

TEZA DE ABILITARE

Cercetări în holografia digitală a obiectelor reale și virtuale. Aplicații în biomedicină și comunicații optice

Research in digital holography of real and virtual objects. Applications in biomedicine and optical communications.

Conf. dr. fiz. Mona Mihăilescu

REZUMAT

Această Teză de Abilitare prezintă o parte a cercetărilor pe care le-am efectuat de la obținerea titlului de Doctor în Domeniul Fizică în anul 2008. Studiile sunt incluse în domeniul optică, subdomeniul holografie, ramurile microscopie holografică digitală (MHD) și holograme generate pe computer (HGC). Aplicațiile sunt interdisciplinare domeniilor fizică, biofizică, biomedicină, procesarea imaginilor, comunicații optice, fiind realizate în colaborare cu echipe de cercetare de la Institutul de Fizica Laserilor, Plasmei, Radiației, Grupul CETAL, Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, Institutul de Microtehnologie, Spitalul “Lotus”, Spitalul Oncologic A. Trestioreanu, Institutul de Fizică și Inginerie Nucleară, Spitalul Universitar de Urgență București, Spitalul Clinic de Urgență “Bagdasar-Arseni”, Optoelectronica 2000 S.A., DDS Diagnostics SRL.

Primul capitol al acestei lucrări este o introducere în domeniul abordat, punctând principalele mele direcții de cercetare, din 2008 până în prezent.

Capitolul al doilea este dedicat studiilor realizate folosind MHD. Acestea au fost îndreptate în trei direcții importante:

- 1/ găsirea condițiilor specifice de înregistrare holografică, adecvate fiecărui tip de probă,
- 2/ reconstrucția numerică a probelor ca imagini cantitative de fază (ICF), cât mai fidele probelor reale,
- 3/ stabilirea setului de parametri necesari caracterizării complete pentru fiecare tip de probă pornind de la ICF.

Prima categorie de aplicații ale MHD se referă la introducerea unor metode automate de identificare a tipurilor de celule din probe neomogene, prin calcularea parametrilor semnificativi din valorile ICF. A doua categorie de aplicații se bazează pe avantajul MHD de a fi o tehnică de înregistrare în timp real (fără scanare) pentru celule vii “in vitro”, și a fost utilizată în studiul procesului de electroporare. A treia categorie este reprezentată de introducerea unei aplicații unice în literatură, care face posibilă monitorizarea culturilor celulare crescute pe structuri polimerice, tehnicile standard neoferind suficient câmp de înregistrare, sau fiind limitate de înălțimea probei.

Primul meu studiu a pornit de la necesitatea unei metode care să nu folosească markeri de colorare, utilizabilă în laboratoare de analize medicale, și care să îndeplinească simultan trei cerințe: vizualizarea, identificarea și numărarea celulelor de pe o lamă cu frotiu de sânge. Pentru a distinge între hematiile mature și imature, am propus o metodă bazată pe calculul gradientului din centrul unei celule, aplicat pe ICF. Rezultatele obținute au fost confirmate de analiza cu numărătorul automat comercial.

Am efectuat studii de analiză a deformabilității celulelor de sânge – simulare și experiment – cu scopul de a obține o metodă de identificare a procentului de celule aflate într-o anumită stare într-o probă cu subpopulații deformate diferit. În simulare, studiul imaginilor de difracție a pus în evidență faptul că, în spațiul reciproc, curbele de izoamplitudine au formă și dimensiuni care sunt independente de numărul celulelor aflate în aceeași stare de deformare, dar depind de geometria celulelor. Valorile monitorizate în curbele de izoamplitudine sunt

proporționale cu numărul celulelor aflate într-o anumită stare de deformare, putând calibra astfel o metodă de obținere a valorilor statistice pentru subpopulațiile dintr-o probă. În abordarea experimentală, am folosit hematii imersate în lichide cu diferite osmolarități și am reconstruit imaginile lor 3D. Am combinat valorile mai multor coeficienți: raza minoră, excentricitatea, sfericitatea, pentru a realiza distribuțiile statistice ale celulelor aflate în diferite stări de deformare într-o probă supusă aceluiași condiții.

Pentru a diferenția speciile de leucocite de sânge am folosit hărțile de fază din ICF convertite în serii de date la care am analizat, comparativ, factorul de deviație de la multifractalitate și coeficientul Lempel-Ziv, ca măsuri candidate pentru discriminarea speciilor. Rezultatele sunt similare celor din studiul cromatografic, dar propunerea noastră nu necesită agent de colorare.

Am extins studiul bazat pe proprietățile fractale la imaginile de fază 3D ale celulelor cervicale aflate în diferite stadii de malignitate. Am introdus o metodă bazată pe descriptorii fractali care combină dimensiunile fractale locale obținute prin metoda acoperirii topologice a volumelor/suprafețelor cu sfere de raze crescătoare. O versiune concatenată a descriptorului de volum la scară mică, combinat cu descriptorul de suprafață la scară mare, a fost cea mai potrivită pentru identificarea corectă a tipului celulelor. Atât segmentarea cât și algoritmi de calcul au fost dezvoltati intern.

O altă metodă de discriminare propusă s-a bazat pe combinarea coeficientului de bimodalitate Sarle cu parametrii structurali și morfologici ai celulei (indice de refracție, masă uscată, înălțime) pentru a caracteriza celule din linia de cultură B16, sub-linii aflate în diferite stadii de malignitate. Celulele normale au o distribuție multimodală a valorilor din ICF, pe când cele maligne au tendința spre o distribuție unimodală. Folosind o procedură de decuplare prin înregistrarea perechilor de holograme într-o cameră microfluidică, s-a pus în evidență faptul că B16F1 au o concentrație de masă uscată (deci implicit de proteine) mai mare decât B16F10.

Capacitatea MHD de a înregistra holograme cu viteze de zeci/sute cadre pe secundă a celulelor vii aflate în mediul propriu, a fost exploatată pentru studiul fenomenului de electroporare și culegerea de noi informații pentru explicarea fenomenelor care se petrec la scară moleculară atât pe perioada pulsului, cât și în post puls.

1/ Studiul intervalelor de ordinul 100s de la pulsul de electroporare s-a realizat prin înregistrarea filmelor holografice rapide (5400 holograme în 1.5min). O provocare a fost găsirea parametrilor de reconstrucție astfel încât să obțin ICF cu parametri similari atât pentru întreg filmul cât și optimi pentru fiecare cadru (focalizare, înclinare, raport semnal/zgomot, contrast). În studiul ICF, relevanți au fost următorii parametri: aria proiectată, densitatea de masă uscată, entropia, coeficienții de autocorelație, ca predictorii ai celulelor electroporate care se umflă sau se sparg.

2/ Studiul intervalelor post puls, de ordinul câtorva minute, s-a realizat prin decuplarea informațiilor optice (indice de refracție) de cele geometrice (înălțime) prin înregistrarea de holograme pereche (în două lichide cu indici de refracție apropiați), atât înainte cât și după pulsul de electroporare. Un tablou complet al evoluției s-a realizat prin analiza parametrilor locali și globali calculați din ICF. Comportamentul bifazic al acestor parametri s-a explicat prin dinamica apei și a manitolului prin membrana permeabilizată a celulei.

Pentru prima dată în literatură am realizat monitorizarea celulelor vii, în mediul natural, crescute pe suprafețe structurate, fabricate din polimeri de către colegii de la CETAL. Provocările au fost multiple, deoarece probele nu au fost total transparente, sau au fost foarte înalte, dar am profitat de câteva avantaje ale MHD:

- 1/ înregistrarea a peste $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ fără scanare în montajul experimental,
- 2/ vizualizarea probelor etajate de peste $25 \mu\text{m}$ înălțime,
- 3/ obținerea informațiilor axiale cantitative prin decuplarea valorilor de înălțime și indice de refracție.
- 4/ monitorizare celule vii în mediul natural, fără markeri chimici.

În acest fel au fost puse în evidență atât caracteristici morfologice/structurale, cât și evoluții ale proprietăților celulelor aflate pe structuri tubulare, pe rețele, sau suprafețe de diferite forme, dimensiuni, densități, produse prin mai multe tehnici, din polimeri cu proprietăți magnetice sau electrice.

În al treilea capitol al acestei lucrări sunt descrise activitățile de generare a hologramelor pe computer, reconstrucția acestora folosind un modulator spațial de lumină (SLM), cu aplicații la sisteme de comunicații optice prin spațiul liber. Sistemele sau metodele obținute au fost propuse spre brevetare (4 brevete depuse dintre care unul acordat).

Multiplexarea spațială a purtătoarelor optice modulate cu distribuții de fază elicoidală sau/și radială este obținută cu ajutorul hologramelor generate pe computer (HGC). Acestea sunt transmise prin spațiul liber, spre unitatea de recepție, unde sunt "citite" prin utilizarea altor HGC proiectate adecvat. Am propus două sisteme:

1/ bazat pe un SLM și o mască de citire de amplitudine: în unitatea de emisie este folosită o mască de fază obținând suprapunerea în același fascicul a mai multor momente cinetice orbitale MCO, iar în unitatea de recepție sunt introduse măști de amplitudine pentru identificarea fiecărei valori MCO în poziții spațiale diferite dar simultan;

2/ bazat pe trei SLM-uri: două fascicule laser independente, fiecare purtând alt mod spațial (unul conical și unul helical) sunt suprapuse printr-un beam-splitter, apoi propagate ca distribuții concentrice de intensitate până la unitatea de recepție și "citite" cu o mască de fază (adresată pe al treilea SLM). Identificarea apare atunci când minimum de intensitate se schimbă în maxim; această schimbare este în acord și cu modelul analitic propus bazat pe produsul scalar. Am realizat și un studiu de crosstalk care indică o suprapunere nesemnificativă a modurilor.

În al patrulea capitol "Concluzii" sunt enumerate principalele rezultate ale contribuțiilor obținute prin studiile care implică MHD și HGC, cât și alte câteva contribuții implicând sisteme optice prin polarizare pentru studiul probelor polimerice, efectuate cu colegii de la Institutul de Cercetări în Chimie.

Fiecare capitol conține cercetare personală, originală, atât ca sisteme optice, cât și din punct de vedere al tipului de aplicații și al metodelor de analiză.

În Concluzie, studiile prezentate în această Teză de Abilitare oferă o imagine clară a condițiilor necesare obținerii unor holograme experimentale sau simulate, specifice aplicației, cât și avantajele oferite de aceste tehnici.

Planul de viitor pentru cercetare în domeniile mele de competență:

- a) Propunerea unor noi teme de cercetare cu aplicații ale MHD sau HGC.
 - b) Introducerea unei metode de analiză a țesuturilor din biopsii fără a le colora, folosind MHD;
 - c) Combinarea MHD cu microscopia hiperspectrală pentru investigarea celulelor aflate în prezența nanoparticulelor sau a secțiunilor necolorate de țesut
 - d) Introducerea unor HGC în sisteme interferometrice;
 - e) Dezvoltarea unei noi direcții de imagistică folosind ca sursă fotoni entangled;
 - f) Teme de doctorat în domeniul sistemelor optice, holografiei;
- Rezultatele cercetărilor
- g) publicarea în reviste din zona roșie sau galbenă și prin participarea la conferințe internaționale în domeniu;
 - h) finanțarea prin granturi de cercetare;
 - i) colaborarea cu colective din străinătate și stimularea studenților prin burse Erasmus