

Università degli Studi di Bari “Aldo Moro” – Dottorato in Fisica XXXII ciclo

Relazione attività dottorato – Primo Anno

Microscopio Brillouin per l’oftalmologia

Dottorando: *Aldo Mazzilli*

Tutor: *Milena D’Angelo*
Roberto Bellotti

1 Introduzione

La microscopia ad effetto Brillouin è una innovativa tecnica ottica sviluppata per la caratterizzazione biomeccanica di tessuti. Grazie a questa tecnica si possono ricavare le proprietà viscoelastiche di materiali in modo non invasivo e senza contatto, lasciando inalterate le proprietà del materiale in esame. In particolare, questa tecnica di imaging è stata applicata in oftalmologia per lo studio della rigidità del tessuto corneale su campioni *ex vivo* [1]. Per creare una mappatura accurata delle proprietà elastiche della cornea su pazienti, è necessario sviluppare uno strumento che, monitorando la posizione dell’occhio, riesca a determinare con precisione il punto che ha prodotto lo shift Brillouin misurato [2, 3]. Il paziente, durante la fase di acquisizione del segnale, può compiere dei movimenti che inficiano il punto di acquisizione dello scattering Brillouin. È importante tenere sotto controllo non solo la posizione nel piano trasverso dell’occhio, ma anche la componente lungo la direzione assiale rispetto al piano di incidenza della radiazione utilizzata (la respirazione può provocare una variazione in profondità tra i 150 e i 200 μm). Obiettivo della mia attività di ricerca durante il primo anno di dottorato è stato quello di studiare tecniche di eye imaging/tracking che consentano di determinare la posizione dell’occhio non solo sul piano trasversale ($x - y$), ma anche lungo la direzione assiale (z). Questo è un primo passo per ottenere un dispositivo che, utilizzando la microscopia ad effetto Brillouin, possa essere utilizzato nella pratica clinica ed essere accurato, preciso, user-friendly e robusto.

2 Tecniche di Eye-Tracking

Durante la fase iniziale del mio dottorato di ricerca mi sono occupato dello studio delle tecniche di eye-tracking presenti allo stato dell'arte. I sistemi maggiormente utilizzati per la rivelazione della posizione della pupilla e per il gaze-tracking sono basati sull'utilizzo di una o più videocamere. Per la rivelazione dell'occhio tramite l'utilizzo di camere, è necessario utilizzare dei modelli che considerino la variabilità dell'aspetto e della dinamica dell'occhio stesso, ma che siano sufficientemente efficienti dal punto di vista computazionale. L'aspetto dell'occhio è influenzato da diversi fattori: angolo di visione, posa della testa, colore, struttura, condizioni di luce, posizione dell'iride all'interno della presa degli occhi, stato dell'occhio (apertura/chiusura). L'immagine dell'occhio acquisita tramite una camera è caratterizzata da diverse distribuzioni di intensità e da diverse forme che caratterizzano le pupille, l'iride e la cornea. Esistono diversi metodi utilizzati per la rivelazione delle zone d'interesse dell'occhio che si basano sulla forma [4–6] o sull'aspetto [7–9] o metodi ibridi che considerano entrambe le caratteristiche [10, 11]. L'approccio basato sulla forma utilizza dei modelli geometrici (modello ellittico o complesso) e delle misure di similarità (es. Likelihood) per individuare le regioni caratteristiche dell'occhio. I metodi basati sull'aspetto (modello di immagine o metodi olistici) rilevano e seguono gli occhi direttamente, in base all'aspetto fotometrico (distribuzione del colore o risposta del filtro utilizzato). Questo tipo di approccio utilizza tecniche statistiche per analizzare la distribuzione dell'intensità dell'intero aspetto dell'oggetto. I metodi ibridi combinano l'utilizzo dei metodi precedenti, sfruttando i vantaggi di ciascuno dei due [12].

Altri metodi per la rivelazione della posizione dell'occhio utilizzano, oltre alle camere, delle sorgenti di illuminazione infrarossa (IR). La sorgente di luce infrarossa utilizzata ha una lunghezza d'onda ($\lambda \sim 780 - 880 \mu m$) tale da essere rilevata anche dalle più comuni camere in commercio, ma invisibile all'occhio umano in modo da non provocare la distrazione del paziente che può portare a movimenti della pupilla. È possibile posizionare la sorgente IR in diverse configurazioni [12, 13]. Se una sorgente luminosa si trova vicino all'asse ottico della camera, configurazione *on-axis*, l'immagine catturata mostra una pupilla luminosa. Invece, quando la sorgente luminosa si trova lontano dall'asse ottico della camera, configurazione *off-axis*, l'immagine rivelata mostra una pupilla scura [Figura 1] [12]. I modelli che utilizzano l'illuminazione da sorgente luminosa IR, sfruttano la differenza delle immagini ottenute con le due diverse configurazioni. Le sorgenti *on-axis* e quelle *off-axis* vengono implementate nello stesso apparato e sincronizzate con il frame-rate della camera in modo da guidare l'acquisizione delle immagini. Le immagini di pupilla luminosa e scura ottenute vengono processate tramite un algoritmo di differenza delle immagini che consente la segmentazione della pupilla. [13–15]. Questo metodo risulta più robusto rispetto agli altri precedentemente citati, inoltre è invariante rispetto alle condizioni di luce esterna. Questi metodi costituiscono la fase preliminare per lo sviluppo di un

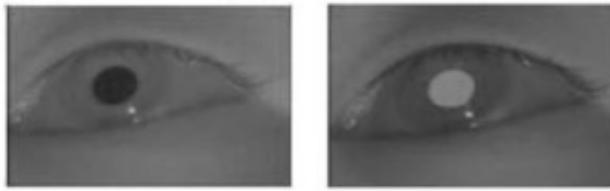


Figura 1: Immagine di pupilla scura e luminosa ottenute con l'illuminazione con sorgente IR.

dispositivo di eye-tracking, consentendo l'individuazione bidimensionale della posizione della pupilla.

In molte applicazioni è importante stabilire non solo la posizione dell'occhio, ma anche la direzione del sguardo (*gaze*). Le tecniche principali di gaze-tracking, che consentono di ricavare la posizione tridimensionale del centro della cornea, utilizzano la riflessione di un fascio luminoso da parte della superficie esterna della cornea [Figura 2]. Infatti, quando un fascio luminoso incide sulla superficie curva della cornea, produce diverse riflessioni che si verificano nel passaggio dalla cornea al cristallino. La prima riflessione, che avviene sulla superficie esterna della cornea, è chiamata *glint* ed è la più usata nei dispositivi di eye-tracking.

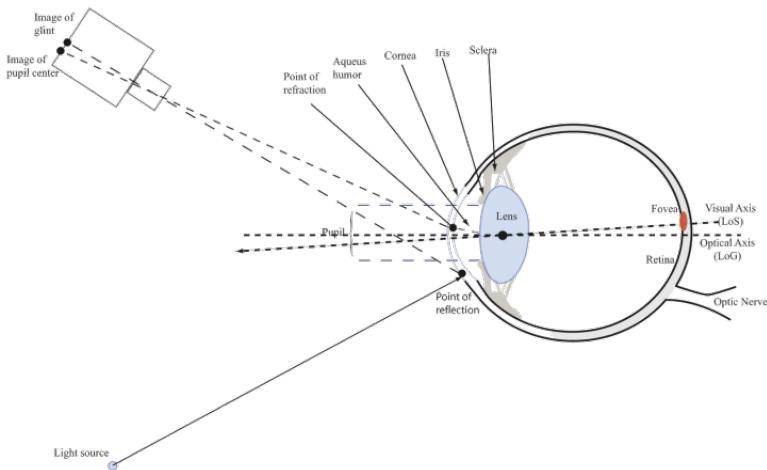


Figura 2: Modello generale per il Gaze Tracking

Il modello per la determinazione della direzione dello sguardo in 3D, sfrutta a sua volta un modello delle strutture fisiche comuni dell'occhio (es. bulbo oculare approssimativamente sferico con raggio 12 – 13 mm). Come direzione dello sguardo può essere considerato o l'asse ottico (linea che connette il centro della pupilla, il centro della cornea e il centro del bulbo oculare) o l'asse visivo (la linea che connette la fovea e il centro della cornea). La conoscenza della posizione 3D del centro del bulbo oculare o del centro della cornea è un indicatore diretto per la posizione dell'occhio nello spazio 3D. Nelle implementazioni più semplici, sono utilizzate una camera e una sorgente luminosa. Questo tipo di apparato richiede, però, molte conoscenze aggiuntive che riguardano le proprietà caratteristiche dell'occhio e l'intera calibra-

zione dell'apparato sperimentale. Con una curvatura della cornea nota, è possibile trovare il centro della cornea usando una camera e due sorgenti di luce e applicando dei semplici modelli geometrici [16]. Quando i parametri caratteristici dell'occhio sono sconosciuti, sono necessarie almeno due sorgenti di luce e due camere per la determinazione del centro della cornea. Aggiungendo una o più sorgenti luminose si ottiene un passo avanti per tenere sotto controllo spostamenti della testa [12, 16, 17]. Questi sistemi risultano abbastanza accurati, ma richiedono una calibrazione continua della geometria del sistema e della camera che introducono errori aggiuntivi.

Le tecniche di eye-tracking basate sull'utilizzo di camere e sorgenti luminose che ho avuto modo di studiare in letteratura, risultano di facile implementazione, ma richiedono l'utilizzo di modelli per la curvatura della superficie esterna della cornea, le distanze intraoculari e la calibrazione dell'apparato implementato. Queste tecniche consentono di determinare la coordinata assiale di un punto specifico dell'occhio, il centro della cornea, con un'accuratezza $\sim 5 \div 10 \text{ mm}$ [16, 18, 19]. Un'incertezza nella determinazione della posizione assiale dell'occhio di questo ordine di grandezza, risulta molto grande rispetto agli spostamenti che si ha bisogno di considerare ($150 - 200 \text{ }\mu\text{m}$).

Per queste ragioni, ho considerato di utilizzare delle tecniche ottiche per la misura di distanze e spostamenti.

3 OCT

In letteratura sono riportate diverse tecniche interferometriche per misurare distanze e spostamenti. Negli ultimi anni hanno trovato diverse applicazioni in ambito medico e biologico sensori interferometrici chiamati “*optical coherence tomography*” (OCT).

L'Optical Coherence Tomography è una tecnica di imaging ottico non invasiva che produce immagini in tempo reale, 2D a sezione trasversale e volumetrica 3D di un campione. Questa tecnica fornisce informazioni strutturali sul campione in base alla luce scatterata da diversi strati di materiale all'interno del campione, producendo immagini con risoluzione del micron. Oltre all'alta risoluzione, la natura non-invasiva e senza contatto di OCT lo rende adatto per l'imaging di campioni come il tessuto biologico.

Lo schema di base è quello dell'interferometro di Michelson in cui lo specchio semiriflettente è sostituito da un fiber coupler, che ha quattro terminali costituiti da fibre ottiche [20]. Il passaggio da un interferometro in aria ad uno in fibra è conveniente sia perché permette maggiore flessibilità nella disposizione e allineamento dei componenti sia perché è più facile da implementare per scopi clinici. Per la ricostruzione dell'immagine tridimensionale si uniscono i profili assiali di riflettività (A-line) acquisiti in vari punti sulla superficie dell'oggetto che si

sta analizzando. La scansione laterale è effettuata per mezzo di uno specchio galvanometrico che permette spostamenti rapidi e piccoli (comparabili con la risoluzione laterale che è tipicamente di qualche μm) [21]. Si misura quindi un'intensità variabile nel tempo, da cui il nome di time domain OCT (TD-OCT). Questo approccio all'acquisizione dell'A-line presenta però una grande limitazione: il tempo di acquisizione. Infatti l'inerzia meccanica dello specchio pone un limite inferiore ai tempi di acquisizione e se il campione è in movimento, come spesso accade in vivo, si possono manifestare artefatti. La soluzione è fornita dall'analisi del contributo che ogni lunghezza d'onda della sorgente fornisce alla figura di interferenza. Nasce quindi la seconda generazione di OCT nota come Fourier domain.

Nell'OCT Fourie domain (FD-OCT) si utilizza una sorgente con monocromatica. Una sorgente non monocromatica può essere pensata come la sovrapposizione di infinite sorgenti monocromatiche, ciascuna con una propria intensità di radiazione. La FD-OCT applica la trasformata di Fourier al profilo di intensità in uscita dall'interferometro. Lo schema di un setup di OCT nel dominio di Fourier è molto simile a quello nel dominio del tempo con un importante differenza: bisogna misurare il contributo di ogni singola lunghezza d'onda alla figura di interferenza. Le strategie utilizzate sono due:

- *swept source*: si fa variare nel tempo la lunghezza d'onda della sorgente; le swept sources disponibili commercialmente permettono velocità di scansione elevate ed anche il rivelatore, che solitamente è un fotodiodo.
- *spectral domain*: si utilizza una sorgente ad ampio spettro e la luce in uscita dall'interferometro viene analizzata con uno spettrometro. Una scelta comune è utilizzare un reticolo di diffrazione che disperde la luce su una CCD lineare

I sistemi FD-OCT hanno una accuratezza nella misura della distanza limitata dall'intervallo di frequenza della scansione e pertanto offrono un'accuratezza di $\sim 10 \mu\text{m}$. Il loro principale vantaggio rispetto ai sistemi TD-OCT è la velocità di scansione potenzialmente molto maggiore [21].

Abbiamo quindi deciso di sviluppare per la nostra applicazione un dispositivo che unisca le tecniche di eye-tracking bidimensionale, già in uso presso i laboratori dell'Università del Maryland (College Park), con un interferometro di FD-OCT per la determinazione assiale del punto di interesse nell'occhio.

4 Correlation Plenoptic Imaging

In questo primo anno dottorato mi sono occupato del miglioramento dell'apparato sperimentale di Correlation Plenoptic Imaging (CPI) riportato nell'articolo in fase di revisione [22].

Questa attività di laboratorio mi ha consentito da un lato di portare a termine un progetto di ricerca intrapreso precedentemente (*Assegno di ricerca: “Progettazione e realizzazione di un dispositivo di imaging remoto”*), dall’altro mi ha consentito di acquisire delle competenze utili per la realizzazione della mia attività di ricerca. Infatti, ho avuto modo di utilizzare una camera CMOS, acquisendo familiarità con le tecniche di acquisizione e post-processing di immagini. Inoltre si è verificata un’esperienza utile per migliorare l’utilizzo di dispositivi e componenti di laboratorio. Il setup realizzato è mostrato in figura 3.

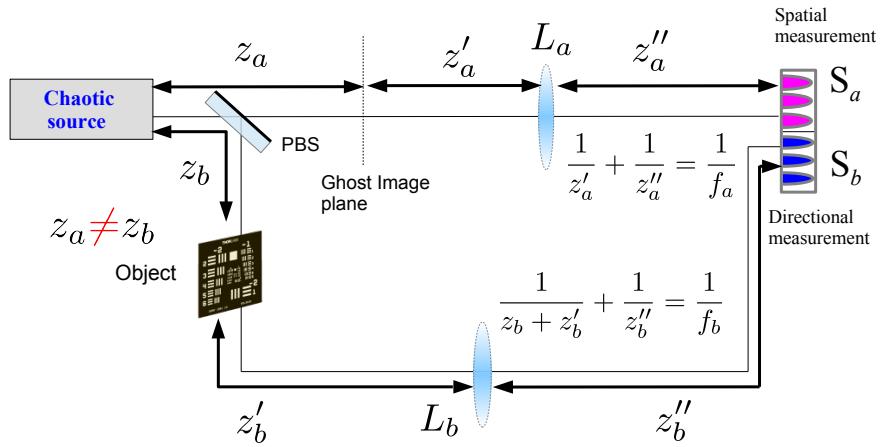


Figura 3: Setup sperimentale realizzato per l’esperimento di CPI. I sensori spaziali e angolari S_a e S_b sono regioni diverse di una camera sCMOS.

La sorgente caotica è ottenuta utilizzando un laser CW a singolo modo di lunghezza d’onda $\lambda = 532\text{ nm}$ e potenza variabile fino a 5 W (Azur Light Systems ALS-532nm-SF). Il fascio, dopo aver attraversato un beam expander che ne aumenta la deviazione standard trasversale a $\sigma = 1.08\text{ mm}$, passa attraverso un filtro polarizzatore, per poi raggiungere un disco di vetro smerigliato rotante a 0.05 Hz , a distanza di circa 4 cm dal centro. La luce diffusa attraverso il disco viene divisa per mezzo di un beam splitter polarizzatore (PBS); la combinazione di polarizzatore e PBS consente di bilanciare le intensità sui sensori S_a e S_b , che sono regioni diverse della stessa camera sCMOS (Hamamatsu ORCA-Flash 2.8 camera C11440-10C), allo scopo di massimizzare il rapporto segnale rumore. Il fascio riflesso passa attraverso l’oggetto di interesse (1951 USAF resolution test target), posto a distanza z_b dal disco, e si propaga attraverso una lente (L_b) di lunghezza focale $f_b = 300\text{ mm}$, per poi raggiungere il sensore angolare S_b sul quale è riprodotta l’immagine della sorgente con ingrandimento $M_b = 1$. Il fascio trasmesso si propaga attraverso una lente (L_a) di lunghezza focale $f_a = 125\text{ mm}$, riproducendo sul sensore spaziale S_a , l’immagine del piano immagine della GI con ingrandimento $M_a = 1$. Il piano immagine della GI si trova a $z_a = 92\text{ mm}$ dalla sorgente e coincide con il piano oggetto di L_a . La camera è caratterizzata da pixel di lato pari a $3.6\text{ }\mu\text{m}$. È stato eseguito un binning dei pixel

della fotocamera per abbinare i pixel effettivi δ_x (spaziale) e δ_u (angolare) con le risoluzioni spaziale e angolare.

In fase di elaborazione dei dati, è stato eseguito un ulteriore binning 10×10 sulla regione del sensore della camera dedicato alla misura angolare. Per ciascuna misura, effettuata posizionando l'oggetto di cui volevamo fare l'immagine a diverse distanze rispetto alla sorgente, sono stati acquisiti 50 000 fotogrammi ad un frame rate di 45.4 s^{-1} , con un tempo di esposizione pari a $t_{exp} = 21 \mu\text{s}$. Questo valore corrisponde al tempo minimo consentito dalla fotocamera ed è circa 100 più piccolo del tempo di coerenza della luce prodotta dalla sorgente.

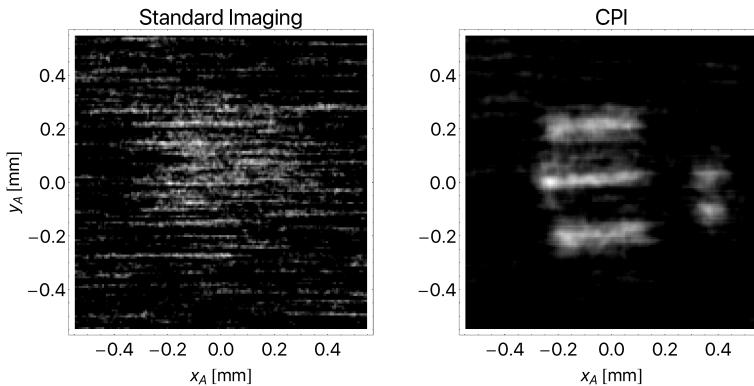


Figura 4: Confronto sperimentale tra l'immagine fuori fuoco ottenuta mettendo l'oggetto (elemento 3 del gruppo 2 del test target USAF 1951) in $z_b - z_a = 21 \text{ mm}$ (a sinistra), e la corrispondente immagine CPI rifocalizzata (a destra).

I fotogrammi acquisiti sono stati elaborati per valutare la correlazione spazio-temporale, applicando un algoritmo sviluppato in ambiente di lavoro Mathematica per la rifocalizzazione dell'immagine sfuocata. Successivamente sono stati applicati un filtro gaussiano passa-banda e una soglia nel dominio di Fourier per rimuovere il background non correlato.

5 Prospettive future

Lo studio e l'attività di laboratorio svolta nel primo anno di dottorato, mi hanno consentito di delineare la direzione sperimentale da intraprendere per la realizzazione di un dispositivo di eye-tracking. Combinando tecniche di eye-tracking bidimensionale $x - y$, già implementate presso i laboratori dell'università del Maryland, con un interferometro OCT per la rivelazione della coordinata assiale z si può ottenere un dispositivo che monitori, con la precisione richiesta, la posizione dell'occhio. Gli obiettivi successivi della mia attività di ricerca sono

- la realizzazione sperimentale dell'apparato;
- test preliminari per verificare il corretto funzionamento del dispositivo realizzato;
- test clinici effettuati su pazienti.

6 Sintesi del primo anno

Pubblicazioni:

- ✓ Milena D'Angelo , [Aldo Mazzilli](#), Francesco V. Pepe, Augusto Garuccio, Vincenzo Tamma, “Characterization of two distant double-slits by chaotic light second-order interference” *Scientific Reports*, 7 (2017).
- Francesco V. Pepe, Francesco Di Lena, [Aldo Mazzilli](#), Eitan Edrei, Augusto Garuccio, Giuliano Scarcelli, and Milena D'Angelo, “Diffraction-limited plenoptic imaging with correlated light” *In fase di revisione (Physical Review Letters)*.

Scuole:

- ✓ “Brillouin Microscope for Ophthalmology” (poster), “International Training School - Beyond Conventional Tissue Imaging”, Bari 22 - 24 febbraio 2017.

Conferenze:

- ✓ Partecipazione al 37 congresso SISFA, Bari 26 - 29 settembre 2017.

Altre attività:

- ✓ Visita guidata ai laboratori imaging e quantum technologies, Conferenza Italiana Studenti di Fisica, Bari 11 - 12 maggio 2017.

Corsi frequentati:

- ✓ How to prepare a technical speech in English.
- ✓ Programing with Python for Data Science.
- ✓ Introduction to parallel Computing and GPU Programming using CUDA.
- Interpolation Methods e techniques for Exsperimental Data Analysis. (Lezioni terminate ad ottobre 2017)
- Management and knowledge of European research model and promotion of research results.
- LabView introductory Course.
- Statistical and computational model for physics data analysis. (Lezioni terminate ad ottobre 2017)

Riferimenti bibliografici

- [1] G. Scarcelli and S. H. Yun, “Confocal brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging,” *Nature photonics*, vol. 2, no. 1, pp. 39–43, 2008.
- [2] G. Scarcelli, R. Pineda, and S. H. Yun, “Brillouin optical microscopy for corneal biomechanics,” *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 53, no. 1, pp. 185–190, 2012.
- [3] G. Scarcelli, S. Kling, E. Quijano, R. Pineda, S. Marcos, and S. H. Yun, “Brillouin microscopy of collagen crosslinking: Noncontact depth-dependent analysis of corneal elastic modulusbrillouin microscopy of collagen crosslinking,” *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 54, no. 2, pp. 1418–1425, 2013.
- [4] A. Villanueva and R. Cabeza, “Models for gaze tracking systems,” *Journal on Image and Video Processing*, vol. 2007, no. 3, p. 4, 2007.
- [5] R. H. Carpenter, *Movements of the Eyes*, 2nd Rev. Pion Limited, 1988.
- [6] D. Tweed and T. Vilis, “Geometric relations of eye position and velocity vectors during saccades,” *Vision research*, vol. 30, no. 1, pp. 111–127, 1990.
- [7] A. L. Yuille, P. W. Hallinan, and D. S. Cohen, “Feature extraction from faces using deformable templates,” *International journal of computer vision*, vol. 8, no. 2, pp. 99–111, 1992.
- [8] D. H. Yoo and M. J. Chung, “A novel non-intrusive eye gaze estimation using cross-ratio under large head motion,” *Computer Vision and Image Understanding*, vol. 98, no. 1, pp. 25–51, 2005.
- [9] R. Newman, Y. Matsumoto, S. Rougeaux, and A. Zelinsky, “Real-time stereo tracking for head pose and gaze estimation,” in *Automatic Face and Gesture Recognition, 2000. Proceedings. Fourth IEEE International Conference on*, pp. 122–128, IEEE, 2000.
- [10] K.-M. Lam and H. Yan, “Locating and extracting the eye in human face images,” *Pattern recognition*, vol. 29, no. 5, pp. 771–779, 1996.
- [11] Z. Zhu, K. Fujimura, and Q. Ji, “Real-time eye detection and tracking under various light conditions,” in *Proceedings of the 2002 symposium on Eye tracking research & applications*, pp. 139–144, ACM, 2002.

- [12] D. W. Hansen and Q. Ji, “In the eye of the beholder: A survey of models for eyes and gaze,” *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, vol. 32, no. 3, pp. 478–500, 2010.
- [13] C. H. Morimoto, D. Koons, A. Amir, and M. Flickner, “Pupil detection and tracking using multiple light sources,” *Image and vision computing*, vol. 18, no. 4, pp. 331–335, 2000.
- [14] A. Tomono, M. Iida, and Y. Kobayashi, “A tv camera system which extracts feature points for non-contact eye movement detection,” in *Optics, Illumination, and Image Sensing for Machine Vision IV*, vol. 1194, pp. 2–21, International Society for Optics and Photonics, 1990.
- [15] Y. Ebisawa and S.-I. Satoh, “Effectiveness of pupil area detection technique using two light sources and image difference method,” in *Engineering in Medicine and Biology Society, 1993. Proceedings of the 15th Annual International Conference of the IEEE*, pp. 1268–1269, IEEE, 1993.
- [16] C. H. Morimoto, A. Amir, and M. Flickner, “Detecting eye position and gaze from a single camera and 2 light sources,” in *Pattern Recognition, 2002. Proceedings. 16th International Conference on*, vol. 4, pp. 314–317, IEEE, 2002.
- [17] C. H. Morimoto and M. R. Mimica, “Eye gaze tracking techniques for interactive applications,” *Computer vision and image understanding*, vol. 98, no. 1, pp. 4–24, 2005.
- [18] Z. Zhu and Q. Ji, “Novel eye gaze tracking techniques under natural head movement,” *IEEE Transactions on biomedical engineering*, vol. 54, no. 12, pp. 2246–2260, 2007.
- [19] S.-W. Shih, Y.-T. Wu, and J. Liu, “A calibration-free gaze tracking technique,” in *Pattern Recognition, 2000. Proceedings. 15th International Conference on*, vol. 4, pp. 201–204, IEEE, 2000.
- [20] M. E. Brezinski, *Optical coherence tomography: principles and applications*. Academic press, 2006.
- [21] G. Berkovic and E. Shafir, “Optical methods for distance and displacement measurements,” *Advances in Optics and Photonics*, vol. 4, no. 4, pp. 441–471, 2012.
- [22] F. V. Pepe, F. Di Lena, A. Mazzilli, A. Garuccio, G. Scarcelli, and M. D’Angelo, “Diffraction-limited plenoptic imaging with correlated light,” *arXiv preprint arXiv:1703.03830*, 2017.