



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.A. 2025/2026

Sessione di laurea Luglio 2026

Ottimizzazione dell'imaging fotoacustico volumetrico della sO_2 : ruolo della densità di campionamento e della correzione dell'energia dell'impulso

Relatrice

Prof.ssa Kristen Mariko Meiburger

Candidato

Federico Chiarello

Correlatrici

Ing.ra Bruna Cotrufo

Ing.ra Silvia Seoni

Dichiarazione sull'uso di strumenti di intelligenza artificiale generativa

Durante la redazione della tesi, è stato utilizzato ChatGPT (OpenAI) modello GPT-5.5 Thinking, come supporto alla revisione linguistica, alla riorganizzazione di alcune parti del testo e alla formulazione di didascalie.

Indice

Elenco delle figure	5
Elenco delle tabelle	7
Abstract	13
1 Introduzione	13
2 Background teorico	15
2.1 Ultrasound imaging (US)	15
2.2 Photoacoustic imaging (PAI)	16
2.2.1 Principi fisici dell'imaging fotoacustico	17
2.2.2 Fluence ottica e attenuazione del tessuto	18
2.2.3 Energy correction	18
2.3 Spectral unmixing	19
2.3.1 Cromofori e bande di assorbimento	19
2.3.2 Principi dello spectral unmixing	20
2.3.3 Stima della mappa di saturazione dell'ossigeno	20
2.4 Algoritmi di ricostruzione dell'imaging fotoacustico	21
2.4.1 Delay and sum (DAS)	22
2.4.2 Delay and Multiply Sum (DMAS)	22
2.5 Vantaggi e svantaggi dell'imaging fotoacustico	23
2.6 Applicazioni dell'imaging fotoacustico	24
2.6.1 Ambito oncologico	24
2.6.2 Ambito cardiovascolare	24
3 Materiali e metodi	25
3.1 Setup sperimentale	25
3.1.1 Sistema di acquisizione Verasonics Vantage 256	25
3.1.2 Sonda lineare	26
3.1.3 Sistema laser	28
3.2 Protocollo di acquisizione dati	29

3.3	Data processing	31
3.3.1	Ricostruzione dell'immagine fotoacustica.....	31
3.3.2	Costruzione del volume e segmentazione della ROI	34
3.3.3	Spectral unmixing e stima della sO ₂	37
3.3.4	Selezione dei pixel e applicazione della maschera segmentata	39
3.4	Metriche quantitative.....	40
4	Risultati.....	43
4.1	Studio del fantoccio	45
4.2	Studio dell'avambraccio in acqua	50
4.3	Studio dell'avambraccio con gel pad	55
4.4	Studio del polso in acqua.....	60
4.5	Studio del polso con gel pad.....	65
4.6	Riepilogo comparativo dei volumi analizzati	70
5	Discussione	76
6	Limitazioni e sviluppi futuri	78
7	Conclusione	80

Elenco delle figure

Figura 2.1: Rappresentazione schematica del processo fotoacustico, dalla generazione del segnale fotoacustico alla rilevazione acustica tramite trasduttore a ultrasuoni, fino alla ricostruzione dell'immagine.	17
Figura 2.2: Spettri di assorbimento di cromofori endogeni (a) ed esogeni (b). Per i cromofori endogeni (a) l'assorbimento è espresso come coefficiente di assorbimento, mentre per i mezzi esogeni (b) è espresso come assorbanza, definita dalla legge di Beer-Lambert come $A = \epsilon(\lambda)Cd$, dove $\epsilon(\lambda)$ è l'assorbività molare, C la concentrazione e d lo spessore attraversato dalla luce. Il coefficiente di assorbimento può essere ricavato dall'assorbanza secondo la relazione $\alpha = (A/d)\log_{10}e$	20
Figura 3.1: Architettura hardware/software del sistema Verasonics Vantage per l'acquisizione e la ricostruzione delle immagini [26]	26
Figura 3.2: Sonda lineare L11-5v utilizzata per l'acquisizione dei dati US/PA	27
Figura 3.3: Setup sperimentale utilizzato per le acquisizioni fotoacustiche. (a) Dettaglio della sonda lineare con supporto dedicato e terminazioni delle fibre ottiche posizionate ai lati del trasduttore, per garantire un'illuminazione bilaterale del campione. (b) Sistema laser OPOTEK Phocus Mobile SE utilizzato come sorgente di illuminazione per le acquisizioni fotoacustiche	28
Figura 3.4: Setup di acquisizione in vivo nelle due modalità di accoppiamento acustico considerate: (a) acquisizione del polso con gel pad; (b) acquisizione dell'avambraccio in acqua, tramite immersione all'interno di una vaschetta.	29
Figura 3.5: Pipeline di elaborazione dei dati fotoacustici utilizzata per l'analisi quantitativa della sO_2	42
Figura 4.1: Segmentazione tridimensionale del vaso del fantoccio ottenuta in 3D Slicer	45
Figura 4.2: Esempio di analisi sul fantoccio relativa al 40° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittiche gialle selezionate per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.	46
Figura 4.3: Confronto tra mappe di sO_2 del fantoccio relative al 40° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 30% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile	46
Figura 4.4: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare del fantoccio a 40 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.	47
Figura 4.5: Segmentazione tridimensionale dell'avambraccio in acqua: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).	50
Figura 4.6: Esempio di analisi sull'avambraccio in acqua relativa al 5° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background.	

(b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.....	51
Figura 4.7: Confronto tra mappe di sO_2 dell'avambraccio in acqua relative al 5° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 30% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 30° percentile.....	51
Figura 4.8: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare dell'avambraccio acquisito in acqua a 40 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.....	52
Figura 4.9: Segmentazione tridimensionale dell'avambraccio acquisito con gel pad: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).	55
Figura 4.10: Esempio di analisi sull'avambraccio acquisito con gel pad relativa al 20° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.....	56
Figura 4.11: Confronto tra mappe di sO_2 dell'avambraccio acquisito con gel pad relative al 20° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 30% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile.....	56
Figura 4.12: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare dell'avambraccio acquisito con gel pad a 60 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.	57
Figura 4.13: Segmentazione tridimensionale del polso in acqua: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).	60
Figura 4.14: Esempio di analisi sul polso in acqua relativa al 15° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata nera e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera	61
Figura 4.15: Confronto tra mappe di sO_2 del polso in acqua relative al 15° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 20% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile.	61
Figura 4.16: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare del polso acquisito in acqua a 40 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.....	62

Figura 4.17: Segmentazione tridimensionale del polso acquisito con gel pad: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).	65
Figura 4.18: Esempio di analisi sul polso acquisito con gel pad relativa al 18° frame del volume acquisito a 20 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata nera e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.....	66
Figura 4.19: Confronto tra mappe di sO_2 del polso acquisito con gel pad relative al 18° frame del volume acquisito a 20 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 20% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile.....	66
Figura 4.20: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare del polso acquisito con gel pad a 20 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO_2 all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.	67

Elenco delle tabelle

Tabella 3.1: Specifiche tecniche della sonda lineare L11-5v	27
Tabella 3.2: Riepilogo dei principali parametri di acquisizione dei dataset fotoacustici multispettrali a diversa densità di campionamento spaziale. Si noti che il numero totale di acquisizioni PA per dataset è stato calcolato come $N_f \cdot N_\lambda \cdot N_a$, dove N_f indica il numero di frame per dataset scelto, N_λ indica il numero delle lunghezze d'onda utilizzate (3) e N_a indica il numero di acquisizioni per lunghezza d'onda (5).....	31
Tabella 4.1: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	48
Tabella 4.2: Valore medio di sO_2 e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.	49
Tabella 4.3: Variabilità intra-frame della sO_2 nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO_2 ottenute nei singoli frame.	49
Tabella 4.4: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO_2 nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.	49
Tabella 4.5: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	53
Tabella 4.6: Valore medio di sO_2 e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati per le tre densità di campionamento e confrontati tra la versione standard e la versione con correzione energetica. Il valore medio di sO_2 è ottenuto come media delle medie calcolate nei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame è espressa come deviazione standard delle medie calcolate nei singoli frame.	54
Tabella 4.7: Variabilità intra-frame della sO_2 nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO_2 ottenute nei singoli frame.	54
Tabella 4.8: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO_2 nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.	54
Tabella 4.9: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	58
Tabella 4.10: Valore medio di sO_2 e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media	

delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.	59
Tabella 4.11: Variabilità intra-frame della sO_2 nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO_2 ottenute nei singoli frame.	59
Tabella 4.12: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO_2 nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.	59
Tabella 4.13: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	63
Tabella 4.14: Valore medio di sO_2 e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.	64
Tabella 4.15: Variabilità intra-frame della sO_2 nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO_2 ottenute nei singoli frame.	64
Tabella 4.16: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO_2 nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.	64
Tabella 4.17: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	68
Tabella 4.18: Valore medio di sO_2 e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.	69
Tabella 4.19: Variabilità intra-frame della sO_2 nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO_2 ottenute nei singoli frame.	69
Tabella 4.20: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO_2 nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.	69
Tabella 4.21: Valori medi e deviazioni standard del CNR calcolato sull'immagine PA a 800 nm per i diversi volumi analizzati, alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	72
Tabella 4.22: Valori medi e deviazioni standard del gCNR calcolato sull'immagine PA a 800 nm per i diversi volumi analizzati, alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.	72

Tabella 4.23: Valori medi di sO_2 e deviazioni standard inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per tutti i volumi analizzati alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica. Il valore medio è stato calcolato come media delle medie di sO_2 ottenute nei singoli frame, mentre la deviazione standard inter-frame è stata calcolata sulle medie dei singoli frame.	73
Tabella 4.24: Differenza della sO_2 media tra elaborazione con correzione energetica e versione standard, calcolata come $EC - Standard$, per ciascun volume e per le tre densità di campionamento considerate.....	73
Tabella 4.25: Valori medi del 90° percentile della sO_2 e relative deviazioni standard inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO_2 per i diversi volumi analizzati alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica. Il 90° percentile è stato calcolato per ciascun frame sui valori validi di sO_2 , mentre i valori riportati rappresentano la media e la deviazione standard dei 90° percentili ottenuti nei singoli frame.	74
Tabella 4.26: Variazione del 90° percentile della sO_2 tra versione con correzione energetica e versione standard, calcolata come $EC - Standard$, nei diversi volumi e per le tre densità di campionamento.....	74
Tabella 4.27: Valori di variabilità intra-frame della sO_2 nella regione vascolare, calcolati per i diversi volumi analizzati alle tre densità di campionamento e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. La variabilità intra-frame è stata ottenuta come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO_2 calcolate nei singoli frame.	75

Abstract

L'imaging fotoacustico nasce dalla fusione tra ottica e ultrasonografia, unendo la sensibilità ottica all'assorbimento dei cromofori con la capacità dell'ultrasonografia di rilevare le onde acustiche. Grazie alla possibilità di distinguere specifici cromofori endogeni, come l'emoglobina ossigenata (HbO_2) e deossigenata (Hb), questa modalità di imaging consente di stimare la distribuzione della saturazione di ossigeno (sO_2). Il setup include una piattaforma Verasonics Vantage 256, un laser Oportek Phocus Mobile SE e una sonda lineare L11-5v. I volumi fotoacustici sono stati acquisiti traslando meccanicamente la sonda lungo una direzione, a diverse velocità di scansione. Su questa base, l'obiettivo della tesi è valutare l'effetto della densità di campionamento sulla quantificazione della sO_2 nei dati fotoacustici volumetrici acquisiti, considerando il ruolo della correzione energetica del segnale. Variando la velocità di scansione della sonda su una distanza fissa di 20 mm, sono state ottenute tre densità di campionamento (20, 40 e 60 frame), acquisite a tre lunghezze d'onda (750, 800 e 850 nm) ed elaborate sia in versione standard sia con correzione energetica. Le acquisizioni sono state condotte sia in vitro, su fantoccio, sia in vivo, su polso e avambraccio. Le acquisizioni in vivo sono state effettuate in due condizioni di accoppiamento acustico: immersione in acqua e utilizzo di gel pad. Le immagini fotoacustiche sono state ricostruite tramite Delay-and-Sum e utilizzate per ottenere le mappe di sO_2 tramite spectral unmixing basato su un modello lineare. L'analisi quantitativa è stata limitata ai pixel della regione vascolare segmentata che superavano le soglie sull'ampiezza fotoacustica e sul THb. Le metriche utilizzate sono state la media delle medie e dei 90° percentili calcolati frame per frame, la variabilità intra-frame, intesa come media delle deviazioni standard nei singoli frame, e la variabilità inter-frame, intesa come deviazione standard delle medie tra i frame del volume. I risultati mostrano che la correzione energetica determina valori di sO_2 più elevati rispetto alla versione standard, sia per la media sia per il 90° percentile, con differenze comprese tra +3,4% e +7,2% per la sO_2 media e tra +0,9% e +6,6% per il 90° percentile. Considerando i valori ottenuti con correzione energetica, la variabilità intra- e inter-frame evidenzia un andamento legato alla densità di campionamento. Il passaggio da 20 a 40 frame migliora la stabilità della misura, soprattutto nel polso: in acqua la variabilità inter-frame si riduce da 9,03% a 6,69%, mentre con gel pad passa da 12,17% a 8,91%. Rispetto ai 40 frame, la configurazione a 60 frame risulta più favorevole, soprattutto per la variabilità intra-frame, che diminuisce in tutti i volumi analizzati, come nell'avambraccio in acqua, dove passa da 33,90% con 20 frame a 22,65% con 40 frame fino a 21,19% con 60 frame. La variabilità inter-frame migliora nella maggior parte dei casi passando da 40 a 60 frame, tranne nell'avambraccio con gel pad, in cui i 40 frame mostrano valori più stabili. Nel complesso, i 40 frame rappresentano un buon compromesso operativo, con risultati comparabili ai 60 frame, che offrono comunque la maggiore stabilità complessiva. In sintesi, lo studio mostra come la densità di campionamento e la correzione energetica influenzino la quantificazione della sO_2 , contribuendo all'ottimizzazione delle procedure di elaborazione dei dati fotoacustici.

Capitolo 1

Introduzione

La valutazione dello stato di ossigenazione dei tessuti rappresenta un aspetto di grande rilevanza nello studio dei processi fisiologici e patologici, in quanto fornisce informazioni fondamentali sul metabolismo cellulare e sulla funzionalità vascolare. La saturazione dell'ossigeno nel sangue (sO_2) costituisce uno dei parametri funzionali principali per la valutazione del metabolismo dell'ossigeno nei tessuti. In questo contesto, l'imaging fotoacustico consente di misurare, sfruttando contrasti endogeni, diversi parametri necessari per la stima del metabolismo dell'ossigeno, tra cui il diametro vascolare, la concentrazione totale di emoglobina, la sO_2 , il volume tissutale di interesse e la velocità del flusso sanguigno [1].

Utilizzando acquisizioni multispettrali a diverse lunghezze d'onda, è possibile stimare la concentrazione relativa dell'ossiemoglobina (HbO_2) e della deossiemoglobina (Hb) e calcolare le mappe di saturazione dell'ossigeno (mappe sO_2) [2]. La mappa di saturazione non rappresenta una misura diretta, ma il risultato di un processo che include la registrazione dei segnali grezzi, la ricostruzione delle immagini fotoacustiche e il successivo processo di spectral unmixing. Di conseguenza, la qualità e l'affidabilità della stima della sO_2 possono essere influenzate da diversi fattori, tra cui il rumore del segnale, la stabilità dell'acquisizione, la segmentazione della regione vascolare e la densità di campionamento spaziale.

Un aspetto rilevante riguarda il ruolo dell'energia luminosa nella formazione del segnale fotoacustico: il segnale fotoacustico non dipende esclusivamente dal coefficiente di assorbimento dei cromofori, ma anche dalla quantità di energia elettromagnetica che raggiunge il tessuto. In acquisizioni multispettrali, eventuali variazioni dell'energia degli impulsi laser possono influenzare l'intensità del segnale fotoacustico e, di conseguenza, la stima della mappa di saturazione della sO_2 . Per ridurre l'effetto delle fluttuazioni energetiche pulse-to-pulse, viene applicata una correzione energetica, basata sulla normalizzazione del segnale grezzo rispetto all'energia misurata per ciascun impulso laser.

In questa tesi, lo scopo è quello di valutare l'effetto della densità di campionamento e della correzione energetica sulla quantificazione della sO_2 in dati fotoacustici volumetrici multispettrali. Nel processo sono state confrontate mappe ottenute con elaborazione standard e mappe ottenute dopo correzione energetica, al fine di verificare come la correzione energetica modifichi la distribuzione e la variabilità dei valori di sO_2 all'interno della regione vascolare indagata. L'analisi è stata condotta su tre diverse condizioni sperimentali, corrispondenti a dataset di 20, 40 e 60 frame, ottenuti variando la velocità di scansione del sistema all'interno dello stesso campo di vista. A parità di volume acquisito, una scansione più rapida produce un numero minore di frame, mentre una scansione più lenta consente di acquisire un numero

maggiore di frame e quindi una maggiore densità di campionamento spaziale. L'obiettivo finale è valutare l'effetto della densità di campionamento sulla stabilità della misura di sO_2 , considerando il ruolo della correzione energetica rispetto all'elaborazione standard. In questo modo, il lavoro mira a comprendere l'impatto dei parametri di acquisizione e della normalizzazione dell'energia dell'impulso sulla stima dell'ossigenazione nei dati fotoacustici multispettrali volumetrici, individuando una configurazione che rappresenti un compromesso tra qualità della misura, stabilità quantitativa e carico di acquisizione ed elaborazione.

Il resto della tesi è organizzato come segue: il Capitolo 2 introduce i principi teorici dell'imaging fotoacustico e della stima della sO_2 . Il Capitolo 3 descrive il setup sperimentale, le procedure di acquisizione e la pipeline di elaborazione dei dati, dalla ricostruzione delle immagini fotoacustiche fino alla generazione delle mappe di sO_2 . Il Capitolo 4 presenta i risultati ottenuti dal confronto tra le condizioni a 20, 40 e 60 frame. Il Capitolo 5 discute i risultati ottenuti, evidenziando il ruolo della densità di campionamento, della correzione energetica e della modalità di accoppiamento acustico. Il Capitolo 6 descrive le principali limitazioni dello studio e i possibili sviluppi futuri. Il Capitolo 7 riporta le conclusioni del lavoro.

Capitolo 2

Background teorico

2.1 Ultrasound imaging (US)

L'ecografia (US) è una tecnica che utilizza ultrasuoni per acquisire immagini in tempo reale di diversi tessuti all'interno del corpo. Essa si basa sul principio dell'eco delle onde ultrasonore. I parametri più importanti che descrivono le onde ultrasonore sono la lunghezza d'onda, la frequenza, la velocità di propagazione e l'intensità [3]. Le prime tre caratteristiche sono collegate dalla formula:

$$v = f\lambda$$

dove:

- v = velocità degli ultrasuoni, circa 1540 m/s nei tessuti molli;
- f = frequenza, misurata in Hz;
- λ = lunghezza d'onda, espressa in metri o millimetri.

La frequenza è un parametro fondamentale, poiché frequenze più elevate determinano una migliore risoluzione dell'immagine, ma anche una minore penetrazione in profondità [4]. Per questo, in ambito clinico, la scelta della frequenza indica un aspetto cruciale. Nella diagnostica ecografica si impiegano impulsi brevi di ultrasuoni con frequenze comprese tra 3 e 10 MHz [3].

Il suono si trasmette attraverso un mezzo sotto forma di onda meccanica e può propagarsi attraverso materiali diversi, come i tessuti e i liquidi presenti nel corpo, tramite l'interazione tra le particelle indotta dalle vibrazioni. Durante la propagazione delle onde sonore nei tessuti, l'energia sonora vibrazionale diminuisce. Questo fenomeno, noto come attenuazione, è influenzato dall'impedenza acustica del mezzo attraverso cui si propagano le onde sonore, proprietà caratteristica di ogni tessuto che determina l'opposizione alla propagazione delle onde US [4].

I fattori che determinano l'attenuazione sono:

- rifrazione, quando l'onda viene deviata dalla direzione originale in presenza di un cambiamento di composizione tissutale tra interfacce;
- scattering, quando l'onda rimbalza in direzioni diverse dopo aver colpito una particella;
- assorbimento, quando l'onda urta le particelle e le fa vibrare, generando energia termica e attenuando la potenza dell'ultrasuono;
- riflessione, quando l'onda, incontrando un ostacolo, cambia direzione di propagazione, ritornando verso il mezzo da cui proveniva.

La riflessione, o eco, rappresenta il principio fisico principale dell'ecografia [4]. Quando l'onda ultrasonora raggiunge il bersaglio (ad esempio i tessuti), una parte viene riflessa verso la sonda che l'ha generata, mentre il resto dell'energia viene persa per assorbimento, scattering e rifrazione. I componenti principali di un dispositivo ecografico includono il trasduttore, il generatore di impulsi, gli amplificatori di compensazione, l'unità di controllo per la focalizzazione, i processori digitali e il sistema di visualizzazione [3]. Il generatore produce un impulso di tensione che viene applicato alla sonda: essa contiene cristalli piezoelettrici che convertono l'energia elettrica del generatore in onde ultrasonore e, al ritorno dell'eco, le onde ultrasonore riflesse in energia elettrica attraverso l'effetto piezoelettrico. La sonda riceve l'onda ultrasonora riflessa, la converte in segnale elettrico e il computer centrale lo elabora e lo trasforma in un'immagine visualizzata sul monitor [4].

2.2 Photoacoustic imaging (PAI)

Nel 1880 Alexander Graham Bell osservò come onde sonore fossero emesse da parte di materiali irradiati da luce modulata, fenomeno oggi noto come effetto fotoacustico [5]. L'applicazione di tale effetto per scopi biomedicali e diagnostici si è sviluppata negli ultimi decenni, dando vita a una nuova modalità di imaging: la photoacoustic imaging (PAI).

Nell'imaging fotoacustico (PAI), il processo si compone di diverse fasi.

Inizialmente, l'energia luminosa, prodotta da una sorgente ottica, viene assorbita dalle molecole portandole in uno stato energetico eccitato. Questo stato è instabile e, per tornare allo stato d'equilibrio precedente, l'energia in eccesso viene convertita e rilasciata sotto forma di calore.

Il calore generato dall'assorbimento induce una veloce espansione termoelastica, che produce una rapida variazione di pressione. Questa pressione non può restare localizzata nel tessuto, ma si rilassa propagandosi sotto forma di onde acustiche, tipicamente a banda larga (decine di Megahertz) e di bassa ampiezza (inferiore a 10 kPa) [6].

La PAI sfrutta il principio di rilevazione acustica alla base dell'ecografia. Le onde emesse vengono registrate da trasduttori a ultrasuoni (US) e utilizzate per la ricostruzione dell'immagine.

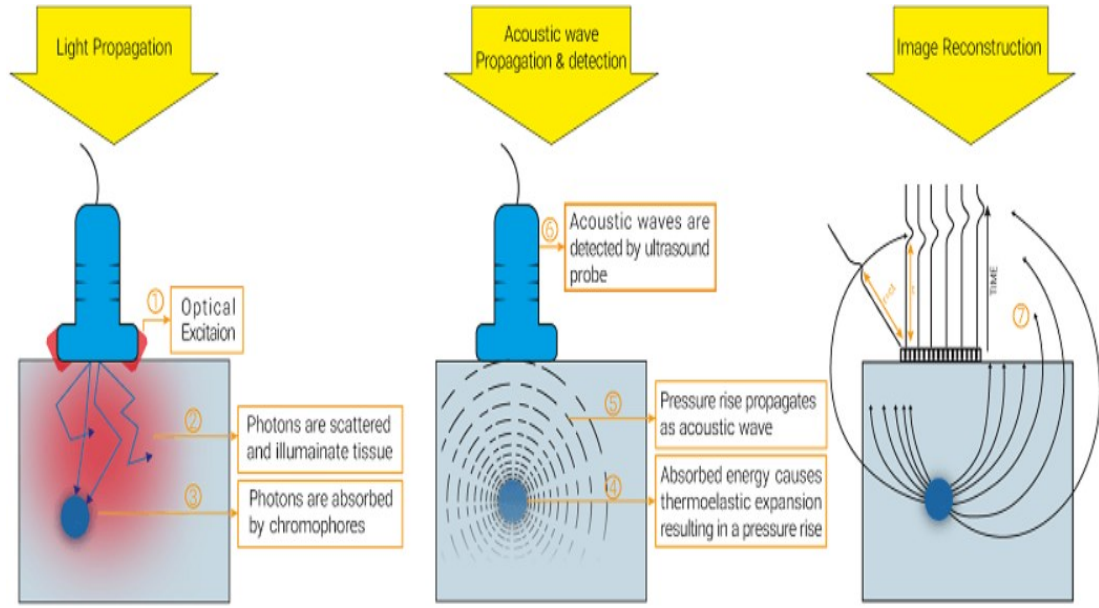


Figura 2.1: Rappresentazione schematica del processo fotoacustico, dalla generazione del segnale fotoacustico alla rilevazione acustica tramite trasduttore a ultrasuoni, fino alla ricostruzione dell'immagine.

2.2.1 Principi fisici dell'imaging fotoacustico

La pressione fotoacustica originata dall'assorbimento di energia luminosa può essere espressa, in un dato punto, come:

$$p_0(r) = \Gamma H(r) \quad (2.1)$$

dove Γ è il coefficiente di Grüneisen, una costante termodinamica adimensionale che fornisce una misura dell'efficienza di conversione dell'energia termica in pressione [6].

La costante Γ è definita dalla relazione:

$$\Gamma = \frac{\beta c^2}{C_p} \quad (2.2)$$

dove β indica il coefficiente di espansione termica volumetrica, c la velocità del suono e C_p la capacità termica specifica a pressione costante [6].

Il termine $H(r)$ è la distribuzione di energia ottica assorbita. Essa è data dal prodotto tra il coefficiente di assorbimento locale $\mu_a(r)$ e la fluence ottica locale $\Phi(r; \mu_a, \mu_s, g)$, dove μ_a e μ_s sono rispettivamente il coefficiente di assorbimento e il coefficiente di scattering nel volume di tessuto illuminato, mentre g rappresenta il fattore di anisotropia dello scattering [6]. La pressione fotoacustica può quindi essere formulata come:

$$p_0(r) = \Gamma \mu_a(r) \Phi(r; \mu_a, \mu_s, g) \quad (2.3)$$

Nel caso di acquisizioni multispettrali, la dipendenza dalla lunghezza d'onda può essere esplicitata come [7]:

$$p_0(r, \lambda) = \Gamma \mu_a(r, \lambda) \Phi(r, \lambda) \quad (2.4)$$

2.2.2 Fluence ottica e attenuazione del tessuto

Ipotizzando che il sangue sia un mezzo uniformemente e diffusivamente scatterante e che il modello di illuminazione sia approssimabile a un'onda piana, la fluence ottica all'interno di un vaso sanguigno può essere approssimata mediante un modello di decadimento esponenziale [8]:

$$\Phi(r, \lambda) = \Phi_0 \cdot k(\lambda) \cdot \exp[-\mu_{eff}(r, \lambda) \cdot z] \quad (2.5)$$

dove Φ_0 rappresenta la fluence alla superficie dell'oggetto, mentre μ_{eff} è il coefficiente di attenuazione efficace utilizzato nella teoria diffusiva del trasporto della luce e correlato al coefficiente di assorbimento μ_a e al coefficiente di scattering ridotto μ_s' [cm⁻¹] secondo la relazione [8]:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3 \cdot \mu_a \cdot (\mu_a + \mu_s')} \quad (2.6)$$

2.2.3 Energy correction

Prendendo in considerazione la fluence alla superficie dell'oggetto, Φ_0 , essa può essere approssimata, assumendo un'illuminazione uniforme e un'area illuminata costante, come il rapporto tra l'energia dello specifico impulso laser utilizzato e l'area della regione illuminata.

La fluence locale si può formulare come:

$$\Phi_0 = \frac{E_i}{\pi \cdot w^2} \quad (2.7)$$

dove E_i rappresenta l'energia dello specifico impulso laser e $\pi \cdot w^2$ l'area illuminata dal fascio laser [9].

Sotto l'ipotesi che l'area illuminata dal laser rimanga costante tra impulsi successivi, dividendo il segnale fotoacustico grezzo per l'energia misurata del singolo impulso, è possibile ottenere un dato normalizzato rispetto alle fluttuazioni energetiche per impulso del laser. Questa correzione energetica non elimina completamente la dipendenza dalla fluence, influenzata dalla propagazione della luce nel tessuto, dalla

profondità e dalle proprietà ottiche del mezzo, ma consente di ridurre l'effetto delle variazioni energetiche tra impulsi successivi.

2.3 Spectral unmixing

Una delle caratteristiche chiave dell'imaging fotoacustico è la sua capacità di illuminare i tessuti a diverse lunghezze d'onda, permettendo di acquisire immagini con una dimensione spettrale. Mentre le immagini fotoacustiche ottenute a una singola lunghezza d'onda mostrano principalmente dettagli morfologici, simili a quelle dell'imaging ecografico o radiografico, l'imaging spettrale offre la possibilità di rilevare cromofori intrinseci e agenti esterni, fornendo così informazioni preziose su funzioni fisiologiche, cellulari e subcellulari [10].

I vari cromofori presenti nei tessuti reagiscono in modo diverso alle diverse lunghezze d'onda. Pertanto, un'immagine fotoacustica acquisita a una sola lunghezza d'onda rivela l'assorbimento totale del tessuto a quella specifica lunghezza, ma non consente di distinguere il contributo dei singoli cromofori. Questo accade perché più cromofori possono assorbire la luce contemporaneamente, influenzando il segnale fotoacustico complessivo.

L'acquisizione di immagini a lunghezze d'onda diverse permette di osservare come il segnale fotoacustico cambi al variare della lunghezza d'onda, ottenendo un profilo spettrale del tessuto. Gli algoritmi di spectral unmixing utilizzano queste informazioni per separare i contributi dei vari cromofori al segnale totale [11] [12].

2.3.1 Cromofori e bande di assorbimento

Il segnale fotoacustico si forma quando specifiche molecole, chiamate cromofori o assorbitori ottici, assorbono l'energia luminosa. I cromofori, o assorbitori, possono essere endogeni, cioè naturalmente presenti all'interno del tessuto, oppure esogeni, ovvero introdotti tramite agenti di contrasto. Alcuni cromofori endogeni sono l'emoglobina, ossigenata o deossigenata, la mioglobina, ossigenata o deossigenata, la melanina, i lipidi, la bilirubina e l'acqua, mentre i coloranti sono esempi di cromofori esogeni [13].

Ogni cromoforo è caratterizzato da uno specifico spettro di assorbimento, che indica la quantità di energia elettromagnetica assorbita al variare della lunghezza d'onda. Poiché ogni assorbitore presenta uno specifico spettro di assorbimento, la scelta della lunghezza d'onda di eccitazione consente di discriminare specifici cromofori. Nell'imaging fotoacustico vengono comunemente utilizzate lunghezze d'onda nel visibile e nel vicino infrarosso, circa 550–900 nm, poiché questo intervallo consente una profondità di penetrazione nel tessuto di diversi centimetri [6].

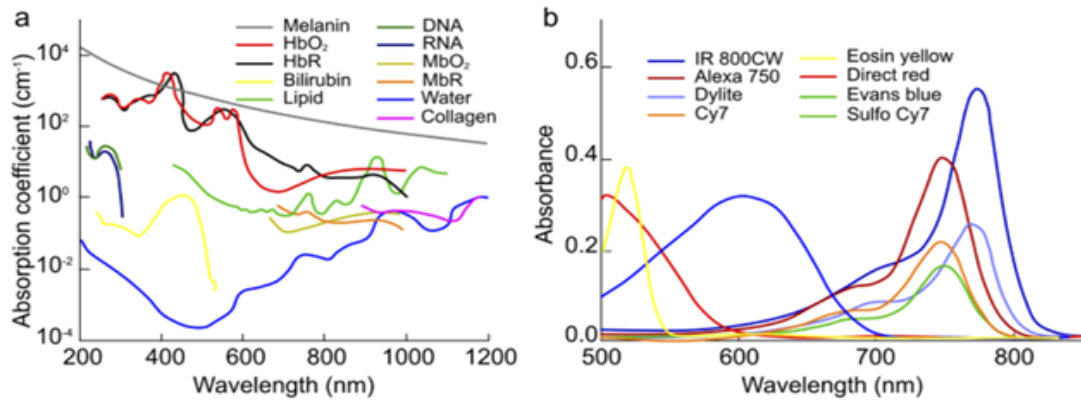


Figura 2.2: Spettri di assorbimento di cromofori endogeni (a) ed esogeni (b). Per i cromofori endogeni (a) l'assorbimento è espresso come coefficiente di assorbimento, mentre per i mezzi esogeni (b) è espresso come assorbanza, definita dalla legge di Beer-Lambert come $A = \epsilon(\lambda)Cd$, dove $\epsilon(\lambda)$ è l'assorbività molare, C la concentrazione e d lo spessore attraversato dalla luce. Il coefficiente di assorbimento può essere ricavato dall'assorbanza secondo la relazione $\alpha = (A/d)\log_{10}e$.

2.3.2 Principi dello spectral unmixing

Il segnale multispettrale può essere interpretato come il risultato della somma dei contributi dei vari cromofori presenti alle varie lunghezze d'onda. A ciascun cromoforo viene attribuito un peso, che indica quanto quel cromoforo contribuisce al segnale complessivo e quale sia la sua concentrazione media nel tessuto [14]. Gli algoritmi di spectral unmixing vengono usati per separare i contributi dei diversi cromofori al segnale complessivo: conoscendo i profili di assorbimento dei cromofori, è possibile stimare separatamente cromofori che presentano spettri di assorbimento diversi tra loro [12].

2.3.3 Stima della mappa di saturazione dell'ossigeno

Una delle principali applicazioni dello spectral unmixing è la stima della saturazione di ossigeno nel sangue (sO_2). I cromofori indagati sono due: l'emoglobina ossigenata (HbO_2) e l'emoglobina deossigenata (Hb).

La stima della sO_2 tramite spectral unmixing di immagini fotoacustiche richiede un numero di lunghezze d'onda almeno pari al numero di cromofori indagati, in questo caso almeno due. Usando più lunghezze d'onda, la stima diventa più robusta [15].

La stima della sO_2 deriva dalla misurazione dei contributi dei due cromofori HbO_2 e Hb . Essa può essere calcolata come:

$$sO_{2(x,y,z)} = \frac{[HbO_2](x,y,z)}{[HbO_2](x,y,z) + [Hb](x,y,z)} \quad (2.8)$$

dove $[HbO_2]$ e $[Hb]$ indicano rispettivamente le concentrazioni di emoglobina ossigenata e deossigenata nel punto (x,y,z) [16].

L'intensità del segnale fotoacustico è proporzionale al coefficiente di assorbimento ottico locale $\mu_a(\lambda)$ [16] [17].

Il coefficiente di assorbimento ottico $\mu_a(\lambda)$ può essere espresso dalla seguente formula:

$$\mu_a(\lambda_i) \approx \epsilon_{\{Hb\}(\lambda_i)} \cdot [Hb] + \epsilon_{\{HbO_2\}(\lambda_i)} \cdot [HbO_2] \quad (2.9)$$

dove $\epsilon_{\{Hb\}(\lambda_i)}$ e $\epsilon_{\{HbO_2\}(\lambda_i)}$ indicano rispettivamente i coefficienti di estinzione molari dell'emoglobina ossigenata e deossigenata alla determinata lunghezza d'onda [16].

Acquisendo il segnale fotoacustico a un numero di lunghezze d'onda pari o superiore a due e conoscendo i coefficienti di estinzione, si ottiene un sistema di equazioni in cui le incognite sono i contributi dei cromofori indagati HbO_2 e Hb . Una volta ottenuti, è possibile stimare la saturazione dell'ossigeno.

2.4 Algoritmi di ricostruzione dell'imaging fotoacustico

Gli algoritmi di ricostruzione (beamforming) delle immagini fotoacustiche si dividono in due grandi categorie: algoritmi nel dominio del tempo (TD) e algoritmi nel dominio della frequenza (FD).

Negli algoritmi TD, la ricostruzione si basa sul calcolo del tempo di volo dell'onda acustica ricevuta dal trasduttore. Negli algoritmi FD, i dati grezzi vengono convertiti nel dominio della frequenza per poi essere riconvertiti attraverso la trasformata di Fourier inversa per ricostruire l'immagine fotoacustica [18].

Nel presente lavoro sono stati considerati algoritmi TD: la ricostruzione delle immagini è stata effettuata tramite Delay and Sum (DAS) e, in alcune prove preliminari iniziali, tramite Delay Multiply and Sum (DMAS), come alternativa al DAS. Di seguito vengono descritti questi due algoritmi.

2.4.1 Delay and sum (DAS)

Nel Delay and sum (DAS) viene calcolato il tempo di volo dell'onda acustica generata da ogni singolo punto dell'immagine verso tutti gli elementi del trasduttore. Poiché il segnale proveniente dallo stesso punto raggiunge ogni elemento in un istante temporale diverso, in base alla distanza tra il punto origine e l'elemento considerato, il DAS calcola i relativi ritardi temporali e registra il segnale di ogni elemento del trasduttore a uno specifico campione temporale, basato sul ritardo calcolato. Questo procedimento serve per allineare i segnali provenienti da uno stesso punto. Infine essi vengono sommati per ottenere l'intensità del punto di origine dell'onda acustica. Il processo viene ripetuto per ogni punto dell'immagine e infine si ottiene l'immagine fotoacustica [18] [19].

La formulazione generale del DAS è espressa come:

$$y_{\text{DAS}}(n) = \sum_{n=1}^N s_n(k - \Delta_n) \quad (2.10)$$

dove s_n è il segnale ricevuto dall' n -esimo elemento del trasduttore, Δ_n è il ritardo temporale applicato e N è il numero totale di elementi del trasduttore. Il DAS ha numerosi vantaggi: è un metodo lineare, è robusto, veloce e compatibile con applicazioni in tempo reale, la sua implementazione è semplice e, essendo indipendente dai dati, preserva la coerenza temporale [19]. I limiti dell'algoritmo riguardano la presenza di lobi laterali elevati (high sidelobe), che possono degradare la qualità dell'immagine, e una maggiore sensibilità al rumore rispetto ad altri beamforming più avanzati [18] [20].

2.4.2 Delay and Multiply Sum (DMAS)

Come il DAS, anche il DMAS calcola il ritardo e registra il segnale dell'elemento allo specifico campione temporale. A differenza del DAS, prima della somma, i campioni vengono organizzati in coppie e moltiplicati tra loro [18] [21].

La formulazione generale del DMAS è espressa come:

$$y_{\text{DMAS}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \text{sign}(s_i(t)s_j(t)) \sqrt{s_i(t)s_j(t)} \quad (2.11)$$

dove $s_i(t)$ e $s_j(t)$ rappresentano i segnali ricevuti rispettivamente dall' i -esimo e dal j -esimo elemento del trasduttore, mentre N indica il numero totale di elementi del trasduttore.

Il DMAS è un algoritmo non lineare che permette di migliorare la risoluzione e

presenta lobi laterali più bassi, ma ha un costo computazionale più alto rispetto al DAS, e questo si traduce in tempi di processing più lunghi [18].

2.5 Vantaggi e svantaggi dell'imaging fotoacustico

L'imaging fotoacustico offre diversi vantaggi rispetto ad alcune tecniche di imaging convenzionale. A differenza della tomografia computerizzata (TC) e della tomografia a emissione di positroni (PET), non utilizza radiazioni ionizzanti e può essere realizzato con sistemi relativamente più compatti ed economici rispetto ad altre tecniche di imaging biomedico, come la risonanza magnetica [22].

L'imaging fotoacustico può fornire informazioni utili sul network vascolare, sulla saturazione dell'ossigeno (sO_2) e sulla concentrazione di specifici cromofori, senza l'utilizzo di agenti di contrasto [22]. Dal punto di vista della sicurezza, l'assorbimento dell'impulso luminoso da parte dei cromofori biologici produce un incremento di calore molto limitato, generalmente inferiore a 0,1 K, troppo basso per provocare danno fisico o modifiche fisiologiche del tessuto [6].

Nonostante i numerosi vantaggi dell'imaging fotoacustico in ambito biomedico, la sua applicazione clinica è ancora limitata da alcune criticità tecniche e metodologiche:

La profondità di penetrazione.

Essa è condizionata sia dall'attenuazione ottica sia da quella acustica del segnale. Nei tessuti molli l'attenuazione ottica rappresenta generalmente il fattore dominante ed è determinata dai fenomeni di assorbimento e scattering. A circa 700 nm, la profondità di penetrazione ottica a $1/e$, cioè la profondità alla quale l'irradianza si riduce a circa il 37% del valore iniziale, è di circa 8 mm e, oltre il primo millimetro di tessuto, la luce viene attenuata di circa un fattore 4 per ogni centimetro aggiuntivo [6]. Questo comporta, nell'imaging a profondità di diversi centimetri, un'attenuazione del segnale di diversi ordini di grandezza, ottenendo un peggioramento del SNR.

Attraverso un'adeguata scelta della lunghezza d'onda, l'ottimizzazione dell'illuminazione e del design del trasduttore, coadiuvate da approcci endoscopici, sono state dimostrate profondità di imaging di diversi centimetri, come ad esempio fino a circa 4 cm in vivo nella mammella umana e 5-6 cm in fantocci o tessuti ex vivo con l'uso di agenti di contrasto [6].

Distribuzione non uniforme della fluence ottica

Nel PACT con array lineare l'illuminazione del tessuto avviene da una posizione laterale alla sonda. Un sistema con una disomogeneità nella distribuzione della luce può far sì che alcune regioni ricevano più energia luminosa rispetto ad altre. Inoltre, a causa dei fenomeni di scattering e assorbimento, le strutture profonde risultano parzialmente attenuate, con conseguente qualità limitata dell'immagine. Per questo una possibile soluzione sarebbe l'utilizzo di un sistema di illuminazione multi-angolo che ha portato a un incremento del SNR del 71% e del contrasto del 50% negli esperimenti ex vivo [23].

2.6 Applicazioni dell'imaging fotoacustico

Questi vantaggi hanno favorito l'uso dell'imaging fotoacustico in varie applicazioni biomediche, tra cui l'imaging di tumori, malattie della pelle e malattie emorragiche e ischemiche [24].

2.6.1 Ambito oncologico

Tra le applicazioni maggiormente studiate della PAI rientra la valutazione dei tumori, con riferimento al tumore al seno e al melanoma, a causa della profondità di penetrazione limitata della PAI. L'aumento della vascolarizzazione tumorale produce un maggior assorbimento ottico emoglobिनico, rivelando nelle immagini fotoacustiche regioni a contrasto più elevato rispetto al tessuto circostante. Questo può essere usato sia per il rilevamento sia per la diagnosi tumorale. Inoltre, la capacità dell'imaging fotoacustico di mappare l'ossigenazione del sangue può fornire informazioni utili sulla risposta del tessuto alla terapia, dando supporto alla pianificazione e al monitoraggio del trattamento. Un'ulteriore applicazione riguarda il riconoscimento del linfonodo sentinella, importante indicatore della diffusione metastatica. Attraverso l'utilizzo di agenti assorbenti come il metilene blu, la PAI contribuisce alla sua visualizzazione, supportando e migliorando l'efficienza di procedure di biopsia guidata con ago [24] [6]. In dermatologia, l'analisi della vascolarizzazione dermica e sottodermica e del contenuto di melanina, risulta di enorme supporto nella valutazione di patologie cutanee, come il melanoma, e nella pianificazione dell'escissione chirurgica [6].

2.6.2 Ambito cardiovascolare

La capacità di distinguere cromofori specifici è di rilevante importanza nel riconoscimento delle placche ateromatose ricche di lipidi, attraverso l'assorbimento ottico dei lipidi a 1210 nm, supportando l'individuazione di placche sensibili a rischio rottura. Rispetto alla sola ecografia intravascolare (IVUS), la capacità spettroscopica della PAI potrebbe fornire informazioni più specifiche e quantitative sulla composizione della placca aterosclerotica, inclusi lipidi, calcio, macrofagi e materiale fibroso, componenti della placca con spettri di assorbimento distintivi [6]. L'uso combinato di imaging US-PA è studiato per la rilevazione della trombosi venosa profonda (DVT). Essa è una delle cause principali di embolia polmonare (EP), potenzialmente fatale, e il suo trattamento varia in base all'età del trombo. Il segnale fotoacustico può fornire informazioni cliniche sulla sua struttura ed età, permettendo una valutazione efficace che consente di scegliere il trattamento della DVT più adeguato [25].

Capitolo 3

Materiali e metodi

In questo capitolo viene descritto il processo sperimentale utilizzato nell'ambito di questa tesi. Inizialmente, vengono descritti il setup sperimentale e il sistema di acquisizione impiegato. Successivamente, vengono presentate le diverse fasi del processo, a partire dalla raccolta dei dati fino alle principali fasi di elaborazione: la ricostruzione delle immagini fotoacustiche, l'identificazione della regione vascolare sul volume fotoacustico mediante 3D Slicer, e lo spectral unmixing, utilizzato per la stima della mappa di ossigenazione e dei relativi parametri emoglobinici.

3.1 Setup sperimentale

3.1.1 Sistema di acquisizione Verasonics Vantage 256

In questa tesi viene utilizzata la piattaforma di ricerca Verasonics Vantage 256. La piattaforma Verasonics è costituita da un hardware di acquisizione collegato a un computer host, sul quale vengono eseguiti script di controllo in ambiente Matlab. L'hardware integra moduli dedicati alla generazione di forme d'onda di trasmissione multicanale, all'amplificazione e al filtraggio dei segnali ricevuti, alla conversione analogico-digitale, all'elaborazione digitale e al sequenziamento delle acquisizioni [26]. Il processo di acquisizione viene definito negli script di controllo Matlab, nei quali sono impostati i principali parametri del sistema, tra cui le caratteristiche del trasduttore, il numero di canali di trasmissione e ricezione, il numero di acquisizioni e di frame e le modalità di trasferimento e salvataggio dei dati. Gli script Matlab vengono caricati tramite l'interfaccia VSX di Verasonics, che consente di avviare la sequenza e visualizzare le immagini ricostruite.

Durante l'esecuzione della sequenza, il controllo operativo viene affidato alla funzione runAcq, che gestisce l'interazione con l'hardware e le funzioni di processing e display. I dati grezzi acquisiti vengono trasferiti nel RcvBuffer e utilizzati per la ricostruzione delle immagini, che possono essere visualizzate tramite l'interfaccia del sistema e salvate per l'elaborazione offline.

Nel caso dell'imaging fotoacustico, l'acquisizione richiede la sincronizzazione tra il sistema Verasonics e il laser. Questa sincronizzazione viene gestita attraverso segnali di trigger.

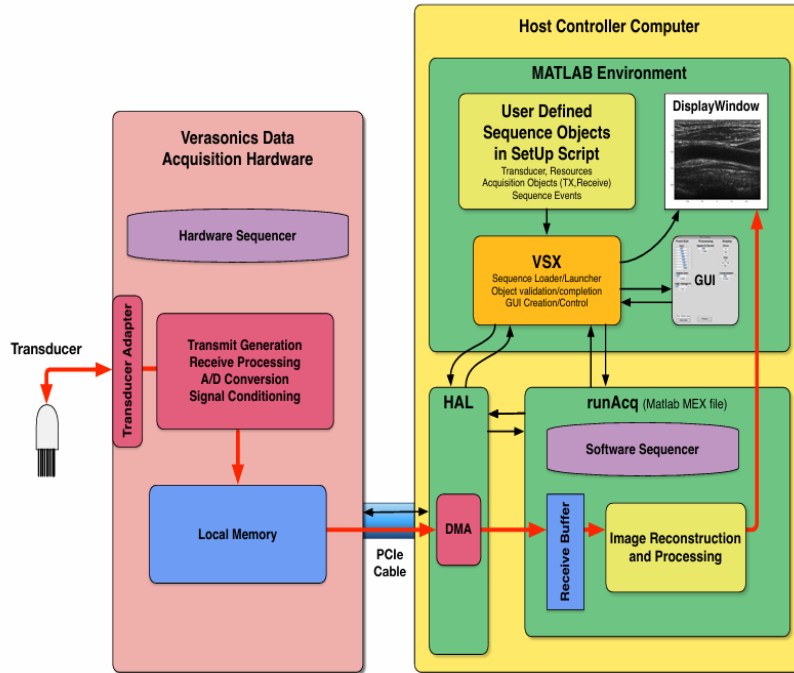


Figura 3.1: Architettura hardware/software del sistema Verasonics Vantage per l'acquisizione e la ricostruzione delle immagini [26]

3.1.2 Sonda lineare

In questo setup è stato utilizzato un trasduttore lineare L11-5v. Esso consiste in un array lineare composto da 128 elementi, con un range di frequenze comprese tra 5 e 11 MHz, una frequenza centrale di 7.6 MHz e una larghezza di banda del 77%. Per una descrizione più accurata del trasduttore lineare, la **Figura 3.2** mostra la sonda lineare mentre le principali specifiche tecniche del trasduttore sono invece riassunte nella **Tabella 3.1**.



Figura 3.2: Sonda lineare L11-5v utilizzata per l'acquisizione dei dati US/PA

Specifiche trasduttore lineare L11-5v	
Numero di elementi	128
Pitch (mm)	0.3
Elevation focus (mm)	18
Sensibilità (dB)	-52 ± 3

Tabella 3.1: Specifiche tecniche della sonda lineare L11-5v.

Le sonde ecografiche lineari sono spesso utilizzate nella tomografia fotoacustica (PAT) grazie alla loro ampia disponibilità, al basso costo e alla versatilità rispetto a geometrie di sensori più complesse. Nonostante questi vantaggi, presentano diverse limitazioni: il loro spettro angolare limitato riduce la qualità delle immagini ricostruite, creando regioni di ricostruzione instabili e determinando risoluzioni diverse nelle direzioni laterale e assiale [27].

Per ottenere la densità di campionamento di interesse, la sonda è stata equipaggiata con un sistema di movimento motorizzato, capace di traslarla in una direzione specifica dopo il suo posizionamento sul tessuto o fantoccio preso in esame. Il motorino è gestito dal software Thorlabs, capace di impostare i principali parametri di scansione, tra cui il campo di misura, la velocità di traslazione e il movimento di andata e ritorno della sonda lungo la direzione selezionata.

3.1.3 Sistema laser

Il sistema di illuminazione utilizzato per ottenere acquisizioni fotoacustiche è il sistema laser tunabile OPOTEK Phocus Mobile SE, basato su tecnologia OPO (Optical Parametric Oscillator). Questo sistema consente di utilizzare diverse lunghezze d'onda di illuminazione, utilizzando la modalità Scan with Fast Tuning, che consente di programmare una sequenza di lunghezze d'onda da acquisire in modo consecutivo. Per ciascuna lunghezza d'onda è stato definito il numero di impulsi/acquisizioni da eseguire insieme al numero di cicli della sequenza. L'impulso laser viene convogliato verso la sonda lineare tramite un fascio di fibre ottiche interbloccato che si ramifica in due uscite per distribuire l'illuminazione su entrambe le estremità della sonda lineare.

L'energia degli impulsi è stata calcolata tramite un misuratore di energia Ophir, gestito dal software StarLab. Il misuratore di energia consente di ottenere l'energia di ogni singolo impulso in mJ, mentre il software StarLab rende disponibili i valori di energia di ciascun impulso, abbinati al momento in cui ogni impulso viene registrato, e alcuni parametri statistici della misura, come il valore massimo, il valore minimo e il valore medio dell'energia degli impulsi acquisiti.

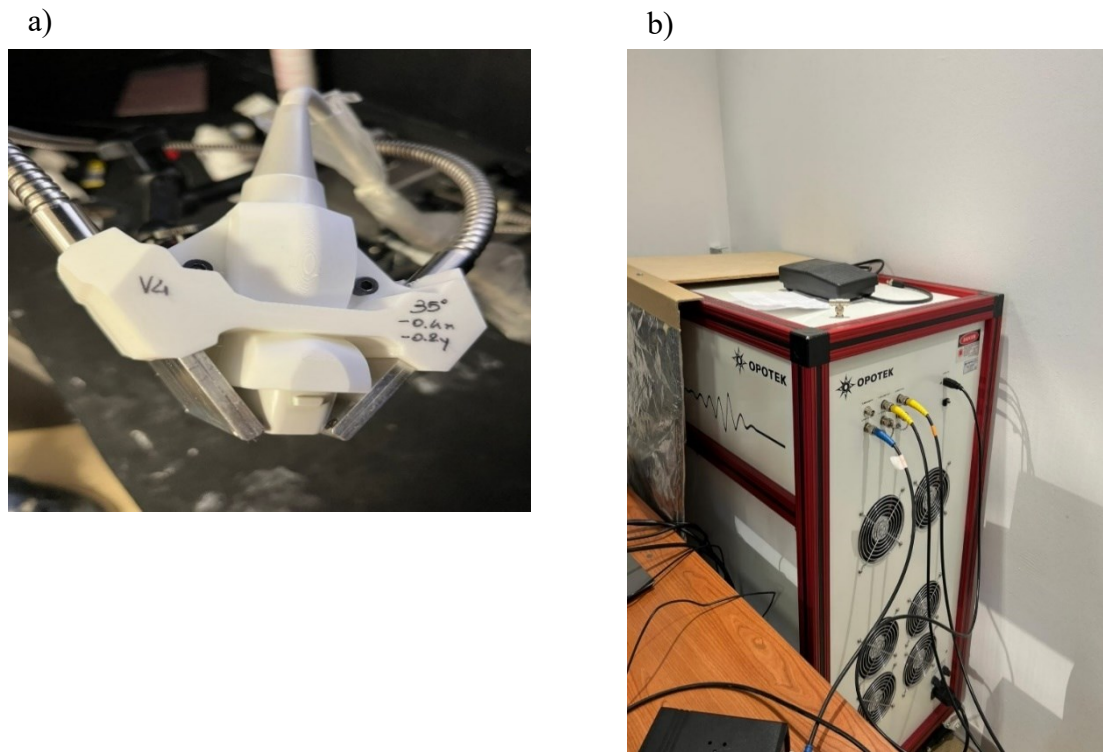


Figura 3.3: Setup sperimentale utilizzato per le acquisizioni fotoacustiche. (a) Dettaglio della sonda lineare con supporto dedicato e terminazioni delle fibre ottiche posizionate ai lati del trasduttore, per garantire un'illuminazione bilaterale del campione. (b) Sistema laser OPOTEK Phocus Mobile SE utilizzato come sorgente di illuminazione per le acquisizioni fotoacustiche

3.2 Protocollo di acquisizione dati

L'acquisizione dei dati è stata condotta su due distretti corporei di un soggetto sano, ovvero avambraccio e polso, e su un fantoccio sperimentale. Il fantoccio è costituito da un vaso artificiale con biforcazione, contenuto all'interno di un supporto polietilenico, e riempito con un liquido simil-inchiostro.

I due distretti corporei sono stati indagati in due diverse condizioni sperimentali: una condizione in acqua, immergendo il distretto e la sonda in una bacinella, e una condizione fuori acqua, considerata come condizione ambientale/convenzionale.

Il fantoccio è stato acquisito solo in configurazione ambientale.

La sonda lineare L11-5v è stata posizionata perpendicolarmente alla cute o alla superficie del fantoccio, scegliendo una posizione ottimale che permettesse di visualizzare adeguatamente la struttura vascolare di interesse.

Nelle acquisizioni fuori acqua è stato utilizzato un gel pad interposto tra la sonda e la cute, o tra la sonda e il fantoccio. È stato steso del gel ecografico sia all'interfaccia sonda-pad sia all'interfaccia pad-cute/pad-fantoccio, con l'obiettivo di migliorare l'accoppiamento acustico e ridurre la presenza di bolle d'aria o discontinuità di impedenza acustica. L'utilizzo del gel pad ha permesso di rendere più regolare la superficie di contatto durante la scansione, creando un'interfaccia più uniforme e quindi facilitando la traslazione della sonda durante la scansione motorizzata. Un altro vantaggio è la riduzione della pressione esercitata dalla sonda sulla cute, limitando il rischio di deformare eccessivamente il tessuto o il network vascolare durante l'acquisizione. Nella configurazione in acqua, l'acqua riduce le discontinuità di impedenza dovute alla presenza di aria tra sonda e cute, favorendo l'accoppiamento acustico e di conseguenza la qualità del segnale.

Per questioni di sicurezza, ogni persona presente nel laboratorio indossava occhiali protettivi per proteggersi da una possibile esposizione al laser.

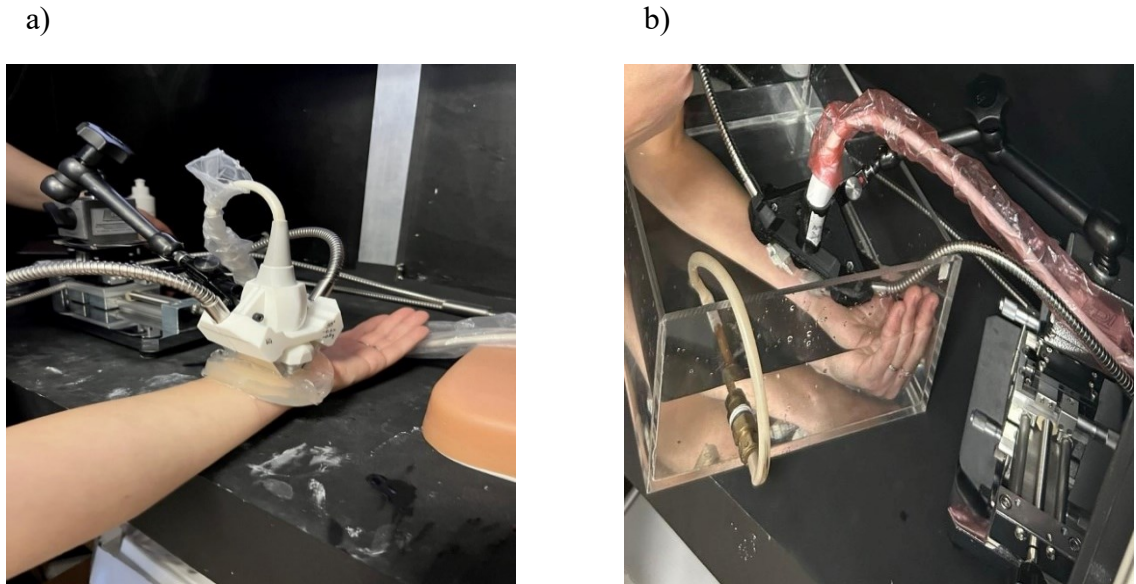


Figura 3.4: Setup di acquisizione in vivo nelle due modalità di accoppiamento acustico considerate: (a) acquisizione del polso con gel pad; (b) acquisizione dell'avambraccio in acqua, tramite immersione all'interno di una vaschetta.

Prima dell'acquisizione dei dati, è stata eseguita una fase preliminare valutando la posizione della sonda rispetto alla regione di interesse tramite imaging ecografico in modalità B-mode, utilizzando lo script Matlab SetUpL11_5vFlash.m. Questa fase ha permesso di verificare la corretta visualizzazione della struttura vascolare da acquisire e di controllare che il movimento della sonda lungo la direzione di scansione fosse adeguato. Dopo la verifica iniziale del setup, sono stati definiti i parametri di acquisizione del sistema laser OPOTEK tramite la relativa interfaccia di controllo. Il trigger è stato impostato in modalità External Trigger, in modo da sincronizzare l'emissione degli impulsi laser con il sistema Verasonics. Successivamente, il sistema è stato preparato alla sequenza di acquisizione attivando in ordine i comandi LAMP e LASER: il primo consente l'avvio della sorgente, mentre il secondo abilita l'emissione degli impulsi laser durante l'acquisizione. Per l'acquisizione multispettrale è stata utilizzata la modalità Scan with Fast Tuning, che permette di programmare una sequenza di lunghezze d'onda da acquisire in modo consecutivo. Per la stima della saturazione dell'ossigeno sono state selezionate tre lunghezze d'onda: 750, 800 e 850 nm. La scelta di queste lunghezze d'onda è legata agli spettri di assorbimento specifici dell'emoglobina deossigenata (Hb) e dell'ossiemoglobina (HbO₂): l'emoglobina deossigenata presenta una maggiore sensibilità spettrale a 750 nm, l'ossiemoglobina mostra una maggiore sensibilità a 850 nm, mentre a 800 nm i due cromofori presentano un assorbimento simile.

Per ciascun ciclo di acquisizioni, sono stati acquisiti 5 impulsi fotoacustici per ogni lunghezza d'onda, rispettivamente a 750, 800 e 850 nm, per un totale di 15 acquisizioni fotoacustiche. La sequenza impostata è stata quindi trasferita al controller del laser prima dell'avvio dell'acquisizione.

L'acquisizione è stata gestita tramite lo script Matlab SetUpL11_5vUSPA_vol. Nelle impostazioni dello script, la velocità del suono nel mezzo è stata assunta pari a 1540 m/s per i tessuti molli e pari a 1250 m/s per il fantoccio. All'interno dello script è stato inoltre impostato il numero di frame da acquisire in base al protocollo considerato. Per ciascun frame impostato, il sistema eseguiva un'acquisizione ecografica e una sequenza di acquisizioni fotoacustiche multispettrali composta da 5 acquisizioni per ciascuna delle tre lunghezze d'onda impostate. In totale, per ogni frame venivano quindi acquisite 16 acquisizioni: una ecografica e 15 fotoacustiche. Sono stati acquisiti tre diversi dataset, corrispondenti a 20, 40 e 60 frame, per ogni distretto analizzato. Attraverso il software Thorlabs, è stato impostato un campo di misura pari a 20 mm per ogni dataset e la velocità di traslazione della sonda è stata modificata in base al numero di frame da acquisire. Un numero maggiore di frame richiedeva tempi di acquisizione più lunghi e di conseguenza velocità di scansione inferiori. Le velocità sono state scelte dopo alcune prove preliminari, così da permettere il completamento della sequenza di acquisizioni lungo l'intero campo di misura. Sono state utilizzate velocità pari a circa 1,3 mm/s per 20 frame, 0,65 mm/s per 40 frame e 0,43 mm/s per 60 frame.

Dataset (Numero frame) (N_f)	Velocità di traslazione (v)	Lunghezze d'onda (λ)	Acquisizioni per lunghezza d'onda (N_a)	Totale Acquisizioni PA ($N_f \cdot N_\lambda \cdot N_a$)
20	1,3 mm/s	750,800,850 nm	5	300
40	0,65 mm/s	750,800,850 nm	5	600
60	0,43 mm/s	750,800,850 nm	5	900

Tabella 3.2: Riepilogo dei principali parametri di acquisizione dei dataset fotoacustici multispettrali a diversa densità di campionamento spaziale. Si noti che il numero totale di acquisizioni PA per dataset è stato calcolato come $N_f \cdot N_\lambda \cdot N_a$, dove N_f indica il numero di frame per dataset scelto, N_λ indica il numero delle lunghezze d'onda utilizzate (3) e N_a indica il numero di acquisizioni per lunghezza d'onda (5).

3.3 Data processing

L'elaborazione dei dati è stata sviluppata combinando l'utilizzo di Python e 3D Slicer. Python è stato impiegato per la gestione dei dati grezzi, l'organizzazione dei dataset, l'applicazione della correzione energetica, la ricostruzione delle immagini fotoacustiche tramite DAS, lo spectral unmixing e il calcolo delle metriche quantitative. I dati acquisiti alle diverse lunghezze d'onda sono stati elaborati sia in modalità standard sia applicando una normalizzazione rispetto all'energia dell'impulso laser, al fine di confrontare l'effetto della correzione energetica sui diversi dataset.

3D Slicer è stato invece utilizzato per la gestione dei volumi: tramite il croppaggio, la segmentazione della superficie cutanea e dei vasi, è stata possibile la valutazione delle regioni di interesse. L'elaborazione numerica automatizzata in Python è stata integrata con una valutazione visiva e volumetrica dei dati tramite 3D Slicer.

3.3.1 Ricostruzione dell'immagine fotoacustica

I dati sono stati acquisiti con il sistema Verasonics in ambiente Matlab. Per ogni frame veniva acquisita una componente US, seguita da 15 acquisizioni PA organizzate secondo un pattern multispettrale: cinque acquisizioni a 750 nm, cinque a 800 nm e cinque a 850 nm. I dati grezzi sono stati poi salvati in file.mat e successivamente importati in Python per la riorganizzazione e la ricostruzione delle immagini fotoacustiche. L'elaborazione in Python è stata strutturata come una

pipeline comune ai diversi dataset, così da mantenere lo stesso procedimento sia per le acquisizioni standard sia per quelle sottoposte a correzione energetica.

Una volta importati i file.mat in Python, sono state estratte le variabili RcvData e Receive. La variabile RcvData contiene i segnali grezzi ricevuti dai canali del trasduttore, mentre la struttura Receive fornisce le informazioni necessarie per identificare i singoli blocchi di acquisizione, tra cui i parametri startSample ed endSample. Questi definiscono la lunghezza del segnale associato alla singola acquisizione determinando l'intervallo di campioni da estrarre da RcvData.

I dati grezzi sono stati suddivisi in singoli blocchi, ognuno dei quali corrispondenti a un'acquisizione e riorganizzati in una matrice di segnali RF. In questa fase, l'acquisizione ecografica, ovvero la prima acquisizione per ciascun frame, è stata separata dalle acquisizioni fotoacustiche. La componente US è stata utile come riferimento morfologico per verificare il corretto posizionamento della sonda sul distretto corporeo di interesse e per visualizzare l'area acquisita.

Le acquisizioni PA successive sono state organizzate in base al pattern multispettrale del dataset. In Python, la separazione dei dati PA è stata parametrizzata specificando il numero di lunghezze d'onda utilizzate e il numero di acquisizioni associate a ciascuna lunghezza d'onda. Le acquisizioni fotoacustiche sono state assegnate correttamente alle tre lunghezze d'onda selezionate, pari a 750, 800 e 850 nm, con cinque acquisizioni PA per ciascuna lunghezza d'onda.

Elaborazione standard e correzione energetica

Dopo la separazione dei dati PA, i segnali fotoacustici sono stati elaborati secondo due modalità parallele: una modalità standard e una modalità con correzione energetica. Nella modalità standard, i dati grezzi PA sono stati processati senza alcuna normalizzazione rispetto all'energia del laser. Nella modalità con correzione energetica, invece, ogni acquisizione PA è stata normalizzata in funzione dell'energia del corrispondente impulso laser. Questa normalizzazione è stata applicata per ridurre l'effetto delle variazioni di energia tra impulsi laser successivi. In questo modo, i segnali acquisiti con impulsi a energia più bassa sono stati riportati a una scala confrontabile con quelli acquisiti a energia maggiore, permettendo di riferire tutti i dati a un livello comune.

Per ciascuna acquisizione, il segnale PA grezzo è stato normalizzato rispetto all'energia dell'impulso laser secondo la relazione:

$$PA_{\text{norm}} = PA_{\text{raw}} \cdot \frac{E_{\text{max}}}{E_{\text{acq}}} \quad (3.1)$$

dove PA_{raw} rappresenta il segnale fotoacustico grezzo della singola acquisizione, E_{acq} l'energia dell'impulso laser associata a quella acquisizione ed E_{max} l'energia massima tra le acquisizioni considerate.

Questa procedura non rappresenta una correzione completa della fluence all'interno del tessuto, ma una normalizzazione energetica del segnale fotoacustico rispetto alle variazioni pulse-to-pulse dell'energia laser.

Ricostruzione mediante algoritmo DAS

Sia in modalità standard sia in modalità normalizzata per l'energia, le singole acquisizioni PA sono state ricostruite tramite algoritmo Delay-and-Sum (DAS). La scelta del beamforming è caduta sul DAS perché rappresenta un metodo di ricostruzione semplice, lineare e con tempi computazionali relativamente brevi.

In alcune prove preliminari è stato considerato anche l'algoritmo Delay Multiply and Sum (DMAS). Poiché il DMAS combina e moltiplica tra loro coppie di segnali ritardati, esso contribuiva a modificare maggiormente la distribuzione dei valori dell'immagine, enfatizzando variazioni locali, artefatti o componenti di rumore del segnale. Questo comportamento poteva rendere meno stabile la successiva generazione delle mappe sO₂ tramite spectral unmixing. Per questo motivo, l'elaborazione finale è stata condotta utilizzando il DAS.

Nel workflow implementato, ogni acquisizione PA è stata ricostruita singolarmente. L'algoritmo DAS calcola, per ogni punto della griglia di ricostruzione, il tempo di arrivo atteso del segnale acustico sui diversi elementi del trasduttore, considerando la posizione degli elementi della sonda, la geometria dell'immagine e la velocità del suono impostata. I segnali ricevuti dai diversi canali vengono quindi opportunamente ritardati e sommati, ottenendo un valore di intensità per ciascun punto dell'immagine. La ricostruzione è stata eseguita utilizzando una velocità del suono pari a 1540 m/s, una profondità massima di ricostruzione pari a 53,6 mm e un'apodizzazione di tipo Tukey, applicata per pesare il contributo degli elementi del trasduttore durante la somma dei segnali.

Dopo aver ricostruito ciascuna acquisizione tramite algoritmo DAS, è stata estratta l'envelope lineare del segnale ricostruito. Questo passaggio ha permesso di ottenere una rappresentazione dell'ampiezza del segnale fotoacustico, indipendente dalle oscillazioni positive e negative del segnale RF, mantenendo valori positivi e più adatti alle successive elaborazioni quantitative.

Le envelope lineari ottenute dalle cinque acquisizioni PA relative a una stessa lunghezza d'onda sono state successivamente mediate tra loro: per ciascun frame è stata ottenuta una singola immagine PA media per ogni lunghezza d'onda. Questa procedura corrisponde a un averaging incoerente, poiché la media non viene eseguita direttamente sui segnali RF grezzi, conservando fase e segno del segnale, ma sulle envelope, cioè sull'ampiezza positiva del segnale ricostruito.

Questo tipo di media è stato utilizzato per ridurre la variabilità tra acquisizioni successive, incrementare l'SNR dell'immagine finale e limitare l'effetto di eventuali jitter o artefatti locali dovuti a micro-movimenti o rumore presenti nelle singole acquisizioni. La scelta di lavorare sull'envelope ha permesso di evitare possibili cancellazioni del segnale dovute a differenze di fase tra acquisizioni ripetute, che potrebbero verificarsi nel caso di una media coerente sui segnali grezzi.

Una volta ottenute le immagini PA medie, generate tramite media incoerente delle cinque acquisizioni relative a ciascuna lunghezza d'onda, sono state considerate due diverse rappresentazioni del dato ricostruito:

- **Rappresentazione lineare:** corrisponde all'immagine ottenuta a partire dall'envelope lineare del segnale ricostruito. Questa rappresentazione è proporzionale all'ampiezza del segnale fotoacustico ed è stata utilizzata come dato principale per le successive elaborazioni quantitative.
- **Rappresentazione logaritmica in dB:** è stata utilizzata principalmente per la visualizzazione e il controllo qualitativo delle immagini ricostruite. La

conversione in dB permette di comprimere la dinamica del segnale e di rappresentare l'immagine su una scala di grigi, consentendo una valutazione migliore sia delle strutture ad alta intensità sia di quelle caratterizzate da valori più bassi.

La visualizzazione delle immagini in dB è ottenuta confrontando diversi intervalli di dinamica, in particolare 30, 35 e 40 dB. La scelta del range finale si è basata sull'osservazione della resa visiva delle immagini ricostruite: sono stati preferiti i valori che consentivano di evidenziare in modo più chiaro le strutture fotoacustiche, limitando al tempo stesso il contributo del fondo e delle componenti meno informative. La distribuzione dei valori all'interno del range dinamico scelto è stata verificata tramite l'istogramma dei valori dell'immagine in dB. Ciò è stato utile per osservare la distribuzione delle intensità dei pixel e l'eventuale presenza di valori concentrati nelle basse intensità, saturazioni o differenze di contrasto tra le immagini. In questo lavoro la rappresentazione in dB è stata impiegata come supporto visivo per valutare la qualità della ricostruzione, mentre la rappresentazione lineare è stata mantenuta per le successive analisi quantitative e multispettrali.

I frame in rappresentazione lineare ottenuti alle tre lunghezze d'onda, 750, 800 e 850 nm, sono stati combinati in uno stack PA multispettrale. Questa operazione è stata eseguita per ciascuna configurazione di campionamento considerata, ottenendo dataset costituiti da 20, 40 e 60 frame alle tre lunghezze d'onda. Lo stack multispettrale rappresenta il dato di partenza per lo spectral unmixing, poiché raccoglie, per ogni posizione acquisita, l'informazione fotoacustica relativa alle diverse lunghezze d'onda necessaria per la generazione delle mappe sO₂.

3.3.2 Costruzione del volume e segmentazione della ROI

Dopo la ricostruzione fotoacustica, i singoli frame di ciascun dataset sono stati impilati lungo la direzione elevazionale, assunta come asse y, in modo da costruire un volume tridimensionale esportabile in formato NRRD e importabile in 3D Slicer. Per ciascuna densità di campionamento, pari a 20, 40 e 60 frame, è stato selezionato il dataset PA standard a 800 nm. Questa lunghezza d'onda è stata scelta come riferimento perché, a 800 nm, l'assorbimento dell'emoglobina ossigenata e deossigenata risulta simile e di conseguenza, la rappresentazione fotoacustica del vaso non favorisce in modo marcato uno dei due cromofori rispetto all'altro. La distanza tra frame consecutivi lungo l'asse y è stata definita in funzione del campo di misura considerato, pari a 20 mm. Assumendo il primo frame in posizione 0, il passo di campionamento lungo y è stato calcolato come:

$$s_y = \frac{20 \text{ mm}}{(N_{\text{frame}} - 1)} \quad (3.2)$$

dove s_y indica il passo di campionamento lungo l'asse y e N_{frame} indica il numero di frame utilizzati per costruire il volume.

Il passo elevazionale è risultato pari a circa 1,05 mm per 20 frame, 0,51 mm per 40 frame e 0,34 mm per 60 frame.

L'elaborazione dei volumi in 3D Slicer ha previsto diverse fasi:

1) Importazione del volume PA standard a 800 nm

Il volume ricostruito a 800 nm è stato importato in 3D Slicer e utilizzato come riferimento per la visualizzazione della struttura vascolare.

2) Cropping della regione di interesse

Il volume è stato croppato selezionando un intervallo di profondità compreso tra circa 10 e 20 mm. Questo passaggio ha permesso di mantenere la regione del distretto corporeo di interesse e di rimuovere sia la porzione superficiale al di sopra della pelle, priva di informazioni utili per l'analisi, sia le aree più profonde dell'immagine, caratterizzate prevalentemente da rumore o artefatti.

3) Segmentazione della superficie cutanea

La segmentazione della superficie cutanea è stata eseguita come passaggio preliminare alla segmentazione del vaso, con l'obiettivo di individuare il volume di interesse vascolare e separarlo dalla regione superficiale della pelle. Questo passaggio è stato necessario perché la cute, trovandosi in prossimità delle strutture vascolari da analizzare, poteva ostacolare visivamente l'identificazione della regione sottocutanea di interesse e rendere più difficile la distinzione tra segnale cutaneo e segnale vascolare.

Inoltre, nelle immagini fotoacustiche, la pelle può generare un segnale distinguibile per la presenza di cromofori endogeni, in particolare la melanina a livello epidermico: essa presenta un ampio spettro di assorbimento dal visibile al vicino infrarosso ed è spesso visualizzata tramite imaging fotoacustico a lunghezze d'onda superiori a 750 nm. Poiché la mappa sO_2 deriva dal contributo spettrale dell'emoglobina ossigenata e deossigenata, l'eventuale inclusione della superficie cutanea all'interno della maschera vascolare avrebbe ostacolato l'interpretazione dei valori estratti: i valori attribuiti alla regione del vaso non sarebbero stati riferibili esclusivamente al segnale emoglobinico, ma avrebbero potuto includere anche un contributo non vascolare legato alla melanina presente nella pelle [28].

Per questi motivi, la superficie cutanea è stata prima identificata e successivamente separata dalla regione sottocutanea. La segmentazione iniziale della superficie cutanea è stata effettuata sul volume PA standard a 800 nm individuando manualmente una soglia di intensità in 3D Slicer. Nei diversi volumi, ad esclusione del fantoccio, la superficie cutanea appariva più luminosa e caratterizzata da valori di intensità distinguibili rispetto alle regioni circostanti. Partendo da ciò, è stato selezionato un intervallo di intensità in grado di ottenere una prima separazione della pelle dal resto del volume. In seguito, la soglia è stata rifinita secondo ispezione visiva, aumentando o diminuendo il range di intensità in base alla corrispondenza ottenuta tra la maschera ottenuta e la superficie cutanea.

La segmentazione è stata poi ulteriormente corretta tramite operazioni di post-processing nel Segment Editor, rimuovendo manualmente con lo strumento gomma

eventuali regioni non pertinenti e applicando kernel di chiusura di 1 mm per riempire piccoli buchi nella maschera, ridurre discontinuità locali e ottenere una segmentazione più regolare della superficie cutanea.

4) Estrazione della regione sottocutanea tramite codice Python

Una volta ottenuta la segmentazione della superficie cutanea, è stata estratta la regione sottocutanea in Python, al fine di limitare l'analisi alla porzione del volume situata al di sotto della pelle, dove erano presenti le strutture vascolari di interesse. Il volume PA croppato a 800 nm e la maschera della pelle ottenuta in 3D Slicer sono stati importati in Python in formato NRRD tramite la libreria SimpleITK. Dopo la lettura dei due file, è stata verificata la corrispondenza tra le dimensioni del volume e quelle della maschera cutanea, in modo da garantire che i voxel della segmentazione fossero correttamente allineati al volume originale.

Il volume è stato interpretato come una matrice tridimensionale con assi Z, Y e X, dove Z rappresenta la profondità, Y corrisponde alla direzione di impilamento dei frame e X alla direzione laterale. Per ogni frame lungo l'asse Y e per ogni posizione laterale X, il codice ha individuato i voxel appartenenti alla maschera della pelle lungo la profondità Z: è stato considerato l'ultimo voxel appartenente alla pelle lungo la direzione della profondità e tutti i voxel successivi, più profondi rispetto alla superficie cutanea, sono stati assegnati alla regione sottocutanea.

Ciò è servito alla generazione di una maschera under-skin, avente la geometria del volume di partenza, che identifica la porzione situata al di sotto della pelle. La maschera è stata applicata al volume PA: i voxel appartenenti alla regione sottocutanea sono stati mantenuti con il loro valore originale, mentre tutti i voxel esterni a questa regione sono stati sostituiti con un valore costante pari a -1. Questa scelta ha permesso di distinguere in 3D Slicer la regione vascolare da analizzare. Il volume under-skin ottenuto è stato infine salvato in formato NRRD, mantenendo le stesse informazioni geometriche del volume originale.

5) Identificazione del vaso tramite threshold

All'interno della regione sottocutanea ottenuta, il vaso è stato identificato utilizzando una soglia di intensità sull'immagine fotoacustica di riferimento a 800 nm.

Analogamente a quanto effettuato per la segmentazione della superficie cutanea, è stata inizialmente applicata una soglia automatica e, a partire da questo valore, sono state poi effettuate rifiniture progressive della threshold fino a ottenere una segmentazione compatibile con la morfologia del vaso. Sebbene la precedente fase di croppaggio avesse consentito di ridurre buona parte del rumore, degli artefatti e delle variazioni locali dovute a piccoli movimenti, alcune componenti residue erano comunque presenti nella regione sottocutanea. Sulla base di questo, per l'identificazione del vaso sono state considerate le regioni che presentavano un segnale fotoacustico più marcato rispetto alle aree circostanti e un profilo semicurvilineo compatibile con la porzione superiore della struttura vascolare. Il fatto che nell'immagine fotoacustica a 800 nm risulti visibile principalmente la porzione superiore del vaso dipende dalla distribuzione dell'energia ottica nel tessuto: la parte superiore della struttura vascolare, trovandosi più vicina alla sorgente luminosa, produce un segnale fotoacustico più marcato, mentre nelle porzioni più profonde l'energia ottica risulta attenuata, con intensità del segnale più debole. L'applicazione della soglia ha evidenziato una struttura continua a

morfologia tubulare, compatibile con il vaso e non riconducibile a rumore locale. La segmentazione ottenuta tramite threshold è stata completata tramite operazioni di post-processing: la rimozione manuale, con lo strumento gomma, di eventuali regioni non appartenenti al vaso e l'applicazione di un'operazione di chiusura morfologica, con lo scopo di riempire eventuali cavità interne, regolarizzare la segmentazione e ridurre piccoli artefatti locali. Questa procedura ha permesso di ottenere una maschera vascolare finale, utilizzata successivamente per estrarre i valori della mappa di sO₂ nella regione del vaso selezionato.

3.3.3 Spectral unmixing e stima della sO₂

Una volta ottenuti gli stack fotoacustici multispettrali alle tre lunghezze d'onda selezionate (750, 800 e 850 nm), per ogni frame di ogni volume è stata effettuata la procedura di spectral unmixing per stimare il contributo dei cromofori emoglobinici (HbO₂ e Hb) che consentono di stimare la saturazione di ossigeno.

Il principio dello spectral unmixing si basa sull'assunzione che il segnale fotoacustico misurato a ciascuna lunghezza d'onda possa essere descritto come una combinazione lineare dei contributi dei cromofori presenti nel volume analizzato. In questo lavoro è stato adottato un modello lineare per cui, per ogni pixel dello stack multispettrale, i valori di segnale acquisiti alle diverse lunghezze d'onda sono stati messi in relazione con i coefficienti di estinzione molari dei due cromofori considerati, HbO₂ e Hb. I coefficienti sono stati letti da un file esterno organizzato in tre colonne: la prima contenente le lunghezze d'onda, espresse in nm, e le due successive contenenti i coefficienti di estinzione associati a HbO₂ e Hb per ciascuna lunghezza d'onda.

Il modello utilizzato è espresso come:

$$PA(\lambda_i) \approx \epsilon_{\{Hb\}(\lambda_i)} \cdot [Hb] + \epsilon_{\{HbO_2\}(\lambda_i)} \cdot [HbO_2] \quad (3.3)$$

dove $PA(\lambda_i)$ rappresenta il segnale fotoacustico alla lunghezza d'onda λ_i , mentre $\epsilon_{\{Hb\}(\lambda_i)}$ e $\epsilon_{\{HbO_2\}(\lambda_i)}$ rappresentano i coefficienti di estinzione molare dell'emoglobina deossigenata e ossigenata alla lunghezza d'onda λ_i .

Nel codice, il modello è stato implementato in forma matriciale. Per ogni pixel, i valori del segnale fotoacustico acquisiti alle tre lunghezze d'onda sono stati raccolti in un vettore, mentre i coefficienti di estinzione molare di HbO₂ e Hb sono stati organizzati in una matrice spettrale.

Il sistema può quindi essere scritto come:

$$\begin{bmatrix} PA(750) \\ PA(800) \\ PA(850) \end{bmatrix} \approx \begin{bmatrix} \epsilon_{\{HbO_2\}(750)} & \epsilon_{\{Hb\}(750)} \\ \epsilon_{\{HbO_2\}(800)} & \epsilon_{\{Hb\}(800)} \\ \epsilon_{\{HbO_2\}(850)} & \epsilon_{\{Hb\}(850)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [HbO_2] \\ [Hb] \end{bmatrix} \quad (3.4)$$

In forma compatta, può essere scritto come:

$$PA \approx Hx \quad (3.5)$$

dove PA è il vettore dei segnali fotoacustici, H è la matrice spettrale dei coefficienti di estinzione molare e x è il vettore dei contributi emoglobinici da stimare.

Il sistema lineare così definito è stato risolto mediante metodo NNLS, Non-Negative Least Squares. Il metodo NNLS si basa sulla stima di un vettore di coefficienti che minimizza l'errore quadratico tra il dato misurato e quello ricostruito dalla relazione lineare, imponendo il vincolo che ciascun coefficiente stimato sia maggiore o uguale a zero (vincolo di non negatività) [29].

Il metodo NNLS può essere espresso come:

$$\{\hat{d}\} = \operatorname{argmin}_{d \geq 0} \|x - Zd\|_2^2 \quad (3.6)$$

dove (x) rappresenta il vettore dei dati misurati, (Z) la matrice contenente le variabili note del modello lineare e (d) il vettore dei coefficienti da stimare.

Quest'approccio è stato applicato allo spectral unmixing: il vettore x dei dati misurati è rappresentato dai segnali fotoacustici acquisiti alle tre lunghezze d'onda (PA), la matrice Z contenente le variabili note corrisponde alla matrice spettrale (H) e il vettore d dei coefficienti da stimare corrisponde ai contributi di HbO₂ e Hb.

Nel caso specifico dello spectral unmixing, il metodo NNLS può essere espresso come:

$$\{\hat{d}\} = \operatorname{argmin}_{d \geq 0} \|PA - Hd\|_2^2 \quad (3.7)$$

In termini matriciali può essere espresso come:

$$\left\{ \begin{bmatrix} \widehat{[HbO_2]} \\ \widehat{[Hb]} \end{bmatrix} \right\} = \operatorname{argmin}_{\substack{[HbO_2] \\ [Hb]} \geq 0} \left\| \begin{bmatrix} PA(750) \\ PA(800) \\ PA(850) \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \varepsilon_{\{HbO_2\}}(750) & \varepsilon_{\{Hb\}}(750) \\ \varepsilon_{\{HbO_2\}}(800) & \varepsilon_{\{Hb\}}(800) \\ \varepsilon_{\{HbO_2\}}(850) & \varepsilon_{\{Hb\}}(850) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [HbO_2] \\ [Hb] \end{bmatrix} \right\|_2^2 \quad (3.8)$$

dove il vincolo $\begin{bmatrix} [HbO_2] \\ [Hb] \end{bmatrix} \geq 0$ impone che i contributi stimati di HbO₂ e Hb siano non negativi.

Il codice calcola inizialmente una soluzione ai minimi quadrati non vincolata: se i contributi stimati di HbO₂ e Hb risultano entrambi non negativi, la soluzione è compatibile e viene mantenuta mentre se uno dei due contributi assume valore negativo, vengono valutate soluzioni alternative che rispettano il vincolo di non negatività. Per ciascuna soluzione viene calcolato l'errore quadratico tra il segnale fotoacustico misurato e quello ricostruito dal modello lineare e, tra le soluzioni ammissibili, viene selezionata quella che minimizza l'errore. La procedura viene applicata a ogni pixel: il codice considera il vettore delle intensità fotoacustiche misurate alle tre lunghezze d'onda (750, 800 e 850 nm) per ogni pixel e stima la combinazione di HbO₂ e Hb che meglio ricostruisce i valori di intensità, rispettando il vincolo di non negatività.

Una volta ottenuti i contributi relativi di HbO₂ e Hb, la saturazione di ossigeno per ogni punto è stata calcolata come frazione dell'emoglobina ossigenata rispetto alla quantità totale di emoglobina:

$$sO_{2(x,y,z)} = \frac{[HbO_2](x,y,z)}{[HbO_2](x,y,z) + [Hb](x,y,z)} \quad (3.9)$$

Attraverso questa procedura sono state ottenute mappe bidimensionali di HbO_2 , Hb e sO_2 per ciascun frame acquisito. Il calcolo è stato ripetuto per ogni densità di campionamento analizzata e per ciascun distretto corporeo o struttura considerata, permettendo così di confrontare la distribuzione spaziale della saturazione di ossigeno nelle diverse condizioni e configurazioni.

3.3.4 Selezione dei pixel e applicazione della maschera segmentata

Dopo il calcolo delle mappe sO_2 , è stata effettuata una selezione dei pixel da includere nelle successive analisi, al fine di considerare solo le regioni caratterizzate da un segnale fisiologico affidabile. Sono stati applicati due criteri di selezione:

Soglia basata sull'emoglobina totale

Durante le operazioni di spectral unmixing, è stato calcolato il contributo di emoglobina totale (THb) dato dalla somma di emoglobina ossigenata e deossigenata. I pixel caratterizzati da valori molto bassi di THb sono stati considerati poco affidabili per il calcolo della sO_2 . In questi punti, il contributo emoglobinico stimato è ridotto e il valore di sO_2 viene calcolato come rapporto tra quantità molto piccole, con la conseguenza che anche piccole variazioni nei contributi stimati di HbO_2 e Hb , dovute al rumore o ad artefatti locali, possono influenzare in modo rilevante il valore di sO_2 . Per definire la soglia THb è stato utilizzato come riferimento il 95° percentile della distribuzione dei valori di THb nel volume analizzato: questo evita l'uso del valore massimo assoluto, che potrebbe essere influenzato da singoli pixel anomali, rumore o artefatti locali. La soglia è stata calcolata come percentuale del 95° percentile, considerando valori pari al 20% e al 30%. La scelta tra questi due valori è stata effettuata per ciascun volume mediante ispezione qualitativa delle mappe ottenute, valutando quale soglia consentisse di escludere i pixel con contributo emoglobinico troppo basso senza rimuovere eccessivamente la struttura di interesse. Per ciascun volume analizzato, la soglia THb selezionata è stata mantenuta costante per tutte le densità di campionamento relative a quel volume, in modo da rendere più coerente il confronto tra 20, 40 e 60 frame.

Soglia basata sull'ampiezza fotoacustica

Il secondo criterio di selezione si basa sull'ampiezza del segnale fotoacustico. Anche dopo l'applicazione della soglia sul THb, alcune regioni non appartenenti alla struttura di interesse potevano presentare valori di sO_2 apparentemente plausibili. Questo può verificarsi quando segnali residui, rumore o piccoli artefatti locali producono, tramite il metodo NNLS, valori positivi di HbO_2 e Hb , dai quali viene successivamente calcolata la sO_2 , senza un reale contributo vascolare. Per ridurre questo effetto, è stata applicata una soglia sull'ampiezza del segnale PA ricostruito a 800 nm. Questa lunghezza d'onda è stata scelta perché si trova in prossimità del punto isosbastico dell'emoglobina, dove HbO_2 e Hb presentano coefficienti di assorbimento simili: il segnale a 800 nm non privilegia nessuno dei due cromofori, mentre l'utilizzo di lunghezze d'onda più sbilanciate verso uno dei due cromofori avrebbe invece potuto rendere la soglia maggiormente dipendente dalla composizione relativa tra HbO_2 e Hb .

La soglia sull'immagine PA a 800 nm è stata definita a partire dal percentile della distribuzione dei valori PA800 nei pixel già selezionati con la soglia sul THb, mantenendo nelle analisi solo i pixel con intensità PA800 maggiore o uguale alla soglia scelta. Nella maggior parte dei volumi è stato utilizzato il 40° percentile, mentre per l'avambraccio acquisito in acqua è stato scelto il 30° percentile, poiché dall'ispezione qualitativa delle mappe di sO₂ una soglia più elevata risultava troppo restrittiva e tendeva a rimuovere anche porzioni della struttura di interesse. Una volta selezionato, il percentile è stato mantenuto costante per tutte le densità di campionamento di uno stesso volume, così da rendere coerente il confronto tra 20, 40 e 60 frame.

L'applicazione delle due soglie ha permesso di ottenere mappe di sO₂ più robuste, permettendo di analizzare i pixel caratterizzati sia da un contributo emoglobinico sufficiente sia da un'ampiezza fotoacustica adeguata.

Una volta ottenute le mappe di sO₂ filtrate, è stata applicata la maschera di segmentazione della struttura di interesse. La maschera, precedentemente ottenuta in 3D Slicer e salvata in formato NRRD, è stata importata in Python e riallineata al volume di riferimento utilizzato per il crop, garantendo la corrispondenza spaziale con le mappe di sO₂.

La maschera segmentata è stata applicata frame per frame alle corrispondenti mappe di sO₂. Per ogni frame, la maschera è stata sovrapposta alla mappa di saturazione, permettendo di selezionare solo i pixel appartenenti alla regione segmentata e non esclusi dopo l'applicazione dei criteri di selezione basati su THb e PA800. Infine, i valori di sO₂ contenuti all'interno di questa maschera finale sono stati estratti e utilizzati per le analisi quantitative.

Utilizzando le mappe di sO₂ filtrate e la maschera segmentata, sono state generate le ricostruzioni tridimensionali della regione vascolare di interesse. La ricostruzione basata sulle immagini PA a 800 nm è stata utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare, mentre le visualizzazioni tridimensionali della distribuzione di sO₂ all'interno della struttura vascolare segmentata ottenute con elaborazione standard e con correzione energetica hanno permesso di confrontare qualitativamente la distribuzione spaziale della saturazione di ossigeno tra le due modalità di elaborazione. Le ricostruzioni sono state prodotte per ciascun volume e per le diverse densità di campionamento considerate, mentre nella sezione dei risultati sono state riportate le condizioni più rappresentative per il confronto qualitativo.

3.4 Metriche quantitative

A partire dai valori di sO₂ validi estratti all'interno della maschera finale, sono state calcolate le metriche quantitative utilizzate per confrontare le diverse densità di campionamento, pari a 20, 40 e 60 frame, e le due modalità di elaborazione, standard e con correzione energetica.

La prima metrica considerata è stata la media delle medie di sO₂. Per ciascun frame è stata calcolata la media dei valori di sO₂ contenuti all'interno della maschera finale, ottenendo un valore rappresentativo della saturazione media della struttura vascolare in quel singolo frame. Per descrivere il comportamento complessivo dell'intero

volume, le medie calcolate frame per frame sono state mediate tra loro. Il valore ottenuto è la media complessiva della sO_2 del volume analizzato.

La seconda metrica è stata la media dei 90° percentili di sO_2 . Per ciascun frame è stato calcolato il 90° percentile della distribuzione dei valori di sO_2 all'interno della maschera finale. I 90° percentili ottenuti nei singoli frame sono stati mediati tra loro, ottenendo un indice rappresentativo dell'intero volume. Questa metrica è stata utilizzata per descrivere la porzione più alta della distribuzione dei valori di sO_2 , evitando di utilizzare il valore massimo assoluto, che potrebbe essere influenzato da singoli pixel anomali o rumore.

La terza metrica è stata la variabilità intra-frame, intesa come media delle deviazioni standard dei valori di sO_2 calcolate nei singoli frame all'interno della maschera finale. In ciascun frame, la deviazione standard descrive la dispersione spaziale dei valori di saturazione, cioè quanto i valori di sO_2 risultano omogenei o variabili all'interno della regione vascolare segmentata. Su questa base, la variabilità intra-frame è stata considerata come indicatore qualitativo dell'omogeneità della mappa ottenuta dopo le diverse fasi di elaborazione, incluse ricostruzione, spectral unmixing, applicazione delle soglie e selezione della regione di interesse. Le deviazioni standard calcolate nei singoli frame sono state poi mediate tra loro, ottenendo un indice rappresentativo della variabilità intra-frame dell'intero volume.

La quarta metrica è stata la variabilità inter-frame, utilizzata per valutare la stabilità delle misure lungo la sequenza acquisita. In questo caso è stata calcolata la deviazione standard delle medie di sO_2 ottenute frame per frame e, separatamente, la deviazione standard dei 90° percentili calcolati nei singoli frame. Questa metrica descrive quanto i valori rappresentativi della sO_2 variano tra i diversi frame del volume e valuta come la distribuzione della sO_2 cambi al variare della densità di campionamento, confrontando le acquisizioni a 20, 40 e 60 frame.

Come analisi accessorie sono stati calcolati il CNR e il gCNR sull'immagine PA a 800 nm per valutare il contrasto tra la regione vascolare segmentata e il tessuto circostante. Il background è stato definito mediante un'ellisse fissa centrata sul baricentro della maschera vascolare, considerando come background l'area interna all'ellisse esclusa la regione del vaso. Sono state testate diverse dimensioni dell'ellisse, fino a individuare una configurazione che includesse adeguatamente il vaso e una porzione di tessuto circostante posta a profondità simile. Il CNR è stato utilizzato per quantificare il contrasto tra vaso e background tenendo conto della differenza tra le intensità medie e della variabilità del segnale, mentre il gCNR ha permesso di valutare la separazione tra le distribuzioni di intensità delle due regioni [30].

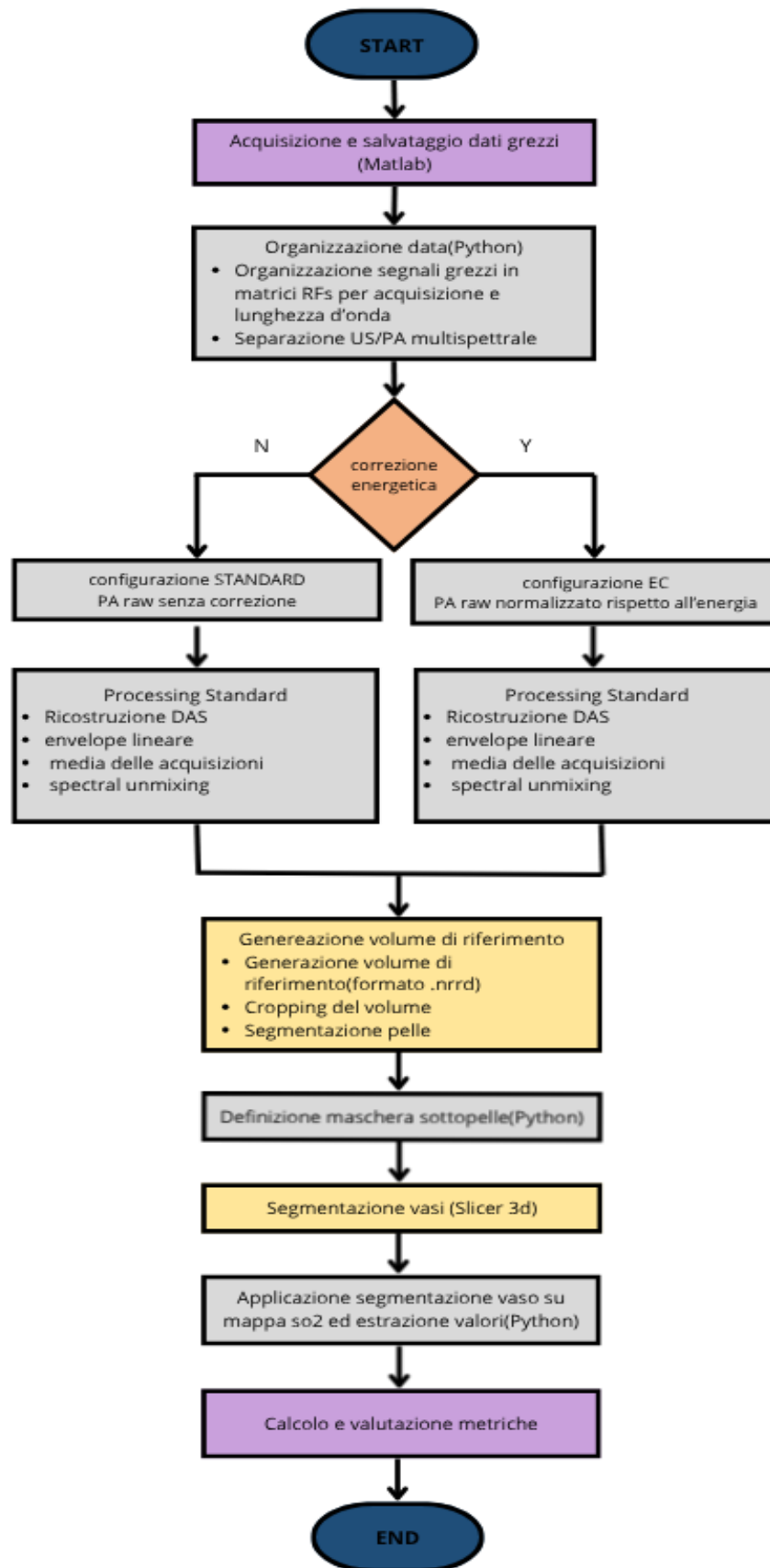


Figura 3.5: Pipeline di elaborazione dei dati fotoacustici utilizzata per l'analisi quantitativa della sO_2 .

Capitolo 4

Risultati

In questo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti dall'elaborazione dei dati fotoacustici volumetrici per ottenere una valutazione dell'effetto della densità di campionamento e della correzione energetica sulla quantificazione della sO_2 .

Prima dell'analisi quantitativa delle mappe di sO_2 , le immagini fotoacustiche ricostruite sono state osservate visivamente per verificare la riconoscibilità delle strutture di interesse, la continuità spaziale del segnale lungo il volume e l'eventuale presenza di rumore o artefatti che potessero influenzare la segmentazione.

Nel caso del fantoccio, i vasi con l'inchiostro risultavano più facilmente identificabili rispetto alle strutture vascolari nei dati in vivo: per questo l'acquisizione volumetrica del fantoccio è stata utilizzata come fase preliminare per verificare il processo di ricostruzione, segmentazione, applicazione delle soglie e per effettuare una prima valutazione delle metriche quantitative. Nei dati in vivo, le strutture vascolari apparivano come strutture filamentose con intensità maggiore rispetto al tessuto circostante, coerentemente con il maggiore assorbimento ottico dell'emoglobina alle lunghezze d'onda considerate.

A supporto di questa osservazione, sono stati considerati anche CNR e gCNR sull'immagine PA a 800 nm, utilizzati come metriche accessorie per valutare il contrasto e la separabilità tra la regione segmentata e il background circostante. Queste metriche hanno fornito un'indicazione aggiuntiva sulla distinguibilità del segnale attribuito alla struttura vascolare rispetto al tessuto circostante e all'eventuale rumore locale. Nell'interpretazione complessiva dei risultati, il loro ruolo è stato considerato limitato, poiché CNR e gCNR non intervengono direttamente nella stima della sO_2 , ma rappresentano un controllo supplementare della qualità del segnale fotoacustico a 800 nm.

Nell'interpretazione dei risultati è stato inoltre considerato che le acquisizioni in vivo possono essere influenzate da diversi fattori sperimentali, tra cui rumore, piccoli artefatti locali e micromovimenti durante la scansione. Inoltre, la distribuzione non perfettamente omogenea della luce nel tessuto può determinare variazioni locali dell'ampiezza fotoacustica e influenzare, di conseguenza, la stima della sO_2 . Questi aspetti possono aver contribuito alla variabilità osservata nelle metriche quantitative, in particolare nella variabilità intra-frame e inter-frame. La visualizzazione volumetrica ha permesso di valutare la continuità delle strutture segmentate lungo la direzione di scansione. Questo passaggio è stato utile per verificare che la regione selezionata non fosse limitata a singoli frame isolati, ma mantenesse una certa coerenza spaziale nel volume acquisito.

Per quanto riguarda le condizioni di accoppiamento acustico, esse possono influenzare la qualità e la stabilità del segnale acquisito. Nel caso dell'acquisizione

con gel pad, il contatto diretto tra sonda, gel pad e superficie cutanea può comportare una pressione locale sul distretto analizzato, con possibile deformazione dei tessuti superficiali e parziale modifica della geometria o della visibilità delle strutture vascolari. L'acquisizione in acqua consente invece un accoppiamento acustico senza contatto diretto con la cute, riducendo l'effetto della pressione meccanica dalla sonda.

4.1 Studio del fantoccio

Nello studio del fantoccio, non essendo presente uno strato cutaneo, non è stato necessario effettuare la segmentazione della pelle e quindi si è proceduto direttamente alla segmentazione della struttura vascolare artificiale. Il fantoccio era costituito da un vaso che si biforcava contenente una soluzione assorbente simil-inchiostro: i valori ottenuti tramite spectral unmixing non devono essere interpretati come una misura fisiologica reale di sO_2 , ma come mappe apparenti ottenute applicando la stessa pipeline di elaborazione utilizzata per i dati in vivo. L'analisi del fantoccio è stata utilizzata principalmente per verificare la segmentazione della struttura di interesse, l'applicazione delle soglie, l'andamento delle metriche quantitative in una condizione più controllata e la visualizzazione della ricostruzione volumetrica.

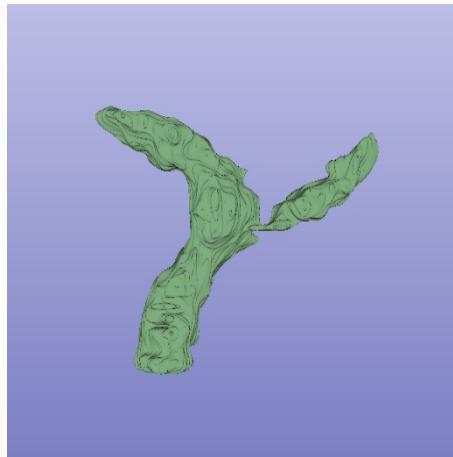


Figura 4.1: Segmentazione tridimensionale del vaso del fantoccio ottenuta in 3D Slicer

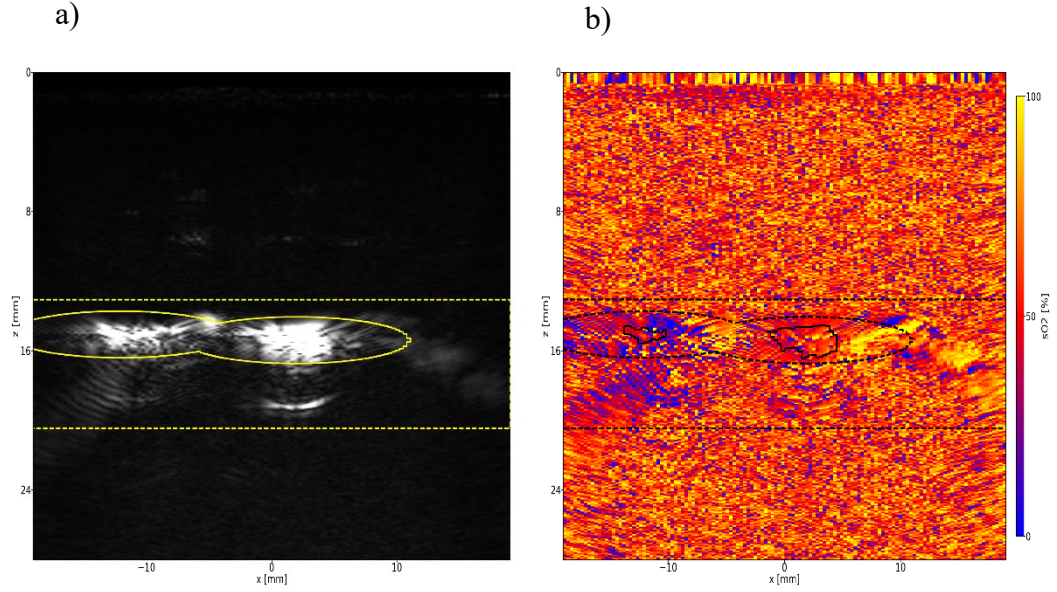


Figura 4.2: Esempio di analisi sul fantoccio relativa al 40° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittiche gialle selezionate per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.

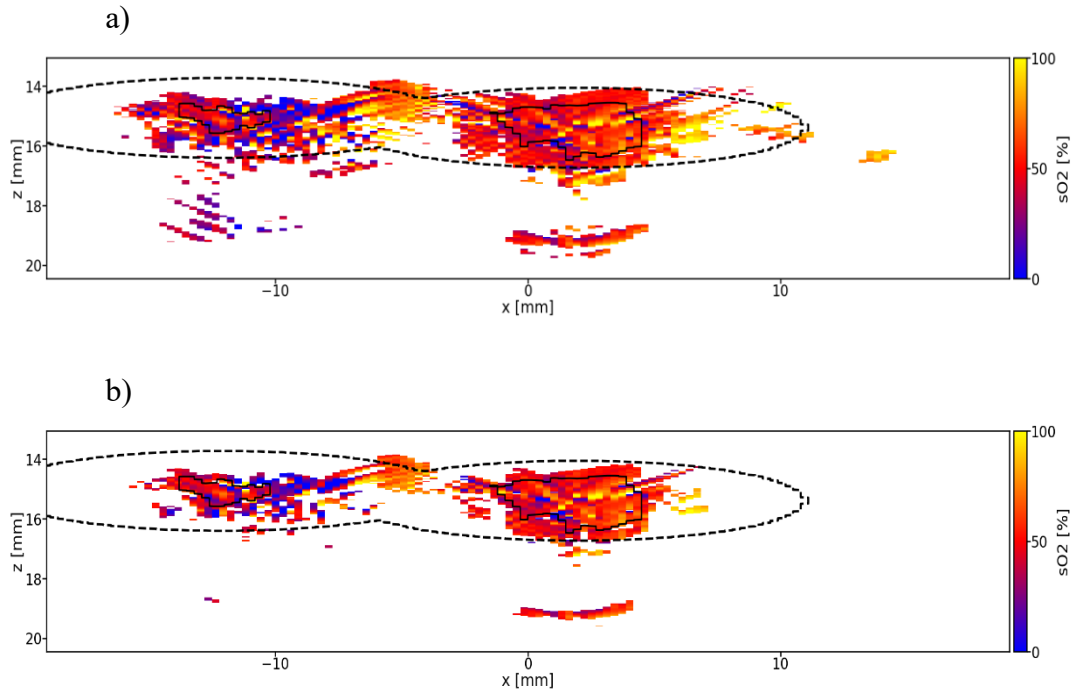


Figura 4.3: Confronto tra mappe di sO_2 del fantoccio relative al 40° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 30% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile

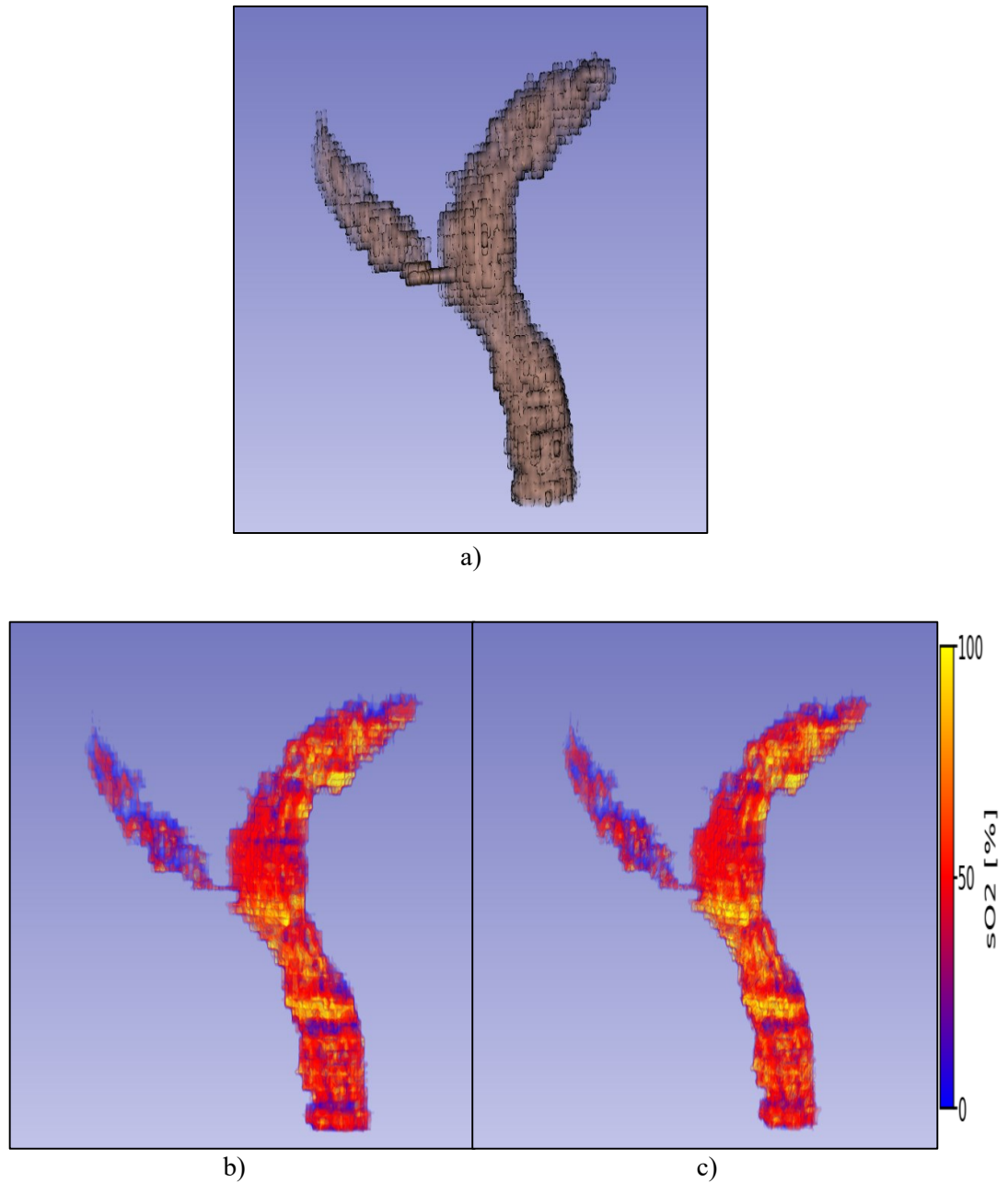


Figura 4.4: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare del fantoccio a 40 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.

Le metriche di contrasto indicano che il contrasto tra la struttura segmentata e il background rimane alto e tende ad aumentare passando da 20 a 40 frame, con risultati paragonabili tra 40 e 60 frame. Inoltre i valori di contrasto sono simili tra la versione standard e quella con correzione energetica, che modifica leggermente il contrasto strutturale del segnale PA800.

Densità di campionamento	CNR PA800 Standard	CNR PA800 EC	gCNR PA800 Standard	gCNR PA800 EC
20 frame	0,9669 $\pm$ 0,2141	0,9667 $\pm$ 0,2139	0,7833 $\pm$ 0,0843	0,7836 $\pm$ 0,0844
40 frame	1,1181 $\pm$ 0,2969	1,1180 $\pm$ 0,2968	0,8314 $\pm$ 0,0575	0,8315 $\pm$ 0,0577
60 frame	1,0592 $\pm$ 0,3094	1,0593 $\pm$ 0,3095	0,8032 $\pm$ 0,0617	0,8032 $\pm$ 0,0618

Tabella 4.1: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

L'effetto della correzione energetica sulla quantificazione della sO₂ nella regione vascolare ha determinato, in tutte le densità di campionamento considerate, un aumento dei valori medi di sO₂ rispetto alla versione standard, con un incremento energetico simile nelle tre condizioni, pari a +3,4/+3,5 punti percentuali. Nel 90° percentile della distribuzione la correzione energetica produce un aumento in ogni densità di campionamento, pari a circa +2,9 punti percentuali a 20 frame, +3,3 punti percentuali a 40 frame e +3,4 punti percentuali a 60 frame. Valutando l'effetto della densità di campionamento, si nota che il passaggio da 20 a 40 frame determina un aumento sia nella versione standard sia nella versione corretta. A 60 frame i valori risultano leggermente inferiori rispetto a 40 frame, ma superiori rispetto a 20 frame. Questo andamento suggerisce che il miglioramento più marcato si osserva passando da 20 a 40 frame, mentre l'aumento ulteriore della densità di campionamento non comporta necessariamente un incremento monotono del valore medio di sO₂. L'effetto della densità di campionamento risulta più apprezzabile valutando la variabilità intra-frame e inter-frame, che si riducono progressivamente all'aumentare del numero di frame.

Densità di campionamento	sO ₂ media + variabilità inter-frame Standard (%)	sO ₂ media + variabilità inter-frame EC (%)
20 frame	41,1408 ± 14,8290	44,5812 ± 15,6621
40 frame	50,4583 ± 12,4053	53,9967 ± 11,5897
60 frame	47,4019 ± 10,5540	50,8490 ± 10,2793

Tabella 4.2: Valore medio di sO₂ e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.

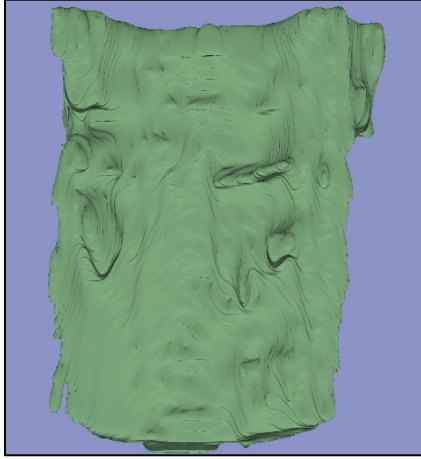
Densità di campionamento	Variabilità intra-frame Standard (%)	Variabilità intra-frame EC (%)
20 frame	29,3484	29,6803
40 frame	24,7289	24,8057
60 frame	20,7169	20,7615

Tabella 4.3: Variabilità intra-frame della sO₂ nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO₂ ottenute nei singoli frame.

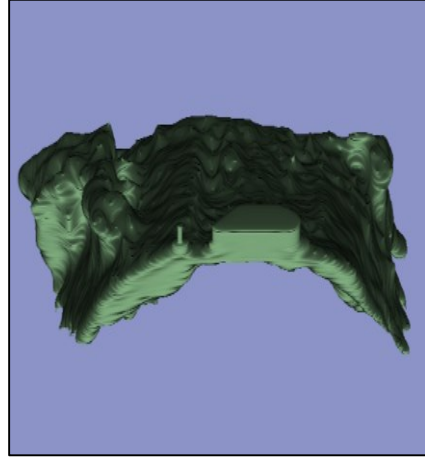
Densità di campionamento	90° percentile medio sO ₂ ± std Standard (%)	90° percentile medio sO ₂ ± std EC(%)
20 frame	82,8569 ± 15,5384	85,7981 ± 14,6331
40 frame	83,2074 ± 12,3248	86,5401 ± 11,0124
60 frame	73,2429 ± 14,6209	76,6317 ± 14,1034

Tabella 4.4: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO₂ nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.

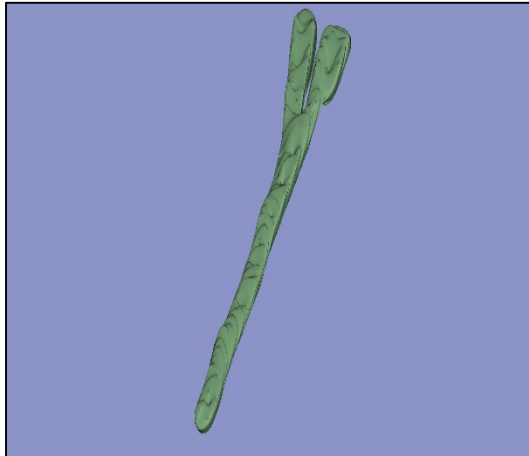
4.2 Studio dell'avambraccio in acqua



a) Segmentazione della pelle (vista superiore)



b) Segmentazione della pelle (vista laterale)



c) Segmentazione del vaso

Figura 4.5: Segmentazione tridimensionale dell'avambraccio in acqua: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).

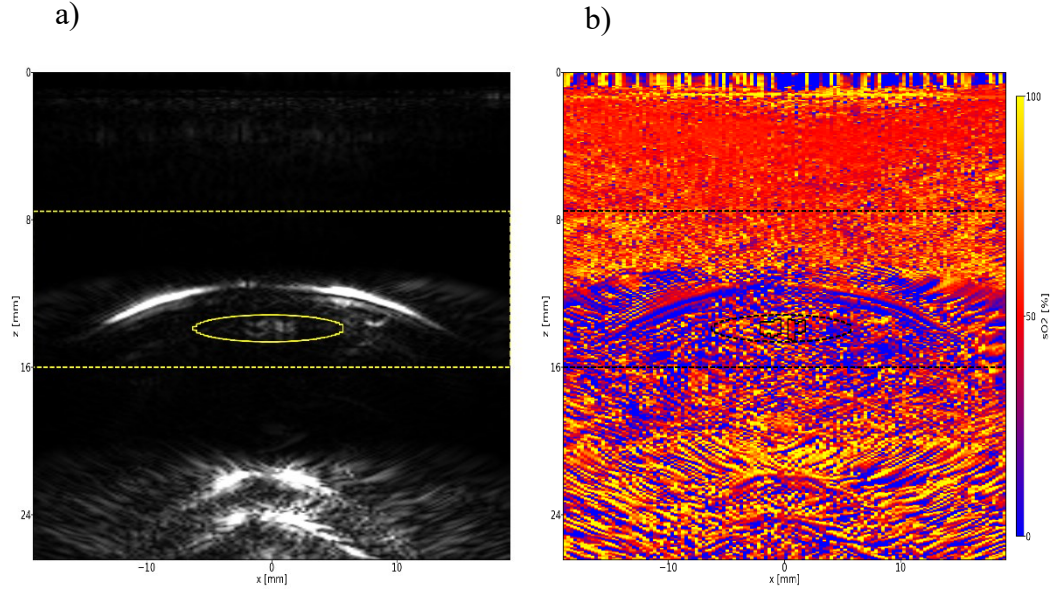


Figura 4.6: Esempio di analisi sull'avambraccio in acqua relativa al 5° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO₂, con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.

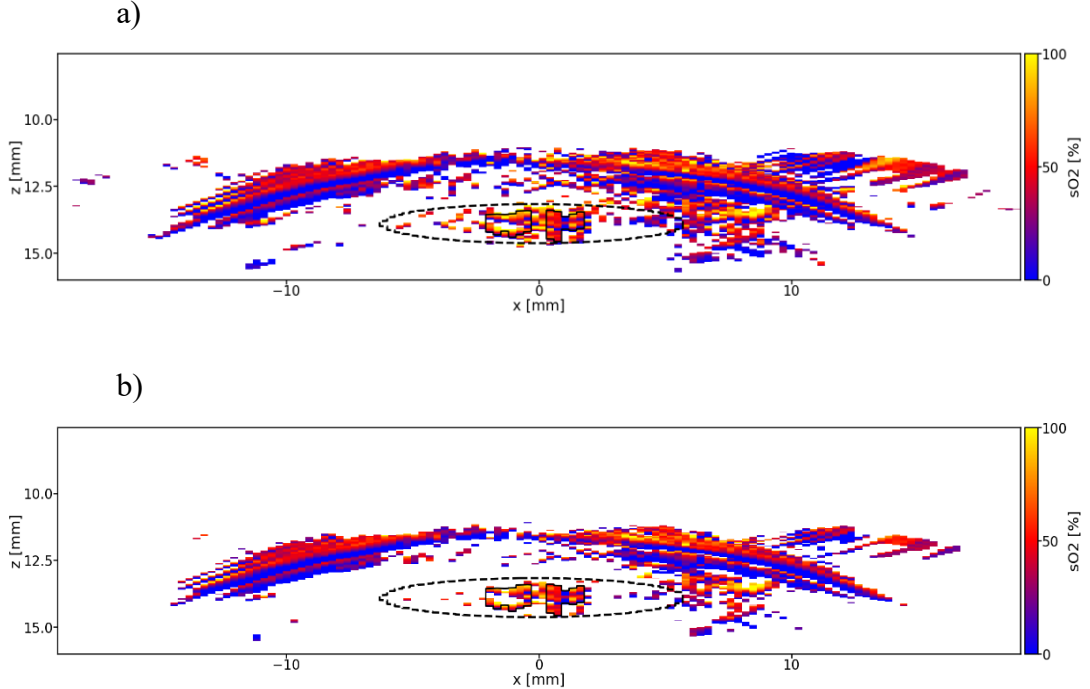


Figura 4.7: Confronto tra mappe di sO₂ dell'avambraccio in acqua relative al 5° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 30% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 30° percentile.

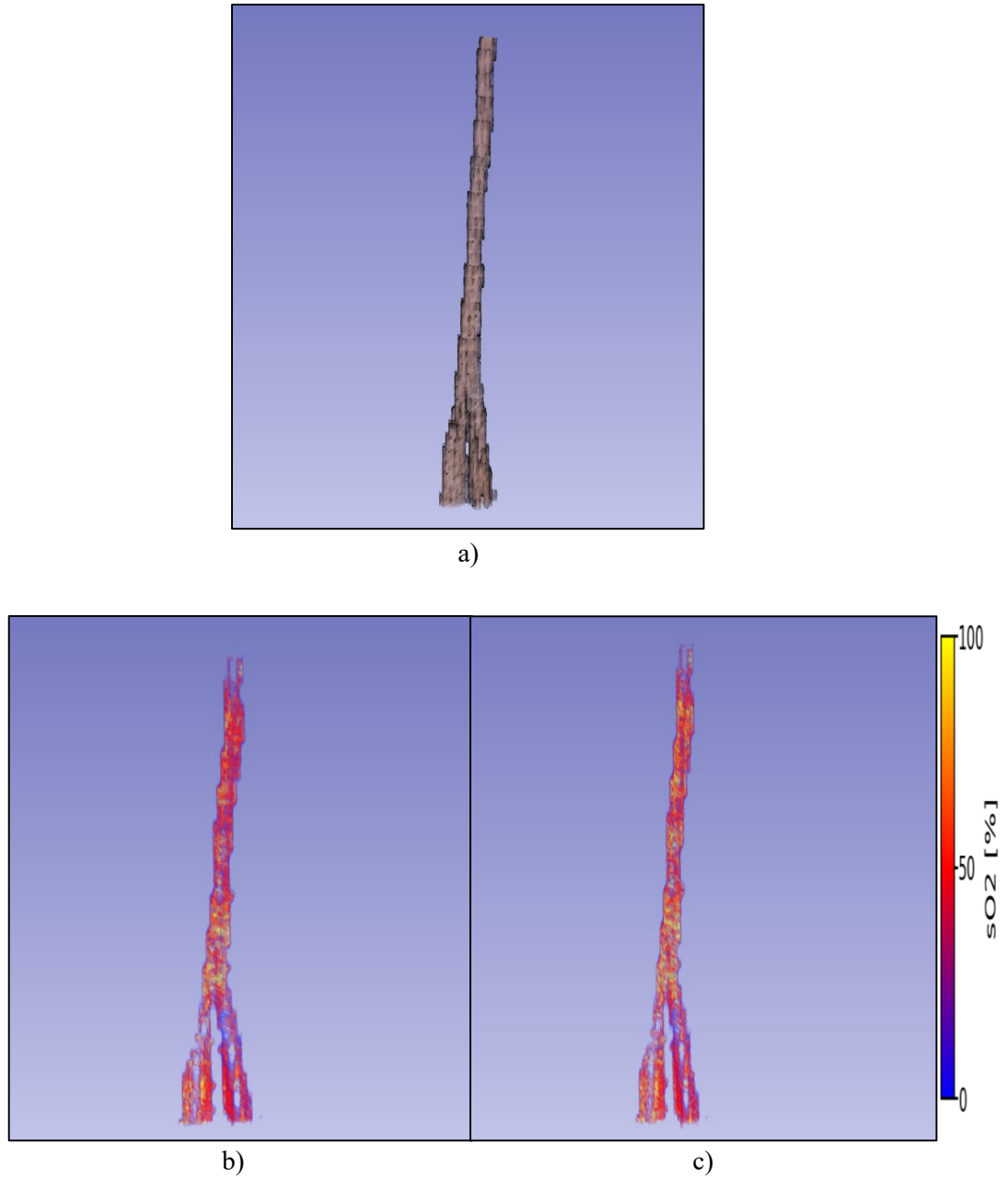


Figura 4.8: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare dell'avambraccio acquisito in acqua a 40 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.

Le metriche di contrasto risultano complessivamente elevate per tutte le densità di campionamento considerate. Il CNR mostra un lieve incremento all'aumentare del numero di frame, passando da 20 a 40 frame e si mantiene su valori simili a 60 frame. Il gCNR presenta variazioni più contenute, con valori molto simili tra le tre densità, con un valore massimo a 40 frame. Inoltre, i valori ottenuti nella versione standard e in quella con correzione energetica risultano molto simili, indicando che la correzione energetica non modifica in modo apprezzabile il contrasto dell'immagine PA a 800 nm.

Densità di campionamento	CNR PA800 Standard	CNR PA800 EC	gCNR PA800 Standard	gCNR PA800 EC
20 frame	1,3623 $\pm$ 0,346	1,363 $\pm$ 0,3453	0,7167 $\pm$ 0,1141	0,7163 $\pm$ 0,1141
40 frame	1,4063 $\pm$ 0,2414	1,4063 $\pm$ 0,2413	0,7244 $\pm$ 0,07	0,7231 $\pm$ 0,0689
60 frame	1,4183 $\pm$ 0,2413	1,4183 $\pm$ 0,2288	0,7203 $\pm$ 0,0744	0,7206 $\pm$ 0,0743

Tabella 4.5: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

L'effetto della correzione energetica sulla quantificazione della sO₂ nella regione vascolare ha determinato, in tutte le densità di campionamento considerate, un aumento dei valori medi di sO₂ rispetto alla versione standard. L'incremento risulta pari a +3,62 punti percentuali a 20 frame, +4,74 punti percentuali a 40 frame e +4,63 punti percentuali a 60 frame.

Nel 90° percentile della distribuzione, la correzione energetica produce un aumento in ogni densità di campionamento, pari a circa +0,94 punti percentuali a 20 frame, +4,43 punti percentuali a 40 frame e +4,20 punti percentuali a 60 frame.

Valutando l'effetto della densità di campionamento, si nota che i valori medi di sO₂ aumentano lievemente passando da 20 a 60 frame, sia nella versione standard sia nella versione con correzione energetica. Questo andamento suggerisce che, in questa condizione, l'aumento della densità di campionamento è associato a un incremento del valore medio di sO₂ nella regione vascolare.

L'effetto della densità di campionamento risulta più apprezzabile valutando la variabilità intra-frame, che si riduce progressivamente all'aumentare del numero di frame. La variabilità inter-frame mostra un andamento meno lineare, con valori più elevati a 40 frame e una successiva lieve riduzione a 60 frame.

Densità di campionamento	sO ₂ media ± variabilità inter-frame Standard (%)	sO ₂ media ± variabilità inter-frame EC (%)
20 frame	50,9382 ± 3,4821	54,5589 ± 3,3990
40 frame	51,2713 ± 4,7486	56,0097 ± 4,5425
60 frame	52,6727 ± 4,0258	57,3040 ± 3,9611

Tabella 4.6: Valore medio di sO₂ e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati per le tre densità di campionamento e confrontati tra la versione standard e la versione con correzione energetica. Il valore medio di sO₂ è ottenuto come media delle medie calcolate nei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame è espressa come deviazione standard delle medie calcolate nei singoli frame.

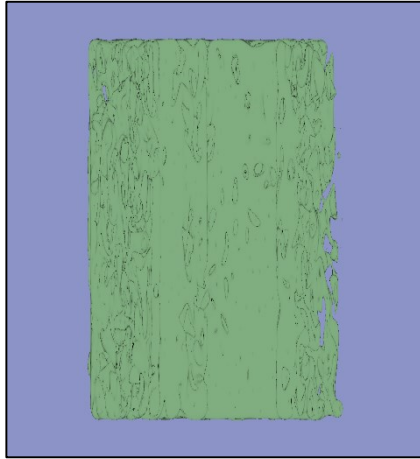
Densità di campionamento	Variabilità intra-frame Standard (%)	Variabilità intra-frame EC (%)
20 frame	34,2416	33,9009
40 frame	22,7298	22,6464
60 frame	21,5747	21,1854

Tabella 4.7: Variabilità intra-frame della sO₂ nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO₂ ottenute nei singoli frame.

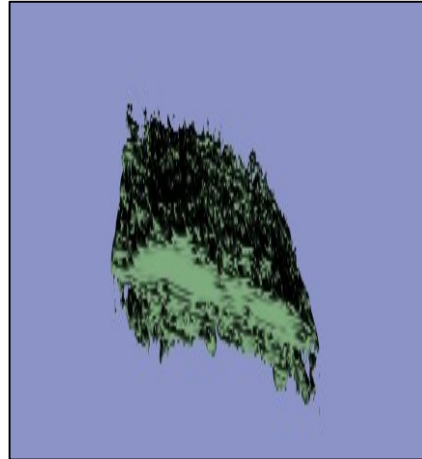
Densità di campionamento	Media del 90° percentile sO ₂ Standard (%)	Media del 90° percentile sO ₂ EC (%)
20 frame	98,5298 ± 2,6032	99,4681 ± 1,5028
40 frame	79,4065 ± 6,4409	83,8428 ± 5,8995
60 frame	79,8495 ± 8,1212	84,0493 ± 7,6965

Tabella 4.8: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO₂ nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.

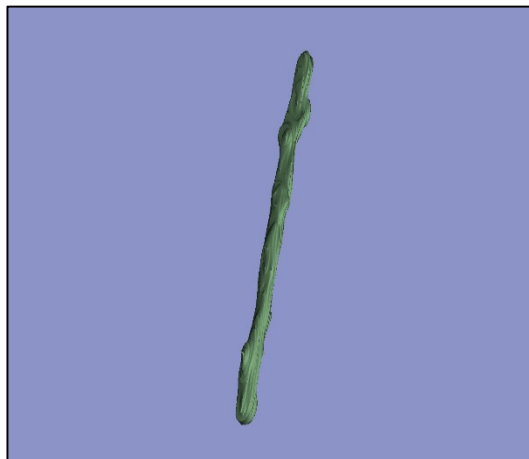
4.3 Studio dell'avambraccio con gel pad



a) Segmentazione della pelle (vista superiore)



b) Segmentazione della pelle (vista laterale)



c) Segmentazione vaso

Figura 4.9: Segmentazione tridimensionale dell'avambraccio acquisito con gel pad: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).

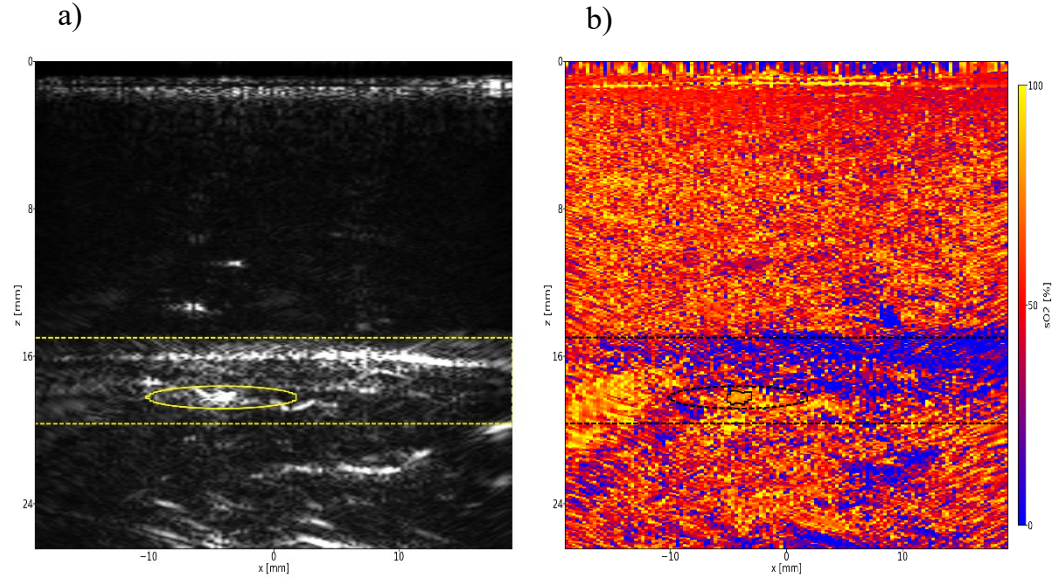


Figura 4.10: Esempio di analisi sull'avambraccio acquisito con gel pad relativa al 20° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.

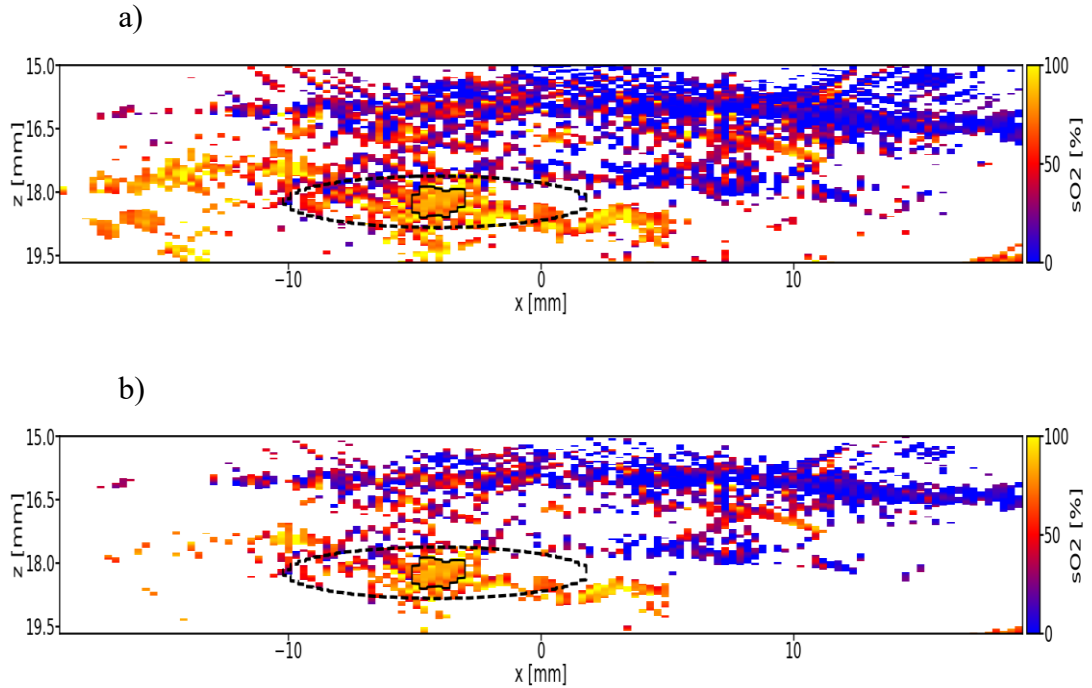


Figura 4.11: Confronto tra mappe di sO_2 dell'avambraccio acquisito con gel pad relative al 20° frame del volume acquisito a 60 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 30% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile.

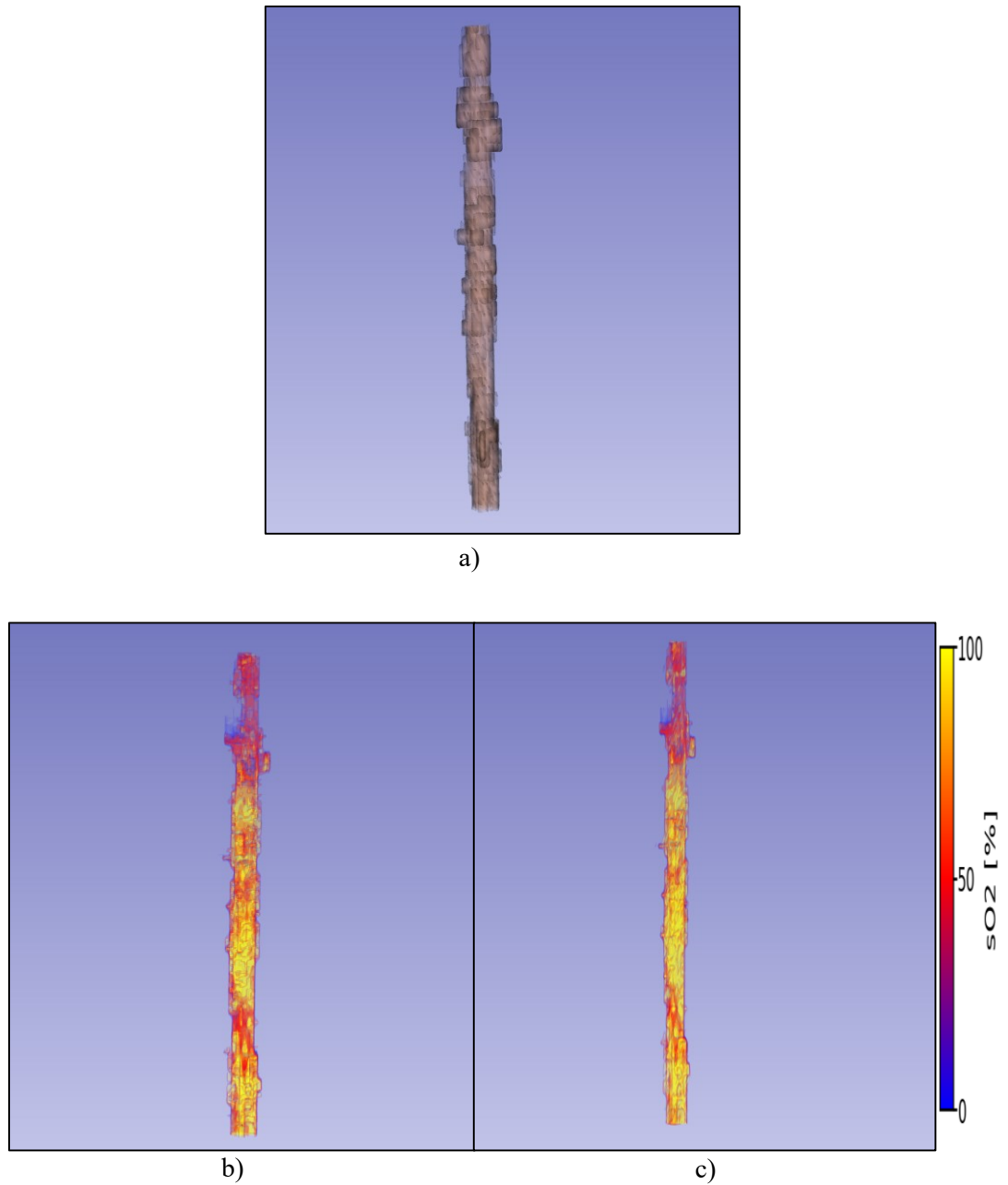


Figura 4.12: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare dell'avambraccio acquisito con gel pad a 60 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.

Le metriche di contrasto indicano che il contrasto tra la struttura segmentata e il background tende ad aumentare all'aumentare della densità di campionamento: il CNR e il gCNR crescono progressivamente passando da 20 a 40 e a 60 frame, sia nella versione standard sia nella versione con correzione energetica, indicando una migliore separabilità tra regione vascolare e background a densità di campionamento più elevate. Inoltre, i valori di contrasto risultano molto simili tra la versione standard e quella con correzione energetica, suggerendo che la correzione energetica non modifica in modo rilevante il contrasto strutturale del segnale PA800.

Densità di campionamento	CNR PA800 Standard	CNR PA800 EC	gCNR PA800 Standard	gCNR PA800 EC
20 frame	0,7648 $\pm$ 0,1764	0,7654 $\pm$ 0,1762	0,5778 $\pm$ 0,1200	0,5764 $\pm$ 0,1228
40 frame	0,8275 $\pm$ 0,1732	0,8283 $\pm$ 0,1733	0,6085 $\pm$ 0,1218	0,6091 $\pm$ 0,1216
60 frame	0,9159 $\pm$ 0,1449	0,9162 $\pm$ 0,1450	0,6574 $\pm$ 0,1187	0,6585 $\pm$ 0,1186

Tabella 4.9: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

L'effetto della correzione energetica sulla quantificazione della sO₂ nella regione vascolare ha determinato, in tutte le densità di campionamento considerate, un aumento dei valori medi di sO₂ rispetto alla versione standard. L'incremento risulta pari a +4,30 punti percentuali a 20 frame, +4,82 punti percentuali a 40 frame e +4,81 punti percentuali a 60 frame. Nel 90° percentile della distribuzione, la correzione energetica produce un aumento in ogni densità di campionamento, pari a circa +3,11 punti percentuali a 20 frame, +4,12 punti percentuali a 40 frame e +4,32 punti percentuali a 60 frame.

Valutando l'effetto della densità di campionamento, si nota che i valori medi di sO₂ non seguono un andamento monotono: nella versione standard si osserva una riduzione a 40 frame e un successivo aumento a 60 frame, mentre nella versione con correzione energetica si osserva un andamento analogo, con il valore più elevato a 60 frame. Questo suggerisce che, in questa condizione, l'aumento della densità di campionamento non determina necessariamente un incremento progressivo del valore medio di sO₂.

L'effetto della densità di campionamento risulta invece più apprezzabile valutando la variabilità intra-frame, che si riduce progressivamente all'aumentare del numero di frame. La variabilità inter-frame mostra una riduzione passando da 20 a 40 frame, seguita da un aumento a 60 frame, pur mantenendosi inferiore rispetto al valore osservato a 20 frame.

Densità di campionamento	sO ₂ media ± variabilità inter-frame Standard (%)	sO ₂ media ± variabilità inter-frame EC (%)
20 frame	62,1321 ± 14,2985	66,4346 ± 13,6579
40 frame	59,6080 ± 8,6618	64,4316 ± 8,4919
60 frame	62,1874 ± 12,0112	66,9995 ± 11,2187

Tabella 4.10: Valore medio di sO₂ e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.

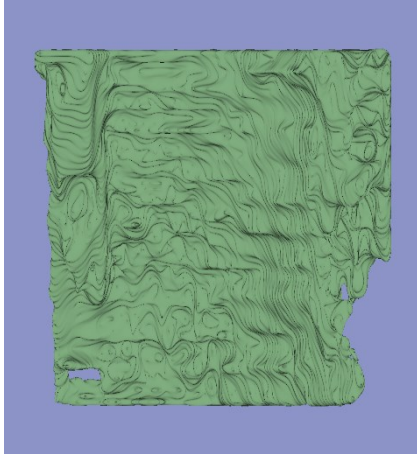
Densità di campionamento	Variabilità intra-frame Standard (%)	Variabilità intra-frame EC (%)
20 frame	22,7022	22,2699
40 frame	19,7767	19,3447
60 frame	17,1955	16,7209

Tabella 4.11: Variabilità intra-frame della sO₂ nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO₂ ottenute nei singoli frame.

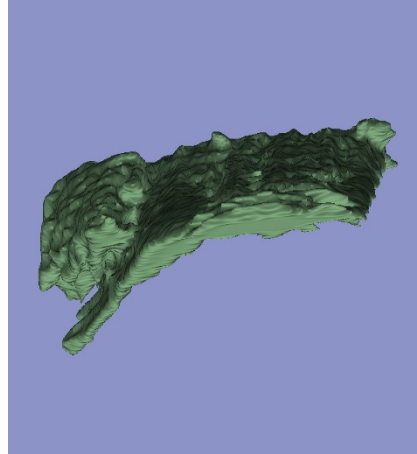
Densità di campionamento	90° percentile medio sO ₂ ± std Standard (%)	90° percentile medio sO ₂ ± std EC (%)
20 frame	90,1995 ± 10,3098	93,3109 ± 8,7878
40 frame	83,2125 ± 10,6866	87,3318 ± 10,1348
60 frame	81,3333 ± 8,7522	85,6493 ± 8,1363

Tabella 4.12: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO₂ nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.

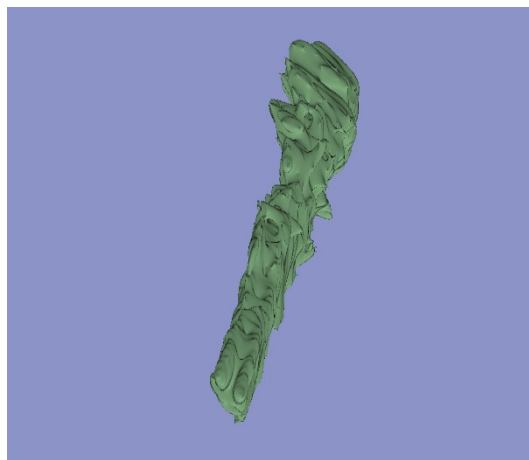
4.4 Studio del polso in acqua



a) Segmentazione della pelle (vista superiore)



b) Segmentazione della pelle (vista laterale)



c) Segmentazione vaso

Figura 4.13: Segmentazione tridimensionale del polso in acqua: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).

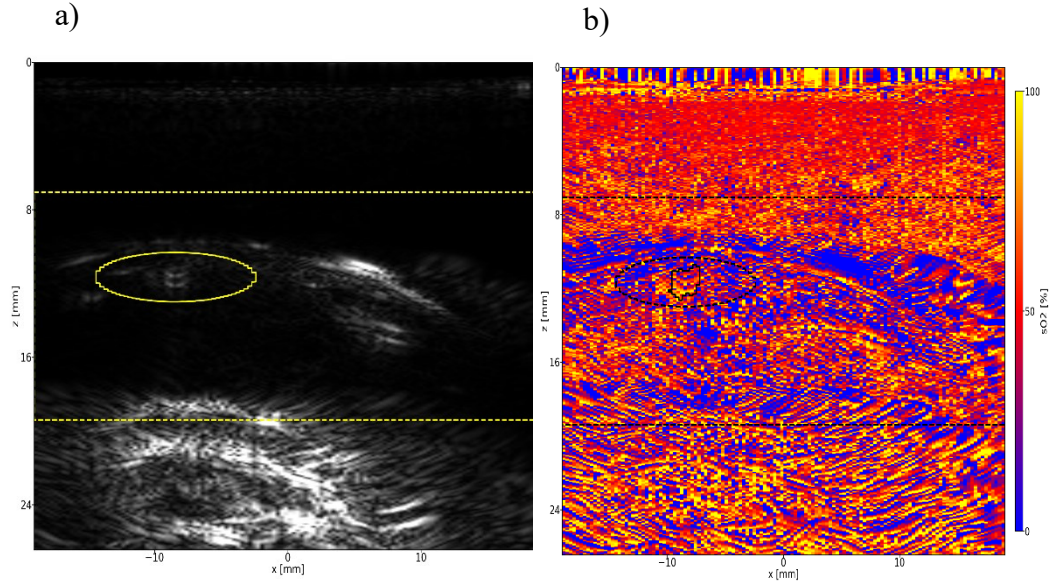


Figura 4.14: Esempio di analisi sul polso in acqua relativa al 15° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata nera e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera

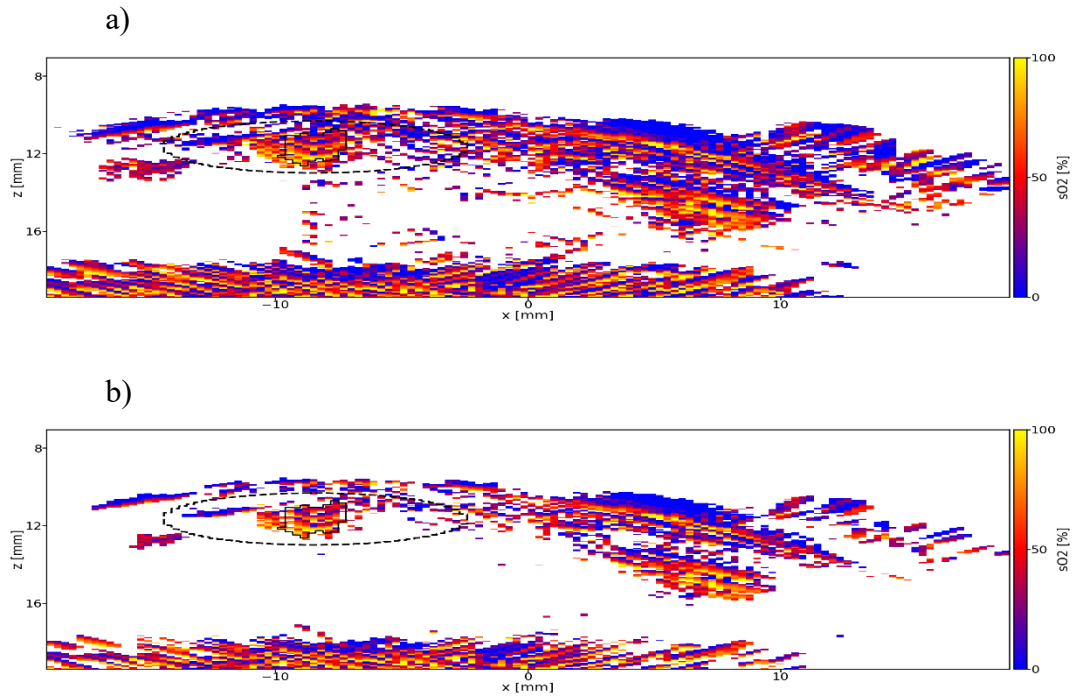


Figura 4.15: Confronto tra mappe di sO_2 del polso in acqua relative al 15° frame del volume acquisito a 40 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 20% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile.

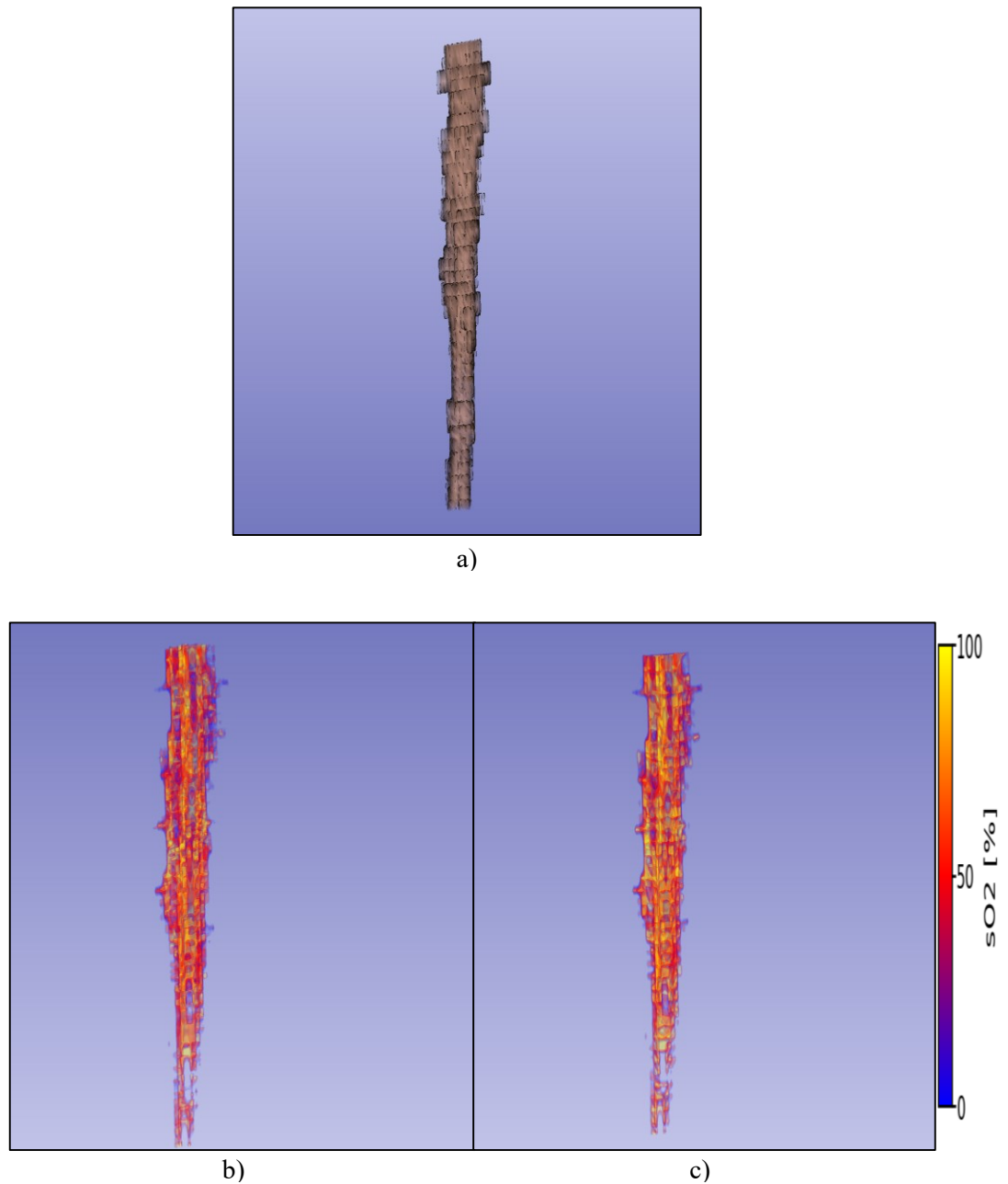


Figura 4.16: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare del polso acquisito in acqua a 40 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.

Le metriche di contrasto indicano che il contrasto tra la struttura segmentata e il background risulta complessivamente elevato. Il CNR presenta valori simili tra 20 e 40 frame, mentre aumenta in modo più evidente a 60 frame. Il gCNR mostra valori confrontabili tra 20 e 40 frame e un incremento più marcato a 60 frame, indicando una migliore separabilità tra regione vascolare e background alla densità di campionamento più elevata. Inoltre, i valori di contrasto risultano molto simili tra la versione standard e quella con correzione energetica, suggerendo che la correzione energetica non modifica in modo rilevante il contrasto strutturale del segnale PA800.

Densità di campionamento	CNR PA800 Standard	CNR PA800 EC	gCNR PA800 Standard	gCNR PA800 EC
20 frame	0,9443 $\pm$ 0,3177	0,9467 $\pm$ 0,3179	0,6029 $\pm$ 0,1722	0,6037 $\pm$ 0,1720
40 frame	0,9539 $\pm$ 0,2939	0,9536 $\pm$ 0,2919	0,5881 $\pm$ 0,1489	0,5883 $\pm$ 0,1483
60 frame	1,2795 $\pm$ 0,3627	1,2792 $\pm$ 0,3618	0,7942 $\pm$ 0,1679	0,7944 $\pm$ 0,1675

Tabella 4.13: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

L'effetto della correzione energetica sulla quantificazione della sO₂ nella regione vascolare ha determinato, in tutte le densità di campionamento considerate, un aumento dei valori medi di sO₂ rispetto alla versione standard. L'incremento risulta pari a +3,69 punti percentuali a 20 frame, +4,45 punti percentuali a 40 frame e +4,18 punti percentuali a 60 frame. Nel 90° percentile della distribuzione, la correzione energetica produce un aumento in ogni densità di campionamento, pari a circa +1,17 punti percentuali a 20 frame, +3,82 punti percentuali a 40 frame e +3,54 punti percentuali a 60 frame.

Valutando l'effetto della densità di campionamento, si nota che i valori medi di sO₂ non seguono un andamento lineare: sia nella versione standard sia nella versione con correzione energetica si osserva una riduzione a 40 frame e un successivo aumento a 60 frame. Questo suggerisce che, in questa condizione, l'aumento della densità di campionamento non determina necessariamente un incremento progressivo del valore medio di sO₂.

L'effetto della densità di campionamento risulta invece più apprezzabile valutando la variabilità intra-frame e inter-frame, che si riducono progressivamente all'aumentare del numero di frame, con valori paragonabili tra 40 frame e 60 frame.

Densità di campionamento	sO ₂ media ± variabilità inter-frame Standard (%)	sO ₂ media ± variabilità inter-frame EC (%)
20 frame	53,1387 ± 8,7981	56,8262 ± 9,0294
40 frame	50,4012 ± 6,3704	54,8560 ± 6,6876
60 frame	52,4453 ± 5,6474	56,6257 ± 5,5075

Tabella 4.14: Valore medio di sO₂ e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.

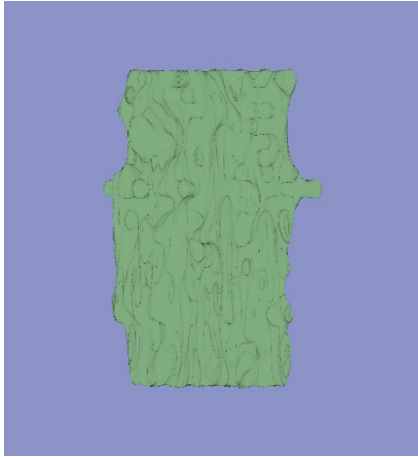
Densità di campionamento	Variabilità intra-frame Standard (%)	Variabilità intra-frame EC (%)
20 frame	32,7527	32,6103
40 frame	26,6472	26,3517
60 frame	26,1236	25,7976

Tabella 4.15: Variabilità intra-frame della sO₂ nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO₂ ottenute nei singoli frame.

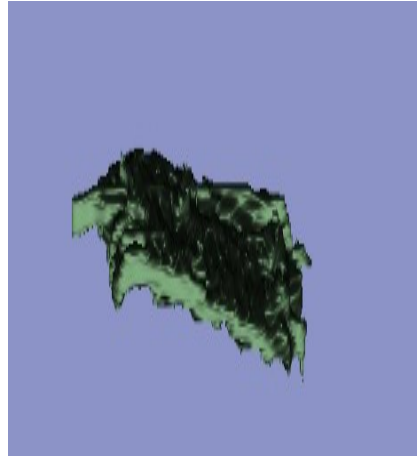
Densità di campionamento	90° percentile medio sO ₂ ± std Standard (%)	90° percentile medio sO ₂ ± std EC (%)
20 frame	97,1019 ± 5,8978	98,2725 ± 4,6767
40 frame	86,1969 ± 6,3682	90,0165 ± 6,2556
60 frame	86,4238 ± 6,1677	89,9616 ± 5,5613

Tabella 4.16: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO₂ nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.

4.5 Studio del polso con gel pad



a) Segmentazione pelle (vista superiore)



b) Segmentazione pelle (vista laterale)



c) Segmentazione vaso

Figura 4.17: Segmentazione tridimensionale del polso acquisito con gel pad: visualizzazione della superficie cutanea in vista superiore (a) e laterale (b), e segmentazione del vaso utilizzato per l'analisi quantitativa (c).

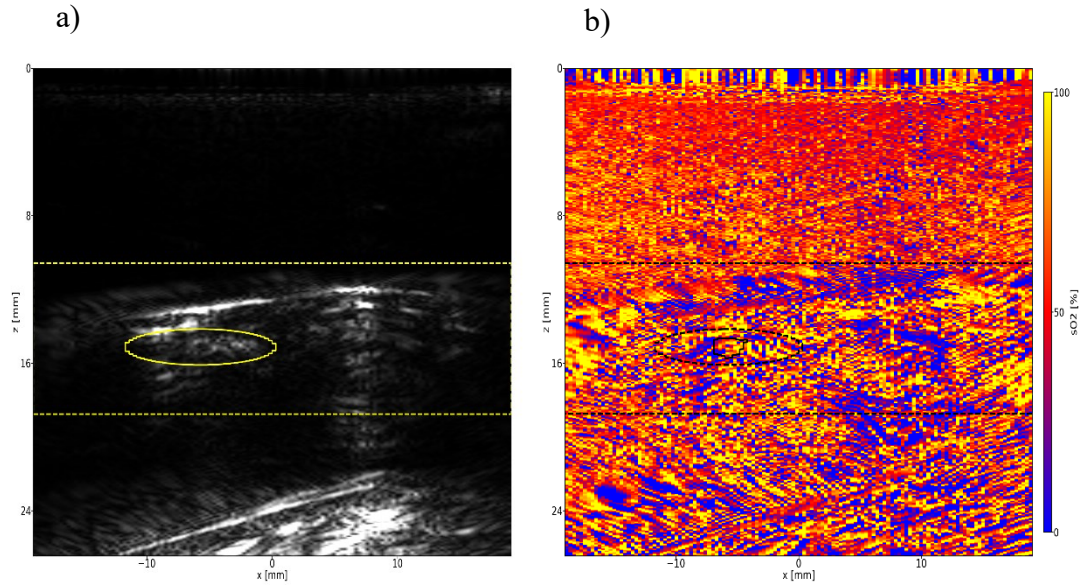


Figura 4.18: Esempio di analisi sul polso acquisito con gel pad relativa al 18° frame del volume acquisito a 20 frame ed elaborato con correzione energetica. (a) Immagine fotoacustica a 800 nm con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata gialla e ROI ellittica gialla selezionata per il calcolo delle metriche di contrasto tra strutture di interesse e background. (b) Corrispondente mappa di sO_2 , con regione di cropping indicata tramite linea tratteggiata nera e segmentazione dei vasi indicata con linea continua nera.

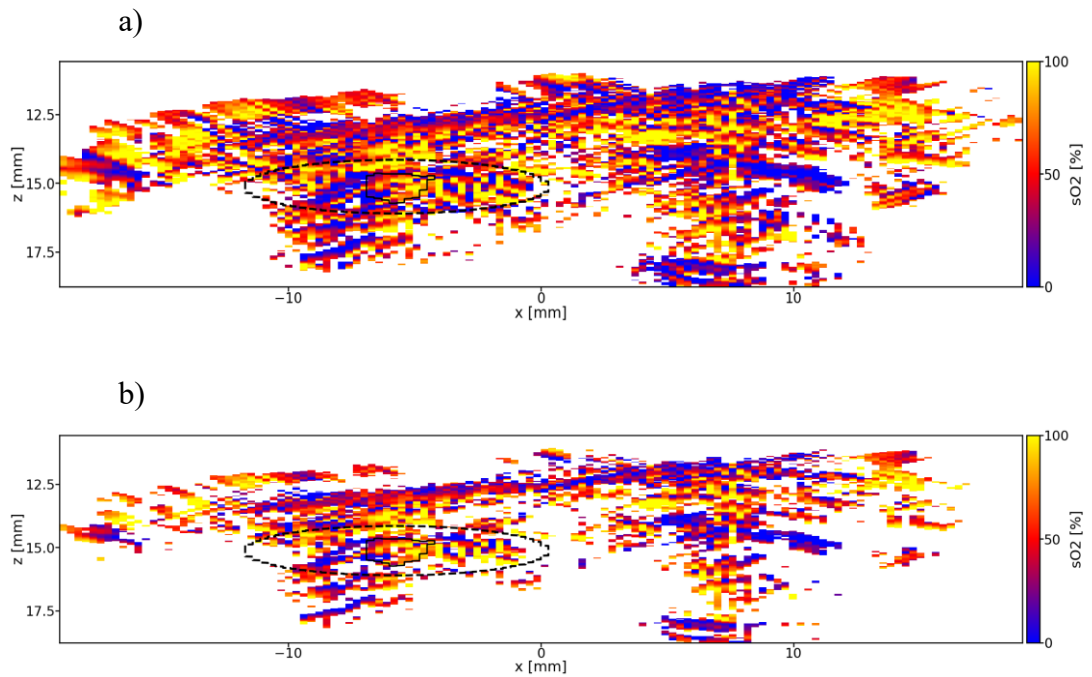


Figura 4.19: Confronto tra mappe di sO_2 del polso acquisito con gel pad relative al 18° frame del volume acquisito a 20 frame ed elaborato con correzione energetica, all'interno della regione di cropping. (a) Mappa ottenuta con soglia THb, pari al 20% del 95° percentile. (b) Mappa ottenuta con soglia THb unita alla soglia PA a 800 nm, pari al 40° percentile.

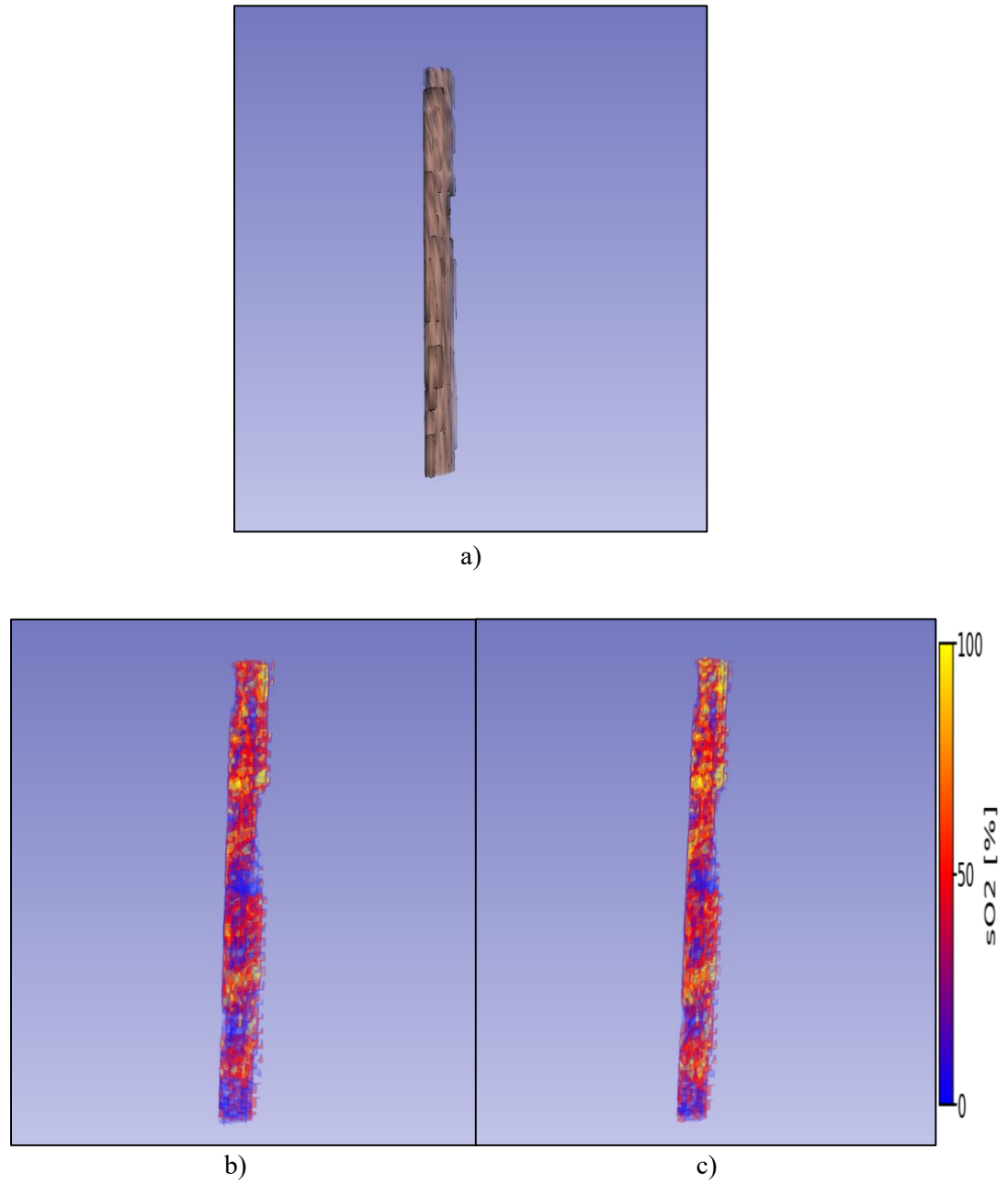


Figura 4.20: Ricostruzione tridimensionale della regione vascolare del polso acquisito con gel pad a 20 frame, ottenuta con preset US-fetal. (a) Ricostruzione PA a 800 nm, utilizzata come riferimento morfologico della struttura vascolare. (b) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con elaborazione standard. (c) Visualizzazione tridimensionale della distribuzione di sO₂ all'interno del vaso segmentato, ottenuta con correzione energetica.

Le metriche di contrasto indicano che, in questa condizione, il contrasto tra la struttura segmentata e il background non aumenta all'aumentare della densità di campionamento. Il CNR mostra una progressiva riduzione passando da 20 a 40 e a 60 frame, sia nella versione standard sia nella versione con correzione energetica. Il gCNR presenta invece una riduzione a 40 frame e un lieve aumento a 60 frame, mantenendosi comunque su valori inferiori rispetto a 20 frame. Inoltre, i valori ottenuti nella versione standard e in quella con correzione energetica risultano molto simili, indicando che la correzione energetica non modifica in modo apprezzabile il contrasto dell'immagine PA a 800 nm.

Densità di campionamento	CNR PA800 Standard	CNR PA800 EC	gCNR PA800 Standard	gCNR PA800 EC
20 frame	0,7256 $\pm$ 0,2527	0,7262 $\pm$ 0,2528	0,4738 $\pm$ 0,0826	0,4740 $\pm$ 0,0827
40 frame	0,5931 $\pm$ 0,2711	0,5931 $\pm$ 0,2709	0,4274 $\pm$ 0,1065	0,4286 $\pm$ 0,1058
60 frame	0,4894 $\pm$ 0,3236	0,4894 $\pm$ 0,3238	0,4453 $\pm$ 0,1579	0,4460 $\pm$ 0,1576

Tabella 4.17: Valore medio e deviazione standard di CNR e gCNR calcolati sull'immagine PA a 800 nm, per le tre densità di campionamento considerate, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

L'effetto della correzione energetica sulla quantificazione della sO₂ nella regione vascolare ha determinato, in tutte le densità di campionamento considerate, un aumento dei valori medi di sO₂ rispetto alla versione standard. L'incremento risulta pari a +5,98 punti percentuali a 20 frame, +7,24 punti percentuali a 40 frame e +7,06 punti percentuali a 60 frame.

Nel 90° percentile della distribuzione, la correzione energetica produce un aumento in ogni densità di campionamento, pari a circa +5,31 punti percentuali a 20 frame, +6,44 punti percentuali a 40 frame e +6,55 punti percentuali a 60 frame.

Valutando l'effetto della densità di campionamento, si nota che i valori medi di sO₂ aumentano passando da 20 a 40 frame, sia nella versione standard sia nella versione con correzione energetica. A 60 frame i valori risultano leggermente inferiori rispetto a 40 frame, ma comunque superiori rispetto a 20 frame. Questo andamento suggerisce che il miglioramento più marcato si osserva nel passaggio da 20 a 40 frame, mentre l'aumento ulteriore della densità di campionamento non determina un incremento progressivo del valore medio di sO₂.

L'effetto della densità di campionamento risulta invece più apprezzabile valutando la variabilità intra-frame e inter-frame, che si riducono progressivamente all'aumentare del numero di frame. Questo andamento suggerisce una maggiore stabilità della quantificazione della sO₂ passando da 20 a 40 e a 60 frame.

Densità di campionamento	sO ₂ media ± variabilità inter-frame Standard (%)	sO ₂ media ± variabilità inter-frame EC (%)
20 frame	42,0244 ± 11,4713	48,0012 ± 12,1651
40 frame	47,1169 ± 9,1503	54,3548 ± 8,9127
60 frame	45,7830 ± 8,9890	52,8478 ± 8,5234

Tabella 4.18: Valore medio di sO₂ e variabilità inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio corrisponde alla media delle medie dei singoli frame, mentre la variabilità inter-frame corrisponde alla deviazione standard delle medie dei singoli frame.

Densità di campionamento	Variabilità intra-frame Standard (%)	Variabilità intra-frame EC (%)
20 frame	28,5354	28,6619
40 frame	22,8293	22,5869
60 frame	15,6198	15,2880

Tabella 4.19: Variabilità intra-frame della sO₂ nella regione vascolare per le tre densità di campionamento considerate, confrontando elaborazione standard e correzione energetica. La metrica è stata calcolata come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO₂ ottenute nei singoli frame.

Densità di campionamento	90° percentile medio sO ₂ ± std Standard (%)	90° percentile medio sO ₂ ± std EC (%)
20 frame	83,9179 ± 12,0440	89,2240 ± 11,8565
40 frame	76,9613 ± 10,9698	83,3994 ± 10,0228
60 frame	65,4770 ± 10,5342	72,0308 ± 9,8736

Tabella 4.20: Valore medio e deviazione standard del 90° percentile della sO₂ nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per le tre densità di campionamento considerate e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. Il valore medio è ottenuto come media dei 90° percentili calcolati nei singoli frame, mentre la deviazione standard è calcolata sui 90° percentili dei singoli frame.

4.6 Riepilogo comparativo dei volumi analizzati

In ogni densità di campionamento e volume analizzato, la correzione energetica induce un incremento dei valori di sO_2 rispetto alla versione standard. Questo effetto è osservabile sia sulla sO_2 media sia sul 90° percentile, con aumenti più contenuti nei volumi acquisiti in acqua e più marcati nei volumi acquisiti con gel pad, in particolare nel polso. La correzione energetica agisce principalmente sulla stima funzionale della saturazione, aumentando i valori calcolati di sO_2 , mentre non modifica il contrasto strutturale dell'immagine PA a 800 nm, come confermato dai valori molto simili di CNR e gCNR tra versione standard e corretta.

Le misure di variabilità risultano maggiormente influenzate dalla densità di campionamento e dal distretto anatomico rispetto alla sola correzione energetica.

Considerando i volumi acquisiti in acqua, l'effetto della densità di campionamento sui valori medi di sO_2 mostra un andamento diverso tra avambraccio e polso.

Nell'avambraccio in acqua si osserva un lieve aumento progressivo della sO_2 media passando da 20 a 60 frame, sia nella versione standard sia nella versione con correzione energetica. Nel polso in acqua l'andamento non è monotono: i valori medi si riducono a 40 frame e aumentano nuovamente a 60 frame. Questo indica che, nella stessa condizione di accoppiamento acustico, l'effetto della densità di campionamento può variare in funzione del distretto anatomico analizzato.

Per quanto riguarda il percentile nei volumi acquisiti in acqua, l'andamento risulta differente rispetto alla media: nell'avambraccio in acqua il percentile presenta valori elevati a 20 frame e valori inferiori a 40 e 60 frame mentre nel polso in acqua si osserva una riduzione da 20 a 40 frame, per poi ottenere valori simili a 60 frame.

Nei volumi acquisiti in acqua, l'effetto della densità di campionamento risulta più evidente osservando le misure di variabilità. Nell'avambraccio in acqua la variabilità intra-frame si riduce progressivamente all'aumentare del numero di frame mentre la variabilità inter-frame mostra invece un andamento meno regolare, con un aumento a 40 frame e una successiva riduzione a 60 frame. Nel polso in acqua la variabilità intra-frame e inter-frame si riducono all'aumentare della densità di campionamento, indicando una maggiore stabilità della misura passando da 20 a 40 e a 60 frame.

Le metriche di contrasto nei volumi acquisiti in acqua mostrano che la correzione energetica non modifica il contrasto strutturale dell'immagine PA a 800 nm, poiché i valori di CNR e gCNR risultano simili tra versione standard e versione corretta.

Tuttavia, l'effetto della densità di campionamento non è identico nei due distretti: nell'avambraccio in acqua il CNR cresce lievemente con l'aumento dei frame, mentre il gCNR raggiunge il valore massimo a 40 frame mentre nel polso in acqua si osserva un incremento più evidente del contrasto a 60 frame, soprattutto per il gCNR. Nei volumi acquisiti con gel pad, l'effetto della densità di campionamento sui valori medi di sO_2 mostra un andamento non lineare. Nell'avambraccio con gel pad nella sO_2 media si osserva una riduzione a 40 frame e un successivo aumento a 60 frame, dove si ha il valore massimo. Nel polso con gel pad la sO_2 media aumenta da 20 a 40 frame e si riduce leggermente a 60 frame, rimanendo superiore rispetto a 20 frame.

Per quanto riguarda il percentile nei volumi acquisiti con gel pad, esso mostra un andamento decrescente: nell'avambraccio e nel polso acquisiti con gel pad il percentile tende a ridursi all'aumentare del numero di frame. Per quanto riguarda la variabilità nei volumi acquisiti con gel pad, la variabilità intra-frame mostra un

andamento lineare, riducendosi progressivamente all'aumentare del numero di frame sia nell'avambraccio sia nel polso. La variabilità inter-frame, invece, mostra un comportamento più variabile: nell'avambraccio con gel pad si riduce a 40 frame e aumenta parzialmente a 60 frame, rimanendo comunque inferiore rispetto a 20 frame mentre nel polso con gel pad tende a ridursi in modo più regolare con l'aumento della densità di campionamento.

Le metriche di contrasto nei volumi acquisiti con gel pad indicano che la correzione energetica non incide sul contrasto strutturale dell'immagine PA a 800 nm. Tuttavia, l'andamento rispetto alla densità di campionamento varia tra avambraccio e polso: nell'avambraccio con gel pad CNR e gCNR aumentano passando da 20 a 60 frame mentre nel polso con gel pad il CNR diminuisce all'aumentare del numero di frame e il gCNR mostra una riduzione a 40 frame seguita da un lieve aumento a 60 frame.

CNR PA800 media $\pm$ std	20 frame Standard	20 frame EC	40 frame Standard	40 frame EC	60 frame Standard	60 frame EC
Avam_water	1,3623 $\pm$ 0,3460	1,3630 $\pm$ 0,3453	1,4063 $\pm$ 0,2414	1,4063 $\pm$ 0,2413	1,4183 $\pm$ 0,2288	1,4182 $\pm$ 0,2278
Avam_gel pad	0,7648 $\pm$ 0,1764	0,7654 $\pm$ 0,1762	0,8275 $\pm$ 0,1732	0,8283 $\pm$ 0,1733	0,9159 $\pm$ 0,1449	0,9162 $\pm$ 0,1450
Polso_water	0,9443 $\pm$ 0,3177	0,9467 $\pm$ 0,3179	0,9539 $\pm$ 0,2939	0,9536 $\pm$ 0,2919	1,2795 $\pm$ 0,3627	1,2792 $\pm$ 0,3618
Polso_gel pad	0,7256 $\pm$ 0,2527	0,7262 $\pm$ 0,2528	0,5931 $\pm$ 0,2711	0,5931 $\pm$ 0,2709	0,4894 $\pm$ 0,3236	0,4894 $\pm$ 0,3238
Fantoccio	0,9669 $\pm$ 0,2141	0,9667 $\pm$ 0,2139	1,1181 $\pm$ 0,2969	1,1180 $\pm$ 0,2968	1,0592 $\pm$ 0,3094	1,0593 $\pm$ 0,3095

Tabella 4.21: Valori medi e deviazioni standard del CNR calcolato sull'immagine PA a 800 nm per i diversi volumi analizzati, alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

gCNR PA800 media $\pm$ std	20 frame Standard	20 frame EC	40 frame Standard	40 frame EC	60 frame Standard	60 frame EC
Avam_water	0,7167 $\pm$ 0,1141	0,7163 $\pm$ 0,1141	0,7244 $\pm$ 0,0700	0,7231 $\pm$ 0,0689	0,7203 $\pm$ 0,0744	0,7206 $\pm$ 0,0743
Avam_gel pad	0,5778 $\pm$ 0,1200	0,5764 $\pm$ 0,1228	0,6085 $\pm$ 0,1218	0,6091 $\pm$ 0,1216	0,6574 $\pm$ 0,1187	0,6585 $\pm$ 0,1186
Polso_water	0,6029 $\pm$ 0,1722	0,6037 $\pm$ 0,1720	0,5881 $\pm$ 0,1489	0,5883 $\pm$ 0,1483	0,7942 $\pm$ 0,1679	0,7944 $\pm$ 0,1675
Polso_gel pad	0,4738 $\pm$ 0,0826	0,4740 $\pm$ 0,0827	0,4274 $\pm$ 0,1065	0,4286 $\pm$ 0,1058	0,4453 $\pm$ 0,1579	0,4460 $\pm$ 0,1576
Fantoccio	0,7833 $\pm$ 0,0843	0,7836 $\pm$ 0,0844	0,8314 $\pm$ 0,0575	0,8315 $\pm$ 0,0577	0,8032 $\pm$ 0,0617	0,8032 $\pm$ 0,0618

Tabella 4.22: Valori medi e deviazioni standard del gCNR calcolato sull'immagine PA a 800 nm per i diversi volumi analizzati, alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica.

sO₂ media ± variabilità inter-frame %	20 frame Standard	20 frame EC	40 frame Standard	40 frame EC	60 frame Standard	60 frame EC
Avambraccio in acqua	50,9382 ± 3,4821	54,5589 ± 3,399	51,2713 ± 4,7486	56,0097 ± 4,5425	52,6727 ± 4,0258	57,304 ± 3,9611
Avambraccio con gel pad	62,1321 ± 14,2985	66,4346 ± 13,6579	59,608 ± 8,6618	64,4316 ± 8,4919	62,1874 ± 12,0112	66,9995 ± 11,2187
Polso in acqua	53,1387 ± 8,7981	56,8262 ± 9,0294	50,4012 ± 6,3704	54,856 ± 6,6876	52,4453 ± 5,6474	56,6257 ± 5,5075
Polso con gel pad	42,0244 ± 11,4713	48,0012 ± 12,1651	47,1169 ± 9,1503	54,3548 ± 8,9127	45,783 ± 8,989	52,8478 ± 8,5234
Fantoccio	41,1408 ± 14,8290	44,5812 ± 15,6621	50,4583 ± 12,4053	53,9967 ± 11,5897	47,4019 ± 10,5540	50,8490 ± 10,2793

Tabella 4.23: Valori medi di sO₂ e deviazioni standard inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per tutti i volumi analizzati alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica. Il valore medio è stato calcolato come media delle medie di sO₂ ottenute nei singoli frame, mentre la deviazione standard inter-frame è stata calcolata sulle medie dei singoli frame.

Δ% sO₂ media : EC - STANDARD	20 frame	40 frame	60 frame
Avambraccio in acqua	+3,6207	+4,7384	+4,6313
Avambraccio con gel pad	+4,3025	+4,8236	+4,8122
Polso in acqua	+3,6875	+4,4548	+4,1805
Polso con gel pad	+5,9769	+7,2379	+7,0648
Fantoccio	+3,4403	+3,5384	+3,4471

Tabella 4.24: Differenza della sO₂ media tra elaborazione con correzione energetica e versione standard, calcolata come EC – Standard, per ciascun volume e per le tre densità di campionamento considerate.

Media 90° Percentile sO ₂ ± std %	20 frame Standard	20 frame EC	40 frame Standard	40 frame EC	60 frame Standard	60 frame EC
Avambraccio in acqua	98,5298 ± 2,6032	99,4681 ± 1,5028	79,4065 ± 6,4409	83,8428 ± 5,8995	79,8495 ± 8,1212	84,0493 ± 7,6965
Avambraccio con gel pad	90,1995 ± 10,3098	93,3109 ± 8,7878	83,2125 ± 10,6866	87,3318 ± 10,1348	81,3333 ± 8,7522	85,6493 ± 8,1363
Polso in acqua	97,1019 ± 5,8978	98,2725 ± 4,6767	86,1969 ± 6,3682	90,0165 ± 6,2556	86,4238 ± 6,1677	89,9616 ± 5,5613
Polso con gel pad	83,9179 ± 12,0440	89,2240 ± 11,8565	76,9613 ± 10,9698	83,3994 ± 10,0228	65,4770 ± 10,5342	72,0308 ± 9,8736
Fantoccio	82,8569 ± 15,5384	85,7981 ± 14,6331	83,2074 ± 12,3248	86,5401 ± 11,0124	73,2429 ± 14,6209	76,6317 ± 14,1034

Tabella 4.25: Valori medi del 90° percentile della sO₂ e relative deviazioni standard inter-frame nella regione vascolare, calcolati sui valori validi di sO₂ per i diversi volumi analizzati alle tre densità di campionamento, confrontando la versione standard e quella con correzione energetica. Il 90° percentile è stato calcolato per ciascun frame sui valori validi di sO₂, mentre i valori riportati rappresentano la media e la deviazione standard dei 90° percentili ottenuti nei singoli frame.

Δ% sO ₂ media 90° percentile: EC - STANDARD	20 frame	40 frame	60 frame
Avambraccio in acqua	+0,9383	+4,4363	+4,1998
Avambraccio con gel pad	+3,1114	+4,1193	+4,316
Polso in acqua	+1,1706	+3,8196	+3,5378
Polso con gel pad	+5,3061	+6,4381	+6,5538
Fantoccio	+2,9412	+3,3327	+3,3888

Tabella 4.26: Variazione del 90° percentile della sO₂ tra versione con correzione energetica e versione standard, calcolata come EC – Standard, nei diversi volumi e per le tre densità di campionamento.

Variabilità intra-frame %	20 frame Standard	20 frame EC	40 frame Standard	40 frame EC	60 frame Standard	60 frame EC
Avambraccio in acqua	34,2416	33,9009	22,7298	22,6464	21,5747	21,1854
Avambraccio con gel pad	22,7022	22,2699	19,7767	19,3447	17,1955	16,7209
Polso in acqua	32,7527	32,6103	26,6472	26,3517	26,1236	25,7976
Polso con gel pad	28,5354	28,6619	22,8293	22,5869	15,6198	15,2880
Fantoccio	29,3484	29,6803	24,7289	24,8057	20,7169	20,7615

Tabella 4.27: Valori di variabilità intra-frame della sO₂ nella regione vascolare, calcolati per i diversi volumi analizzati alle tre densità di campionamento e confrontati tra elaborazione standard e con correzione energetica. La variabilità intra-frame è stata ottenuta come media delle deviazioni standard dei valori validi di sO₂ calcolate nei singoli frame.

Capitolo 5

Discussione

Nel complesso, i risultati ottenuti sui volumi in vivo e in vitro mostrano che la correzione energetica determina un incremento dei valori di sO_2 rispetto alla versione standard, considerando sia la media sia il percentile della regione vascolare. Questo può essere spiegato considerando che, nell'elaborazione standard, eventuali variazioni energetiche tra impulsi successivi non vengono compensate e possono introdurre variazioni di ampiezza nel segnale PA non legate a reali differenze di assorbimento. In seguito queste variazioni si ripercuotono nella stima delle componenti di Hb e HbO_2 , alterando il rapporto tra i segnali utilizzati per il calcolo della sO_2 .

La correzione energetica riduce questo effetto riscaldando ogni acquisizione in funzione dell'energia effettiva dell'impulso laser: i dati grezzi di ciascuna acquisizione sono stati normalizzati rispetto al rapporto tra l'energia dell'impulso corrispondente e l'energia massima di riferimento, così da compensare le variazioni energetiche tra impulsi successivi. Questo riscaldamento non rappresenta un aumento reale del segnale generato dal tessuto, ma modifica l'ampiezza del segnale PA da cui derivano i valori della mappa sO_2 . L'incremento sistematico dei valori di sO_2 osservato dopo correzione non dipende dall'aumento assoluto dell'intensità del segnale, ma dal diverso bilanciamento dei segnali utilizzati per stimare le componenti di Hb e HbO_2 . Poiché nei dati analizzati questo bilanciamento ha portato a una stima più elevata della componente ossigenata, i valori di sO_2 sono superiori rispetto all'elaborazione standard.

Nella maggior parte delle condizioni analizzate, i valori medi di sO_2 ottenuti a 40 e 60 frame risultano superiori rispetto a quelli osservati a 20 frame e si associano a una riduzione della variabilità, soprattutto intra-frame. Questo andamento suggerisce che l'incremento del numero di frame possa contribuire non solo ad aumentare la stima media della sO_2 , ma anche a rendere la distribuzione dei valori più compatta, stabile e meno dipendente da variazioni locali del segnale. La variabilità inter-frame mostra un andamento simile: nella maggior parte delle condizioni analizzate essa tende a ridursi alle densità di campionamento più elevate, con valori a 40 e 60 frame paragonabili tra loro. In sintesi, il passaggio da 20 frame a densità di campionamento maggiori sembra contribuire a una maggiore robustezza della stima di sO_2 sia all'interno dei singoli frame sia lungo il volume acquisito, con differenze legate al distretto anatomico e alla condizione di acquisizione considerata.

L'analisi del 90° percentile, sensibile ai valori molto elevati o ai picchi locali, mostra una sua progressiva diminuzione all'aumento della densità di campionamento, indicando una minore incidenza di valori elevati nella regione vascolare segmentata. Questa riduzione può essere interpretata come una distribuzione meno influenzata da valori estremi: considerata insieme alla diminuzione della variabilità intra-frame, la diminuzione del percentile può suggerire che, alle densità di campionamento

maggiori, i valori di sO_2 tendano a distribuirsi in modo più stabile. Su questa base, la misura può risultare più robusta perché è meno dipendente da picchi locali e da valori elevati che dipendono da fluttuazioni isolate del segnale.

Per quanto riguarda le metriche di contrasto, i valori di CNR e gCNR risultano elevati, indicando un adeguato contrasto tra la regione vascolare segmentata e il fondo dell'immagine PA a 800 nm. La normalizzazione energetica non determina variazioni di queste metriche, confermando che la correzione agisce principalmente sulla quantificazione funzionale della sO_2 . Tuttavia, in alcune condizioni, l'aumento della densità di campionamento ha portato a un miglioramento del contrasto nei volumi acquisiti in acqua e nell'avambraccio con gel pad.

La scelta del tipo di accoppiamento acustico sembra influenzare in modo diverso la variabilità inter-frame e intra-frame della sO_2 . Nei dati analizzati, le acquisizioni in acqua mostrano una minore variabilità inter-frame, suggerendo una maggiore stabilità temporale della misura tra frame consecutivi. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che l'acqua costituisce un mezzo di accoppiamento continuo e omogeneo tra sonda e tessuto, riducendo le discontinuità e le variazioni di contatto tra frame consecutivi.

L'accoppiamento con gel pad mostra variabilità intra-frame inferiore, indicando una minore dispersione spaziale dei valori di sO_2 all'interno del singolo frame. Questo suggerisce che il gel pad possa favorire una distribuzione più uniforme del segnale nella regione vascolare analizzata. Nonostante ciò, essendo un mezzo di accoppiamento più dipendente dalla pressione esercitata dalla sonda, dallo spessore dello strato interposto e dall'adattamento alla superficie cutanea, può risultare più sensibile a variazioni delle condizioni di acquisizione tra frame successivi, contribuendo a una maggiore variabilità inter-frame.

Capitolo 6

Limitazioni e sviluppi futuri

L'analisi condotta ha evidenziato alcuni aspetti che potrebbero essere migliorati in studi successivi. I principali aspetti critici riguardano la compensazione solo parziale degli effetti della fluence ottica, la segmentazione semi-automatica e i micromovimenti durante le acquisizioni in vivo. Per ciascuno di questi aspetti possono essere individuate strategie future in grado di aumentare l'accuratezza quantitativa e la riproducibilità del metodo.

Correzione della fluence ottica

La correzione energetica applicata in questo lavoro ha permesso di normalizzare il segnale fotoacustico rispetto alle variazioni di energia del laser tra le diverse acquisizioni, ma questa procedura non tiene conto della distribuzione spaziale della fluence ottica all'interno del tessuto. Poiché la fluence varia con la profondità, lo scattering, l'assorbimento e le proprietà ottiche dei tessuti, una normalizzazione globale dell'energia non è sufficiente a compensare l'attenuazione locale della luce e ciò può introdurre errori nella quantificazione della sO_2 , soprattutto nelle regioni più profonde o in tessuti con proprietà ottiche eterogenee.

Una strategia efficace consiste nell'utilizzo di simulazioni Monte Carlo per stimare la distribuzione locale della luce all'interno del tessuto e compensare l'effetto della fluence nella ricostruzione quantitativa. Questo approccio si basa sulla modellazione del trasporto dei fotoni nel mezzo: nel metodo Monte Carlo, il tessuto viene suddiviso in voxel, ai quali vengono assegnate specifiche proprietà ottiche, come coefficienti di assorbimento e di scattering. La propagazione della luce viene simulata seguendo il percorso di un elevato numero di fotoni, i quali possono subire scattering, essere assorbiti o depositare energia localmente nei diversi voxel. Ciò porta alla generazione di mappe di fluence specifiche per ciascuna lunghezza d'onda utilizzata nell'acquisizione e quindi alla compensazione del segnale prima dello spectral unmixing [31] [32].

Automazione della segmentazione vascolare

La procedura di segmentazione semi-automatica indica un aspetto critico perché, nonostante l'uso di soglie di intensità per segmentare le strutture vascolari nelle immagini fotoacustiche, il processo ha richiesto un intervento manuale da parte dell'operatore, sia nella scelta della soglia più adeguata sia nel post-processing della maschera ottenuta. Questo aspetto introduce una componente di soggettività nell'analisi, perché la segmentazione della regione vascolare può variare in funzione dell'operatore e della qualità del segnale del singolo volume. Infatti, nelle acquisizioni caratterizzate da intensità più basse o presenza di forte rumore, la

distinzione tra vaso e tessuto circostante risulta più difficile. Inoltre, una soglia troppo bassa può includere regioni non vascolari, mentre una soglia troppo elevata può escludere porzioni reali del vaso, influenzando di conseguenza il calcolo delle metriche quantitative di sO_2 .

Una possibile soluzione consiste nell'utilizzo di reti neurali convoluzionali (CNN), come FCN, U-Net e architetture ibride: il modello viene addestrato su immagini annotate, nelle quali la maschera di riferimento identifica la regione vascolare e, durante l'addestramento, la rete impara ad associare le caratteristiche spaziali e di intensità dell'immagine alla presenza dei vasi, producendo successivamente una maschera automatica della struttura vascolare. Approcci di questo tipo permettono di distinguere tra background, profilo cutaneo e profilo vascolare, riducendo la dipendenza dall'operatore e garantendo una maggiore efficienza in termini di riproducibilità e standardizzazione dell'analisi [33] [34].

Accuratezza dello spectral unmixing

Un ulteriore aspetto critico riguarda l'algoritmo di spectral unmixing utilizzato per la stima della sO_2 . L'approccio lineare basato su vincoli di non negatività può fornire risultati non accurati in condizioni realistiche, poiché la stima dipende dalla scelta e dal numero delle lunghezze d'onda, dalla presenza di spectral coloring, dal condizionamento del problema inverso e dal mantenimento di un adeguato rapporto segnale-rumore. Il modello assume una relazione lineare tra il segnale fotoacustico multispettrale e il contributo dei cromofori, per cui eventuali distorsioni dello spettro acquisito possono alterare la separazione tra Hb e HbO₂, determinando stime di sO_2 non necessariamente rappresentative dei valori fisiologici reali. Una possibile soluzione riguarda l'utilizzo di approcci basati su reti neurali, come il learned spectral decoloring. A differenza del linear unmixing, che stima separatamente Hb e HbO₂ e calcola la saturazione, il learned spectral decoloring stima direttamente la sO_2 a partire dallo spettro fotoacustico multispettrale: durante la fase di addestramento, il modello riceve in ingresso spettri associati a valori noti di sO_2 e impara la relazione tra la forma dello spettro acquisito e la saturazione corrispondente. Successivamente, viene applicato alle immagini reali e, per ogni punto dell'immagine, l'algoritmo considera i valori di pressione iniziale misurati alle diverse lunghezze d'onda, ottenendo uno spettro fotoacustico da cui stimare direttamente la sO_2 . Questo approccio non utilizza una combinazione lineare dei cromofori, ma utilizza un modello addestrato per associare lo spettro misurato al valore di saturazione stimato [35] [36].

Capitolo 7

Conclusione

Il presente lavoro ha permesso di valutare l'effetto della densità di campionamento sulla quantificazione della sO_2 in dati fotoacustici volumetrici, considerando il ruolo della correzione energetica del segnale. I risultati ottenuti evidenziano che entrambi gli aspetti incidono sulla quantificazione delle mappe di saturazione di ossigeno. La correzione energetica determina un aumento sistematico dei valori di sO_2 , mentre l'aumento della densità di campionamento contribuisce generalmente a rendere la misura più stabile.

Il beneficio dell'aumento della densità di campionamento dipende anche dal distretto anatomico analizzato e dalla condizione di accoppiamento acustico utilizzata. Nei dati analizzati, le acquisizioni in acqua mostrano una minore variabilità inter-frame, indicando una maggiore stabilità temporale della misura. Le acquisizioni con gel pad, pur mostrando una minore dispersione intra-frame, risultano complessivamente meno favorevoli in termini di stabilità temporale. In sintesi, l'accoppiamento in acqua, anche se più complesso da attuare, risulta preferibile quando l'obiettivo principale è massimizzare la stabilità della quantificazione della sO_2 .

Il confronto tra le diverse configurazioni mostra che a 20 frame la quantificazione è più sensibile alla variabilità tra frame e alla presenza di valori locali estremi. Il passaggio da 20 a 40 frame rappresenta un miglioramento rilevante in termini di stabilità della misura, mentre l'acquisizione a 60 frame offre in molti casi un ulteriore vantaggio di stabilità, pur mostrando risultati complessivamente paragonabili ai 40 frame. Sulla base di questi risultati, la configurazione a 40 frame può essere considerata un buon compromesso operativo, poiché mantiene una buona stabilità quantitativa riducendo, rispetto alla configurazione a 60 frame, il numero di immagini da acquisire ed elaborare, i tempi di scansione e il carico computazionale. Questo studio conferma che l'ottimizzazione congiunta della densità di campionamento, della correzione energetica e della modalità di accoppiamento acustico può contribuire a rendere l'imaging fotoacustico multispettrale più robusto, riproducibile e adatto ad applicazioni quantitative.

Bibliografia

- [1] Wang, L. V., and Hu, S. “Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs.” In: *Science* 335.6075 (2012), pp. 1458–1462 (cit. a p. 13).
- [2] Mucong Li, Yuqi Tang, and Junjie Yao. “Photoacoustic tomography of blood oxygenation: A mini review”. In: *Photoacoustics* 10 (2018), pp. 65–73 (cit. a p. 13).
- [3] Aladin Carovac, Fahrudin Smajlovic, and Dzelaludin Junuzovic. “Application of Ultrasound in Medicine”. In: *Acta Informatica Medica* 19.3 (2011), pp. 168–171 (cit. alle pp. 15, 16).
- [4] Catalina Poggi and Martin Palavecino. “Ultrasound principles and instrumentation”. In: *Surgery Open Science* 18 (2024), pp. 123–128 (cit. alle pp. 15, 16).
- [5] Xu, M., Wang, L. V. “Photoacoustic imaging in biomedicine”. In: *Review of Scientific Instruments*, vol. 77, n. 4, 2006, 041101, pp. 041101-1–041101-22 (cit. a p. 16).
- [6] Beard, P. “Biomedical photoacoustic imaging”. In: *Interface Focus*, vol. 1, n. 4, 2011, pp. 602–631 (cit. alle pp. 16, 17, 20, 23, 24).
- [7] Pulkkinen, A., Cox, B. T., Arridge, S. R., Kaipio, J. P., Tarvainen, T. “Bayesian parameter estimation in spectral quantitative photoacoustic tomography”. In: *Proceedings of SPIE*, vol. 9708, Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2016, 97081G, 2016, pp. 97081G-1–97081G-8 (cit. a p. 18).
- [8] Perekatova, V. V., Subochev, P. V., Kirillin, M. Y., Sergeeva, E. A., Kurakina, D. A., Orlova, A. G., Postnikova, A. S., Turchin, I. V. “Quantitative techniques for extraction of blood oxygenation from multispectral optoacoustic measurements”. In: *Laser Physics Letters*, vol. 16, 2019, 116201 (cit. a p. 18).
- [9] Amos Danielli, Christopher P. Favazza, Konstantin Maslov, and Lihong V. Wang. “Single-wavelength functional photoacoustic microscopy in biological tissue”. In: *Optics Letters* 36.5 (2011), pp. 769–771 (cit. a p. 18).
- [10] Stratis Tzoumas and Vasilis Ntziachristos. “Spectral unmixing techniques for optoacoustic imaging of tissue pathophysiology”. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 375.2107 (2017), 20170262 (cit. a p. 19).
- [11] Ding, L., Deán-Ben, X. L., Burton, N. C., Sobol, R. W., Ntziachristos, V., Razansky, D. “Constrained inversion and spectral unmixing in multispectral optoacoustic tomography”. In: *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 36, n. 8, 2017, pp. 1676–1685 (cit. a p. 19).
- [12] Grasso, V., Holthof, J., Jose, J. “An automatic unmixing approach to detect tissue chromophores from multispectral photoacoustic imaging”. In: *Sensors*, vol. 20, n. 11, 2020, 3235 (cit. alle pp. 19, 20).
- [13] Kratkiewicz, K., Manwar, R., Zhou, Y., Mozaffarzadeh, M., Avanaki, K. “Technical considerations in the Verasonics research ultrasound platform for developing a photoacoustic imaging system”. In: *Biomedical Optics Express*, vol. 12, n. 2, 2021, pp. 1050–1084 (cit. a p. 19).

- [14] Dolet, A., Ammanouil, R., Petrilli, V., Richard, C., Tortoli, P., Vray, D., Varray, F. “In Vitro and In Vivo Multispectral Photoacoustic Imaging for the Evaluation of Chromophore Concentration”. In: *Sensors*, vol. 21, n. 10, 2021, 3366 (cit. a p. 20).
- [15] Kirchner, T., Sattler, F., Gröhl, J., Maier-Hein, L. “An open-source software platform for translational photoacoustic research and real-time clinical translation”. In: *Photoacoustics*, vol. 14, 2019, pp. 30–38 (cit. a p. 21).
- [16] Song, W., Wei, Q., Liu, W., Liu, T., Yi, J., Sheibani, N., Fawzi, A. A., Linsenmeier, R. A., Jiao, S., Zhang, H. F. “A combined method to quantify the retinal metabolic rate of oxygen using photoacoustic ophthalmoscopy and optical coherence tomography”. In: *Scientific Reports*, vol. 4, 2014, 6525 (cit. a p. 21).
- [17] Nguyen, V. P., Paulus, Y. M. “Photoacoustic Ophthalmoscopy: Principle, Application, and Future Directions”. In: *Journal of Imaging*, vol. 4, n. 12, 2018, 149 (cit. a p. 21).
- [18] Prakash, R., Manwar, R., Avanaki, K. “Evaluation of 10 current image reconstruction algorithms for linear array photoacoustic imaging”. In: *Journal of Biophotonics*, vol. 17, n. 3, 2024, e202300117 (cit. alle pp. 21, 22, 23).
- [19] Perrot, V., Polichetti, M., Varray, F., Garcia, D. “So you think you can DAS? A viewpoint on delay-and-sum beamforming”. In: *Ultrasonics*, vol. 111, 2021, 106309 (cit. alle pp. 21, 22).
- [20] Mozaffarzadeh, M., Mahloojifar, A., Orooji, M., Kratkiewicz, K., Adabi, S., Nasiriavanaki, M. “Linear-array photoacoustic imaging using minimum variance-based delay multiply and sum adaptive beamforming algorithm”. In: *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, n. 2, 2018, 026002, pp. 1–15 (cit. a p. 22).
- [21] Kirchner, T., Sattler, F., Gröhl, J., Maier-Hein, L. “Signed Real-Time Delay Multiply and Sum Beamforming for Multispectral Photoacoustic Imaging”. In: *Journal of Imaging*, vol. 4, n. 10, 2018, 121 (cit. a p. 22).
- [22] Changyeop Lee, Seonghee Cho, Donghyun Lee, Jonghun Lee, Jung-Il Park, Hyun-Jae Kim, Soo Hyun Park, Wonseok Choi, Unyong Kim, and Chulhong Kim. “Panoramic volumetric clinical handheld photoacoustic and ultrasound imaging”. In: *Photoacoustics* 31 (2023), 100512 (cit. a p. 23).
- [23] Manwar, R., Lara, J. B., Prakash, R., Ranjbaran, S. M., Avanaki, K. “Randomized multi-angle illumination for improved linear array photoacoustic computed tomography in brain”. In: *Journal of Biophotonics*, vol. 15, n. 6, 2022, e202200016 (cit. a p. 23).
- [24] Lee, C., Kim, C., Park, B. “Review of Three-Dimensional Handheld Photoacoustic and Ultrasound Imaging Systems and Their Applications”. In: *Sensors*, vol. 23, n. 19, 2023, 8149 (cit. a p. 24).
- [25] Karpouk, A. B., Aglyamov, S. R., Mallidi, S., Shah, J., Scott, W. G., Rubin, J. M., Emelianov, S. Y. “Combined ultrasound and photoacoustic imaging to detect and stage deep vein thrombosis: phantom and ex vivo studies”. In: *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, n. 5, 2008, 054061 (cit. a p. 24).
- [26] Verasonics, Inc. Vantage Sequence Programming Manual. Verasonics, Inc., ultima modifica novembre 2022 (cit. alle pp. 25, 26).
- [27] Pi-Martín, I., Cebrecos, A., García-Garrigós, J. J., Jiménez, N., Camarena, F. “Spatial resolution and reconstructed size accuracy using advanced beamformers in

- linear array-based PAT systems”. In: *Photoacoustics*, vol. 34, 2023, 100576 (cit. a p. 27).
- [28] D. Li, L. Humayun, E. Vienneau, T. Vu, and J. Yao, “Seeing through the Skin: Photoacoustic Tomography of Skin Vasculature and Beyond,” *JID Innovations*, vol. 1, no. 3, p. 100039, 2021, doi: 10.1016/j.xjidi.2021.100039 (cit. a p. 35).
- [29] R. Bro and S. De Jong, “A fast non-negativity-constrained least squares algorithm”. In: *Journal of Chemometrics*, vol. 11, n. 5, 1997, pp. 393–401, doi: 10.1002/(SICI)1099-128X(199709/10) 11:5<393: AID-CEM483>3.0.CO;2-L (cit. a p. 38).
- [30] A. Rodriguez-Molares, O. M. H. Rindal, J. D’hooge, S.-E. Måsøy, A. Austeng, and H. Torp, “The generalized contrast-to-noise ratio.” In: 2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), pp. 1–4, 2018, doi: 10.1109/ULTSYM.2018.8580101 (cit. a p. 41).
- [31] Z. Sun, Y. Hou, M. Sun, and Q. Meng, “Quantitative photoacoustic tomography with light fluence compensation based on radiance Monte Carlo model.” In: *Physics in Medicine & Biology*, vol. 68, no. 6, p. 065009, 2023, doi: 10.1088/1361-6560/acbe90 (cit. a p. 78).
- [32] S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: a review.” In: *Physics in Medicine & Biology*, vol. 58, no. 11, pp. R37–R61, 2013, doi: 10.1088/0031-9155/58/11/R37 (cit. a p. 78).
- [33] A. Y. Yuan, Y. Gao, L. Peng, L. Zhou, J. Liu, S. Zhu, and W. Song, “Hybrid deep learning network for vascular segmentation in photoacoustic imaging.” In: *Biomedical Optics Express*, vol. 11, no. 11, pp. 6445–6457, 2020, doi: 10.1364/BOE.409246 (cit. a p. 79).
- [34] C. D. Ly, V. T. Nguyen, T. H. Vo, S. Mondal, S. Park, J. Choi, T. T. H. Vu, C.-S. Kim, and J. Oh, “Full-view in vivo skin and blood vessels profile segmentation in photoacoustic imaging based on deep learning.” In: *Photoacoustics*, vol. 25, p. 100310, 2022, doi: 10.1016/j.pacs.2021.100310 (cit. a p. 79).
- [35] J. Gröhl, T. Kirchner, T. J. Adler, L. Hacker, N. Holzwarth, A. Hernández-Aguilera, M. A. Herrera, E. Santos, S. E. Bohndiek, and L. Maier-Hein, “Learned spectral decoloring enables photoacoustic oximetry.” In: *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 6565, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83405-8 (cit. a p. 79).
- [36] T. Kirchner, M. Jaeger, and M. Frenz, “Machine learning enabled multiple illumination quantitative optoacoustic oximetry imaging in humans.” In: *Biomedical Optics Express*, vol. 13, no. 5, pp. 2655–2667, 2022, doi: 10.1364/BOE.455514 (cit. a p. 79).