

Relazione scientifica circa lo svolgimento del progetto “Lensfree holographic imaging for onchip cells characterization”, proposto da Pasquale Memmolo nell’ambito del programma Short Term Mobility 2016.

Nel periodo dal 26/06/2016 al 17/07/2016 ho lavorato al progetto in esame in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Aydogan Ozcan presso il prestigioso Bio- and Nano-Photonics Laboratory at the Electrical Engineering and Bioengineering Departments at the University of California, Los Angeles (UCLA). Los Angeles, CA 90095-1594 (U.S.A.).

Lo scopo principale di questo progetto era quello di testare metodi e tecniche sviluppati presso il mio gruppo di ricerca ad ISASI-CNR, nel campo dell’olografia digitale, che potessero essere integrati come tools sulla piattaforma opto-fluidica inventata dal gruppo di ricerca del Prof. Ozcan. Tale piattaforma opera direttamente su chip e realizza un imaging di tipo olografico di campioni biologici utilizzando una tecnologia di tipo lensless.

È noto che la microscopia ottica ad alta risoluzione necessita di un elevato ingrandimento ed una grande apertura numerica, a scapito però di un ridotto field of view. Il gruppo del prof. Ozcan ha dimostrato che anche senza l’utilizzo di lenti (sistema lensless), ma ingegnerizzando la fase di acquisizione, è possibile ottenere un imaging ad alta risoluzione ed allo stesso tempo in grado di investigare un grande field of view [1-4]. Ciò ha rappresentato una rivoluzione nel campo del imaging di campioni biologici, del “point-of-care” e della telemedicina, come attestato dalle decine di brevetti e centinaia di pubblicazioni che il gruppo del Prof. Ozcan vanta.

Tenendo conto di questo nuovo paradigma di imaging per l’investigazione di campioni biologici, i principali obiettivi che erano stati dichiarati nel progetto sono:

- 1) scambio di competenze nel campo della diagnostica “point-of-care” di tipo olografico, relativamente a metodologie e algoritmi sviluppati dal gruppo del Prof. Ozcan e da me presso ISASI-CNR.
- 2) Individuazione ed implementazione delle tecniche, che io ho sviluppato presso ISASI-CNR, che possono essere integrate sulla piattaforma opto-fluidica realizzata ad UCLA.

3) Sperimentazione delle tecniche individuate al punto (ii) su alcuni campioni biologici, allo scopo di caratterizzare le loro proprietà morfologiche e di mobilità per applicazioni nel campo della diagnostica “point-of-care”.

In particolare, rispetto ai punti elencati, durante la prima settimana di lavoro sono stati stabiliti gli esperimenti da condurre e si è deciso di analizzare campioni di sangue umano allo scopo di individuare e classificare globuli rossi e globuli bianchi. Per fare ciò si è scelto di testare le tecniche ricostruzione olografica e caratterizzazione quantitativa dei globuli rossi precedentemente sviluppati ad ISASI [5-7].

In Figura 1 sono riportati uno sketch del set-up ottico e le principali informazioni sui campioni biologici acquisiti.

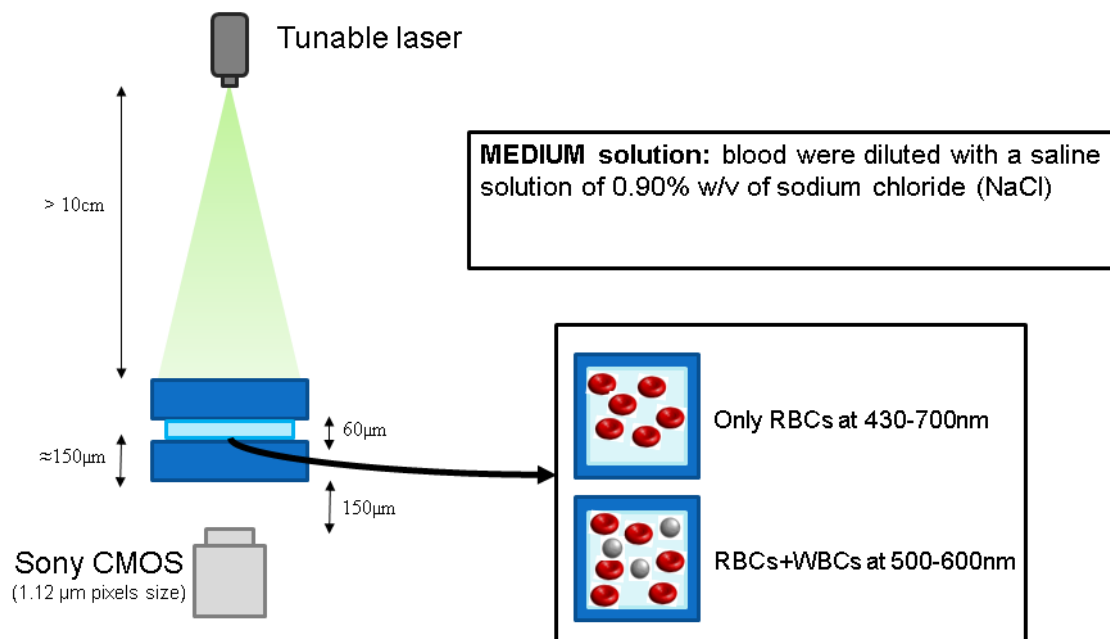


Fig.1. Set-up e campioni acquisiti

Le immagini acquisiti tramite il set-up in Figura 1 sono ologrammi digitali in configurazione lensless ed in-line [4]. Siccome ad ISASI si utilizzano set-up ottici di tipo lens-based e in configurazione off-axis [5], si è reso necessario un periodo di training per adattare gli algoritmi di ricostruzione olografica in mio possesso al tipo di dato a disposizione. In particolare, l'intero processo di ricostruzione è stato implementato a partire dai risultati pubblicati dal gruppo del Prof.

Ozcan in [4], integrando le metodologie che io ho sviluppato in [5,6]. La Figura 2 mostra un diagramma di flusso delle principali elaborazione numeriche implementate per ricostruire gli ologrammi

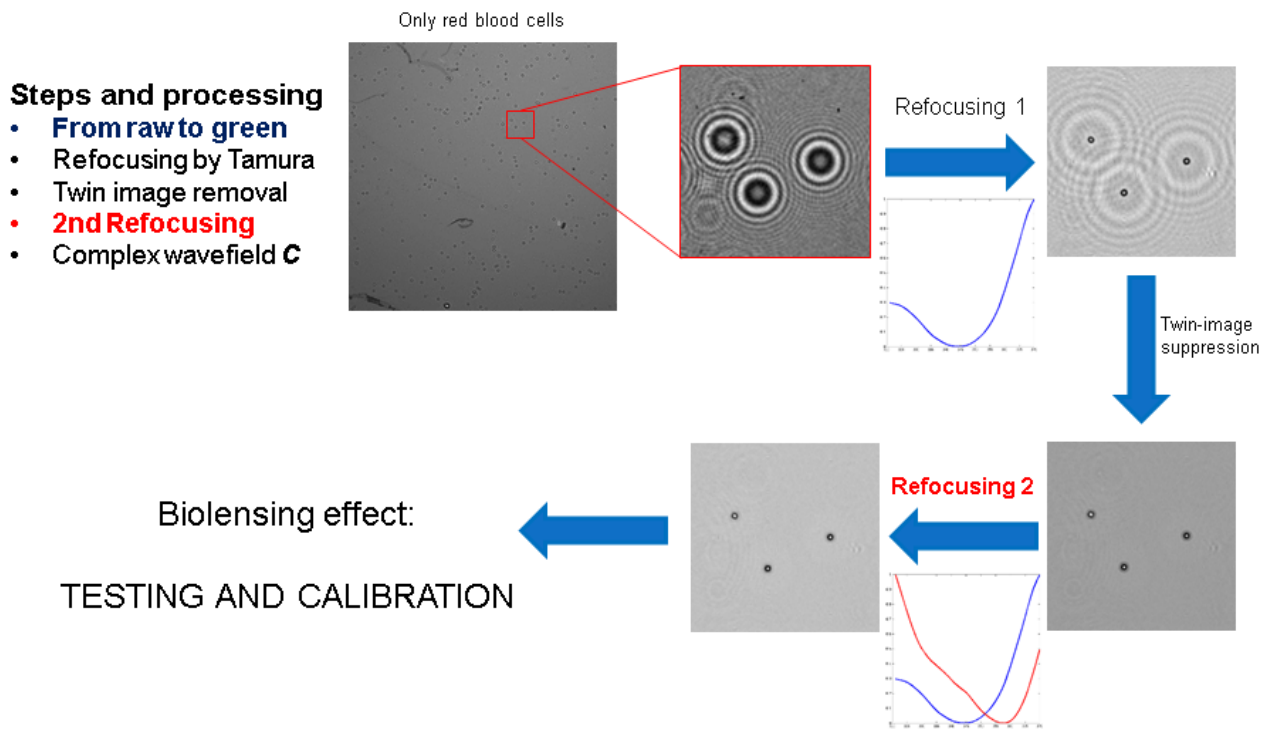


Figure 2. Diagramma di flusso delle elaborazioni numeriche per ricostruire un ologramma lensless in-line.

Un importante contributo è stato dato integrando lo step di refocusing olografico utilizzando la metrica di Tamura che io ho proposto in [6].

Una volta ottenuta la ricostruzione numerica, si è proceduto alla fase di detection e classificazione di globuli rossi e bianchi utilizzando l'effetto lente che il gruppo di ricerca ad ISASI ha pubblicato sul giornale Nature Communication nel 2015 [7]. Le fasi di adattamento e testing della tecnica in [7] hanno richiesto un intenso lavoro che alla fine ha portato, nell'ultima settimana, ad un risultato preliminare molto incoraggiante. Specificamente, si è sviluppato una nuova metrica capace di fare la detection di quante classi diverse di oggetti sono presenti nell'immagine ricostruita, senza dover

fare nessuna ispezione di tipo morfologico, che tipicamente è basata su tecniche di elaborazione di immagini molto dispendiose da un punto di vista computazionale.

In definitiva:

- 1) C'è stato un intenso scambio di idee per decidere su quale linea cellulare effettuare dei test utilizzando i dati acquisiti con il set-up in Fig.1 ed alla fine sono stati effettuati diversi esperimenti con campioni di sangue umano.
- 2) Si è stabilito di integrare due tecniche, refocusing olografico [5,6] ed effetto lente dei globuli rossi [7], all'interno del processo di ricostruzione olografica sviluppato dal gruppo del Prof. Ozcan in [4] e riportato in Fig.2
- 3) È stato ideato, implementato e testato un nuovo metodo di identificazione di globuli bianchi e rossi.

Pertanto tutti gli obiettivi prefissati sono stati raggiunti e la collaborazione stabilita durante il periodo di short term mobility è ora più che mai attiva. Si spera, in breve, di far convergere i risultati ottenuti nella pubblicazione di diversi articoli scientifici e di continuare in modo strutturato non solo questa attività di ricerca ma di trovare altre tematiche di interazione tra gruppi di ISASI-CNR e Bio- and Nano-Photonics del UCLA.

Riferimenti bibliografici

- [1] A. Ozcan and E. McLeod, "Lensless Imaging and Sensing," *The Annual Review of Biomedical Engineering* (2016).
- [2] E. McLeod and A. Ozcan, "Unconventional methods of imaging: computational microscopy and compact implementations," *Rep. Prog. Phys.* 79, 076001 (2016).
- [3] S.A. Arpali, C. Arpali, A.F. Coskun, H-H. Chiang, and A. Ozcan, "High-throughput screening of large volumes of whole blood using structured illumination and fluorescent on-chip imaging," *Lab Chip* 12, 4968-4971 (2012).
- [4] O. Mudanyali, D. Tseng, C. Oh, S.O. Isikman, I. Sencan, W. Bishara, C. Oztoprak, S. Seo, B. Khademhosseini, and A. Ozcan, "Compact, Light-weight and Cost-effective Microscope based on Lensless Incoherent Holography for Telemedicine Applications," *Lab Chip* 10(11), 1417–1428 (2010).
- [5] P. Memmolo, L. Miccio, M. Paturzo, G. Di Caprio, G. Coppola, P.A. Netti, and P. Ferraro, "Recent advances in holographic 3D particle tracking," *Adv. Opt. Photon.* 7, 713-755 (2015).
- [6] P. Memmolo, M. Paturzo, B. Javidi, P.A. Netti, and P. Ferraro, "Refocusing criterion via sparsity measurements in digital holography," *Opt. Lett.* 39, 4719-4722 (2014).
- [7] L. Miccio, P. Memmolo, F. Merola, P.A. Netti, and P. Ferraro, "Red blood cell as an adaptive optofluidic microlens," *Nat. Comm.* 6(6502), (2015).