati ottenuti

In questo capitolo vengono riassunti i risultati ottenuti in fase sperimentale. E' eseguita una presentazione dei valori raccolti a seguito di un'analisi quantitativa e, parallelamente, vengono presentate le immagini generate con il processo di acquisizione ed elaborazione, associate all'andamento del "profilo verticale". Dunque, questa sezione è utile per avere sia un riscontro visivo sia un insieme di risultati numerici di supporto alle immagini. La combinazione di questi dati fornisce un quadro completo e dettagliato dei risultati.

## FANTOCCIO 1

In questo paragrafo è presentata un'analisi dei risultati ottenuti contestualmente alle acquisizioni eseguite sul fantoccio 1, i quali verranno commentati e confrontati. La *Figura 47* presenta le immagini ottenute.







Figura 47: immagini relative al fantoccioX - (a): "immagine\_fusa" ottenuta dall'imaging multi-angolare; (b): "immagine\_fusa\_smoothing" ottenuta filtrando la precedente; (c): "immagine\_stretchata" ottenuta con lo stretching dell'istogramma

Le immagini ottenute a seguito di ciascuna fase di elaborazione mostrano i tessuti dalla superficie, cioè da riga 0 fino ai 40 mm di profondità di riga 549. La prima, nominata "immagine\_fusa", è ottenuta dalla fase di processing in cui si vanno ad unire, per fasce orizzontali, le immagini acquisite dalle singole angolazioni. Precisamente deriva dalla combinazione di otto immagini acquisite con i laser inclinati da 20° a 55° con intervalli di 5°. In altre parole, questa immagine rappresenta il risultato dell'imaging multi-angolare richiesto in tale progetto di tesi sperimentale.

Successivamente si va ad applicare una serie di tecniche di post-processing al fine di migliorare la qualità. In primo luogo, si sfrutta un filtro mediano per eseguire lo "smoothing" dell'immagine, con lo scopo di ridurre gli artefatti ai bordi di ciascuna fascia orizzontale, mentre in secondo luogo, si esegue lo stretching dell'immagine così da ridurre il rumore e risaltare i target, come si osserva in *Figura 47 (c)*.

Nonostante la fase di elaborazione delle immagini, può succedere che a causa di artefatti o della dispersione ottica del fascio luminoso all'interno del fantoccio, il target non venga ben identificato, come nel caso riquadrato in verde nell'immagine sopra presentata. Infatti, attraverso una rapida osservazione è facile non riuscire a rilevare la presenza di un oggetto in quella zona. Per dimostrare la presenza di questo target, dunque, si è calcolato il "profilo verticale" dell'immagine ultrasonografica corrispondente. L'andamento è illustrato in *Figura 48*.



Figura 48: "profilo verticale" relativo alle immagini acquisite sul fantoccioX - (a): "profilo verticale" completo; (b): "profilo verticale"limitato alla profondità dei target

La *Figura 48 (a)* mostra il profilo completo dalla riga 1 alla riga 549 dell'immagine ricavata. Facendo un confronto con la *Figura 47 (c)*, si può trovare una corrispondenza immediata. Nell'immagine fotoacustica si osserva nella parte alta e in quella centrale, vicino alla riga 350, una presenza importante di pixel luminosi,

che sono classificabili come artefatti superficiali o dovuti alla riflessione. Questa evidenza la si ritrova anche nella curva rappresentante il "profilo verticale".

Oltre a ciò, è possibile osservare segnale tra le righe di pixel dalla 50 alla 110 circa. La *Figura 48 (b)* è un ingrandimento di questa porzione di grafico al fine di comprenderne meglio la distribuzione dell'intensità luminosa dei pixel. Si può notare una evidente presentazione di tre picchi distinti e dunque, la presenza dello stesso numero di target ciascuno a profondità differente.

In questo caso specifico tale constatazione, fa capire l'importanza di associare delle analisi "numeriche" ai risultati "visivi" poiché è solo grazie all'andamento del profilo verticale che si ha avuto la certezza della presenza del terzo target riquadrato in verde, il quale nell'immagine poteva essere considerato come sfondo a causa della non facile identificazione dettata da artefatti o difficoltà di acquisizione.

Lo script Matlab, in aggiunta, ha permesso di estrapolare dei risultati oggettivi in termini di qualità delle immagini. È il calcolo del SNR che garantisce un valore numerico di riferimento per definire quanto l'obbiettivo di imaging sia facilmente distinguibile e definibile rispetto ai tessuti circostanti.

Per dimostrare l'efficacia dell'imaging multi-angolare si è calcolato il Rapporto Segnale-Rumore per le immagini prese singolarmente ai fini di confrontarlo con quello uscente dal processing. Come metro di paragone sono qui riportati i valori numerici estremi:

> SNR per img migliore: 8.10 dB SNR per img peggiore: 7.57 dB

Tali risultati possono essere paragonati con quelli ottenuti a seguito del processo di elaborazione multi-angolare e di miglioramento. Specificatamente per questo fantoccio, i valori ottenuti sono tabellati di seguito.

```
SNR per immagine_fusa: 8.14 dB
SNR per immagine_fusa_smoothed: 8.20 dB
SNR per immagine_stretchata: 10.83 dB
```

Come si può osservare, i valori di Rapporto Segnale-Rumore che si ottengono in uscita dal processo di imaging multi-angolare sono superiori rispetto a quelli che si ottengono dalle immagini acquisite su singole angolazioni. Dunque, la qualità delle immagini ottenibili varia in positivo nel caso di imaging su più angoli e dimostra l'importanza di tale tecnica e del suo sviluppo.

Inoltre, analizzando più nel dettaglio gli SNR ricavati, vi è un costante incremento del valore parallelamente all'applicazione delle tecniche di elaborazione. Questi risultati sono indice di quanto sia significativo il processo di elaborazione delle immagini che, oltre a unificare le singole viste favorendo quindi l'imaging multiangolare, permette di incrementare la qualità dei risultati che, essendo in partenza dipendente dalle specifiche del sistema di acquisizione utilizzato, può essere limitata.

Per dimostrare l'efficacia dell'imaging fotoacustico di tipo multi-angolare, sono state fatte delle analisi considerando le medesime condizioni di lavoro della situazione presentata finora, ma utilizzando un numero inferiore di viste.

La figura seguente mostra il risultato a cui si è giunti adoperando le acquisizioni fatte con i laser alle inclinazioni di 20°, 30°, 45° e 55°.



Figura 49: immagine derivante da sole quattro angolazioni dei laser

Questa ridondanza nel test sul medesimo fantoccio è stata studiata in vista di un confronto tra i Rapporti Segnale-Rumore ottenuti nelle due situazioni. Di seguito sono riportati gli SNR ottenuti dal processing di sole quattro immagini.

SNR per immagine\_fusa: 8.35 dB SNR per immagine\_fusa\_smoothed: 8.44 dB SNR per immagine\_stretchata: 8.65 dB

Volendo eseguire delle considerazioni unicamente sul risultato migliore, e ricordando che nel caso precedente SNR valeva 10.83 dB, è immediato osservare come il disporre di un dataset più completo e composto da immagini acquisite da svariate angolazioni sia migliorativo quanto alla qualità dell'immagine. Per tale ragione, la possibilità di eseguire imaging multi-angolare è un vantaggio che permette di sviluppare nuove tecniche e di ottenere migliori risultati nel campo della fotoacustica.

Dunque, gli holder progettati in tale progetto di tesi sono funzionali e garantiscono una corretta esecuzione dell'imaging fotoacustico multi-angolare, come si evince dall'incremento del valore dell'SNR nel momento in cui aumenta il numero di acquisizioni dalle singole viste.

## FANTOCCIO 2

Per quanto riguarda questo fantoccio, viene fatto un confronto in parallelo tra le immagini acquisite in modalità ultrasonografica tradizionale e quelle ricavate adoperando la tecnica dell'imaging fotoacustico. Il parallelismo, che si sviluppa per ciascuno step di processing, può essere utile per evidenziare vantaggi e svantaggi delle due tipologie di acquisizione di immagini mediche.



(a)

(b)



Figura 50: parallelismo tra le immagini fotoacustiche e ultrasonografiche relative al fantoccio 2 – (a):
"immagine\_fusa" PA ottenuta dall'imaging multi-angolare; (c): "immagine\_fusa\_smoothing" PA ottenuta filtrando la precedente; (e): "immagine\_stretchata" PA ottenuta con lo stretching dell'istogramma.
– (b): "immagine\_fusa" US ottenuta dall'imaging multi-angolare; (d): "immagine\_fusa\_smoothing" US ottenuta filtrando la precedente; (f): "immagine\_stretchata" US ottenuta con lo stretching dell'istogramma.

L'imaging fotoacustico multi-angolare ha la finalità di incrementare la qualità delle immagini ed inoltre, rispetto all'imaging ultrasonografico tradizionale, permette di rilevare target potenzialmente non rilevabili a profondità superiori, o comunque difficilmente distinguibili in modo preciso. Questa particolarità è illustrata nelle immagini sopra confrontate. Fin dal primo step di elaborazione si evince come il target posto ad una profondità maggiore sia distinguibile solo nella *Figura 50 (a)* e non nella rispettiva immagine ultrasonografica (b). I riquadri verdi sovraimpressi alle figure chiariscono la situazione.

Con l'applicazione degli step successivi di elaborazione, dunque utilizzando lo *smoothing* e lo *stretching* delle immagini, si può notare in modo ancor più definito che l'obbiettivo di imaging posto ad una profondità corrispondente alle righe circostanti la numero 150, sia visibile solo con la tecnica fotoacustica. Per tale ragione, è evidente come questa metodologia di lavoro possa permettere di mappare tessuti più profondi identificandone eventuali peculiarità.

Invece, per quanto concerne la presenza di artefatti è osservabile come essi si riducano in entrambe le situazioni di lavoro. Va sottolineato che, in tale circostanza, l'immagine US (*Figura 50 (f)*) risulti essere "visivamente" più nitida in termini di identificazione dei target rispetto a quella PA (*Figura 50 (e)*). Questo punto a sfavore per l'imaging fotoacustico viene ricompensato tenendo presente ciò che è stato suddetto ossia che non tutti i target profondi vengono raggiunti, perdendo quindi eventuali obbiettivi di imaging di significativa rilevanza. Dunque, è necessario trovare il giusto compromesso sulla tecnica da utilizzare considerando profondità da raggiungere e/o qualità da garantire.

Ad ogni modo, la qualità delle immagini fotoacustiche ottenute e di interesse per lo studio è sufficientemente accurata. A supporto di questo sono stati calcolati i valori di SNR, i quali presentano un continuo miglioramento parallelamente alle tecniche di post processing applicate.

In riferimento a tal proposito, se fosse necessario avere immagini maggiormente definite e precise è possibile introdurre ulteriori filtraggi o trasformate finalizzate all'incremento qualitativo.

La schematizzazione seguente riporta il Rapporto Segnale-Rumore per le immagini acquisite su tale fantoccio.

Valori riferiti alle immagini fotoacustiche:

SNR per immagine\_fusa: 9.13 dB SNR per immagine\_fusa\_smoothed: 9.22 dB SNR per immagine\_stretchata: 9.89 dB

Valori riferiti alle immagini ultrasonografiche:

SNR per immagine\_fusa: 7.20 dB SNR per immagine\_fusa\_smoothed: 7.17 dB SNR per immagine stretchata: 11.54 dB

I dati sopra raccolti mostrano come, in senso assoluto, la migliore distinzione targetsfondo la sia abbia con le immagini US tradizionali, ma d'altro canto, va ricordato come in tal caso non è certo si riescano a raggiungere gli obbiettivi più profondi. Per tale ragione, è meglio acquisire immagini fotoacustiche nonostante l'SNR definitivo possa risultare leggermente inferiore a quello ultrasonografico. In tal caso si hanno gli 11.54 dB dell'immagine US contro i 9.89 dB della PA.

In aggiunta, l'imaging fotoacustico garantisce di per sé una ottima qualità, infatti, tenendo in considerazione le sole immagini acquisite; dunque, in assenza di miglioramenti dettati dalla fase di elaborazione, il valore dell'SNR è di partenza superiore a quello delle immagini acquisite con soli ultrasuoni. Precisamente, con tale fantoccio, le immagini PA complessive presentano un SNR di 9.13 dB contro gli inferiori 7.20 dB delle immagini US che dunque sono maggiormente ricche di artefatti e meno nitide nell'identificazione del target.

Volendo anche in questo secondo caso di studio dimostrare come l'imaging multiangolare comporti un incremento del valore di SNR rispetto alle acquisizoni eseguite singolarmente, è sufficiente analizzare i valori ottenuti e riportati in seguito.

> SNR per img migliore: 8.49 dB SNR per img peggiore: 7.41 dB

Sono evidenziati gli SNR migliore e peggiore per le immagine a singola angolazione. Ricordando che il valore, sopra esposto, di SNR per l'imaging multi-

angolare era di 9.89 dB, è evidente come anche in questo caso di studio l'esito della tecnica di multi illuminazione sia risultato essere positivo.

### FANTOCCIO 3

#### ANALISI MULTI-ANGOLARE:

Anche in questo caso, il processo di elaborazione aveva l'obbiettivo di migliorare la qualità delle immagini andando a identificare i target presenti nel phantom. Dal punto di vista teorico ci si dovrebbe aspettare di osservare un bersaglio in duplice presenza, essendo che la sonda è stata posizionata in corrispondenza di tale sezione del fantoccio. I risultati ottenuti sono presentati di seguito e, in particolare, il processing genera l'immagine multi-angolare mostrata in *Figura 51*.



Figura 51: immagine fotoacustica post elaborazione

L'immagine risulta essere sicuramente pulita da artefatti di grande entità ed inoltre i target circolari si riescono a distinguere discretamente intorno ai 10 mm di profondità. Il problema che persiste è l'artefatto nella parte alta, dalla superficie ai 2 mm di profondità, il quale però non interferisce negativamente sulla corretta rilevazione dei bersagli.

Il Rapporto Segnale-Rumore calcolato parallelamente agli step di processing evidenzia un continuo incremento del valore in dB, indicando cioè che l'elaborazione ha conseguenze positive sulla chiarezza del risultato finale. I valori ottenuti sono elencati di seguito.

SNR per immagine\_fusa: 8.32 dB SNR per immagine\_fusa\_smoothed: 8.67 dB SNR per immagine\_stretchata: 11.77 dB

A supporto della grande utilità che ha l'imaging multi-angolare nell'ambito della ricerca scientifica si sono calcolati gli SNR delle singole immagini prima del processing. I risultati ottenuti sono tutti inferiori al valore che si estrapola dall'immagine successivamente all'elaborazione e dunque questo dimostra che disporre di un sistema a più angolazioni è una opportunità vincente rispetto ad un supporto a singolo angolo. Qui sono riportati gli SNR delle singole immagini:

```
SNR per immagine_20: 8.04 dB
SNR per immagine_30: 7.77 dB
SNR per immagine_40: 7.72 dB
SNR per immagine_50: 7.36 dB
```

Facendo un confronto tra il migliore dei valori, dunque 8.04 dB, si nota come risulti comunque essere inferiore sia rispetto al valore di SNR che si ottiene con l'imaging multi-angolare, essendo di 8.32 dB, che a quello post-processing di 11.77 dB.

### IMAGING SUL VOLUME:

In questa circostanza non è opportuno eseguire elaborazione delle immagini con il codice Matlab realizzato poiché esso lavora per fasce orizzontali in cui deve essere preservata la coerenza spaziale dei target. Questa necessità viene meno nel caso di imaging sul volume in quanto si esegue uno spostamento della strumentazione di misura con l'obbiettivo di analizzare una porzione di tessuto nella sua completezza e quindi a fronte di una forma articolata del target si perde la coerenza spaziale richiesta per l'applicazione dello script.

Ciò che può essere valutato in questo caso è se effettivamente il posizionamento del target è ad una profondità corrispondente alla realtà oppure se durante lo spostamento trasversale del sistema rispetto al fantoccio vi sono dei movimenti o

non movimenti indesiderati, o ancora eseguire un confronto tra le immagini fotoacustiche e quelle ultrasonografiche.

Nel caso di studio specifico di questa tesi i risultati hanno dimostrato come i supporti progettati si adattino perfettamente anche a tale tipologia di imaging. Tramite il movimento del braccio meccanico controllato millimetricamente si riesce a far scorrere la sonda e i laser sulla superficie del fantoccio andando a scansionare il volume di interesse. Le immagini di riferimento sono state presentate nel capitolo quattro nella sezione 4.3.

## FANTOCCIO 4

Per questo caso di studio, applicare la tecnica multi-angolare ha portato a risultati importanti. Successivamente, si può osservare come la fusione delle immagini ottenute sulle singole viste, precisamente a 20°, 30°, 40° e 50° di angolazione dei fasci luminosi, abbia portato alla visualizzazione di un'immagine finale completa.



Figura 52: immagine fotoacustica post imaging multi-angolare

L'immagine evidenzia la presenza, sebbene non definita perfettamente, di due target su tre totali. Quello alla profondità più elevata è di difficile identificazione considerando strumenti utilizzati e set up sperimentale. In generale, come ci si aspettava, le immagini ottenute sono libere da artefatti.

Una peculiarità è la presenza nitida di righe orizzontali, le quali corrispondono esattamente al solco generato dal filo in acciaio utilizzato per sospendere i target alla posizione desiderata. Un possibile sviluppo, con l'obbiettivo di ridurre la presenza di tale elemento di disturbo, potrebbe essere quello di utilizzare fili più sottili o in materiali differenti, come può essere ad esempio il nylon.

Sotto l'aspetto di valori quantitativi, si è calcolato anche in questa circostanza il Rapporto Segnale-Rumore sia per le immagini singole sia per l'immagine multiangolare in ciascuna fase di processing. I risultati ottenuti sono espressi nel grafico seguente.



Figura 53: Grafico rappresentante i valori di SNR nelle diverse situazioni di studio

Si evince come anche in questa circostanza la tecnica multi-angolare sia migliorativa in termini di Rapporto Segnale-Rumore. Non considerando alcuno step di post processing, il solo imaging multi-angolare comporta un incremento di SNR, che da 14.08 dB, nel caso migliore, passa a 14.11 dB. A seguito del processing si raggiunge il valore di 17.14 dB.

Le medesime analisi sono state eseguite sulle acquisizioni fatte adoperando il trasduttore trasversalmente rispetto ai bersagli. Anche in questa circostanza la qualità si è dimostrato essere superiore a seguito dell'applicazione dela tecnica di multi illuminazione piuttosto che a singolo angolo.

Per quantificare il miglioramento sono riportati di seguito tutti i valori calcolati.

I Rapporti Segnale-Rumore relativi alle acquisizoni sui singoli angoli di illuminazione presentano i seguenti valori in decibel:

```
SNR per immagine_20: 10.00 dB
SNR per immagine_30: 10.40 dB
SNR per immagine_40: 10.42 dB
SNR per immagine 50: 10.25 dB
```

Invece, i valori che seguono sono riferiti alle immagini originate a seguito dell'imaging multi-angolare:

SNR per immagine\_fusa: 11.25 dB SNR per immagine\_fusa\_smoothed: 11.82 dB SNR per immagine stretchata: 14.69 dB

Si può osservare come anche in questo caso si abbia un incremento dei valori e dunque della qualità delle immagini.

# Capitolo 5 Conclusione e sviluppi futuri

Nel corso di questa ricerca, sono stati sviluppati due prototipi mediante tecnologia di stampa 3D, con l'obiettivo di agevolare l'acquisizione di immagini fotoacustiche da diverse angolazioni. I risultati principali del lavoro, dunque, consistono in due supporti utili a eseguire in modo ottimale le acquisizioni di immagini fotoacustiche su fantocci.

Gli holder sono stati progettati in modo da essere regolati manualmente e in maniera più funzionale possibile, riuscendo a garantire il set up di lavoro desiderato. Il materiale con cui sono stati stampati è una resina siliconica che garantiva le proprietà ricercate in ogni parte del supporto.

I prototipi sono stati sottoposti a test e validazioni utilizzando la sonda e i laser impiegati nella progettazione. Al fine di dimostrare la loro utilità in diverse condizioni, sono state eseguite acquisizioni su phantom 3D, variandone forma e/o composizione. In ciascuna circostanza di lavoro, si è riusciti ad ottenere discrete immagini fotoacustiche da ogni angolazione garantita dai supporti.

Le immagini raccolte sono state elaborate e confrontate al fine di valutare se l'approccio multi-angolare migliorasse le acquisizioni rispetto alle immagini ottenute da acquisizioni ultrasonografiche o fotoacustiche da un singolo angolo. I risultati ottenuti, sia in termini di rapporto segnale-rumore che da una prospettiva visiva, sono stati positivi. Gli artefatti sono stati significativamente ridotti, e l'identificazione dei target è stata di buona qualità. Pertanto, entrambi i prototipi sviluppati, in combinazione con l'elaborazione multi-angolare, rappresentano un passo significativo nello sviluppo e nell'avanzamento della tecnica di imaging fotoacustico. Inoltre, entrambe le soluzioni sono adattabili per l'applicazione su altre tipologie di strumentazione andando semplicemente ad apportare modifiche ai fissatori dei laser e al guscio della sonda, in base ai modelli utilizzati.

Per quanto riguarda i costi, invece, essi dipendono dalla precisione e dal dettaglio richiesti, nonché dal tipo di materiale utilizzato per la stampa 3D.

In sintesi, i supporti sviluppati hanno dimostrato di soddisfare gli obiettivi prefissati e rappresentano un contributo di rilievo nel campo della fotoacustica. Questo settore è in costante evoluzione, con l'obiettivo di fornire soluzioni per configurazioni di misura ordinarie e speciali, riducendo, ad esempio, i costi di produzione e l'ingombro o aumentando la percentuale di applicabilità clinica. Dunque, per quanto riguarda lo sviluppo futuro, si possono esplorare ulteriori ottimizzazioni per superare le limitazioni dei prototipi A e B presentati. Anche sotto l'aspetto dell'acquisizione e dell'elaborazione delle immagini è possibile eseguire dei miglioramenti. Due strade percorribili sono quella di implementare algoritmi di ricostruzione delle immagini più sofisticati oppure quella di sviluppare soluzioni software finalizzate alla fusione delle immagini che siano più performanti.

In generale, l'imaging fotoacustico multi-angolare offre un'opportunità unica per ottenere immagini dettagliate di strutture anatomiche altrimenti difficili da identificare e analizzare. Sono proprio le prospettive di sviluppo di questa tecnologia che possono e devono spingere verso un crescente interesse nella materia con lo scopo di massimizzarne il potenziale.

## Appendice

In questa sezione saranno presentate le messe in tavola delle varie parti costituenti i due prototipi progettati. In particolare, prima sarà mostrata la soluzione A e a seguire la soluzione B.
## SOLUZIONE A



















## SOLUZIONE B











## Bibliografia

[1] J. Czuchnowski and R. Prevedel. "Photoacoustics: seeing with sound". *Science in School*, 15 Nov. 2023.

[2] R. R. Gharieb, 'Photoacoustic Imaging for Cancer Diagnosis: A Breast Tumor Example', Photoacoustic Imaging - Principles, Advances and Applications. *IntechOpen*, May 06, 2020. doi: 10.5772/intechopen.92084.

[3] A. G. Bell. 'On the production and reproduction of sound by light'. *American Journal of Science*, Series 3 Vol. 20(118):305{324, 1880.

[4] S. Manohar and D. Razansky. 'Photoacoustics: a historical review'. Adv. *Opt. Photon.*, 8(4):586{617, Dec 2016.

[5] 'Bell's Photophone'. Nature 23, 15–19 (1880). https://doi.org/10.1038/023015a0

[6] Rayleigh, "The photophone," Nature 23, 274–275 (1881).

[7] W. H. Preece, "On the conversion of radiant energy into sonorous vibrations," *Proc. R. Soc. London* 31, 506–520 (1880).

[8] W. C. Röntgen, "Ueber Töne, welche durch intermittirende Bestrahlung eines Gases entstehen," *Ann. Phys.* 248, 155–159 (1881).

[9] J. Tyndall, "Action of an intermittent beam of radiant heat upon gaseous matter," *Proc. R. Soc. London* 31, 307–317 (1880).

[10] M. L. Veingerov, "A method of gas analysis based on the Tyndall-Röntgen optico-acoustic effect," Dokl. Akad. Nauk SSSR 19, 687–688 (1938).

[11] E. L. Kerr and J. G. Atwood, "The laser illuminated absorptivity spectrophone: a method for measurement of weak absorptivity in gases at laser wavelengths," *Appl. Opt.* 7, 915–921 (1968).

[12] A. Rosencwaig, "Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy" (Wiley, 1980).

[13] L. Amar, M. Bruma, P. Desvignes, M. Leblanc, G. Perdriel, and M. Velghe, "Detection, d'ondes élastiques (ultrasonores) sur l'os occipital, induites par impulsions laser dans l'oeil d'un lapin," *C. R. Acad. Sci. Paris* 259, (1964).

[14] T. Bowen, R. L. Nasoni, A. E. Pifer, and G. H. Sembroski, "Some experimental results on the thermoacoustic imaging of tissue equivalent phantom materials," in *Proceedings 1981 Ultrasonics Symposium* (IEEE, 1981), pp. 823–827.

[15] Q. X. Chen, A. Davies, R. J. Dewhurst, and P. A. Payne. 'Photo-acoustic

probe for intra-arterial imaging and therapy'. *Electronics Letters*, 29(18):1632{1633, Sep. 1993. ISSN 0013-5194.

[16] B. Cox, J. Laufer, and P. Beard. 'The challenges for quantitative photoacoustic imaging', volume 7177. 2009

[17] P. Beard. 'Biomedical photoacoustic imaging'. *Interface Focus*, 1(4):602{631, Aug 2011.

[18] R. O. Esenaliev, A. A. Karabutov, F. K. Tittel, B. D. Fornage, S. L. Thomsen, C. Stelling, and A. A. Oraevsky. 'Laser optoacoustic imaging for breast cancer diagnostics: limit of detection and comparison with x-ray and ultrasound imaging'. *Proc.SPIE*, 2979:2979 { 2979 { 12, 1997.

[19] M. Xu and L. V. Wang. 'Photoacoustic imaging in biomedicine'. *Review of Scientic Instruments*, 77(4):041101, 2006.

[20] M. Xu and L. V. Wang. 'Photoacoustic imaging in biomedicine'. *Review of Scientic Instruments*, 77(4):041101, 2006.

[21] A. A. Oraevsky and A. A. Karabutov. 'Optoacoustic tomography'. *Biomedical photonics handbook*, 34:1{34, 2003.

[22] K. M. Meiburger. 'Quantitative Ultrasound and Photoacoustic Imaging for the Assessment of Vascular Parameters'. *Springer*, 2016.

[23] C.-L. Tsai, J.-C. Chen, W.-J. Wang, et al. 'Near-infrared absorption property of biological soft tissue constituents'. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 21(1):7{14, 2001.

[24] Lin L., et al., "Single-breath-hold photoacoustic computed tomography of the breast," *Nat. Commun.* 9(1), 2352 (2018). 10.1038/s41467-018-04576-z

[25] Zhou Y., et al., "A phosphorus phthalocyanine formulation with intense absorbance at 1000 nm for deep optical imaging," *Theranostics* 6(5), 688–697 (2016).

[26] Kruger R. A., Lam R. B., Reinecke D. R., Del Rio S. P., Doyle R. P. 'Photoacoustic angiography of the breast'. *Med. Phys.* 37, 6096. 2010.

[27] Lao Y., Xing D., Yang S., Xiang L. 2008. 'Noninvasive photoacoustic imaging of the developing vasculature during early tumor growth'. *Phys. Med. Biol.* 53, 4203–4212.

[28] Niederhauser J. J., Jaeger M., Lemor R., Weber P., Frenz M. 2005. 'Combined ultrasound and optoacoustic system for real-time high-contrast vascular imaging in vivo'. *IEEE Trans. Med. Imag.* 24, 436–440.

[29] Favazza C. P., Jassim O., Cornelius L. A., Wang L. V. 2011. 'In vivo photoacoustic microscopy of human cutaneous microvasculature and a nevus'. *J. Biomed. Opt.* 16, 016015

[30] Hu S., Maslov K., Wang L. V. 2011. 'Second-generation optical-resolution photoacoustic microscopy with improved sensitivity and speed'. *Opt. Lett.* 36, 1134–1136

[31] Jansen K., van der Steen A. F. W., van Beusekom H. M. M., Oosterhuis J. W., van Soest G. 2011. 'Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis'. *Opt. Lett.* 36, 597–599

[32] Yang JM, Maslov K, Yang HC, Zhou Q, Shung KK, Wang LV. 'Photoacoustic endoscopy'. *Opt Lett.* 2009 May 15;34(10):1591-3.

[33] Brunker, J., Beard, 'P. Acoustic resolution photoacoustic Doppler velocimetry in blood-mimicking fluids'. *Sci Rep* 6, 20902 (2016).

[34] Brunker J, Beard P. 'Pulsed photoacoustic Doppler flowmetry using timedomain cross-correlation: accuracy, resolution and scalability'. *J Acoust Soc Am*. 2012 Sep;132(3):1780-91.

[35] Luke GP, Yeager D, Emelianov SY. 'Biomedical applications of photoacoustic imaging with exogenous contrast agents'. *Ann Biomed Eng.* 2012 Feb;40(2):422-37.

[36] https://www.rfwireless-world.com/Terminology/LED-vs-Laser.html

[37] https://electronicscoach.com/difference-between-led-and-laser.html

[38] R. Manwar, J. B. Lara, R. Prakash, S. M. Ranjbaran, K. Avanaki, J. Biophotonics 2022, 15(6), e202200016. https://doi.org/10.1002/jbio.202200016

[39] Sensors 2020, 20, 4052; doi:10.3390/s20144052

[40] Sensors 2020, 20, 3789; doi:10.3390/s20133789

[41] https://formlabs.com/it/negozio/materials/clear-resin

[42] https://www.opotek.com/products/phocus-mobile/#tab-id-1

[43]https://www.opotek.com/wpcontent/uploads/2023/01/PhocusMOBILE\_DataS heet v400.pdf

[44]https://verasonics.com/wp-content/uploads/2019/04/Vantage-Systems Brochure.pdf

[45]https://verasonics.com/wp-content/uploads/2021/11/TransducerSpecifications-Sheet-October-2021.pdf

[46] https://medicine.umich.edu/dept/ophthalmology/news-publications/annualreport/2018-19-featured-stories/photoacoustic-imaging-macular-degeneration

[47] A. Fatima, K. Kratkiewicz, R. Manwar, M. Zafar, R. Zhang, B. Huang, N. Dadashzadeh, J. Xia, K. Avanaki. 'Review of cost reduction methods in photoacoustic computed tomography', *Photoacoustics*, Volume 15, 2019. https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100137.

[48] Jorge Palma-Chavez, Keith A. Wear, Yash Mantri, Jesse V. Jokerst, William C. Vogt, 'Photoacoustic imaging phantoms for assessment of object detectability and boundary buildup artifacts', *Photoacoustics*, Volume 26, 2022. https://doi.org/10.1016/j.pacs.2022.100348

[49] Bohndiek SE, Bodapati S, Van De Sompel D, Kothapalli S-R, Gambhir SS (2013). 'Development and Application of Stable Phantoms for the Evaluation of Photoacoustic Imaging Instruments'. *PLoS ONE* 8(9): e75533. https://doi:10.1371/journal.pone.0075533

[50] https://doi.org/10.1364/BOE.9.001151

[51] Simul Healthc. 2018 June ; 13(3): 149–153. doi:10.1097/SIH.00000000000302

[52] Journal of Biomedical Optics 114, 041102 July/August 2006