

## RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

**Etapa 1** a proiectului „Sistem de imagistica cantitativa de faza pentru diagnosticarea tesuturilor”, denumita „Proiectarea si dezvoltarea componentelor sistemului QPI si a modelului TMA pentru prelevarea de probe” are ca activitate principala „Proiectarea sistemului de imagistica cantitativa de faza. Faza preparatorie pentru probele TMA (tissue microarray).”

Activitatile desfasurate in prima etapa includ: \*Proiectare sistem experimental; \*Achizitia de componente pentru sistemul experimental; \*Dezvoltarea de sub-ansamble ale sistemului QPI;

Activitatile sunt alocate Partenerilor astfel:

CO: - Proiectarea modelului experimental; - Stabilirea caracteristicilor tehnice ale echipamentelor achizitionate (microscop cu contrast de faza); - Determinarea parametrilor critici si a factorilor de calitate ce trebuie urmariti in dezvoltarea sistemului; - Achizitia componentelor sistemului experimental; -Dezvoltarea de sub-ansamble ale dispozitivului QPI; - Evaluarea riscurilor; implementarea strategiei de risc si reevaluarea posibilelor riscuri; - Selectarea tipurilor de probe de analizat – impreuna cu P1.

P1: - Selectarea sistemului TMA folosit in cadrul proiectului; - Determinarea parametrilor optimi pentru probele de analizat.

### Rezumatul fazei

In cadrul fazei, analizand literatura de specialitate raportata cu privire la sistemele de imagistica, s-a proiectat sistemul de imagistica cantitativa de faza si s-au stabilit caracteristicile tehnice ale principalelor sub-ansamble ale acestuia pe baza carora va fi dezvoltat. Configuratia sistemului cuprinde: microscopul optic inversat, interferometrul de tip Mach-Zehnder si camera CCD de inregistrare a interferogramelor (imaginile probelor), fiind completat de o serie de componente opto-mecanice. Pentru realizarea sistemului, si in completarea dotarilor existente la Coordonator, s-a achizitionat microscopul optic inversat, de tip AxiObserver Z1, Carl Zeiss, precum si o masa de translatie micrometrica XYZ cu control diferential al deplasarii, necesara pozitionarii micrometrice a filtrului spatial. De asemenea, s-au prezentat date cu privire la principiul metodei si modulul de interpretare al interferogramelor, precum si specificatiile tehnice ale principalelor sub-ansamble.

Partenerul din cadrul proiectului a realizat o analiza a tipurilor de materiale biologice care pot fi investigate cu sistemul propus, respectiv matrici de tesuturi de interes oftalmologic, cum sunt: probe de tesut conjunctival; tesuturi maligne; tesuturi corneene. A prezentat, de asemenea, protocolul de preparare a probelor care va fi urmat in obtinerea specimenelor de interes.

# Raport stiintific si tehnic in extenso

## 1. Introducere.

Imagistica cantitativa de faza (QPI) a cunoscut in ultimii ani un interes stiintific crescut in domeniul biomedical. Avantajul acestei metode este reprezentat de faptul ca analiza se efectueaza fara utilizarea unor „markeri” de fluorescenta [1].

Aceasta metoda permite investigarea unor specimene biologice nemarcate prin conversia lungimii drumului optic in date relevante din punct de vedere biologic [2-10].

Prin trecerea luminii prin proba se introduce o modificare a fazei luminii incidente. Aceasta modificare este dependenta atat de grosimea cat si de indicele de refractie al specimenului (caracteristici care determina densitatea probei analizate) ceea ce permite utilizarea QPI intr-o serie de aplicatii inclusiv experimente de determinare a volumului si topografiei globulelor rosii din sange [11, 12], fluctuatii ale membranei celulare [13, 14], dezvoltarea celulara [15, 16], transport de masa intracelular [17-19], diagnosticarea cancerului in biopsii [20-22].

Metoda QPI utilizata in cadrul acestui proiect se bazeaza pe fenomenul de interferenta avand la baza metoda de microscopie de difracție cu contrast de faza (DPM). Dispozitivul experimental dezvoltat in cadrul proiectului va folosi, spre deosebire de DPM, lumina alba emisa de o lampa cu halogen, putandu-se induce de asemenea modificari ale fazei prin intermediul modificarii cu  $\lambda/2$  a pozitiei rețelei de difracție utilizate [23-31].

## 1. Proiectarea modelului experimental si realizarea de sub-ansamble ale dispozitivului QPI;

### Proiectarea modelului experimental si principiul metodei.

Configuratia propusa pentru dispozitivul experimental va utiliza un interferometru compact Mach-Zehnder, ce oferă niveluri scăzute de zgomot și o viteză de achiziție care este limitată numai de viteza camerei CCD folosite. Interferometrul este atasat unui microscop inversat disponibil comercial. Metoda propusa in cadrul proiectului va furniza informatii cantitative despre proba analizata, oferind o imbunatatire a contrastului obtinut cu ajutorul microscopului inversat.

In Fig. 1 este prezentata schema dispozitivului experimental QPI. Microscopul inversat, disponibil comercial, este echipat cu o lampa cu halogen, a carei emisie este filtrata spatial prin intermediul unui condensator. Astfel, proba este iluminata cu un fascicul colimat de lumina alba.

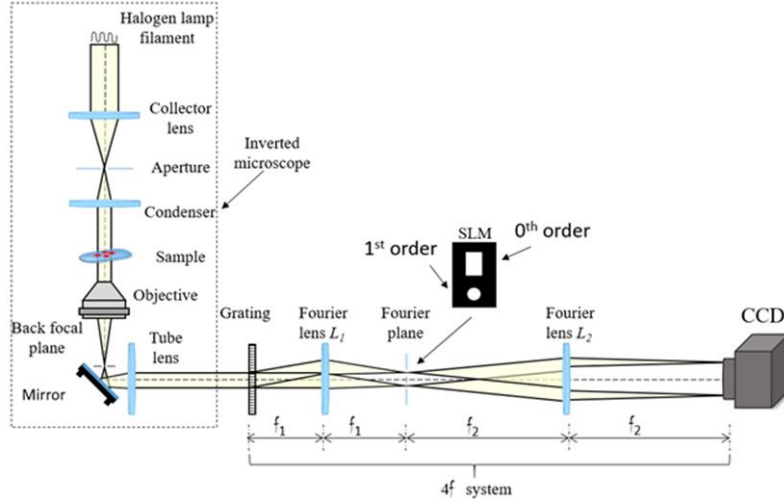


Figura 1. Sistem experimental de imagistica cantitativa de faza. SLM, filtru spatial; CCD, camera video.

În planul imagine al portului de ieșire al microscopului va fi plasată o rețea de difracție cu 110 tras/mm. Filtrul spatial utilizat în sistemul interferometric va filtra ordinul 0 și ordinul 1 de difracție. În esență, rețeaua este folosită pentru a construi un interferometru compact de tip Mach-Zehnder. Pentru a converti difracția de ordinul 0 în câmp de referință al interferometrului, o filtrăm folosind lentila L1 și pinhole-ul. Lentila L2 formează înapoi imaginea în planul camerei CCD. Interferograma înregistrată de către CCD constă în imaginea originală transmisă de primul ordin de difracție, suprapusă peste referință în afara axei generată de ordinul 0. Datorită geometriei optice utilizate, DPM este foarte stabil, cu un zgomot al lungimii de bandă temporală <1nm fără a fi necesare alte măsuri active de stabilizare.

Distribuția iluminării măsurate are forma:

$$I(x, y) = I_0 + I_1 + 2\sqrt{I_0 I_1} \cos[\phi(x, y) + \alpha x] \quad (1)$$

Unde  $I_0$  și  $I_1$  sunt intensitățile luminoase de ordin 0 și respectiv 1, iar  $\phi$  este planul fazei de interes.

Frecvența spațială,  $\alpha = 2\pi/\Lambda$  este un factor al rețelei, cu  $\Lambda$  - perioada acesteia. Pentru a stabili condițiile de sampling ale interferogramei, analizăm domeniul de frecvență spațială. Considerând transformata Fourier a intensității măsurate, obținem:

$$\tilde{I}(k_x, k_y) = \mathfrak{F}[U_0 U_0^* + U_1(x, y) U_1^*(x, y) + U_0 U_1^*(x, y) e^{i\alpha x} + U_0^* U_1(x, y) e^{-i\alpha x}] \quad (2)$$

Unde  $\mathfrak{F}$  reprezintă operatorul transformatei Fourier și  $\tilde{I}$  este transformata Fourier a  $I$ . Folosind teorema de corelare și faptul că  $U_0$  este uniform după filtrarea spațială, Ec. (2) devine:

$$\tilde{I}(k_x, k_y) = |U_0^2| \delta(k_x, k_y) + \tilde{U}_1(k_x, k_y) \otimes \tilde{U}_1(k_x, k_y) U_0 \tilde{U}_1(-k_x - \alpha, -k_y) + U_0 \tilde{U}_1(k_x + \alpha, k_y) \quad (3)$$

Unde  $\otimes$  indică operația de convoluție.

Ec. (3) oferă informații despre acoperirea în frecvență a interferogramei, după cum urmează: cum  $U_1$  este limitată la difracție, acesta este un semnal de bandă limitată, cu frecvență maximă guvernată de apertura numerică (NA) a obiectivului,  $k_{max} = \beta NA$ ,  $\beta = \omega/c$ . Deoarece termenul de corelare  $\tilde{U}_1 \otimes \tilde{U}_1$  are frecvență maximă  $2\beta NA$ , găsim că frecvența minimă de modulare este  $\alpha \geq 3\beta NA$ . Pe de altă parte

frecvența maximă a întregului semnal este  $4\beta NA$ . Conform teoremei lui Nyquist, frecvența de eșantionare a pixelilor,  $k_p$ , trebuie să satisfacă relația  $k_p \geq 8\beta NA$ .

În microscopia de difracție cu contrast de fază în lumina albă (PSwDPM), termenul de corelație este substras astfel încât  $\alpha$  poate fi mai scăzut, respectiv  $\alpha = \beta NA$ , fără a se pierde informații. Drept urmare cea mai mare frecvență a semnalului este  $k_{max}' = 2\beta NA$ , iar noua frecvență de eșantionare a pixelilor este  $k_p' \geq 4\beta NA$ .

În cazul metodei „on-axis” termenul de autocorelare este eliminat prin schimbarea de fază și  $\alpha = 0$ . În acest caz, cea mai crescută frecvență este  $k_{max}'' = \beta NA$  și condiția de eșantionare a pixelilor este  $k_p'' \geq 2\beta NA$ . Astfel, este evident că prin colectarea cadrelor cu două faze deplasate, se obține o îmbunătățire a semnalului colectat cu un factor de 2, în timp ce colectarea a 4 astfel de faze îmbunătățește produsul cu un factor 4.

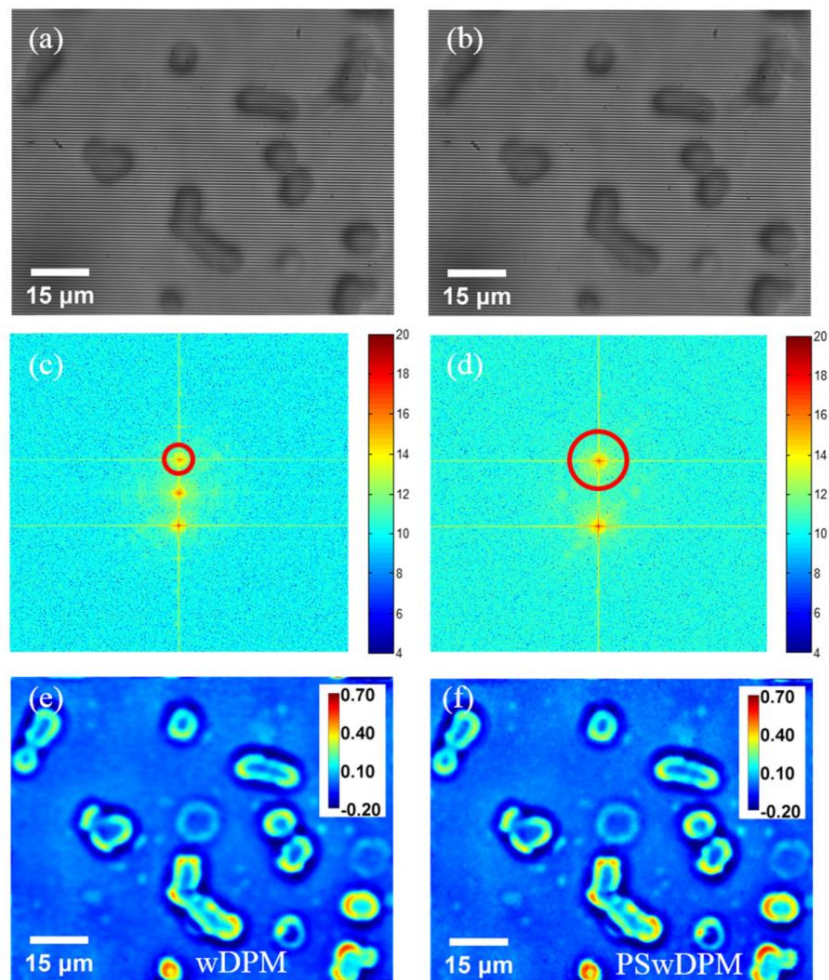


Figura 2. Microscopia de difracție în lumina albă (WDPM) vs PSwDPM pentru un frotiu de sânge. (a) Interferograma  $I(0)$ ; (b) Interferograma  $I(\pi)$ ; (c) Spectrul de putere al lui  $I(0)$ ; (d) Spectrul de putere al  $I(0) - I(\pi)$ ; Faza reconstituită obținută prin wDPM (e) și PSwDPM (f). Barele de culori din c - d indică intensitatea în scara logaritmică și unități arbitrare, iar în e - f arată faza în rad, așa cum este indicat [30].

Fig. 2(a) ilustreaza un exemplu de interferograma masurata. Uzual, aceasta imagine este transformata Fourier, ceea ce are ca rezultat un spectru de putere spațial așa cum este redat în figura 2(c).

În esență, achiziționând două interferograme diferite și scăzându-le,  $I(0) - I(\pi) = 4\sqrt{I_0 I_1} \cos[\phi(x, y) + \alpha x]$ , obținem o imagine de fază cu o rezoluție mai mare, așa cum observăm comparând Fig.2(f) cu 2(e).

Proprietatile luminii (intensitatea luminoasă, faza, spectrul, polarizarea, coerența, direcția) se modifică la trecerea acesteia prin medii neomogene. Modificările observate aduc informații privind proprietățile probei (tesutului). În Ref. [31] a fost derivată o relație statistică de dispersie a undelor ce se propagă în medii neomogene oferind o relație între vectorul de undă și indicele de refracție, informații de interes pentru măsurătorile QPI ce vor fi desfășurate în cadrul proiectului.

### **Stabilirea caracteristicilor tehnice ale echipamentelor achiziționate (microscop inversat); Achiziția componentelor sistemului experimental; Realizarea de sub-ansamble ale dispozitivului QPI.**

Realizarea sistemului experimental de imagistică catitivă de fază (QPI) constă în cuplarea unui microscop optic inversat, disponibil comercial, cu un interferometru Mach-Zehnder, sub-ansamblu al sistemului QPI realizat în laborator, și achiziția și înregistrarea imaginilor probelor investigate utilizând o cameră video sensibilă CCD, existentă în dotarea Coordonatorului. Sistemul va fi dezvoltat pe structura schemei prezentate în Fig.1.

În etapa curentă s-au achiziționat microscopul inversat (sub-ansamblu) și o masă de translație micrometrică XYZ cu control diferențial necesară pentru completarea componentelor opto-mecanice care intră în structura montajului interferometric (sub-ansamblu).

Schema bloc a sistemului QPI cuprinde microscopul care va furniza pe unul din porturile laterale câmpul optic (imaginea probelor analizate) incident pentru interferometru (Figura 3). Componentele interferometrului sunt: - rețeaua de difracție; - lentila  $L_1$  reprezentată de un obiectiv foto macro cu distanța focală  $f_1 = 60\text{mm}$ ; - filtrul spațial (pinhole) care permite trecerea ordinilor 0 și 1 de difracție, și încorporează o lentilă cu gradient de index de refracție (GRIN lens) corespunzător trecerii ordinului 1 al difracției; - lentila  $L_2$  este reprezentată de o lentilă tip dublet-acromatic cu  $f_2 = 150\text{mm}$ ; - camera video CCD utilizată pentru achiziția și înregistrarea interferogramelor.

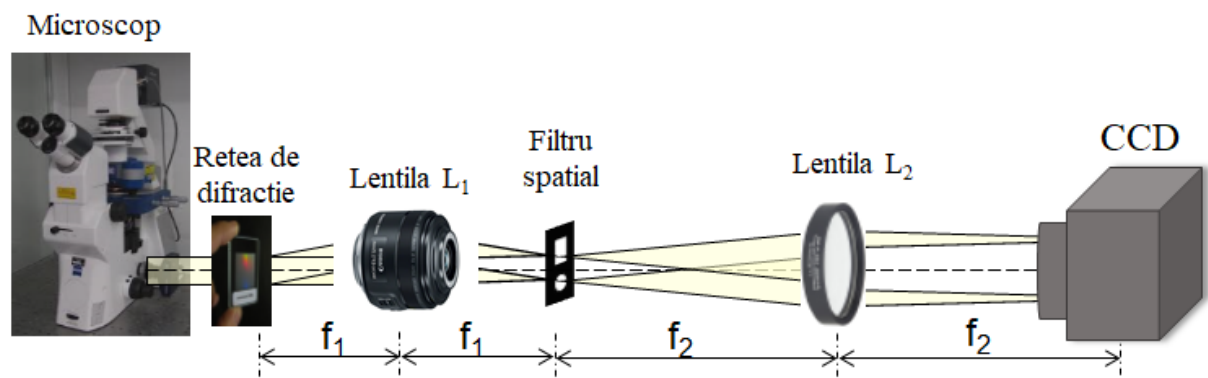


Figura 3. Diagrama montajului experimental; CCD, camera video.

Caracteristicile componentelor sub-ansamblului interferometric sunt:

- Reteaua de difracție este de tip rețea prin transmisie cu 110 tras/mm, dimensiuni liniare 12.7 x 12.7 mm și 25 x 25 mm (Edmund Optics Stock No. #46-073 și No. #46-074);
- Lentila 1 tip obiectiv foto Macro cu distanța focală  $f = 60$  mm (EFS 60 mm f/2.8 Macro, Canon)
- Filtru spațial (SLM) prevăzut cu o lentilă cu gradient de indice de refracție, domeniu spectral 670-1550 nm (EFL  $f = 0.3$  mm, diam. = 0.35 mm, Edmund Optics Stock No. 88-355).
- Masa de translație micrometrică XYZ cu control diferențial pentru poziționarea filtrului spațial, permite o deplasare de 25 mm cu rezoluție grosieră de 25  $\mu$ m per revoluție, și fină de 0.5  $\mu$ m (Thorlabs, 3x LNR25D/M, 1x LNR25P1, 1x LNR25P2).
- Lentila 2 tip dublet – acromatic, distanța focală  $f_2 = 150$  mm, apertură  $\Phi 2''$ , domeniu spectral 400-700 nm (AC508-150-A-ML, Thorlabs).
- Camera CCD, rezoluție 2080x1552 px, 60fps, monocromatică, dim. pixel 2.5  $\mu$ m, 3.2MP, zgomot alb (e-) 6.71 @60fps, eficiența cuantică 67%; CMOS (Flea3 3.2 MP Mono USB3 Vision, Point Grey) sau Ultra-fast CCD camera, rezoluție 800x600px @1200fps până la 32x16px @100 kfps, monocromă și color, dim. pixel 22  $\mu$ m, zgomot alb (e-) 21 (tip Miro 3, Phantom).

### **Microscopul optic inversat.**

În cazul microscopului inversat, în urma consultării literaturii de specialitate privind caracteristicile necesare pe care trebuie să le îndeplinească acesta (a se vedea mai jos) [1, 27-31] pentru a furniza un câmp optic incident, optim, pentru sistemul interferometric, s-au stabilit caracteristicile minime pe baza cărora s-a realizat licitația (achiziția) microscopului. Astfel, în urma încheierii procedurilor de licitație s-a achiziționat Microscopul optic inversat tip AxioObserver Z1, producător Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germania.

Configurația microscopului achiziționat (caracteristici tehnice generale) cuprinde: - Microscopul optic inversat; - Accesorii: camera digitală color incorporată, soft pentru controlul camerei video digitale și a funcțiilor motorizate ale microscopului și pentru analiză; - Stație de lucru (PC) și software.

- Specificații tehnice ale Microscopului optic inversat sunt:
  - Toate funcțiile esențiale ale microscopului sunt motorizate.
  - Are un stand inversat motorizat de înaltă stabilitate.
  - Standul este prevăzut cu interfețe pentru adăugarea diferitelor accesorii: 4xCAN, RS 232, USB și TCP/IP, și mufa pentru controlul unui obturator mecanic extern.
  - Control motorizat al focalizării pe axa Z cu pas de 10 nm.
  - Este prevăzut cu cap revolver motorizat pentru 6 obiective, cu 6 locașuri pentru prismele DIC, ce permite recunoașterea automată a obiectivelor utilizate, chiar dacă acestea sunt poziționate în alte locașuri.
  - Este prevăzut cu două porturi laterale cu trei poziții interschimbabile (100% ocular/0% port lateral; 0% ocular/ 100% - port lateral stânga, 20% ocular/ 80% - port lateral dreapta).
  - Este prevăzut cu un tub binocular inclinabil până la maxim 45 grade, cu obturator manual.
  - Este prevăzut cu oculare 10X, cu un câmp larg de 23 mm, focalizabile, cu protecție de cauciuc.
  - Este echipat cu masa de translație a probelor pe direcțiile X,Y, motorizată cu motor pas cu pas și encoder liniar, având următorii parametri de lucru: domeniu de lungimi de deplasare de 130 mm x 85 mm; control motorizat cu viteză maximă 100 mm/s; două viteze selectabile; rezoluție a deplasării 0.1  $\mu$ m; include accesoriu pentru deplasarea mesei fără a fi nevoie de pornirea software-ului.

- Este prevazut cu un panou de comanda de tip tactil (touch screen) care permite comandarea elementelor motorizate ale standului si poate fi pozitionat oriunde in jurul standului.
- Este prevazut cu un suport universal, atat pentru lame cu lungimea de minim 120 mm, cat si pentru vase Petri cu diametre intre 24 si 68 mm.
- Este prevazut cu un dispozitiv pentru lumina transmisa, inclinabil, cu suport pentru fixarea a minim 3 filtre de culoare.
- Iluminarea pentru lumina transmisa este realizata cu lampa LED, temperatura de culoare 5700K ÷ 6500K, si durata de viata de minim 10.000 ore, cu filtru de conversie la temperatura de culoare de 3200K.
- Este prevazut cu obiectiv 5x, apertura numerica minim 0,16, distanta de lucru minim 18,5 mm, potrivit pentru examinare in camp luminos, contrast de faza si fluorescenta.
- Este prevazut cu obiectiv 10X, apertura numerica minim 0,3, distanta de lucru minim 5,2 mm, potrivit pentru examinare in camp luminos, cu contrast de faza si fluorescenta.
- Este prevazut cu obiectiv 20x, distanta de lucru mare, apertura numerica minim 0,4, optica corectata in functie de grosimea suportului probei; potrivit pentru examinarea in lumina transmisa in camp luminos, cu contrast de faza si fluorescenta. Distanta minima de lucru este variabila: de la 8,4 mm pentru o grosime a suportului probei de 0 mm pana la 7,4 mm cand grosimea suportului probei este de 1,5 mm.
- Este prevazut cu dispozitiv optic intermediar, minim 1,6x si maxim 2x, care poate fi utilizat in combinatie cu oricare dintre obiective pentru magnificatii suplimentare.
- Permite actionarea motorizata a dispozitivului optic intermediar.
- Este prevazut cu micro- si macrovizu concentrice, disponibile pe ambele parti ale standului.
- Este prevazut cu un condensator cu actionare motorizata si apertura numerica de minim 0,55, diafragma motorizata, cu 6 pozitii pentru camp luminos, contrast de faza si contrast diferential de interferenta, distanta de lucru minima 26 mm, pentru obiective cu magnificatii intre 4x – 100x.
- Este prevazut cu o cale optica necesara atasarii unei surse pentru examinare in lumina incidenta (fluorescenta).
- Pe ambele porturi laterale este prevazut cu cate un adaptoar pentru interfata optica tip C-mount.
  - Accesoriile microscopului.
- Camera digitala color are o rezolutie de 2560 (H) x 1920 (V), 5.0 Megapixeli; dimensiunea pixelilor de minim 2,2  $\mu\text{m}$  x 2,2  $\mu\text{m}$ ; dimensiunea senzorului 1/2,5 inc.; rata de achizitie a cadrelor in timp real de 15 cadre/sec la o rezolutie de 2560 x 1920; timp de integrare de 100  $\mu\text{s}$  pana la 2 s; este prevazuta cu interfete, optica, de tip C-mount, si de comunicare, tip USB 3.0.
- Soft-ul pentru controlul camerei video digitale si pentru analiza permite achizitia de imagine alb/negru sau color, de inalta rezolutie si inalta sensibilitate; permite: imbunatatirea imaginii (luminozitate, contrast, gamma, smooth/sharpen, reducere zgomot, extragere zgomot fond (background), corectie umbre, balans de alb), adnotari pe imagine (text, sageti, casute de text, cercuri, linii gradate), masurarea interactiva (a lungimii, ariei, perimetrului, razei, unghiurilor), compunerea imaginilor achizitionate pe mai multe canale de lumina transmisa si fluorescenta, compunerea imaginilor obtinute din planuri focale succesive, permite comandarea functiilor motorizate ale microscopului; este compatibil cu sistem de operare Windows 10.

- Statie de date hardware si software (PC).

Sistem de operare Windows 10, procesor i7, 2.4GHz, 16Gb RAM, 2Tb HDD, 250 Gb SSD, cu accesorii (mouse, tastatura), placa ethernet 1Gb, conexiune USB 3.0 fata si spate; monitor LCD 23", 1080p full HD; Toate pachetele software, inclusiv sistemul de operare, sunt licentiate.

## **2. Determinarea parametrilor critici de urmarit in dezvoltarea sistemului.**

A fost efectuata o analiza a parametrilor critici ce trebuiesc urmariti pe intreaga perioada a proiectului pentru asigurarea dezvoltarii in bune conditii a sistemului experimental propus. Au fost analizate performantele componentelor sistemului experimental si au fost facute recomandari privind posibile imbunatatiri ale performantelor acestora/upgrade. Toate componentele necesare dezvoltarii sistemului experimental propus in cadrul proiectului au fost achizitionate sau sunt in curs de achizitionare, procesul de achizitie urmand sa fie finalizat pana la finalul anului.

Astfel, pe langa componentele opto-mecanice existente, s-au achizitionat Microscopul optic inversat si Masa de translatie XYZ cu control diferential pentru pozitionarea filtrului spatial care incorporeaza lentila GRIN. Masa de translatie XYZ permite pozitionarea lentilei GRIN in spotul lumini determinat de lentilei L1, care poate avea diametrul de ordinul a 10 $\mu$ m.

## **3. Evaluarea riscurilor; implementarea strategiei de risc si reevaluarea posibilelor riscuri.**

A fost efectuata o analiza de risc in ceea ce priveste fezabilitatea si procesul de implementare a proiectului. Au fost analizate posibilele riscuri de ordin tehnic prin evaluarea posibilelor rezultate stiintifice si cum acestea ar putea fi afectate ca urmare a unor variatii/modificari ale performantelor echipamentelor utilizate. Toate celelalte riscuri care au fost luate in calcul la momentul propunerii de proiect au fost reevaluate si au fost propuse solutii pentru preintampinarea acestora. Unul dintre parametrii critici care au fost rezolvati este reprezentat de posibilele fenomene de dispersie ce pot aparea in cadrul sistemului interferometric. Pentru rezolvarea acestei probleme, a fost inlocuita lentila L1 cu un obiectiv de camera foto cu aceasi distanta focala, care va asigura calitatea semnalului ce va fi ulterior filtrat cu ajutorul filtrului spatial (SLM). De asemenea, pentru alinierea precisa a filtrului spatial s-a achizitionat o masa de translatie cu control diferential, respectiv o rezolutie fina a deplasarii de 0.5  $\mu$ m per revolutie. Deoarece sursa de lumina utilizata este reprezentata de o lampa cu lumina alba (si nu un fascicul laser), exista posibilitatea unei scaderi in intensitate a semnalului ceea ce face necesara utilizarea unor timpi de expunere mai mari si implicit a unei camere cu sensibilitate ridicata.

## **4. Selectarea tipurilor de probe de analizat – impreuna cu P1.**

Dupa explorarea bibliografiei de specialitate in vederea selectarii sistemului TMA (tissue microarray - matrici de tesuturi), s-a constatat ca nu exista tesuturi disponibile comercial de interes pentru obiectivele proiectului de fata. Avand in vedere acestea, urmeaza ca P1 (Clinica de Oftalmologie a S.U.U.B. – UMF "Carol Davila" Bucuresti), sa pregateasca matrici de tesuturi de interes oftalmologic,



cum ar fi” \* probe de tesut conjunctival (degenerescente conjunctivale, de tip pterigion sau pinguecula); \* tesuturi maligne (de tipul melanomului malign irian sau coroidian, extrase de la nivelul ochilor eviscerati); \* tesuturi corneene (extrase tot de la nivelul ochiului eviscerat). Aceste tesuturi (probe de tesut) vor fi analizate cu ajutorul sistemului microscopic ce urmeaza a fi dezvoltat in cadrul proiectului.

## 5. Selectarea sistemului TMA folosit in cadrul proiectului; Determinarea parametrilor optimi pentru probele de analizat.

### Tesuturile corneene.

Corneea are o structura relativ simpla, fiind alcatuita din cinci straturi, dinspre exterior spre interior: epiteliul cornean pluristratificat, membrane Bowman, stroma corneana, membrana Descemet si endoteliul cornean. Aceasta structura are o importanta deosebita atunci cand se pune problema realizarii unor keratoplastii partiale (DSAEK – Descemet’s stripping automated endothelial keratoplasty sau DMEK – Descemet’s membrane endothelial keratoplasty), care, in lumina ultimelor studii, capata teren in defavoarea transplantului total de cornee.

In 2013, Prof. Harminder Dua de la Universitatea din Nottingham a sugerat posibilitatea existentei unui al saselea strat (**stratul Dua**), de aproximativ 15 micrometri, localizat intre stroma corneana si membrana Descemet, suficient de rezistent la o presiune de pana la 2 bari, (atunci cand este injectat aer in cornee), a carui localizare si structura par sa prezinte o deosebita importanta in keratoplastiile partiale. Acest strat poate avea un rol deosebit in studierea si intelegerea distrofiilor corneene pre-descemetice, descemetocelilor, hidropsului cornean, intalnit la pacientii cu keratoconus. El nu a fost inca pus in evidenta cu mijloace optice.

Alte structuri de studiat sunt diversele forme de degenerescenta conjunctivala, cum ar fi **pterigionul sau pinguecula**. Exista o multitudine de factori care pot contribui la aparitia acestor afectiuni (expunerea la radiatiile UV, la praf, precum si alti factori iritanti, dar s-a vehiculat si componenta genetica). Caracteristica este degenerescenta elastotica a colagenului si proliferare fibrovasculara. Forma triunghiulara a pterigionului, cu baza la limb si varful catre cornee si structura sa poate reprezenta un obiect de studiu pentru intelegerea compozitiei si evolutiei sale, pentru a putea aplica tratamente eficiente, cu evitarea recurentelor. Pinguecula este un alt tip de degenerescenta corneana, cu aspectul unui nodul galbui, in unghiul extern sau intern al globului ocular, si este constituita din proteine, grasimi sau calciu. Studiul ambelor structuri ne permite sa facem o paralela privind evolutia si tratamentul acestor degenerescente conjunctivale, ce fac parte din aceeasi structura, insa sunt diferite.

**Melanomul malign coroidian** este cea mai frecventa tumora primara de la nivelul globului ocular si al doilea ca frecventa intre melanoamele de la nivelul corpului. Studiul structurii acestor melanoame ne poate ajuta sa intelegem mai bine cauzele pentru care ele apar si sa incercam diverse metode de tratament, eficiente pentru prelungirea ratei de supravietuire si a calitatii vietii.

### MODALITATEA DE PASTRARE SI TRIMITERE A PROBELOR HISTOPATOLOGICE

Probele operatorii se trimit in totalitate, fie neformolizate imediat dupa interventia chirurgicala, fie in formol tamponat 10%, in recipient de plastic cu capac ce trebuie sa contina un volum de formol de 2-10 ori mai mare decat volumul piesei operatorii.

Probele operatorii destinate analizei histopatologice sunt aduse in laborator de catre personalul medical al sectiei care solicita examinarea. El trebuie sa prezinte in afara de proba

operatorie, consimtamantul scris al pacientului, fisa de insotire a materialului biopsic si caietul de evidenta al probelor operatorii.

#### CRITERII DE ORIENTARE A PIESELOR OPERATORII.

Medicul anatomo-patolog apreciaza dimensiunile, greutatea si aspectul piesei operatorii (culoare, consistenta,etc). Prelevarea trebuie sa tina cont de: mentinerea raporturilor anatomice si histologice cat mai aproape de starea "in vivo"; orientarea leziunilor; grosimea sectiunilor. Se recomanda ca suprafata materialului care trebuie prelucrat sa nu depaseasca 4-5cm<sup>2</sup>; de asemenea, grosimea materialului care trebuie sectionat trebuie sa aiba 3-5mm.

#### PRELUCRAREA MATERIALULUI BIOPSIC.

Prelucrarea materialului biopsic se desfasoara in mai multe etape.

1. Fixarea are ca obiective: oprirea fenomenelor vitale din tesuturi si celule; impiedicarea alterarii structurilor celulare si a fenomenului de autoliza; pregatirea celulelor si a tesuturilor pentru colorare. Fixatorul trebuie sa ofere consistenta materialului biopsic, sa aiba o dispersie uniforma, sa nu altereze structurile celulare. Fixatorul standard este formolul cu concentratie de 10%.

2. Deshidratarea indeparteaza apa din probele fixate si spalate la robinet. Deshidratarea se realizeaza prin trecerea probelor prin alcooluri de concentratie din ce in ce mai mare, sau prin substituenti ai alcoolului: ottix shaper si ottix plus.

3. Clarificarea este reprezentata de impregnarea piesei operatorii cu solvent: toluen sau ottixplus.

4. Parafinarea este data de patrunderea pieselor cu parafina topita la 56-58°C.

Procesarea automata a pieselor cu aparatul Donatello:

- a. formol neutru 10%
- b. apa robinet - 1h30 – presiune/vacuum (P/V)
- c. Ottix Shaper – 1h - presiune
- d. OttixPlus – 1h – presiune
- e. OttixPlus – 1h – presiune
- f. OttixPlus – 1h – presiune
- g. OttixPlus – 1h30 – presiune
- h. Parafina – 1h30
- i. Parafina – 1h30
- j. Parafina – 1h30

5. Includerea probelor operatorii se face cu aparatele de inclus Canova sau Labkins.

6. Sectionarea blocurilor de parafina se face la microtom. Se realizeaza sectiuni seriate de 3-5µm grosime. Acestea sunt etalate pe lame, puse in rastel, iar rastelul este introdus in termostat la 58-60°C.

7. Colorarea automata a lamelor - coloratie uzuala hematoxilina-eozinofila.

- solutia de deparafinare ottix plus, timp de 10 minute pentru fiecare cuva, avand rolul de a indeparta definitiv surplusul de parafina.

- dupa expirarea timpului, acestea vor trece in solutia de ottix shaper timp de 10 minute.

- spalarea probelor la apa de robinet.

- colorare cu hematoxilina timp de 10 minute.

- spalare la apa de robinet 5 minute.
- colorare cu eozina 1 minut.
- deshidratare ottix shaper 1 minut.
- clarificare solutie ottix plus 10 minute.
- probele sunt scoase din aparat si transferate in cuvele cu solutie de clarificare ottix plus 5-10 minute.
- montarea lamelei deasupra preparatului.

La sfarsitul acestui process de preparare, probele sunt disponibile pentru investigari microscopice.

## 6. Diseminarea rezultatelor

Rezultatele preliminare ale proiectului au fost diseminate in cadrul unui articol aflat in evaluare:

- Tozar, T; Andrei, IR; Costin, R; Pirvulescu, RA; Pascu, ML; "Case series about ex vivo evaluation of squamous cell carcinomas by laser induced autofluorescence and Fourier transformed infrared spectroscopy", LASERS IN MEDICAL SCIENCE (Under Review) (2017).

De asemenea, pentru diseminarea continua a rezultatelor proiectului s-a creat pagina de web dedicata: <http://lsg.inflpr.ro/ped236.html>.

## 7. Concluzii si perspective.

In cadrul etapei curente s-au evaluat caracteristicile pe care trebuie sa le indeplineasca microscopul optic inversat si sub-ansamblelele sistemului de imagistica cantitativa de faza (QPI) si parametrii la care trebuie sa functioneze sistemul. In functie de acestea s-au intocmit documentatii de achizitie ale microscopului, precum si a unei mese de translatie XYZ pentru pozitionarea Filtrului spatial (SLM). De asemenea, s-a prezentat tipul de material biologic care se are in vedere a fi investigat, precum si protocolul care va fi urmat in prepararea probelor care vor fi utilizate pentru investigare.

In etapa urmatoare se are in vedere realizarea montajului experimental utilizand dispozitivele mentionate. De asemenea, se vor realiza masuratori preliminare si in functie de aceste rezultate se poate propune, intr-o prima faza, pentru optimizarea sistemului experimental, achizitia unor componente opto-mecanice, sau daca nu sunt necesare, trecerea la masuratori pentru demonstrarea functionalitatii sistemului de imagistica cantitativa de faza.

## 8. Referinte:

- [1] G. Popescu, Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues (McGraw-Hill, 2011).
- [2] L. Miccio, A. Finizio, R. Puglisi, D. Balduzzi, A. Galli, and P. Ferraro, "Dynamic DIC by digital holography microscopy for enhancing phase-contrast visualization," Biomed. Opt. Express 2(2), 331–344 (2011).

- [3] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe, Y. Emery, C. Depeursinge, and P. Magistretti, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy," *Opt. Express* 13(23), 9361–9373 (2005).
- [4] B. Kemper, A. Bauwens, A. Vollmer, S. Ketelhut, P. Langehanenberg, J. Müthing, H. Karch, and G. von Bally, "Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy," *J. Biomed. Opt.* 15(3), 036009 (2010).
- [5] N. T. Shaked, T. M. Newpher, M. D. Ehlers, and A. Wax, "Parallel on-axis holographic phase microscopy of biological cells and unicellular microorganism dynamics," *Appl. Opt.* 49(15), 2872–2878 (2010).
- [6] P. Bon, S. Aknoun, S. Monneret, and B. Wattellier, "Enhanced 3D spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination," *Opt. Express* 22(7), 8654–8671 (2014).
- [7] N. Warnasooriya and M. K. Kim, "LED-based multi-wavelength phase imaging interference microscopy," *Opt. Express* 15(15), 9239–9247 (2007).
- [8] P. Kolman and R. Chmelík, "Coherence-controlled holographic microscope," *Opt. Express* 18(21), 21990–22003 (2010).
- [9] V. P. Pandiyan and R. John, "Optofluidic bioimaging platform for quantitative phase imaging of lab on a chip devices using digital holographic microscopy," *Appl. Opt.* 55(3), A54–A59 (2016).
- [10] Y. Park, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, T. Kuriabova, M. L. Henle, A. J. Levine, and G. Popescu, "Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(15), 6731–6736 (2010).
- [11] H. V. Pham, B. Bhaduri, K. Tangella, C. Best-Popescu, and G. Popescu, "Real time blood testing using quantitative phase imaging," *PLoS One* 8(2), e55676 (2013).
- [12] M. Mir, Z. Wang, K. Tangella, and G. Popescu, "Diffraction Phase Cytometry: blood on a CD-ROM," *Opt. Express* 17(4), 2579–2585 (2009).
- [13] Y. Park, C. A. Best-Popescu, R. R. Dasari, and G. Popescu, "Light scattering of human red blood cells during metabolic remodeling of the membrane," *J. Biomed. Opt.* 16(1), 011013 (2011).
- [14] Y. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. Choi, M. S. Feld, and S. Suresh, "Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(37), 13730–13735 (2008).
- [15] M. Mir, A. Bergamaschi, B. S. Katzenellenbogen, and G. Popescu, "Highly sensitive quantitative imaging for monitoring single cancer cell growth kinetics and drug response," *PLoS One* 9(2), e89000 (2014).
- [16] G. Popescu, Y. Park, N. Lue, C. Best-Popescu, L. Deflores, R. R. Dasari, M. S. Feld, and K. Badizadegan, "Optical imaging of cell mass and growth dynamics," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295(2), C538–C544 (2008).
- [17] S. Ceballos, M. Kandel, S. Sridharan, H. Majeed, F. Monroy, and G. Popescu, "Active intracellular transport in metastatic cells studied by spatial light interference microscopy," *J. Biomed. Opt.* 20(11), 111209 (2015).
- [18] M. Mir, T. Kim, A. Majumder, M. Xiang, R. Wang, S. C. Liu, M. U. Gillette, S. Stice, and G. Popescu, "Corrigendum: Label-Free Characterization of Emerging Human Neuronal Networks," *Sci. Rep.* 5, 11311 (2015).
- [19] R. Wang, Z. Wang, L. Millet, M. U. Gillette, A. J. Levine, and G. Popescu, "Dispersion-relation phase spectroscopy of intracellular transport," *Opt. Express* 19(21), 20571–20579 (2011).

- [20] S. Sridharan, V. Macias, K. Tangella, A. Kajdacsy-Balla, and G. Popescu, "Prediction of prostate cancer recurrence using quantitative phase imaging," *Sci. Rep.* 5, 9976 (2015).
- [21] Z. Wang, K. Tangella, A. Balla, and G. Popescu, "Tissue refractive index as marker of disease," *J. Biomed. Opt.* 16(11), 116017 (2011).
- [22] S. Uttam, H. V. Pham, J. LaFace, B. Leibowitz, J. Yu, R. E. Brand, D. J. Hartman, and Y. Liu, "Early prediction of cancer progression by depth-resolved nanoscale mapping of nuclear architecture from unstained tissue specimens," *Cancer Res.* 75(22), 4718–4727 (2015).
- [23] D. Paganin and K. A. Nugent, "Noninterferometric phase imaging with partially coherent light," *Phys. Rev. Lett.* 80(12), 2586–2589 (1998).
- [24] N. T. Shaked, Y. Zhu, M. T. Rinehart, and A. Wax, "Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells," *Opt. Express* 17(18), 15585–15591 (2009).
- [25] C. Edwards, B. Bhaduri, B. G. Griffin, L. L. Goddard, and G. Popescu, "Epi-illumination diffraction phase microscopy with white light," *Opt. Lett.* 39(21), 6162–6165 (2014).
- [26] B. Bhaduri, C. Edwards, H. Pham, R. Zhou, T. H. Nguyen, L. L. Goddard, and G. Popescu, "Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences," *Adv. Opt. Photonics* 6(1), 57–119 (2014).
- [27] H. Pham, B. Bhaduri, H. Ding, and G. Popescu, "Spectroscopic diffraction phase microscopy," *Opt. Lett.* 37(16), 3438–3440 (2012).
- [28] B. Bhaduri, H. Pham, M. Mir, and G. Popescu, "Diffraction phase microscopy with white light," *Opt. Lett.* 37(6), 1094–1096 (2012).
- [29] G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics," *Opt. Lett.* 31(6), 775–777 (2006).
- [30] M. SHAN, M. E. KANDEL, H. MAJEED, V. NASTASA, G. POPESCU, White-light diffraction phase microscopy at doubled space-bandwidth product, *OPTICS EXPRESS*, Vol. 24, No. 25, pp. 29033 (2016).
- [31] Shan M, Nastasa V, Popescu G., Statistical dispersion relation for spatially broadband fields, *Opt Lett.* 2016 Jun 1;41(11):2490-2. doi: 10.1364/OL.41.002490.