

TEZA DE ABILITARE

Cercetări în Domeniile Medicinii, Biologiei și Științei Materialelor prin Metode Bazate pe Tehnici de Microscopie Neconvenționale

Dr. Stefan G. Stanciu

- Rezumat -

1. Introducere

Autorul acestei lucrări și-a desfășurat studiile doctorale în perioada 2007-2011, pe parcursul acestei perioade derulând o activitate de cercetare focalizată pe dezvoltarea unor noi tehnici de procesare și analiză a imaginilor digitale dedicate microscopiei confocale cu baleiaj laser (CLSM). Pe parcursul celor 10 ani ce au urmat obținerii titlului de doctor, interesul științific al autorului s-a axat asupra tehnicilor de microscopie și nanoscopie ce utilizează baleiajul fasciculelor laser, pe cele bazate pe baleiajul microsondelor, și asupra tehnicilor hibride ce operează în domeniul câmpului apropiat, care reunesc concepte din ambele familii. În acest interval, activitățile sale de cercetare s-au axat pe trei direcții principale :

- (i) cercetări asupra speciilor biologice și materialelor avansate prin abordări bazate pe metode corelative de caracterizare optică la scala micro- și nanometrică;
- (ii) dezvoltări hardware și metode de procesare a imaginilor dedicate tehnicilor de caracterizare optică de înaltă rezoluție;
- (iii) dezvoltări ale unor noi metode bazate pe învățare automată și inteligență artificială dedicate analizei automate a datelor prelevate prin tehnici de microscopie neconvenționale.

Lucrarea de față prezintă o parte din rezultatele obținute pe parcursul acestei perioade, concentrându-se în principal pe trei direcții științifice:

- (a) cercetări asupra țesuturilor biologice prin intermediul tehnicilor de microscopie bazate pe efecte optice neliniare, augmentate prin metode de învățare automată și inteligență artificială;
- (b) cercetări asupra bacteriilor patogene utilizând tehnici de nanoscopie ce funcționează cu și fără agenți de contrast;
- (c) studii asupra probelor biologice și a materialelor avansate prin intermediul unor abordări corelative și cantitative în microscopia în câmp apropiat.

Subiectele adresate în capitolele tezei se referă la rezultate raportate anterior în rol de autor principal, acestea fiind obținute în cadrul unor proiecte de cercetare ce au fost conduse de autor în calitate de director sau coordonator de proiect, finanțate în cadrul unor programe naționale și europene. În continuare sunt prezentate succint principalele rezultate obținute în cadrul cercetărilor efectuate.

2. Cercetări asupra țesuturilor biologice prin tehnici de microscopie optică neliniară asistate de metode de învățare automată și inteligență artificială

Abordările histopatologice convenționale ce au la baza caracterizarea prin microscopie clasică în câmp luminos (BM) a unor eșantioane de țesut extrase din corp prin biopsie excizională, și ulterior marcate cu diferiți agenți de contrast, reprezintă în acest moment cele mai des folosite soluții pentru diagnosticul patologicilor definite de modificări tisulare, inclusiv al tumorilor solide. Cu toate acestea, astfel de metode

prezintă numeroase dezavantaje precum ar fi invazivitate, erori de eşantionare, necesitatea unor resurse importante de timp si financiare, variabilitate interpretativă sau imposibilitatea de a lua decizii terapeutice în timp real. Aceasta situație a motivat pe parcursul ultimilor ani o serie de eforturi importante ce au urmărit transferul tehnicilor de microscopie bazate pe baleiaj laser (LSM) către domeniul caracterizării ţesuturilor. Printre tehnicile LSM demonstrate pana in prezent ca fiind cele mai utile in raport cu studiul ţesuturilor, tehnicile de microscopie bazate pe efecte optice neliniare (NLO) au câştigat un interes semnificativ având în vedere capacitatea acestora de a interoga diferite proprietăţi optice endogene ce facilitează identificarea unor trăsături anatomice si fiziologice care permit diagnosticarea in stadii timpurii, in-un mod neinvaziv, a anumitor patologii importante, precum ar fi cancerule¹⁻⁵, bolile cardiovasculare⁶, sau neurodegenerative⁷, permiţând in acelaşi timp urmărirea modului in care acestea evoluează.

Microscopia de fluorescenţa bazata pe excitaţia cu doi fotoni (TPEF), microscopia de fluorescenţa bazata pe excitaţia cu trei fotoni (3PEF), microscopia bazata pe generarea armonicii a doua (SHG) şi microscopia bazata pe generarea armonicii a treia (THG), reprezintă principalele tehnici NLO utilizate pana in prezent pentru studiul ţesuturilor in baza proprietăţilor optice endogene. Aceste tehnici pun la dispoziţie informaţii complementare asupra unor aspecte importante de interes biomedical precum ar fi morfologia sau funcţia metabolica a ţesuturilor. Pe scurt, TPEF poate fi utilizata pentru a interoga semnalele autofluorescente generate de diferiţi cromofori endogeni, precum ar fi elastina, melanina, nicotinamida adenina dinucleotidă (NAD + / NADH) sau flavin adenina dinucleotida (FAD), iar semnalele SHG sunt generate exclusiv de moleculele care poseda o structura non-centrosimetrica, principala proteina din corpul uman având aceasta proprietate fiind colagenul². Capacitatea SHG de a caracteriza la rezoluţii spaţiale ridicate distribuţia colagenului în ţesuturi, permite o evaluare precisă şi neinvazivă a diferitor modificări ale matricei extracelulare, astfel de modificări realizând-se cu o specificitate ridicata in cazul unei game largi de patologii, facilitând aşadar diagnosticul acestora². Mai multe aspecte despre mecanismele de contrast si despre aplicaţiile generale ale tehnicilor NLO sunt discutate in Secţiunea 2.1 a tezei.

Secţiunea 2.2 a acestei lucrări, intitulată „*Evaluarea automată a fibrozei hepatice prin microscopie de fluorescenţa bazata pe excitaţia cu doi fotoni si metode de învăţare automata de tip Bag-of-Features*” prezinta rezultatele unui experiment discutat anterior in revista *Scientific Reports*⁸, ce a fost efectuat pe parcursul anilor 2012-2013 în colaborare cu parteneri de cercetare de la Universitatea Naţională din Singapore, Institutul de Tehnologii din Massachusetts, si Institutul ETH Zurich. In cadrul lucrărilor desfăşurate s-a vizat dezvoltarea unei metode pentru identificarea automată a etapelor distincte ale fibrozei hepatice bazata pe imagistica TPEF a ţesuturilor nemarcate şi a unui concept de învăţare automata care exploatează frecventa trăsăturilor invariante conţinute într-o imagine, cunoscut sub denumirea de Bag-of-Features⁹ (BoF). Acest studiu a fost motivat de faptul că progresia fibrozei hepatice este puternic corelata atât cu insuficienţa funcţiei hepatice cat si cu apariţia tumorilor la nivelul ficatului¹⁰. Prin urmare, monitorizarea modificărilor tisulare specifice acestei patologii are o importanta deosebita in raport cu diagnosticul de precizie a bolilor hepatice cronice şi cu stabilirea terapilor medicamentoase celor mai adecvate pentru diferite stadii ale acestora. Un aspect important descoperit in cadrul acestui experiment a constat in faptul ca imaginile TPEF achiziţionate la nivelul suprafeţei ficatului, si in profunzime, prin secţionare optica, conţin informaţii suficiente pentru a stabili stadiul de fibroza al acestuia. Este important de subliniat faptul ca in timp ce semnalele SHG corespunzând capsulei Glisson, si planurilor superioare acesteia, au un contrast bun, acesta este puternic atenuat in momentul accesării unor regiuni mai profunde. In cadrul experimentelor întreprinse am observat ca semnalele TPEF nu se comporta după aceeaşi regula,

acestea fiind mult mai intense în comparație cu semnalele SHG provenind din zonele subcapsulare, punând la dispoziție informații importante din punct de vedere morfo-structural. De asemenea am arătat faptul ca aceste semnale pot fi analizate în mod automat, prin metode Bag-of-Features, pentru diagnosticul fibrozei de ficat. Experimentele desfășurate au arătat așadar ca TPEF și SHG pot înlocui în anumite situații procedurile tradiționale de evaluare a fibrozei hepatice bazate pe puncție și ca, în egala măsură, aceste tehnici pot fi utilizate pentru a aduce informații complementare care pot maximiza nivelul total al informațiilor disponibile în urma intervențiilor tradiționale bazate pe biopsie excizională.

În Secțiunea 2.3 a acestei lucrări intitulată „*Caracterizarea țesuturilor epiteliale prin tehnici de microscopie optica neliniara si inteligenta artificiala*” sunt prezentate o serie de rezultate obținute pe parcursul perioadei 2018-2019 în colaborare cu parteneri de cercetare de la Universitatea Tampere din Finlanda și Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, prezentate și în revista *Biomedical Optics Express*¹¹. Utilitatea tehnicilor TPEF și SHG în raport cu subiectul caracterizării țesuturilor epiteliale a fost demonstrată anterior atât în scenarii *ex-vivo*¹², cât și *in-vivo*¹³⁻¹⁵, iar activitățile pe care le-am întreprins extind aceste eforturi anterioare printr-o abordare nouă, în cadrul căreia ne-am concentrat asupra studiului fragmentelor de țesut epitelial secționat în plan transversal, care conțin joncțiunea dermoepidermică (DEJ)¹⁶. Atenția acordată acestei structuri este motivată de două aspecte principale: (a) DEJ se află la o adâncime accesibilă sistemelor NLO dezvoltate pentru aplicații clinice *in-vivo* (b) pe parcursul genezei și progresiei cancerelor de piele au loc modificări importante în DEJ, care pot fi corelate cu fazele hiperplazice și neoplazice timpurii. Un prim segment al rezultatelor obținute au arătat ca multe dintre aceste modificări subtile, care sunt dificil de evaluat prin intermediul abordărilor histopatologice convenționale, sunt disponibile în cadrul imaginilor prelevate cu TPEF și SHG pe țesuturi nemarcate. Mai precis, rezultatele obținute, arată faptul ca reprezentările compozite ce combina imaginile TPEF și SHG, conțin caracteristici ușor de interpretat pentru medicii specialiști, care permit evaluarea integrității DEJ și diferențierea țesuturilor sănătoase de cele displazice. Acest aspect se considera ca fiind deosebit de important din punct de vedere medical, având în vedere faptul ca structurile DEJ compromise reprezintă un semn reprezentativ pentru progresia și gradul de invazivitate al cancerelor epiteliale. Un al doilea segment al activităților întreprinse privind studiul țesuturilor epiteliale a fost motivat de faptul ca analiza imaginilor histopatologice de către medicii specialiști reprezintă un proces laborios și în același timp predispus la erori. Pentru a rezolva aceasta situație, am demonstrat că imaginile TPEF și SHG achiziționate prin tehnici NLO pe joncțiunea dermoepidermică pot fi analizate în mod automat în scopul asigurării unui diagnostic precis utilizând metode Deep Learning¹⁷, o familie de tehnici de inteligență artificială care a adus transformări semnificative pe parcursul ultimilor ani în raport cu multe domenii științifice, inclusiv în medicină¹⁸⁻²⁰. Rezultatele pe care le-am obținut în raport cu acest subiect¹¹, prezentate în detaliu în teza, au arătat ca o abordare Deep Learning bazată pe conceptul de transfer a cunoștințelor, disponibil prin intermediul modelului GoogLeNet, oferă posibilitatea clasificării imaginilor NLO în timp real, cu sensibilitate, specificitate și precizie ridicate (> 90%).

În Secțiunea 2.4 a lucrării, intitulată „*Imagistica țesuturilor nemarcate prin microscopie bazată pe generarea armonicii a doua în configurație re-scan*”, sunt prezentate o serie de rezultate obținute în perioada 2019-2021 în parteneriat cu Confocal.nl, o companie din Tarile de Jos, renumită pentru comercializarea sistemelor de microscopie confocală bazată pe utilizarea principiului Re-scan (RCM). În timp ce în secțiunile precedente ale acestei lucrări au fost discutate imagini TPEF și SHG achiziționate la rezoluții optice limitate de difracție, în cadrul acestui capitol discutăm o serie de rezultate privind achiziția datelor NLO la rezoluții care depășesc această barieră rezolutivă (imagini de „super-rezoluție” conform

terminologiei de profil), în baza conceptului re-scan, demonstrat anterior în cazul microscopiei confocale de fluorescență²¹. Rezultatele obținute arată faptul că metoda Re-scan SHG, demonstrată în cadrul proiectului H2020 Attract: HARMOPLUS²², coordonat de autorul acestei lucrări, oferă avantaje similare în ceea ce privește rezoluția și sensibilitatea precum tehnica RCM. Respectiv, prin metodele re-scan pot fi obținute imagini cu o rezoluție îmbunătățită cu ~50% față de imaginile SHG obținute prin metodele convenționale limitate de difracție, utilizând fascicule laser de intensitate joasă. Aceste avantaje au fost evidențiate atât pe fragmente de țesut reprezentând tendoane ale cozilor de șobolan²², un eșantion model pentru imagistica SHG a colagenului, cât și pe eșantioane de țesut mamar, pregătite pentru examen convențional de histopatologie. Cu aceeași configurație dezvoltată pentru Re-scan SHG, am explorat de asemenea fezabilitatea metodei Re-scan TPEF. La fel ca și în cazul tehnicii Re-scan SHG, am observat că tehnica Re-scan TPEF poate discerne trăsături indisponibile implementărilor TPEF convenționale.

3. Cercetări asupra bacteriilor patogene prin tehnici de nanoscopie în câmp îndepărtat și câmp apropiat

Printre cele mai periculoase specii bacteriene patogene o importanță aparte o au cele cuprinse în grupul ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Enterobacter*)²³. Acestea se numără printre cei mai frecvenți agenți patogeni bacterieni în infecțiile nosocomiale, o cauză importantă de mortalitate la nivelul pacienților cu boli grave și a celor imunocompromiși²⁴. Toate aceste specii afișează un nivel ridicat de rezistență la antibiotice, fapt ce a determinat recent Organizația Mondială a Sănătății să nominalizeze agenții patogeni din grupul ESKAPE ca reprezentând una dintre cele mai mari amenințări la adresa sănătății umane și să încurajeze în mod explicit noi cercetări privind dezvoltarea unor linii de tratament de nouă generație capabile de a adresa într-un mod eficient infecțiile rezistente la antibiotice²⁵. În acest context, este important de precizat faptul că posibilitatea caracterizării detaliate a celulelor bacteriene corespunzând speciilor ESKAPE joacă un rol fundamental în studiile biomedicale orientate către diagnosticul și tratamentul infecțiilor asociate, iar analiza morfo-structurală a acestora oferă informații deosebit de importante în raport cu funcția și organizarea spațială a acestor microorganisme. Înțelegând în profunzime aceste aspecte pot fi elucidate mecanismele prin care bacteriile patogene supraviețuiesc strategiilor de tratament curente, fapt ce poate conduce la dezvoltarea unor noi abordări care pot învinge aceste mecanisme.

Rezoluția laterală disponibilă prin intermediul tehnicilor convenționale de fluorescență, precum CLSM, este limitată de către fenomenul de difracție la ~ 200nm, valoarea exactă depinzând de lungimea de undă utilizată pentru excitație. Această limită rezolutivă împiedică o înțelegere precisă a unei game largi de structuri și procese fundamentale ale bacteriilor regăsite la nivel celular și subcelular, elucidarea acestor aspecte necesitând rezoluții superioare. Tehnicile emergente de nanoscopie optică²⁶, se dovedesc a fi de mare ajutor în raport cu studiul organizării subcelulare a organismelor procariote, fapt demonstrat în cadrul unei serii de eforturi foarte valoroase ce au fost depuse în acest sens până în prezent^{27,28}. Trebuie remarcat însă faptul că volumul de lucrări științifice ce prezintă studii asupra organismelor bacteriene la scala nanometrică este în continuare limitat, tehnicile de nanoscopie optică nefiind încă exploatate la potențialul lor maxim pentru a asigura o înțelegere exactă a aspectelor morfo-structurale, și funcționale, de interes.

În secțiunea 3.2 intitulată „*Studii asupra bacteriilor patogene gram-pozitive și gram-negative prin microscopie bazată pe depleția stimulată a emisiei*” sunt prezentate rezultatele unor activități de cercetare desfășurate în perioada 2019-2020 în cadrul unei colaborări științifice cu o echipă parteneră de la

Universitatea Roma Tre, din Italia. Experimentele discutate fac parte dintr-un efort mai amplu, prin care s-a urmărit rezolvarea unor aspecte mai puțin înțelese privind morfologia și funcția bacteriilor patogene prin intermediul tehnicilor emergente de nanoscopie, cu și fără agenți de contrast. Este important de amintit faptul că rezultatele pe care le-am obținut cu ajutorul tehnicii STED²⁹ au fost prezentate inclusiv pe coperta revistei *Journal of Biophotonics*, a numărului în care a fost publicat acest studiu, fapt ce subliniază semnificația eforturilor depuse. Acestea au vizat evaluarea agentului de contrast KK114, unul dintre cei mai populari agenți de contrast utilizați în tehnica STED^{30,31}, în raport cu fezabilitatea utilizării sale pentru marcarea și studiul bacteriilor. KK114 este un colorant solubil în apă, fotostabil, cu emisie în infraroșu, având o structură chimică asemănătoare rodaminei, și o durată de viață a semnalelor fluorescente asociate > 3 ns. Acest compus are sarcina negativă (-1), ceea ce face ca celulele eucariote să fie impermeabile în raport cu substanțele conjugate cu acest colorant. Întrucât utilitatea agentului KK114 în raport cu marcajul celulelor procariote nu a fost demonstrată anterior lucrărilor desfășurate, am urmărit evaluarea potențialului și mecanismelor de marcarea în raport cu unsprezece specii diferite, incluzând pe cele din grupul ESKAPE, doi agenți patogeni asociați fibrozei chistice (*Achromobacter xylosoxidans* și *Stenotrophomonas maltophilia*), agentul cauzator de scarlatină, *Streptococcus pyogenes*, și în raport cu speciile *E. coli* și *B. subtilis*, considerate organisme model gram-negativ și, respectiv, gram-pozitiv. Rezultatele obținute arată că agentul de contrast KK114 poate marca atât membranele bacteriene ale speciilor gram-pozitive, cât și pe cele ale speciilor gram-negativ, rezultatele variind însă de la specie la specie. Utilizând tehnica STED pentru a investiga bacterii marcate cu KK114, am putut discerne trăsături celulare indisponibile tehnicilor convenționale, precum septul de diviziune și structuri asemănătoare citoscheletului, a căror înțelegere este importantă în raport cu elucidarea unor aspecte în continuare nerezolvate privind ciclul de viață și comportamentul bacteriilor.

În Secțiunea 3.3 intitulată „*Studii asupra speciei Acinetobacter baumannii prin microscopie confocală în configurație re-scan și abordări fluorometrice complementare*”, sunt prezentate o serie de rezultate analizate anterior și într-un articol publicat în revista *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*³², provenite dintr-un al doilea segment al colaborării cu partenerii de cercetare de la Universitatea Roma Tre, Italia, derulat pe parcursul anului 2020. În cadrul activităților întreprinse în raport cu utilizarea tehnicii RCM pentru studiul bacteriilor, ne-am concentrat atenția asupra investigării caracteristicilor morfologice ale speciei *Acinetobacter baumannii*, un agent patogen nosocomial care reprezintă o amenințare importantă la adresa sănătății globale, data fiind capacitatea acestei specii de a se adapta, rezultând în noi tulpini multidrog rezistente (MDR)³³. Pentru această specie bacteriană, cât și pentru majoritatea celorlalte, o analiză detaliată a caracteristicilor morfologice specifice este deosebit de necesară pentru a putea evalua modul de acțiune și a eficacității medicamentelor antibacteriene, precum cele care afectează sinteza membranelor celulare sau cele care deteriorează aceste membrane. În acest scop au fost analizate efectele colistinei (polimixina E), utilizată în prezent ca opțiune terapeutică de ultimă linie în fața infecțiilor cauzate de tulpini *A. baumannii* multi- și pandrog rezistente³⁴. Colistina este o polipeptidă cationică a cărei activitate anti-microbiană este exercitată prin intermediul efectelor pe care le are asupra membranei celulare. Experimentele noastre au arătat că tehnica RCM poate fi utilizată cu succes pentru a caracteriza cu precizie morfologia membranei celulelor în cazul speciei *A. baumannii*, instanțele studiate fiind marcate cu agenții de contrast SYTO9 și KK114. Accentul principal a fost pus pe analiza celulelor *A. baumannii* filamentoase, motivul fiind dat de faptul că filamentarea reprezintă unul dintre mecanismele principale care contribuie la rezistența celulelor bacteriene la antibiotice. În cadrul experimentelor desfășurate, alungirea celulelor *A. baumannii* a fost observată atât în fazele logaritmice, cât și în fazele

staționare, prin intermediul imagisticii RCM a celulelor marcate cu SYTO9 și KK114. Aceste observații se considera a fi importante întrucât pentru multe alte specii bacteriene procesul de filamentare este asociat toleranței la antibiotice, însă astfel de aspecte nu sunt încă bine înțelese la nivelul speciei *A. baumannii*. Totodată, cercetările desfășurate au relevat faptul ca marcajul KK114 poate fi utilizat pentru a discerne organismele bacteriene vii fata de cele ce si-au pierdut viabilitatea, putând facilita așadar studii complexe in care modificările ce survin in raport cu morfologia celulelor bacteriene in urma a diferite tratamente terapeutice pot fi puse in corespondenta cu capacitatea acestora de se menține in viață.

În Secțiunea 3.4 intitulată „*Către Știința Deschisă: o colecție structurată de imagini ale bacteriilor patogene investigate prin microscopie optică în câmp apropiat fără apertură*”, este prezentată o a treia direcție de cercetare abordată în cadrul relației de colaborare stabilită cu partenerii de cercetare de la Universitatea Roma Tre, Italia, pe parcursul anilor 2019-2020. În timp ce experimentele discutate în primele secțiuni ale acestui capitol au avut la baza utilizarea tehnicilor de nanoscopie optica bazate pe fluorescența, în această secțiune ne-am axat interesul pe imagistica bacteriilor patogene prin microscopie in camp apropiat bazata pe împrăștiere (s-SNOM), o tehnică emergentă care a făcut posibilă progrese remarcabile în domeniul Științei materialelor³⁵ pe parcursul ultimilor ani, și care începe să se remarce și în cadrul subiectelor de cercetare privind Științele vieții, facilitând aplicații greu de implementat cu alte tehnici. În prezent, un larg segment al rezultatelor pe care le-am obținut în cadrul studiilor întreprinse asupra organismelor patogene bacteriene prin intermediul tehnici s-SNOM sunt încă în analiză, însă, un prim rezultat important al acestor eforturi a fost publicat în revista *GigaScience*, sub forma setului de date SSNOMBACTER³⁶. Această colecție de imagini s-SNOM prelevate pe diferite specii bacteriene atent selectate a fost proiectată, achiziționată și publicată pentru a promova popularitatea acestei tehnici emergente în domeniul științelor vieții, și pentru a încuraja noi aplicații în diferite câmpuri ale acestui domeniu. SSNOMBACTER reprezintă așadar o colecție structurată de imagini s-SNOM prelevate pe cincisprezece specii bacteriene, incluzând pe cele ce alcătuiesc grupul ESKAPE. Imaginile s-SNOM ce alcătuiesc acest set de date sunt însoțite de date înregistrate prin microscopie cu forțe atomice (AFM), pe același regiuni, acestea fiind intrinsec disponibile într-o sesiune de imagistică s-SNOM. Perechile de imagini s-SNOM - AFM au o utilitate aparte în raport cu plasarea informațiilor optice obținute la scară nanometrică într-un context topografic relevant³⁷. În cadrul lucrării sunt discutate în detaliu mai multe scenarii de potențială utilitate a setului de date SSSNOMBACTER³⁶, accentul principal fiind pus pe utilizarea acestui set de date ca suport pentru dezvoltarea unor noi metode de analiză automată a imaginilor s-SNOM prelevate pe probe biologice (și nu numai), astfel de metode lipsind în acest moment aproape cu desăvârșire.

4. Studii asupra materialelor avansate și probelor biologice prin microscopie în câmp apropiat fără apertură augmentată prin metode corelative și cantitative

În timp ce tehnicile de nanoscopie optica bazate pe fluorescența și-au demonstrat până în prezent utilitatea în principal în aplicații din domeniul Științelor vieții compatibile cu conceptul marcajului fluorescent, contribuția acestora în domeniul Științei materialelor a fost limitată având în vedere necesitatea utilizării agenților de contrast. În același timp, domeniul, de mare prioritate, al nanotehnologiilor este într-o continuă căutare a instrumentelor ce pot caracteriza în detaliu diferite tipuri de nanomateriale de ultima generație, pentru a permite o mai bună înțelegere a proprietăților acestora și pentru dezvoltarea unor metode de funcționalizare eficiente³⁸. Referindu-ne la tehnicile de nanoscopie optică fără coloranți apărute pe parcursul ultimilor ani, se pot distinge două familii: (a) tehnici de nanoscopie bazate pe interacțiunea

luminii cu un vârf ascuțit (microsonda) baleiat pe suprafața eșantionului de interes, cum ar fi s-SNOM³⁵, microscopia de fluorescența augmentată prin microsonda (TEF)^{39,40}, spectroscopia Raman augmentată prin microsonda⁴¹ (TERS), microscopia bazată pe forțe foto-induse (Pi-FM)⁴² sau microscopia bazată pe forțe foto-termice⁴³, și b) tehnici de câmp îndepărtat bazate pe strategii de pompaj-sondare („*pump & probe*”), care se bazează pe interacțiunea probei cu două sau mai multe fascicule incidente, printre acestea numărându-se microscopia bazată pe saturarea tranzitorie a absorbției⁴⁴, microscopia bazată pe reflectivitate foto-modulată⁴⁵ sau microscopia bazată pe saturarea radiației Raman stimulate⁴⁶. Toate aceste tehnici dețin un potențial semnificativ pentru caracterizarea materialelor avansate la scară nanometrică, permițând caracterizarea proprietăților fizico-chimice intrinseci ale acestora.

În Secțiunea 4.1 sunt discutate motivele ce au stat la baza cercetărilor întreprinse în raport cu utilizarea tehnicii s-SNOM în diferite aplicații, o parte dintre acestea fiind prezentate în acest capitol, alături de principiile acestei tehnici.

În Secțiunea 4.2, intitulată „*Imagistica corelativă a microcapsulelor polielectrolitice prin microscopie optică în câmp apropiat fără apertură și microscopie confocală*”, sunt analizate rezultatele obținute în perioada 2015-2016 în colaborare cu parteneri de cercetare de la Universitatea din Genova, Italia și Plasmachem, GmbH, Germania, publicate anterior în revista *Materials Letters*⁴⁷. În cadrul activităților derulate am urmărit să demonstrez avantajele unor noi abordări de imagistica corelativă bazate pe tehnici de microscopie în câmp apropiat și câmp îndepărtat. În acest scop, ne-am îndreptat atenția către studiul unei clase emergente de materiale avansate, respectiv asupra microcapsulelor polielectrolitice (PMC) sintetizate prin strategii strat-cu-strat, pe care le-am studiat în cadrul unui experiment de tip „*proof-of-concept*”. Aceste materiale dețin un potențial ridicat în raport cu livrarea în scop terapeutic a moleculelor bioactive^{48,49} într-o manieră bine controlată din punct de vedere spațial și temporal. Acest potențial se datorează faptului că proprietățile pereților microcapsulelor, și de asemenea, ale nucleelor acestora, pot fi proiectate astfel încât întreaga structură să reacționeze într-un anumit mod dorit sub acțiunea unor stimuli interni sau externi, precum ar fi interacțiunea cu proteine, anticorpi, semnale optice, magnetice, etc. În ceea ce privește etapele de proiectare și testare a unor astfel de aplicații ale PMC, înțelegerea aprofundată a proprietăților structurale, funcționale și fizico-chimice este deosebit de importantă. Prin eforturile depuse am încercat să contribuim în raport cu această situație introducând o nouă strategie de imagistica corelativă prin intermediul căreia pot fi rezolvate simultan mai multe proprietăți complementare în câmp apropiat și câmp îndepărtat. Aceasta se bazează pe un sistem multimodal pe care l-am dezvoltat între anii 2012-2015 în proiectul FP7 LANIR și pe care l-am extins ulterior în cadrul unor proiecte naționale, acest prototip atrăgând o serie de premii la nivel european.

Utilizând acest sistem multimodal, structuri PMC sintetizate prin depunerea consecutivă a unor filme subțiri de polistiren sulfonat (PSS) și clorhidrat de polialilamină (PAH) în jurul unor nuclee alcătuite din CaCO₃ încărcate cu Docetaxel (DTX), un medicament chimioterapeutic, au fost investigate prin trei tehnici: s-SNOM, AFM și CLSM. Prin intermediul tehnicii s-SNOM s-au accesat informații optice la scară nanometrică în baza mecanismului de contrast discutat pe larg în partea introductivă a acestui capitol, în timp ce cu CLSM au fost interogate proprietățile optice (în reflexie și fluorescență) ale probelor PMC studiate, cele din urmă fiind asociate incorporării fluoroforului Alexa488 în pereții structurilor PMC. Tehnica AFM a fost utilizată pentru plasarea informațiilor optice achiziționate cu s-SNOM și CLSM într-un context topografic bine înțeles. Experimentul discutat în Secțiunea 4.2 a acestei lucrări a reprezentat la momentul în care a fost raportat inițial o premieră în raport cu investigarea structurilor PMC prin tehnici de nanoscopie optică, demonstrând avantajele oferite de tehnica s-SNOM în raport cu rezolvarea unor detalii

morfo-structurale importante ce nu sunt accesibile tehnicilor de imagistica convențională, cu posibilități rezolutive limitate de difracție.

În Secțiunea 4.3 intitulată „*Imagistica corelativă a țesuturilor prin microscopie optică în câmp apropiat fără apertura și microscopie confocală cu baleiaj laser*”, prezentăm o serie de rezultate obținute pe parcursul perioadei 2016-2017, în cadrul unor eforturi ce au vizat explorarea avantajelor imagisticii corelative cu tehnici de câmp îndepărtat și câmpul apropiat în raport cu studiul țesuturilor. Experimentele desfășurate, prezentate și în revista *Biomedical Optics Express*⁵⁰, au fost motivate de faptul că tehnica s-SNOM deține un potențial semnificativ pentru a rezolva diferite aspecte celulare și tisulare cu puternică relevanță fiziologică și patologică, dar, acest potențial este puternic limitat de faptul că interpretarea imaginilor prelevate cu această tehnică pe eșantioane de natură biologică este foarte dificilă, acestea având un aspect complet diferit față de imaginile prelevate în baza marcajului fluorescent sau histopatologic, care reprezintă standardul de aur privind analiza imaginilor bio. Această problemă poate fi ameliorată prin disponibilitatea unor imagini suport prelevate pe specimenul de interes prin intermediul unor tehnici mature, ușor accesibile unui specialist, însă această soluție este de obicei dificil de implementat cu ajutorul unor sisteme de imagistica independente, bazate pe mecanisme de contrast distincte, și acționând la scale diferite. Ca soluție la această problemă, am propus utilizarea abordării corelative, discutată anterior în cadrul Secțiunii 4.2 în contextul caracterizării structurilor PMC. Utilizând în tandem tehnicile s-SNOM și CLSM am studiat fragmente de țesut retinian provenite de la peștele zebură (*Danio rerio*), pregătite de un grup partener de la Universitatea din Zurich în baza unei metodologii inspirate din microscopia corelativă bazată pe fluorescența și fascicul de electroni⁵¹. Motivele pentru care ne-am îndreptat atenția către acest tip de țesut sunt legate de semnificația sa în raport cu înțelegerea mecanismelor de regenerare ale retinei. Mai precis, peștele zebură prezintă o capacitate remarcabilă de a-și regenera celulele retiniene, putând reveni dintr-o stare incompatibilă cu funcția vizuală (cauzată de exemplu de expunerea la stimuli nocivi) la o stare de viziune funcțională într-un interval foarte scurt. O bună înțelegere a mecanismelor fiziologice ce stau la baza acestei capacități regenerative este extrem de importantă pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice care pot stimula procese similare la om⁵². În cadrul experimentului desfășurat⁵⁰, am arătat că structura retinei peștelui zebură poate fi mai bine înțeleasă cu ajutorul imagisticii corelative s-SNOM - CLSM atunci când acestea tehnici sunt utilizate într-o configurație multimodală. Avantajul principal al unei astfel de abordări imagistice corelative în raport cu studiul țesuturilor constă în disponibilitatea concomitentă a unor caracteristici ultrastructurale de scală nanometrică (prin s-SNOM) și a unui context anatomic bine înțeles la scara micrometrică (prin CLSM), oferit de marcajului fluorescent aplicat în mod specific structurilor de interes.

În Secțiunea 4.4, intitulată „*Studii asupra materialelor nanostructurate prin metode cantitative de microscopie în câmp apropiat fără apertura*”, sunt prezentate rezultatele unor experimente desfășurate în perioada 2018-2020 în colaborare cu partenerii de cercetare de la Universitatea din Genova, Universitatea Politehnică din Milano, Institutul de Știință și Tehnologie Gwangju, Coreea de Sud, Institutul Național pentru Știința Materialelor, Japonia și Institutul Ningbo pentru Tehnologia și Ingineria Materialelor, China, o parte dintre acestea publicate anterior în revista *ACS Applied Nano Materials*⁵³. Aceste eforturi au vizat utilizarea unei metode dezvoltate anterior în vederea determinării funcției dielectrice locale, la nanoscală^{54,55}, în scopul caracterizării a patru categorii de materiale nanostructurate: (i) microcapsule polielectrolitice cu rol în administrarea medicamentelor, o clasă de materiale discutate și în Secțiunea 4.2

(ii) filme subțiri cu proprietăți colorimetrice ajustabile⁵⁶ (UT-OC) (iii) nanoparticule ceramice^{57,58} și (iv) nanoparticule de aur.

În raport cu structurile PMC, ne-am concentrat atenția asupra unor variante ce au capacitatea de a se auto-degrada în baza interacțiunii unei enzime proteolitice încorporate în pereții microcapsulei cu aceștia. Acest experiment, bazat pe o analiză cantitativă a imaginilor s-SNOM extinde un studiu recent⁵⁹ al partenerilor de la Universitatea din Genova, în cadrul căruia au arătat prin CLSM și AFM că anumite enzime încorporate între filmele electrolite ce alcătuiesc pereții microcapsulei pot fi utilizate pentru a-i degrada într-un mod controlat, proces foarte important în raport cu implementarea diferitor aplicații ce vizează eliberare controlată a medicamentelor („*controlled drug-release*”). În studiul nostru, structurile PMC investigate au fost asamblate din straturi de dextran și polarginină, iar papaina a fost aleasă ca enzimă degradantă datorită utilizării sale pe scala largă în diferite aplicații, atât în industria alimentară cât și în industria farmaceutică. Investigarea și evaluarea procesului de degradare controlată au un rol esențial în raport cu proiectarea unor strategii de funcționalizare cât mai eficiente, însă, având în vedere dimensiunile structurilor PMC și scala trăsăturilor morfo-structurale ce indică degradarea, acest proces este imposibil de investigat în detaliu cu tehnici optice convenționale. Ca soluție, am utilizat analiza cantitativă a imaginilor s-SNOM, utilizând o metodă dezvoltată anterior⁵⁴, pentru a investiga modificările ce apar la nivelul permitivității suprafeței structurilor PMC pe parcursul procesului de degradare, la diferite intervale de timp.

În ceea ce privește cea de-a doua aplicație discutată în Secțiunea 4.4, aceasta se referă la studiul structurilor UT-OC, dezvoltate de partenerii de cercetare de la GIST, Coreea de Sud,⁵⁶ în cadrul eforturilor pe care aceștia le depun pentru a demonstra noi clase de filme subțiri cu proprietăți colorimetrice ajustabile. Metodele acestora se bazează pe controlul porozității ultimului strat al structurii UT-OC, realizată dintr-o serie de pelicule depuse consecutiv, utilizând tehnica de depunere la unghiuri oblice (OAD). Rezultatele experimentale obținute anterior de acest grup⁵⁶, au demonstrat la micro și macro scala că indicii de refracție efectiv al acestor structuri variază în funcție de porozitatea stratului superior, aceste rezultate corespunzând simulărilor efectuate în baza teoriei medierii volumului. În cadrul experimentelor desfășurate am arătat că metodele cantitative de imagistică s-SNOM pot fi utilizate pentru a pune la dispoziție harți ale funcției dielectrice, și ale parametrilor optici asociați, la rezoluții similare tehnicii AFM. În setul de date discutat în teza, sunt adresate patru instanțe de structuri UT-OC Ti/Au/Ge (depuse pe substrat de Si), respectiv instanțe pentru care pelicula superioară, alcătuită din germaniu, are o grosime de 10nm sau 25nm, fiind depusă prin OAD sub unghiuri de 0° și 70°. În fiecare dintre aceste probe au fost induse defecte sub forma unor orificii cu diametru de 5 μm, care ajung la substratul de Si, pentru a ilustra mai bine capacitatea s-SNOM de a evalua omogenitatea permitivității și a parametrilor optici asociați pe suprafața structurilor UT-OC. Acest experiment a demonstrat utilitatea tehnicii s-SNOM pentru verificarea și validarea calității structurilor UT-OC, prin prisma posibilităților puse la dispoziție de această tehnică de a „cartografia” în mod cantitativ proprietățile optice ale suprafețelor la rezoluții nanometrice ce depind doar de dimensiunea vârfului microsondei utilizate pentru baleiaj. În prezent aceste metode de investigație sunt extinse pentru a fi utilizate pentru studiul unor noi variante de materiale UT-OC, precum cele bazate pe viruși bacteriofagi⁶⁰.

În aceeași secțiune a acestei lucrări sunt prezentate studii similare vizând alte două clase de nanomateriale: nanoparticule ceramice și nanoparticule de aur. În cazul nanoparticulelor din nitru de titan (TiN) și din carbură de titan (TiC), evaluarea exactă a permitivității complexe în cazul structurilor distincte, sau organizate în aglomerări de tip cluster, este foarte importantă pentru evaluarea comportamentului și performanței acestora în diferite aplicații ce le exploatează proprietățile plasmonice, dar și pentru

optimizarea strategiilor de funcționalizare. În cadrul experimentelor desfășurate am demonstrat că metodologia propusă pentru imagistica s-SNOM cantitativa permite măsurarea acestor proprietăți cu o rezoluție spațială de ordin nanometric, reprezentând așadar un instrument important pentru înțelegerea aprofundată a proprietăților optice ale acestor materiale emergente.

5. Direcții viitoare de cercetare

Un segment important al eforturilor pe care le vom depune pe viitor în raport cu direcțiile de cercetare discutate în această lucrare va fi dedicat dezvoltării unor noi abordări în imagistica de înaltă rezoluție ce vor combina diferite tehnici de microscopie și nanoscopie cu metode de inteligență artificială de tip Deep Learning. Astfel de metode sunt în plină expansiune la momentul de față, aducând transformări semnificative în multe domenii cheie precum în medicina, biologie, știința materialelor sau nanotehnologie. Capitolul 5 al acestei lucrări discută pe larg aceste direcții viitoare de cercetare, pentru o parte dintre acestea obținându-se deja finanțare.

Bibliografie

- 1 Hawkins, E. D. *et al.* T-cell acute leukaemia exhibits dynamic interactions with bone marrow microenvironments. *Nature* **538**, 518-522 (2016).
- 2 Campagnola, P. J. & Dong, C. Y. Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser & Photonics Reviews* **5**, 13-26 (2011).
- 3 Martínez-Ojeda, R. M., Pérez-Cárceles, M. D., Ardelean, L. C., Stanciu, S. G. & Bueno, J. M. Multiphoton Microscopy of Oral Tissues. *Frontiers in Physics* **8**, 128 (2020).
- 4 Dilipkumar, A. *et al.* Label-Free Multiphoton Endomicroscopy for Minimally Invasive In Vivo Imaging. *Advanced Science*, 1801735 (2019).
- 5 Perrin, L., Bayarmagnai, B. & Gligorijevic, B. Frontiers in intravital multiphoton microscopy of cancer. *Cancer Reports*, e1192 (2019).
- 6 Wu, Z. *et al.* Multi-Photon Microscopy in Cardiovascular Research. *Methods* (2017).
- 7 Meyer-Luehmann, M. *et al.* Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **451**, 720-724 (2008).
- 8 Stanciu, S. G. *et al.* Experimenting liver fibrosis diagnostic by two photon excitation microscopy and bag-of-features image classification. *Scientific reports* **4**, 4636 (2014).
- 9 O'Hara, S. & Draper, B. A. Introduction to the bag of features paradigm for image classification and retrieval. *arXiv preprint arXiv:1101.3354* (2011).
- 10 Friedman, S. L. Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of hepatology* **38**, S38-S53 (2003).
- 11 Huttunen, M. J. *et al.* Multiphoton microscopy of the dermoepidermal junction and automated identification of dysplastic tissues with deep learning. *Biomedical Optics Express* **11**, 186-199, doi:10.1364/BOE.11.000186 (2020).
- 12 Paoli, J., Smedh, M., Wennberg, A.-M. & Ericson, M. B. Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics. *Journal of Investigative Dermatology* **128**, 1248-1255 (2008).
- 13 Sun, T. Y., Haberman, A. M. & Greco, V. Preclinical advances with multiphoton microscopy in live imaging of skin cancers. *Journal of Investigative Dermatology* **137**, 282-287 (2017).
- 14 Cicchi, R., Kapsokalyvas, D. & Pavone, F. S. Clinical nonlinear laser imaging of human skin: a review. *BioMed research international* **2014** (2014).
- 15 Balu, M. *et al.* In vivo multiphoton microscopy of basal cell carcinoma. *JAMA dermatology* **151**, 1068-1074 (2015).

- 16 Briggaman, R. A. & Wheeler Jr, C. E. The epidermal-dermal junction. *Journal of investigative Dermatology* **65**, 71-84 (1975).
- 17 LeCun, Y., Bengio, Y. & Hinton, G. Deep learning. *nature* **521**, 436 (2015).
- 18 Esteva, A. *et al.* Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature* **542**, 115-118 (2017).
- 19 Rajkomar, A., Dean, J. & Kohane, I. Machine Learning in Medicine. *New England Journal of Medicine* **380**, 1347-1358 (2019).
- 20 Hinton, G. Deep learning—a technology with the potential to transform health care. *Jama* **320**, 1101-1102 (2018).
- 21 De Luca, G. M. *et al.* Re-scan confocal microscopy: scanning twice for better resolution. *Biomedical optics express* **4**, 2644-2656 (2013).
- 22 Stanciu, S. G. *et al.* in *Proc. ATTRACT-Final Conf.—Igniting Deep Tech Revol.* 1-5.
- 23 Boucher, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases* **48**, 1-12 (2009).
- 24 Rice, L. B. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **31**, S7-S10 (2010).
- 25 Tacconelli, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* **18**, 318-327 (2018).
- 26 Sahl, S. J., Hell, S. W. & Jakobs, S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nature reviews Molecular cell biology* **18**, 685 (2017).
- 27 Gahlmann, A. & Moerner, W. Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 9-22 (2014).
- 28 Lee, S. A., Ponjavic, A., Siv, C., Lee, S. F. & Biteen, J. S. Nanoscopic cellular imaging: confinement broadens understanding. *ACS nano* **10**, 8143-8153 (2016).
- 29 Lucidi, M. *et al.* STED nanoscopy of KK114-stained pathogenic bacteria. *Journal of Biophotonics* (2020).
- 30 Wurm, C. A. *et al.* Novel red fluorophores with superior performance in STED microscopy. *Optical Nanoscopy* **1**, 1-7 (2012).
- 31 Kolmakov, K. *et al.* Red-emitting rhodamine dyes for fluorescence microscopy and nanoscopy. *Chemistry—A European Journal* **16**, 158-166 (2010).
- 32 Lucidi, M. *et al.* Characterization of *Acinetobacter baumannii* Filamentous Cells by Re-Scan Confocal Microscopy and Complementary Fluorometric Approaches. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **27**, 1-7 (2021).
- 33 Peleg, A. Y., Seifert, H. & Paterson, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews* **21**, 538-582 (2008).
- 34 Dickstein, Y. *et al.* Treatment outcomes of colistin-and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: an exploratory subgroup analysis of a randomized clinical trial. *Clinical Infectious Diseases* **69**, 769-776 (2019).
- 35 Chen, X. *et al.* Modern Scattering-Type Scanning Near-Field Optical Microscopy for Advanced Material Research. *Advanced Materials*, 1804774 (2019).
- 36 Lucidi, M. *et al.* SSNOMBACTER: A collection of scattering-type scanning near-field optical microscopy and atomic force microscopy images of bacterial cells. *GigaScience* **9**, gaa129 (2020).
- 37 Pasquina-Lemonche, L. *et al.* The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*, 1-4 (2020).
- 38 Stanciu, S. G., Latterini, L. & Charitidis, C. A. Recent Trends in Optical and Mechanical Characterization of Nanomaterials. *Frontiers in Chemistry* **8** (2020).

- 39 Gerton, J. M., Wade, L. A., Lessard, G. A., Ma, Z. & Quake, S. R. Tip-enhanced fluorescence microscopy at 10 nanometer resolution. *Physical Review Letters* **93**, 180801 (2004).
- 40 Yang, B. *et al.* Sub-nanometre resolution in single-molecule photoluminescence imaging. *Nature Photonics*, 1-7 (2020).
- 41 Zhang, R. *et al.* Chemical mapping of a single molecule by plasmon-enhanced Raman scattering. *Nature* **498**, 82-86 (2013).
- 42 Nowak, D. *et al.* Nanoscale chemical imaging by photoinduced force microscopy. *Science advances* **2**, e1501571 (2016).
- 43 Lu, F., Jin, M. & Belkin, M. A. Tip-enhanced infrared nanospectroscopy via molecular expansion force detection. *Nature photonics* **8**, 307-312 (2014).
- 44 Wang, P. *et al.* Far-field imaging of non-fluorescent species with subdiffraction resolution. *Nature photonics* **7**, 449-453 (2013).
- 45 Tzang, O., Pevzner, A., Marvel, R. E., Haglund, R. F. & Cheshnovsky, O. Super-resolution in label-free photomodulated reflectivity. *Nano letters* **15**, 1362-1367 (2015).
- 46 Gong, L., Zheng, W., Ma, Y. & Huang, Z. Saturated Stimulated-Raman-Scattering Microscopy for Far-Field Superresolution Vibrational Imaging. *Physical Review Applied* **11**, 034041 (2019).
- 47 Stanciu, S. G. *et al.* Combined far-field, near-field and topographic imaging of nano-engineered polyelectrolyte capsules. *Materials Letters* **183**, 105-108 (2016).
- 48 Sukhorukov, G. B. *et al.* Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design. *Polymers for Advanced Technologies* **9**, 759-767 (1998).
- 49 Richardson, J. J., Björnmalm, M. & Caruso, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *science* **348**, aaa2491 (2015).
- 50 Stanciu, S. G., Tranca, D. E., Hristu, R. & Stanciu, G. A. Correlative imaging of biological tissues with apertureless scanning near-field optical microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Biomedical optics express* **8**, 5374-5383 (2017).
- 51 Mateos, J. M. *et al.* Topographic contrast of ultrathin cryo-sections for correlative super-resolution light and electron microscopy. *Scientific reports* **6**, 34062 (2016).
- 52 Wan, J. & Goldman, D. Retina regeneration in zebrafish. *Current opinion in genetics & development* **40**, 41-47 (2016).
- 53 Stanciu, S. G. *et al.* Characterization of Nanomaterials by Locally Determining their Complex Permittivity with Scattering-Type Scanning Near Field Optical Microscopy. *ACS Applied Nano Materials* (2020).
- 54 Tranca, D. E. *et al.* High-resolution quantitative determination of dielectric function by using scattering scanning near-field optical microscopy. *Scientific reports* **5**, 11876 (2015).
- 55 Tranca, D. E., Stanciu, S. G., Hristu, R., Witgen, B. M. & Stanciu, G. A. Nanoscale mapping of refractive index by using scattering-type Scanning Near-Field Optical Microscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **14**, 47-50 (2018).
- 56 Yoo, Y. J., Lim, J. H., Lee, G. J., Jang, K.-I. & Song, Y. M. Ultra-thin films with highly absorbent porous media fine-tunable for coloration and enhanced color purity. *Nanoscale* **9**, 2986-2991 (2017).
- 57 Ishii, S., Shinde, S. L. & Nagao, T. Nonmetallic Materials for Plasmonic Hot Carrier Excitation. *Advanced Optical Materials* **7**, 1800603 (2019).
- 58 Ishii, S., Sugavaneshwar, R. P. & Nagao, T. Titanium nitride nanoparticles as plasmonic solar heat transducers. *The Journal of Physical Chemistry C* **120**, 2343-2348 (2016).
- 59 Boi, S. *et al.* Encapsulated functionalized stereocomplex PLA particles: An effective system to support mucolytic enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **179**, 190-198 (2019).
- 60 Yoo, Y. J. *et al.* Large-Area Virus Coated Ultrathin Colorimetric Sensors with a Highly Lossy Resonant Promoter for Enhanced Chromaticity. *Advanced Science*, 2000978 (2020).