

## AUTOREFERAT

### 1. Imiona i Nazwisko wnioskodawcy: Iwona Maria Gorczyńska

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **2006 stopień doktora nauk fizycznych w zakresie fizyki** nadany przez Instytut Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rozdzielczość obrazowania w spektralnej koherentnej tomografii optycznej”, promotor: prof. dr hab. Piotr Targowski.
- **2001 tytuł magistra nauk fizycznych**, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń.  
Tytuł pracy magisterskiej: „Zjawisko plamkowania i jego wybrane zastosowania”, promotor: prof. dr hab. Piotr Targowski.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i badawczych.

2014 – 2017 Department of Ophthalmology and Vision Science, University of California in Davis, Sacramento, CA, USA, stanowisko: visiting assistant professor.

2009 – 2018 Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, stanowisko: adiunkt.

2006 – 2008 Research Laboratory of Electronics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA and Tufts – New England Medical Center, Boston, MA, USA (joint position), stanowisko: visiting scientist.

2006 – 2009 Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, stanowisko: asystent.

### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).

#### a. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Rozwój metod eksperymentalnych szybkiego obrazowania w tomografii optycznej OCT i ich zastosowania w przyżyciowym badaniu struktury tkankowej oraz układu naczyniowego oka ludzkiego.**

#### b. Spis prac naukowych wybranych do prezentacji osiągnięcia naukowego

Numeracja zgodna z załącznikiem nr 4.

Oświadczenia dotyczące udziału habilitantki w prezentowanych pracach znajdują się w załączniku nr 4. *Impact factors* oraz liczby cytowań publikacji podano na podstawie *Web of Science*.

I.B.1. I. Gorczyńska, J. V. Migacz, R. J. Zawadzki, A. G. Capps, J. S. Werner, "Comparison of amplitude-decorrelation, speckle-variance and phase-variance OCT angiography methods for imaging the human retina and choroid," *Biomedical Optics Express* **7**(3), 911-942 (2016).  
<https://doi.org/10.1364/BOE.7.000911> (wolny dostęp)

*Impact factor* czasopisma w roku publikacji: 3,344, liczba cytowań: 13

I.B.2. M. Szkulmowski, I. Gorczyńska, D. Szlag, M. Sylwestrzak, A. Kowalczyk, M. Wojtkowski, "Efficient reduction of speckle noise in Optical Coherence Tomography," *Optics Express* **20**(2), 1337-1359 (2012).  
<https://doi.org/10.1364/OE.20.001337> (wolny dostęp)

*Impact factor* czasopisma w roku publikacji: 3,546, liczba cytowań: 48

I.B.3. I. Grulkowski, I. Gorczyńska, M. Szkulmowski, D. Szlag, A. Szkulmowska, R. A. Leitgeb, A. Kowalczyk, M. Wojtkowski, "Scanning protocols dedicated to smart velocity ranging in Spectral OCT," *Optics Express* **17**(26), 23736-23754 (2009).

<https://doi.org/10.1364/OE.17.023736> (wolny dostęp)

*Impact factor* czasopisma w roku publikacji: 3,278, liczba cytowań: 69

I.B.4. I. Gorczyńska, V. J. Srinivasan, L. N. Vuong, R. W. S. Chen, J. J. Liu, E. Reichel, M. Wojtkowski, J. S. Schuman, J. S. Duker, J. G. Fujimoto, "Projection OCT fundus imaging for visualizing outer retinal pathology in non-exudative age related macular degeneration," *British Journal of Ophthalmology*, bjo.2007.136101 (2009).

<http://dx.doi.org/10.1136/bjo.2007.136101>

*Impact factor* czasopisma w roku publikacji: 2,917, liczba cytowań: 32

I.B.5. B. Potsaid, I. Gorczyńska, V. J. Srinivasan, Y. Chen, J. Jiang, A. Cable, J. G. Fujimoto, "Ultrahigh speed Spectral / Fourierdomain OCT ophthalmic imaging at 70,000 to 312,500 axial scans per second," *Optics Express* **16**(19), 15149-15169 (2008).

<https://doi.org/10.1364/OE.16.015149> (wolny dostęp)

*Impact factor* czasopisma w roku publikacji: 3,880, liczba cytowań: 227

- Liczba cytowań prac wybranych do prezentacji osiągnięcia naukowego: 389
- Liczba cytowań wszystkich prac habilitantki: 1668
- Indeks Hirscha (*h-index*): 21

#### c. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania

##### 4.1. TEMAT I CEL PRAC ORAZ ZASTOSOWANIA ICH WYNIKÓW

Tematem moich prac był rozwój metod eksperymentalnych umożliwiających szybkie, trójwymiarowe obrazowanie struktury tkankowej i układu naczyniowego dna oka oraz badanie szybkości przepływu krwi w naczyniach siatkówki i błony naczyniowej z wykorzystaniem technik OCT (ang. *Optical Coherence Tomography*). Celem było zaproponowanie układów pomiarowych i metod obrazowania dna oka oraz sposobów wizualizacji i analizy danych umożliwiających charakterystykę jakościową i ilościową zarówno oczu zdrowych jak i obciążonych patologiami. Wyniki tych prac były wykorzystywane do obrazowania szeregu chorób oka w klinikach okulistycznych, w których odbywałam staże naukowe oraz zostały skomercjalizowane w postaci transferu wiedzy do przemysłu.

##### 4.2. ROZPOZNANIE PROBLEMU BADAWCZEGO I MOTYWACJA BADAŃ

Tomografia optyczna OCT obejmuje szereg technik obrazowania trójwymiarowego, które są intensywnie rozwijane od ponad 25 lat. Jedną z głównych dziedzin jej zastosowania jest okulistyka. Od momentu ukazania się pierwszych raportów naukowych [1-3] dotyczących obrazowania tomograficznego OCT oka, trwają nieustanne badania nad rozwojem metod umożliwiających szeroko pojęte okulistyczne badania naukowe oraz umożliwiających zastosowania w diagnozowaniu chorób i monitorowaniu postępów leczenia [4]. Mimo sukcesów osiągniętych przez grupy badawcze pracujące nad

rozwojem zaawansowanych metod umożliwiających badanie czynności siatkówki [5-16], jej ukrwienia [17-35], badania spektroskopowe [36-43] jak również nad rozwojem metod analizy ilościowej danych OCT [44-65], większość zastosowań klinicznych opiera się na jakościowej analizie obrazów morfologii siatkówki. W ciągu kilku ostatnich lat nastąpił przełom w obrazowaniu układu naczyniowego dna oka – zostały zaproponowane i skomercjalizowane metody angiografii OCT [66-89], jednak większość publikowanych zastosowań okulistycznych opiera się na analizie jakościowej struktury naczyniowej.

Przepaść między badaniami nad rozwojem zaawansowanych metod analizy struktury i czynności siatkówki oraz jej układu naczyniowego i zastosowaniem tych metod w klinicznych badaniach okulistycznych wynika m.in. ze stopnia trudności przeprowadzania eksperymentów, konieczności stosowania zaawansowanych metod analizy danych i trudności w interpretacji uzyskanych wyników. Jedną z przyczyn tych trudności są ograniczenia szybkości obrazowania w tomografii OCT. Motywacją moich prac badawczych była demonstracja eksperymentalna, że zwiększenie szybkości obrazowania w fourierowskiej tomografii OCT pozwala nie tylko na poprawę jakości uzyskiwanych danych i ułatwienie jakościowej i ilościowej analizy morfologii siatkówki, ale również umożliwia zaproponowanie nieskomplikowanych metod pomiarowych, które mogą być wykorzystane do badań w klinikach okulistycznych. Dzięki zwiększeniu szybkości obrazowania można również uzyskać szczegółowe informacje o sieci naczyniowej dna oka do poziomu naczyń włosowatych oraz można zaproponować metody ilościowe analizy struktury sieci naczyniowej oraz szybkości przepływu krwi. Dalekosiężnym celem tego ciągu prac badawczych jest zaproponowanie metod modelowania przepływu krwi w trójwymiarowej sieci naczyń siatkówki i dwuwymiarowej strukturze naczyń włosowatych błony naczyniowej oka, które mogą pozwolić w przyszłości na lepsze zrozumienie mechanizmów ukrwienia tkanek siatkówki oka oraz cyrkulacji krwi w błonie naczyniowej (naczyniówce).

#### 4.3. ORGANIZACJA AUTOREFERATU

Autoreferat rozpoczyna się wstępem wyjaśniającym zasadę działania fourierowskiej tomografii OCT oraz wprowadzającym podstawowe terminy wykorzystywane do jej opisu. Realizowane przeze mnie projekty przedstawiłam w części „Realizacja prac badawczych”. Prace badawcze składały się z szeregu etapów: projektowanie, konstrukcja i testy działania układów pomiarowych, projektowanie i przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie i implementacja metod analizy danych pomiarowych. Opis tych prac podzieliłam na trzy grupy problemowe w obrębie których zachowałam porządek chronologiczny prowadzonych prac: „Projektowanie i konstrukcja układów pomiarowych”, „Rozwój metod eksperymentalnych szybkiego obrazowania OCT”, „Numeryczna analiza danych”. Autoreferat kończy się podsumowaniem wyników projektów.

#### 4.4. WSTĘP

Termin tomografia optyczna OCT (ang. *Optical Coherence Tomography*) obejmuje szereg metod obrazowania obiektów częściowo przezroczystych dla fal elektromagnetycznych z zakresu bliskiej podczerwieni (~800nm – 1500nm) oraz światła widzialnego. Podstawowym zjawiskiem fizycznym wykorzystywanym w tomografii OCT jest interferencja światła o niskiej spójności czasowej. Jeśli w układzie interferometrycznym, np. w interferometrze Michelsona, zostanie wykorzystane światło o niskiej spójności czasowej, wówczas prążki interferencyjne będą obserwowane tylko dla wąskiego zakresu różnicy dróg optycznych między ramionami interferometru. Im krótszy jest czas spójności światła (tj. im szerszy

jest jego zakres widmowy), tym węższy jest zakres różnicy dróg optycznych dla którego można zaobserwować prążki interferencyjne, t.j. z tym większą precyzją można dokonać pomiaru długości ramienia obiektowego interferometru poprzez dopasowanie długości ramienia referencyjnego. Jeśli w jednym z ramion interferometru zostanie umieszczony obiekt złożony z szeregu rozpraszających warstw, wówczas światło odbite na granicach tych warstw będzie źródłem prążków interferencyjnych niosących informację o odległościach optycznych. Im krótszy jest czas spójności światła, tym mniejsza jest odległość między warstwami, którą można jednoznacznie rozróżnić, tj. tym lepsza jest rozdzielczość pomiaru.

Sposób rejestracji sygnału interferencyjnego jest jednym z kryteriów klasyfikacji metod tomografii OCT. Rejestracja prążków interferencyjnych może być realizowana w czasie, podczas zmiany długości ramienia referencyjnego. Zrównanie długości ramienia referencyjnego z długością ramienia obiektowego do wybranej warstwy rozpraszającej powoduje wygenerowanie prążków interferencyjnych. Ich widzialność (określona np. jako kontrast Michelsona) jest tym większa im lepsze jest dopasowanie dróg optycznych. Położenie wybranej warstwy rozpraszającej odpowiada długości ramienia referencyjnego, dla której zarejestrowano maksymalną widzialność prążków (maksimum obwiedni prążków interferencyjnych). Położenia kolejnych warstw obiektu są uzyskiwane w miarę zmiany długości ramienia referencyjnego jako kolejne maksima obwiedni sygnału interferencyjnego. Ta metoda była historycznie pierwszą wykorzystaną do obrazowania tomograficznego OCT i jest znana pod nazwą czasowej tomografii OCT [1].

Sygnał interferencyjny może być również rejestrowany w funkcji długości fali tj. natężenie światła jest rejestrowane dla kolejnych składowych widmowych światła wykorzystanego w obrazowaniu OCT. W tym przypadku długość ramienia referencyjnego jest dopasowana do położenia obiektu w ramieniu obiektowym interferometru (zazwyczaj jest nieznacznie krótsza lub nieco dłuższa) i pozostaje stała podczas pomiaru. Jeśli dla wybranej składowej widmowej różnica dróg optycznych między ramieniem obiektowym i referencyjnym jest równa całkowitej wielokrotności długości fali, wówczas detektor zarejestruje maksimum natężenia światła odpowiadające interferencji konstruktywnej. Ta sama różnica dróg optycznych dla innej składowej widmowej może spełniać warunek interferencji destruktywnej i wówczas detektor zarejestruje minimum natężenia światła dla tej długości fali. Dla kolejnych składowych widmowych detektor będzie rejestrował natężenie światła oscylujące między maksimum i minimum. Częstość oscylacji tak zarejestrowanego spektralnego sygnału interferencyjnego zależy od położenia kolejnych warstw rozpraszających obiektu względem zwierciadła referencyjnego. Im większa jest różnica dróg optycznych, tym większa jest częstość widmowych prążków interferencyjnych. Widmowy sygnał interferencyjny jest superpozycją prążków o częstościach odpowiadających położeniom wszystkich warstw rozpraszających i w związku z tym detekcja składowych częstotliwościowych w zarejestrowanym sygnale interferencyjnym pozwala na uzyskanie informacji o wewnętrznej strukturze obiektu. Uzyskuje się ją zazwyczaj przez transformację Fouriera. Ta metoda rejestracji sygnału interferencyjnego jest wykorzystywana w tzw. fourierowskiej tomografii OCT. W jej obrębie wyróżnia się spektralną tomografię OCT (ang. *spectral domain OCT, sdOCT*) [2, 90-92] oraz tomografię OCT z wykorzystaniem źródeł z przemiataniem widma emitowanego światła (ang. *swept source OCT, ssOCT*) [93-95]. W spektralnej tomografii OCT do rejestracji prążków interferencyjnych wykorzystuje się spektrometr. W tomografii OCT z wykorzystaniem laserów strojonych widmowe prążki interferencyjne są rejestrowane przez fotodiodę w czasie przemiatania długości fal zastosowanego źródła światła.

W opisanych powyżej technikach OCT dane trójwymiarowe są typowo uzyskiwane poprzez skanowanie badanego obiektu wiązką światła (ang. *flying spot methods*), z wykorzystaniem skanerów optycznych. Implementowane jest zazwyczaj skanowanie rastrowe, tj. wiązka światła jest odchylana sekwencyjnie w dwóch ortogonalnych kierunkach: poziomym i pionowym. Kierunek poziomy jest najczęściej kierunkiem skanowania szybkiego. Zbierane w kolejnych położeniach, w kierunku skanowania szybkiego widmowe prążki interferencyjne (A-skany) tworzą po transformacji Fouriera dwuwymiarowy obraz przekroju (B-skan). Kolejno zbierane w kierunku skanowania wolnego (zazwyczaj jest to kierunek pionowy) B-skany tworzą zbiór danych trójwymiarowych OCT. W najprostszej realizacji pomiaru OCT, gęstość skanowania (liczba A-skany zebranych z jednostkowej długości obiektu) jest dobierana tak, aby uzyskać obrazy z jak największego obszaru obiektu unikając utraty informacji, tj. krok skanowania jest bliski połówkowej wartości rozdzielczości poprzecznej. Zebrane w ten sposób dane pozwalają na uzyskanie informacji o morfologii badanych tkanek.

Oprócz obrazowania strukturalnego tomografia optyczna OCT pozwala na obrazowanie zjawisk dynamicznych związanych z procesami fizjologicznymi zachodzącymi w tkankach. Jednym z takich zjawisk jest przepływ krwi w naczyniach krwionośnych. W technice OCT rozróżnia się dwa rodzaje obrazowania przepływu: anemometrię OCT oraz angiografię OCT.

Metody anemometrii OCT pozwalają na pomiar co najmniej jednej składowej wektora prędkości przepływu. Do pomiaru składowej osiowej (wzdłuż kierunku propagacji wiązki światła) wektora prędkości stosuje się metody dopplerowskiej tomografii OCT. Wiązka światła rozproszonego na centrach rozpraszających, poruszających się wewnątrz obiektu z prędkością o niezerowej składowej osiowej, doznaje dopplerowskiego przesunięcia częstości. Interferencja tego światła z wiązką odniesienia prowadzi do tzw. „tętnienia” natężenia światła obserwowanego w czasie. Zarejestrowany sygnał OCT (A-skan) może być opisany matematycznie z wykorzystaniem pojęcia widmowej gęstości mocy światła ( $G$ ).

$$G(\omega) = U_0^s(\omega)U_0^{s*}(\omega) + U_0^r(\omega)U_0^{r*}(\omega) + U_0^s(\omega)U_0^{r*}(\omega) + U_0^r(\omega)U_0^{s*}(\omega) \quad (1)$$

$$G(\omega) = G_{ss}(\omega) + G_{rr}(\omega) + G_{sr}(\omega) + G_{rs}(\omega)$$

gdzie:

$$U_0^x(\omega) = \alpha_x \int_{-T/2}^{T/2} u_0(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (2)$$

opisuje jedną z ortogonalnych składowych polaryzacyjnych światła propagującego się w ramieniu obiektowym ( $x=s$ ) i ramieniu referencyjnym ( $x=r$ ) interferometru;  $\omega$  – częstość oscylacji fali elektromagnetycznej,  $T$  – czas ekspozycji odbiornika światła.

Korzystając ze wzoru opisującego częstość dopplerowską  $\omega''$  oscylacji fali światła poruszającego się w ośrodku optycznym z prędkością  $c_m$ , rozproszonego na obiekcie poruszającym się z prędkością osiową  $V$  i zarejestrowanego przez detektor OCT:

$$\omega'' = \omega \left( \frac{1 - \frac{V}{c_m}}{\sqrt{1 - \left(\frac{V}{c_m}\right)^2}} \right)^2 \cong \omega \left( 1 - 2 \frac{V}{c_m} \right) \quad (3)$$

można pokazać, że wyrazy opisujące interferencję we wzorze (1) mają postać:

$$G_{sr}(k;t) = \alpha S(k) \exp(ik \cdot \Delta z) \exp\left(i \frac{4\pi V}{n\lambda} t\right), \quad (4)$$

$k$  – liczba falowa,  $\lambda$  – długość fali,  $\Delta z$  – różnica dróg optycznych między ramieniem obiektywnym i referencyjnym interferometru,  $t$  – bieżący czas,  $\alpha$  – współczynnik opisujący straty interferometru,  $S(k)$  – widmowa gęstość mocy światła emitowanego przez źródło.

W fourierowskiej tomografii OCT sygnał tętnienia może być obserwowany bezpośrednio lub pośrednio. Pomiar bezpośredni polega na analizie częstości oscylacji czasowych ( $\Omega$ ) natężenia widmowego sygnału interferencyjnego. W tym celu dokonuje się czasowej transformacji Fouriera ( $FT$ ) zarejestrowanego sygnału OCT, po której następuje transformacja Fouriera w dziedzinie liczb falowych [24, 96]:

$$G_{sr}(k;t) = \alpha S(k) \exp(ik \cdot \Delta z) \exp(i\Omega t) \quad (5)$$

$$g'_{sr}(k;V) = FT(t)\{G_{sr}(k;t)\} \quad (6)$$

$$g_{sr}(z;V) = FT(k)\{G_{sr}(k;V)\}'$$

gdzie: 
$$\Omega = \frac{4\pi}{n\lambda} V \rightarrow V = \Omega \frac{n\lambda}{4\pi} \quad (7)$$

jest częstością tętnienia (lub częstością dopplerowską), proporcjonalną do szybkości przepływu: im większa jest wartość składowej osiowej prędkości przepływu, tym większe jest dopplerowskie przesunięcie częstości fal elektromagnetycznych i tym większa jest częstość tętnienia. Wynikiem dwuwymiarowej transformacji Fouriera są A-skany dopplerowskie OCT pozwalające na mapowanie wartości prędkości w głębokości badanego obiektu oraz A-skany strukturalne pozwalające na obrazowanie morfologii tkanek.

W pomiarze pośrednim dopplerowskiej tomografii OCT analizuje się wielkość zmiany fazy prążków interferencyjnych w czasie [17-19, 23, 97-100]. Wartości fazy prążków uzyskuje się w wyniku transformacji Fouriera w dziedzinie liczb falowych, zarejestrowanego sygnału OCT:

$$G_{sr}(k;t) = \alpha S(k) \exp\left\{i\left[k \cdot \Delta z + \phi(t)\right]\right\}, \quad (8)$$

$$g_{sr}(k;t) = FT(k)\{G_{sr}(k;t)\}$$

gdzie faza prążków interferencyjnych: 
$$\phi(t) = \frac{4\pi}{n\lambda} V t \quad \text{jest liniową funkcją czasu.} \quad (9)$$

Pomiar składowej poprzecznej wektora prędkości przepływu krwi wymaga zastosowania metod analizy szybkości dekorelacji pól plamkowych (amplitud zespolonych sygnału OCT po transformacji Fouriera) [84, 101, 102], analizy poszerzeń sygnałów dopplerowskich [103-108] lub zastosowania obrazowania wielowiązkowego [35].

Angiografia OCT [66] obejmuje szereg technik pomiarowych i metod analizy danych, których celem jest obrazowanie struktury naczyniowej bez pomiaru szybkości przepływu krwi. W metodach tych wykorzystuje się fakt, że przepływające komórki krwi wywołują fluktuacje w czasie amplitudy i fazy zespolonego sygnału OCT, uzyskiwanego w wyniku transformacji Fouriera zarejestrowanych widmowych prążków interferencyjnych. Fluktuacje sygnału OCT mogą być wywołane zarówno osiowym jak i poprzecznym przepływem krwi. W celu ich lokalizacji wewnątrz obiektu, definiuje się miary zmienności sygnału OCT, które pozwalają na odróżnienie obszarów objętych przepływem od obszarów zajmowanych przez nieruchome tkanki. Najczęściej stosowanymi miarami zmienności są: wariancja amplitudy rzeczywistej, nazywana często wariancją pól plamkowych [69, 72], wariancja fazy [70, 109], dekorelacja

amplitudy rzeczywistej [75, 77, 85], dekorelacja amplitudy zespolonej [87, 89]. Wysokie wartości tych miar świadczą o obecności przepływu, tj. wskazują lokalizację naczyń krwionośnych. W angiografii OCT można również bezpośrednio wykorzystać metody dopplerowskiej tomografii OCT [67], przy czym w celu pozbycia się informacji ilościowej oblicza się „moc” sygnału dopplerowskiego (moduł sygnału dopplerowskiego lub jego kwadrat) [78].

Zarówno w przypadku anemometrii OCT jak i angiografii OCT koniecznym jest przeprowadzenie obrazowania w taki sposób, aby umożliwić czasową analizę zarejestrowanych danych. Wymaga to zebrania od kilku do kilkunastu A-skanów, w kolejnych poprzecznych położeniach w obiekcie. Najczęściej stosowanymi w praktyce metodami skanowania, zapewniającymi spełnienie tego warunku są metody rastrowe, w których stosuje się wysoką gęstość skanowania – krok skanowania wielokrotnie mniejszy od rozdzielczości poprzecznej obrazowania. W reżimie detekcji i pomiarów przepływów szybkich zapewnia się mały krok w kierunku osi szybkiego skanowania. W reżimie analizy przepływów wolnych stosuje się metody wielokrotnego powtarzania B-skanów (tzw. BM-skany) lub skanów objętościowych, wysoką gęstość skanowania w kierunku osi wolnego skanowania, metody skanowania wstecznego [76], jak również metody skanowania wielowiązkowego [110].

#### 4.5. REALIZACJA PRAC BADAWCZYCH

Wykorzystanie zjawiska interferencji światła o niskiej spójności czasowej oraz zjawiska Dopplera dla fal elektromagnetycznych do szybkiego, przyżyciowego badania tkanek oraz układu naczyniowego oka wymagało: zaprojektowania układów OCT, opracowania metod eksperymentalnych, implementacji metod numerycznej analizy i wizualizacji danych oraz przeprowadzenia eksperymentów demonstrujących możliwość zastosowania i przydatność diagnostyczną tych metod w obrazowaniu oczu zdrowych ochotników oraz oczu obciążonych patologiami. Prace te prowadziłam we współpracy z:

- Zespołem Fizyki Medycznej pod kierownictwem prof. dra hab. A. Kowalczyka (Instytut Fizyki UMK w Toruniu), gdzie byłam zatrudniona na stanowisku asystenta oraz adiunkta;
- Biomedical Optical Imaging and Biophotonics Group, pod kierownictwem prof. J.G. Fujimoto (Research Laboratory of Electronics, MIT, Cambridge, MA, USA oraz New England Eye Center, Tufts Medical Center, Boston, MA, USA), gdzie odbywałam staż podoktorski;
- Vision Science and Advanced Retinal Imaging Laboratory pod kierownictwem prof. J.S. Wernera (University of California, Davis, Medical Center in Sacramento, CA, USA), gdzie odbywałam staż naukowy na stanowisku wizytującego adiunkta.

##### 4.5.1. PROJEKTOWANIE I KONSTRUOWANIE UKŁADÓW POMIAROWYCH

W realizowanych przeze mnie projektach badawczych pierwszy etap prac wymagał projektowania i konstrukcji układów pomiarowych OCT umożliwiających przyżyciowe badanie siatkówki i naczyńki oka ludzkiego. Koniecznym było rozpoznanie wymagań i ograniczeń związanych z obrazowaniem żywej tkanki, wymagań narzuconych przez podstawy fizyczne techniki OCT oraz ograniczeń narzuconych przez dostępną aparaturę pomiarową.

W przypadku zastosowania OCT w diagnostyce okulistycznej, dwoma istotnymi wymaganiami są rozdzielczość i szybkość obrazowania. Rozdzielczość obrazowania powinna umożliwić obserwację zmian zachodzących w wybranych warstwach siatkówki, tj. powinna być rzędu kilku - kilkunastu mikrometrów. W technice OCT rozdzielczość poprzeczna jest określona przez układ optyczny zaprojektowany do obrazowania dna oka, tj. jest określona przez aperturę numeryczną układu, którego częścią jest aparat

optyczny oka. Układy o wysokich aperturach numerycznych pozwalają na osiągnięcie wysokich poprzecznych rozdzielczości, jednak w przypadku obrazowania dna oka możliwość ich uzyskania jest ograniczona przez aberracje optyczne aparatu wzrokowego. Klasyczne układy OCT wykorzystujące wiązki gaussowskie pozwalają na obrazowanie OCT o rozdzielczości poprzecznej ok. 10  $\mu\text{m}$ . Osiągnięcie wyższych poprzecznych rozdzielczości obrazowania wymaga zastosowania technik optyki adaptatywnej, korygujących aberracje oka.

Osiowa rozdzielczość obrazowania jest określona przez zakres widmowy światła emitowanego przez źródło. Zastosowanie światła z zakresu bliskiej podczerwieni ( $\sim 750 - 1100 \text{ nm}$ ) o szerokim widmie ( $\sim 80-100 \text{ nm}$ ), umożliwia obrazowanie o rozdzielczości osiowej  $\sim 3-8 \mu\text{m}$ . Jednak im szersze jest widmo światła, tym trudniejsza staje się rejestracja sygnału interferencyjnego w przypadku spektralnej tomografii OCT i tym trudniejsza staje się budowa źródeł światła w przypadku OCT z wykorzystaniem laserów strojonych. W obu przypadkach krytyczną jest konieczność kontroli i kompensacji dyspersji światła w elementach optycznych, światłowodowych oraz w ośrodku optycznym gałki ocznej, oraz kontroli polaryzacji (modów polaryzacyjnych) w elementach światłowodowych. W przypadku spektralnej tomografii OCT wyzwaniem staje się również projekt i konstrukcja spektrometrów zapewniających jednocześnie wysoką osiową rozdzielczość obrazowania (rzędu kilku mikronów), dużą głębokość obrazowania (większą niż 1 – 1.5 mm ze spadkiem czułości nie większym niż  $\sim 19 \text{ dB}$ ) i wysoką szybkość obrazowania (repetycja A-skanów rzędu 100 -300 kHz).

Szybkość obrazowania OCT jest niezmiernie ważna w przypadku przyżyciowego badania oka ludzkiego. Ilość zebranych w czasie pomiaru informacji zależy od szybkości urządzenia OCT. Ze względu na mimowolne ruchy gałki ocznej oraz wysychanie filmu łzowego rogówki, pomiary OCT wykonuje się zazwyczaj w czasie ok. 5 s. Próba wydłużania tego czasu w celu zebrania większej ilości danych skutkuje zwiększeniem liczby artefaktów ruchowych w obrazach OCT oraz obniżeniem ich jakości (głównie spadek natężenia sygnału). Jednym z rozwiązań tego problemu jest zastosowanie metod aktywnego (w czasie rzeczywistym) lub pasywnego (analiza zarejestrowanych danych) śledzenia ruchów oka, które opisałam w dalszych częściach mojego autoreferatu. Co prawda nie eliminują one ruchów, ale pozwalają na korygowanie artefaktów obrazowania z nimi związanych. Niezależnie od możliwości stosowania metod korekcji ruchów oka w połączeniu z tomografią OCT, pożądanym jest zwiększenie szybkości obrazowania w samej technice OCT. Pozwala to nie tylko na zwiększenie skanowanej objętości dna oka, ale również umożliwia obrazowanie procesów dynamicznych związanych z funkcjonowaniem tkanek, np. przepływu krwi w naczyniach krwionośnych. Konsekwencją zwiększenia szybkości jest jednak spadek czułości obrazowania. Ze względu na normy bezpieczeństwa dotyczące zastosowania promieniowania laserowego do przyżyciowego obrazowania tkanek oka, moc światła którą można wykorzystać w badaniu OCT jest ograniczona do  $\sim 800 \mu\text{W}$ , w przypadku światła o centralnej długości fali  $\sim 850 \text{ nm}$  (typowa dla spektralnej OCT) i do  $\sim 1.8 \text{ mW}$ , w przypadku zastosowania światła o długości fali  $\sim 1060 \text{ nm}$  (typowa dla OCT z zastosowaniem laserów strojonych). Zwiększenie szybkości obrazowania bez możliwości zwiększenia mocy światła skutkuje zmniejszeniem liczby fotonów rejestrowanych przez detektor w pojedynczej ekspozycji i w konsekwencji spadkiem czułości obrazowania. Z drugiej jednak strony, możliwe jest zebranie większej ilości danych, co pozwala nie tylko na zastosowanie metod ich uśredniania, ale również na uzyskanie dodatkowych, diagnostycznie istotnych informacji. Określenie górnej granicy na szybkość obrazowania w zastosowaniach okulistycznych OCT, powyżej którego nie można uzyskać nowych istotnych informacji na temat struktury lub funkcjonowania tkanek dna oka, jest przedmiotem trwającej debaty



naukowej ze względu na szereg połączonych ze sobą parametrów obrazowania związanych z konkretnymi metodami doświadczalnymi. W mojej pracy nad rozwojem szybkich metod obrazowania OCT demonstrowałam eksperymentalnie jakie nowe informacje na temat struktury tkankowej i naczyniowej dna oka oraz na temat przepływu krwi można uzyskać poprzez zwiększanie szybkości obrazowania w tomografii OCT w dziedzinie fourierowskiej.

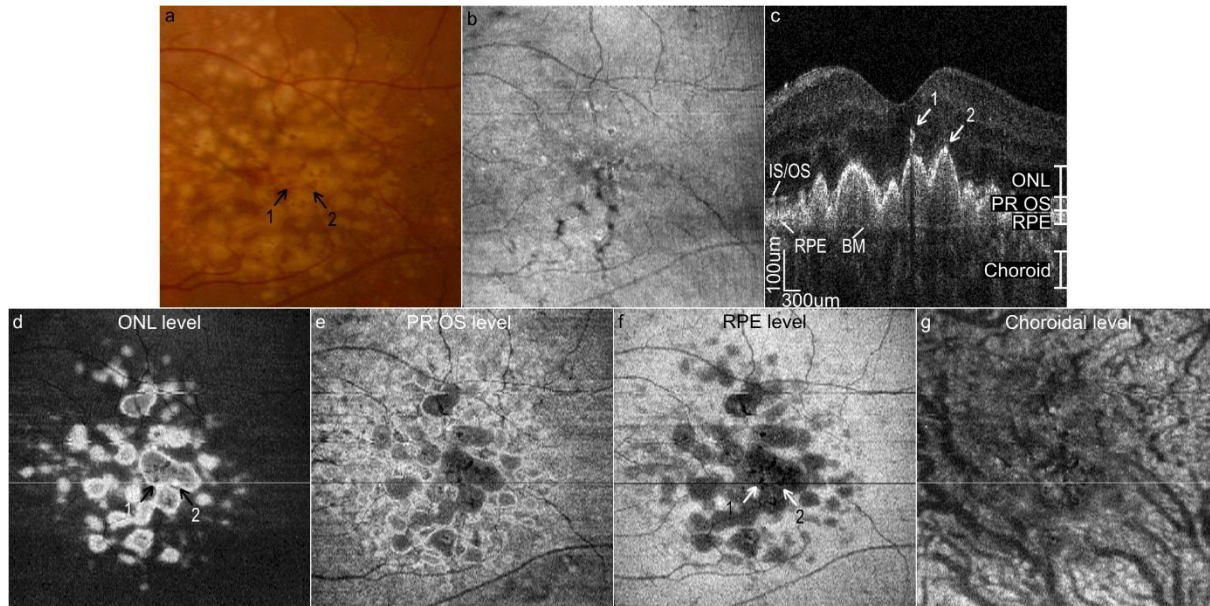
W projektowanych przeze mnie aparatach OCT [I.B.1-5], w układach skanowania dna oka wykorzystywałam rozwiązania klasycznej optyki wiązek gaussowskich. Wybór taki był podyktowany założeniami realizowanych projektów, w których przewidziano obrazowanie wybranych warstw siatkówki oka bez konieczności obrazowania pojedynczych komórek. Do konstrukcji interferometrów OCT wykorzystywałam elementy światłowodowe, jednomodowe, nie utrzymujące polaryzacji. Miało to na celu ograniczenie wpływu elementów środowiskowych na rejestrowany sygnał interferencyjny i umożliwienie zastosowania aparatów OCT w warunkach klinik okulistycznych. Wybór włókien światłowodowych jednomodowych był konieczny w celu uniknięcia dyspersji międzymodowej i zapewnienia możliwości obserwacji prążków interferencyjnych. Wybór włókien nieutrzymujących polaryzacji był podyktowany koniecznością uniknięcia efektów dyspersyjnych i polaryzacyjnych w rejestrowanych obrazach OCT (wygaszanie sygnału interferencyjnego w tkankach dwójtomnych i wprowadzenie różnicy dróg optycznych między składowymi ortogonalnymi polaryzacji światła propagującego się w włóknach światłowodowych), bez konieczności rygorystycznej kontroli stanu polaryzacji światła. Do konstrukcji układów OCT wykorzystywałam źródła emitujące światło z zakresu bliskiej podczerwieni. Były to zarówno komercyjnie dostępne diody superluminescencyjne i lasery femtosekundowe [I.B.2-4] oraz lasery strojone [I.B.1] jak i źródła światła konstruowane na potrzeby techniki OCT w laboratoriach badawczych, w których odbywałam staże naukowe (lasery femtosekundowe [I.B.5], supercontinuum generowane w światłowodach fonicznych [II.A.22]). W przypadku układów spektralnej tomografii OCT, wykorzystanie źródeł światła o różnych zakresach widmowych wymagało zaprojektowania odpowiednich spektrometrów do szybkiej detekcji widmowego sygnału interferencyjnego [I.B.2-5]. Wymagało to doboru elementów optycznych zapewniających wystarczającą rozdzielczość widmową (nieczułe na polaryzację, holograficzne, transmisyjne siatki dyfrakcyjne, obiektywy skorygowane na aberracje geometryczne i chromatyczne), jak również detektorów zapewniających wysoką szybkość obrazowania OCT (liniowe kamery CCD i CMOS).

#### 4.5.2. ROZWÓJ METOD EKSPERYMENTALNYCH SZYBKIEGO OBRAZOWANIA OCT

Moje wczesne prace związane z rozwojem szybkiej tomografii OCT dotyczyły opracowania układów i metod pomiarowych oraz metod wizualizacji danych trójwymiarowych w spektralnej tomografii OCT [I.B.4, II.A.12, II.A.14,16, II.A.19-27]. Dostępne wówczas kamery CCD umożliwiały obrazowanie z szybkością  $\sim 25\,000$  A-skanów/s. Trwający 5 s pomiar pozwalał na akwizycję danych objętościowych o rozmiarze  $\sim 350 \times 350 \times 2048$  pikseli, co było wystarczające do trójwymiarowego obrazowania struktury tkankowej dna oka. W serii projektów [I.B.4, II.A.7, II.A.16, II.A.26, II.B.23 - 25, II.B.27] pokazałam, że umożliwia to trójwymiarowe obrazowanie tkanek siatkówki z rozdzielczością poprzeczną  $\sim 15\ \mu\text{m}$  i osiową  $\sim 3\text{-}5\ \mu\text{m}$  oczu zdrowych ochotników jak również oczu obarczonych patologiami.

Z nowymi możliwościami związany był również szereg nowych wyzwań. Przydatność diagnostyczna danych trójwymiarowych zależy nie tylko od szczegółowości obrazów zarejestrowanych zmian patologicznych, ale również od możliwości ich prezentacji w sposób łatwy do interpretacji przez

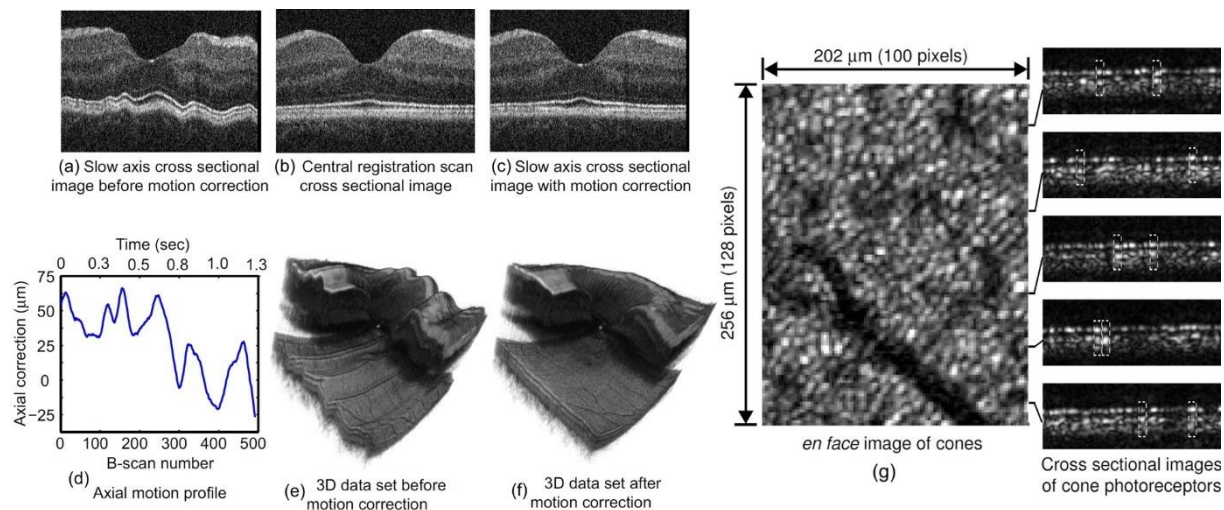
lekarzy okulistów. Opracowanie metod analizy danych trójwymiarowych uzyskanych w szybkim obrazowaniu OCT było jednym z projektów nad którymi pracowałam podczas stażu podoktorskiego. Jego wynikiem była demonstracja łatwej w realizacji metody wizualizacji patologii wywołanych starym zwyrodnieniem plamki żółtej, w postaci projekcji *en face* wybranych warstw siatkówki (Rys.1.) [I.B.4]. Metody analizy danych, które wykorzystałam w realizacji projektu podsumowałam w sekcji „Numeryczna analiza danych”. Wyniki projektu prezentowałam m. in. na międzynarodowej konferencji Photonics West, BiOS, Ophthalmic technologies 2007, na której moje zgłoszenie zostało nominowane do nagrody Pascala Rola. Nominacje do nagrody są wyróżnieniem dla autorów pięciu najwyższej ocenionym przez komisję recenzencką zgłoszeń, co stanowi ok. 5-7% wszystkich zgłoszeń.



Rys.1. Wizualizacja trójwymiarowych danych strukturalnych sdOCT w postaci projekcji *en face* wybranych warstw siatkówki. Przypadek: starcze zwyrodnienie plamki żółtej, zlewające się druzi „miękkie”. a. Zdjęcie dna oka. b. Projekcja *en face* danych OCT z pełnego zakresu głębokości siatkówki. c. Przykładowy tomogram strukturalny OCT. 1-migracja pigmentu, 2- anormalna akumulacja pigmentu w RPE. d-g. Projekcje *en face* z warstw siatkówki wyróżnionych na obrazie przekroju c. BM – błona Brucha, ELM – zewnętrzna błona graniczna, IS/OS – granica między wewnętrznymi i zewnętrznymi segmentami komórek fotoreceptorowych, ONL – zewnętrzna warstwa jądrowa, PR OD – warstwa segmentów zewnętrznych komórek fotoreceptorowych, RPE – nabłonek barwnikowy. Rozmiary obrazów: 6mm x 6mm.

Chociaż wczesne prace nad rozwojem spektralnej tomografii OCT udowodniły możliwość trójwymiarowego obrazowania morfologii tkanek oka, trójwymiarowe obrazowanie struktury naczyniowej oraz uzyskanie objętościowej informacji o wartościach przepływu krwi w naczyniach oka wymagało zwiększenia szybkości obrazowania. Było to również jednym z dążeń mojego stażu podoktorskiego. Głównym celem projektów był rozwój układu obrazowania OCT oraz metod pomiarowych z wykorzystaniem kamer CMOS [I.B.5]. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że zapewnienie wysokich szybkości obrazowania wymaga osiągnięcia kompromisu między czułością, rozdzielczością osiową obrazowania, oraz głębokością obrazowania i zakresem skanowania. Zademonstrowano, że możliwe jest obrazowanie siatkówki oka z szybkościami 70 000 – 300 000 A-skanów/s z czułością ~90-94 dB i rozdzielczością osiową ~3-9  $\mu\text{m}$  pozwalającą na wizualizację wszystkich anatomicznych warstw siatkówki. Zwiększenie szybkości pozwoliło na rejestrację danych objętościowych o rozmiarze 512 x 512 x 800 pikseli, w czasie 1.3 s. Skrócenie czasu akwizycji danych nie tylko zmniejszyło wpływ artefaktów związanych z ruchem na jakość uzyskiwanych obrazów OCT, ale również umożliwiło śledzenie trójwymiarowych

ruchów oka w czasie i korekcję artefaktów w zarejestrowanych danych (rys.2.). Zmniejszenie związanych z ruchem dystorsji obrazów, w połączeniu z wysoką rozdzielczością poprzeczną obrazowania ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) pozwoliło na obrazowanie komórek fotoreceptorowych siatkówki (czopków) w wybranych obszarach zdrowego oka (w odległości kątowej powyżej  $4^\circ$  od plamki żółtej) bez zastosowania technik optyki adaptywnej (rys.2g.). Prezentacja wyników tego projektu była nominowana do nagrody Pascala Rola na międzynarodowej konferencji Photonics West, BiOS, Ophthalmic Technologies 2009.

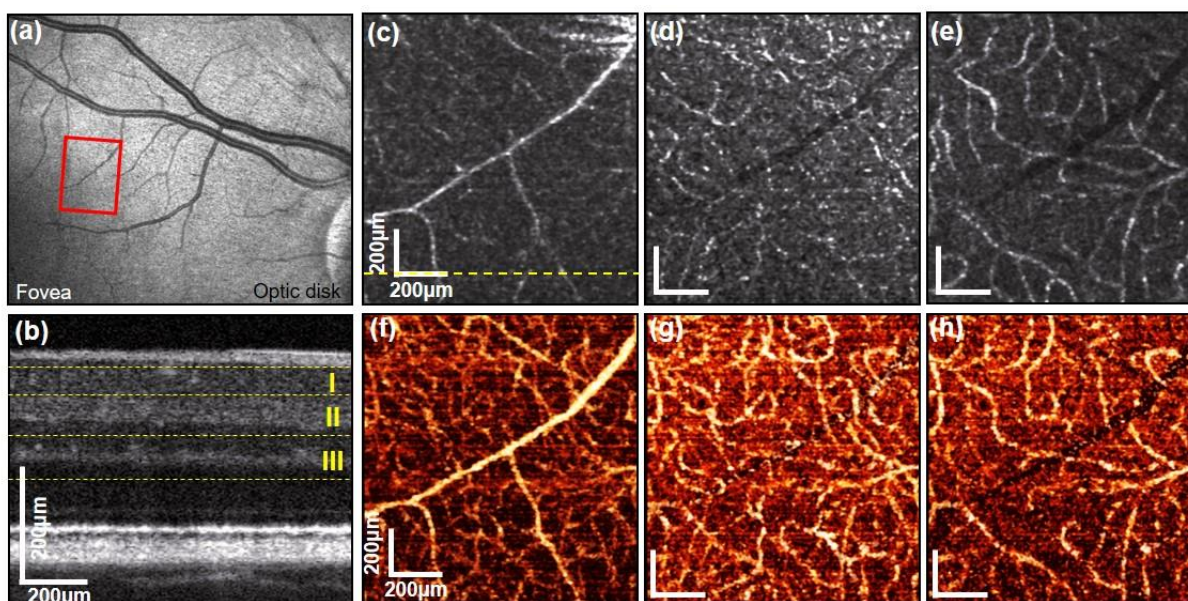


Rys.2. Korekcja artefaktów związanych z ruchem gałki ocznej (a – f) oraz wizualizacja komórek fotoreceptorowych z wykorzystaniem obrazowania sdOCT z szybkością 300 000 A-skanów/s.

Najważniejszą konsekwencją związaną ze zwiększeniem szybkości obrazowania było umożliwienie obserwacji procesów dynamicznych zachodzących w żywej tkance, w szczególności przepływu krwi w naczyniach siatkówki oka. Było to podstawą moich dalszych prac mających na celu opracowanie metod eksperymentalnych umożliwiających obrazowanie struktury naczyniowej siatkówki oka oraz pomiar przepływu krwi w naczyniach, do poziomu naczyń włosowatych [I.B.2, I.B.3, II.B.8, II.B.10, II.B.11, II.B.15, II.B.16]. Projekty te wykonywałam podczas zatrudnienia na stanowisku asystenta oraz adiunkta w Instytucie Fizyki, UMK.

Detekcja przepływu krwi w naczyniach siatkówkowych wymaga zebrania zbioru A-skanów z tych samych punktów obrazowanego obszaru dna oka, w odstępach czasu pozwalających na obserwację zmian sygnału OCT wywołanych przez przemieszczające się komórki krwi. W standardowych metodach doświadczalnych OCT siatkówka jest obrazowana z wykorzystaniem skanowania rastrowego, w którym krok wzdłuż osi szybkiego skanowania (typowo jest to oś pozioma) jest od kilku do kilkunastu razy mniejszy niż rozdzielczość poprzeczna obrazowania. Dzięki temu uzyskuje się od kilku do kilkunastu punktów pomiarowych (A-skanów) z każdego punktu obrazowanego obszaru dna oka. Pozwala to na detekcję i pomiar przepływu krwi z wykorzystaniem metod anemometrii OCT. Taka metoda skanowania ogranicza jednak zakres mierzalnych prędkości przepływu krwi. Górne ograniczenie jest podyktowane szybkością obrazowania. Im większa jest szybkość obrazowania, tym większa jest wartość prędkości przepływu, którą można zmierzyć. Dolne ograniczenie jest podyktowane wartością szumu natężeniowego i fazowego w zespolonym sygnale OCT. Jeśli spowodowana przepływem zmiana sygnału jest mniejsza niż poziom szumu, wówczas detekcja takiego przepływu i pomiar jego szybkości są niemożliwe. W moich badaniach skupiałam się nad opracowaniem metod obrazowania OCT, które pozwoliły na detekcję i pomiar szybkości

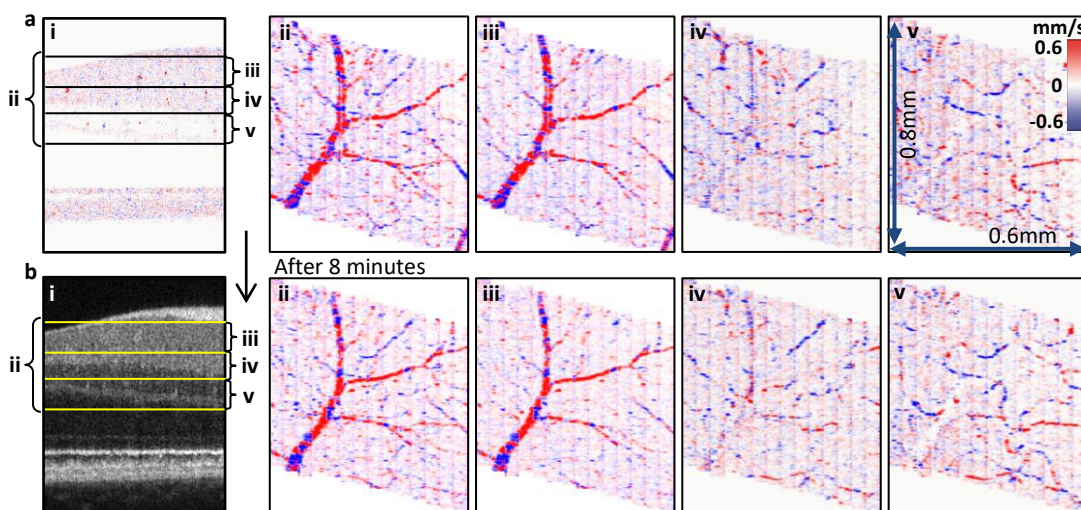
wolnych przepływów (poniżej dolnych ograniczeń narzuconych przez standardowe metody skanowania OCT) bez utraty możliwości mierzenia przepływów szybkich i z zachowaniem możliwości obrazowania trójwymiarowego [I.B.2, I.B.3, II.B.10, II.B.11, II.B.15, II.B.16]. Podstawą tych prac była niezwykle prosta obserwacja, że rejestracja wolnych przepływów wymaga zwiększenia interwału czasowego między zapisem kolejnych punktów pomiarowych (A-skanów). Zwiększenie interwału czasowego nie powoduje co prawda zmniejszenia poziomu szumu, ale pozwala na większą (obserwowalną) zmianę sygnału zespolonego pomiędzy kolejnymi jego rejestracjami. Paradoksalnie, zwiększenie szybkości obrazowania OCT było kluczowym elementem, który pozwolił na osiągnięcie tego celu. Szybka rejestracja umożliwiła opracowanie metod skanowania dna oka, w których krok wzdłuż kierunku wolnego skanowania (typowo oś pionowa) jest kilka- lub kilkunastokrotnie razy mniejszy niż rozdzielczość poprzeczna obrazowania. Analiza przepływów odbywa się wówczas między kolejnymi B-skanami, w odstępach czasu wielokrotnie dłuższych niż dane przez szybkość obrazowania urządzeń OCT (krotność liczby A-skanów w B-skanie). Mimo prostoty pomysłu, jego eksperymentalna implementacja wymagała osiągnięcia szeregu kompromisów, które miały wpływ na poziom szumu, liczbę artefaktów, wierność i szczegółowość uzyskiwanych obrazów układu naczyniowego, rozmiar obrazowanych objętości dna oka, całkowity czas pomiaru, czułość na wybrane zakresy wartości szybkości przepływów. W przypadku obrazowania z szybkością ~200 000 A-skanów/s zastosowanie tej metody pozwoliło na detekcję przepływów rzędu 0.1 mm/s w obszarze siatkówki o rozmiarze 1mm x 1mm i stało się możliwe trójwymiarowe obrazowanie sieci naczyń włosowatych siatkówki (angiografia OCT) (Rys.3.).



Rys.3. Angiografia OCT naczyń siatkówki do poziomu naczyń włosowatych. a. Projekcja *en face* danych trójwymiarowych OCT ilustrująca położenie obszaru dla którego wykonano obrazowanie angiograficzne OCT (prostokąt). b. Przykładowy obraz przekroju z zaznaczonymi warstwami siatkówki przedstawionymi na obrazach c-h. c – e. Projekcje *en face* danych angiograficznych OCT. f – h. Projekcje *en face* danych angiograficznych OCT. Obrazy c – h zostały wygenerowane z tego samego zestawu danych poddane go analizie angiograficznej. I – warstwa naczyń siatkówkowych zilustrowana na c i f, II – wewnętrzna warstwa naczyń włosowatych siatkówki, zilustrowana na d i g. III – zewnętrzna warstwa kapilar siatkówkowych, zilustrowana na e i f.

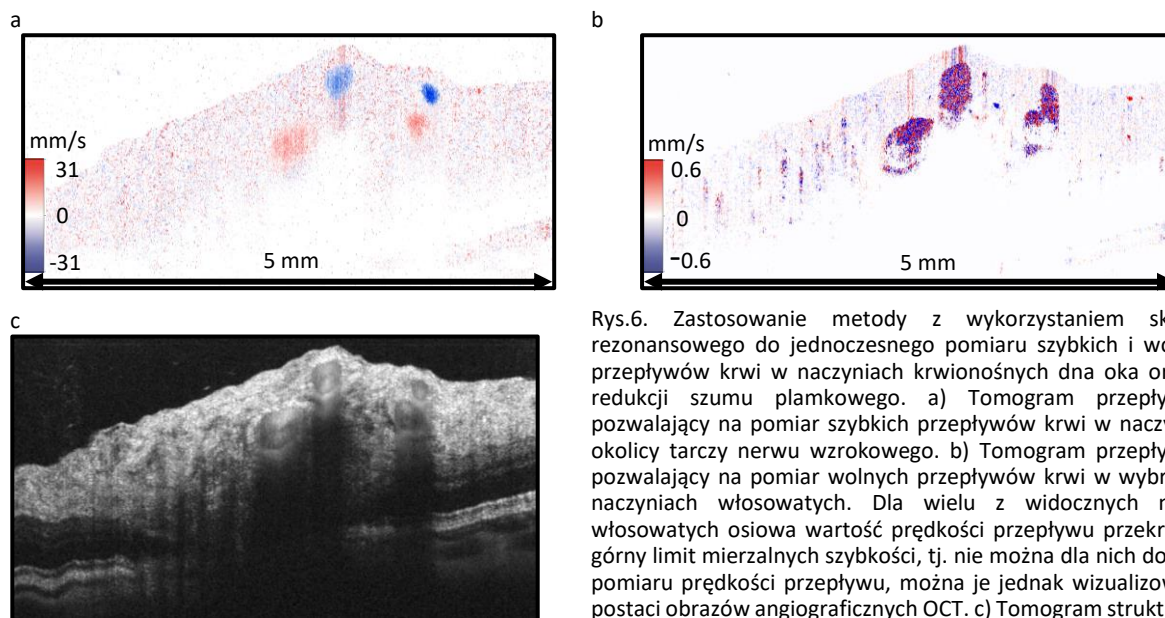
Nie był jednak możliwy pomiar szybkości przepływu w tych naczyniach, ponieważ jej typowe wartości przekraczały górną granicę mierzalnej szybkości przepływu, daną w tym przypadku protokołem skanowania (zbyt długim czasem rejestracji B-skanów). Rozwiązaniem tego problemu było

zapropozowanie skanowania segmentowego dna oka. W celu jego realizacji zaprojektowałam i skonstruowałam platformę obrazowania OCT z zastosowaniem dodatkowego, rezonansowego urządzenia skanującego, które umożliwiło segmentowe skanowanie rastrowe [I.B.2, II.B.10, II.B.16]. Pozwoliło to na skrócenie interwału czasowego między rejestracjami danych wykorzystywanych do analizy przepływowej, wystarczające do pomiaru osiowej wartości przepływu w wybranych naczyniach włosowatych siatkówki, z zastosowaniem metod dopplerowskiej OCT (górną granicą mierzalnej wartości przepływu było 0.6 mm/s) (Rys.5), z jednoczesnym zachowaniem możliwości pomiaru przepływów szybkich (~40mm/s) (rys.6). Dodatkową zaletą tego rozwiązania eksperymentalnego była możliwość zaproponowania efektywnych metod zmniejszania szumu plamkowego w obrazach OCT [I.B.2].



Rys.5. Mapy prędkości przepływu krwi w naczyniach włosowatych siatkówki, uzyskane metodą STdOCT (*joint spectra and time domain OCT*). ii - v. Projekcje *en face* ilustrujące osiowe prędkości przepływu krwi w naczyniach wybranych warstw anatomicznych siatkówki, zaznaczone na tomogramach: przepływowym (ai) i strukturalnym (bi); ii) naczynia wewnętrznych warstw siatkówki, iii) projekcja z warstwy komórek zwojowych, iv) projekcja z wewnętrznej warstwy spłotowatej i wewnętrznej części wewnętrznej warstwy jądrazstej, v) projekcja zewnętrznej części wewnętrznej warstwy jądrazstej i zewnętrznej warstwy spłotowatej. b) Ten sam obszar siatkówki obrazowany 8 minut później; w każdym z obrazów widoczny jest powtarzalny rozkład prędkości przepływu w obrazowanych naczyniach.

W podsumowanych powyżej pracach nad rozwojem metod szybkiego obrazowania OCT struktury tkankowej siatkówki i jej układu naczyniowego wykorzystywałam techniki spektralnej tomografii OCT z zastosowaniem źródeł emitujących światło o centralnej długości fali ~850nm i z zastosowaniem kamer CCD i CMOS, pozwalających na rejestrowanie danych OCT z szybkościami od 25 000 A-skanów/s do 300 000 A-skanów/s. Zastosowanie światła o długości fali ~850 nm do obrazowania OCT tkanek oka nie jest przypadkowe. Z jednej strony światło z zakresu bliskiej podczerwieni ma głębokość wnikania wystarczającą do penetracji wszystkich anatomicznych warstw siatkówki, z drugiej strony elementy fotoczułe na bazie krzemu, które są wykorzystywane w produkcji szybkich kamer CCD i CMOS, mają czułość detekcji wystarczającą do rejestracji światła rozproszonego na tych warstwach. Dzięki temu możliwe było opracowanie metod obrazowania układu naczyniowego siatkówki. Kolejnym logicznym krokiem w wybranym przeze mnie kierunku badań było opracowanie metod obrazowania błony naczyniowej oka. Jest to skomplikowana, warstwowa sieć naczyń krwionośnych zlokalizowanych zewnętrznie w stosunku do nabłonka barwnikowego, odpowiedzialna za utrzymanie prawidłowego funkcjonowania komórek fotoreceptorowych siatkówki (transport substancji biorących udział w procesie fototransdukcji

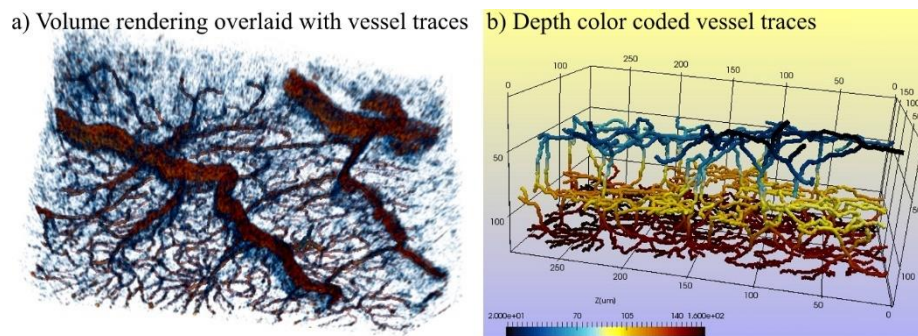


Rys.6. Zastosowanie metody z wykorzystaniem skanera rezonansowego do jednoczesnego pomiaru szybkich i wolnych przepływów krwi w naczyniach krwionośnych dna oka oraz do redukcji szumu plamkowego. a) Tomogram przepływowi pozwalający na pomiar szybkich przepływów krwi w naczyniach okolicy tarczy nerwu wzrokowego. b) Tomogram przepływowi pozwalający na pomiar wolnych przepływów krwi w wybranych naczyniach włosowatych. Dla wielu z widocznych naczyń włosowatych osiowa wartość prędkości przepływu przekraczała górny limit mierzalnych szybkości, tj. nie można dla nich dokonać pomiaru prędkości przepływu, można je jednak wizualizować w postaci obrazów angiograficznych OCT. c) Tomogram strukturalny wygenerowany z wykorzystaniem metody redukcji szumu plamkowego. Wszystkie obrazy zostały wygenerowane z pojedynczego zestawu danych OCT.

oraz regulacja temperatury). Ze względu na lokalizację poniżej wszystkich warstw siatkówki i silnie rozpraszającego nabłonka barwnikowego, korzystne jest wykorzystanie do jej obrazowania światła o długościach fali  $\sim 1050$  nm, tj. o większej głębokości wnikania do tkanek. Możliwość tą daje technika obrazowania OCT z wykorzystaniem laserów strojonych (ang. *swept source OCT* - ssOCT). Prace nad rozwojem metod szybkiego obrazowania ssOCT były częścią mojego stażu naukowego na stanowisku wizytującego adiunkta w University of California, Davis. Wykorzystałam w nich dostępne na rynku lasery strojone pozwalające na uzyskanie szybkości obrazowania o wartości 100 000 A-skanów/s (częstość repetycji 100 kHz), oraz 1 700 000 A-skanów/s (częstość repetycji 1.7 MHz) emitujące światło o centralnej długości fali  $\sim 1050$  nm.

W pierwszej fazie realizacji projektów wykorzystywałam źródło światła o szybkości przemiatania długości fali 100 000 A-skanów/s. Skonstruowany układ ssOCT wykorzystywałam do obrazowania angiograficznego OCT [I.B.1, II.B.5, II.H.1, II.H.8]. Przeprowadzone badania pokazały, że możliwe jest uzyskiwanie trójwymiarowych obrazów naczyń krwionośnych na tyle szczegółowych, że pozwoliły one na zastosowanie częściowo automatycznych numerycznych metod segmentacyjnych i konstrukcję modelu szkieletowego układu naczyniowego siatkówki oka do poziomu naczyń kapilarnych (rys.7.). Była to pierwsza udana demonstracja tego typu analizy danych trójwymiarowych w angiografii OCT. Pokazała ona, że możliwe jest wykorzystanie danych OCT do modelowania struktury sieci naczyniowej siatkówki, co otwiera możliwość modelowania przepływu krwi i w przyszłości może pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów ukrwienia tkanek oka.

Ważną częścią projektu było przeprowadzenie analizy porównawczej kilku najczęściej stosowanych metod angiograficznych OCT, w obrazowaniu warstwy naczyń włosowatych błony naczyniowej (*choriocapillaris*) [I.B.1, II.B.5]. *Choriocapillaris* tworzą ciekłą ( $\sim 10 - 15 \mu\text{m}$ ), gęstą, silnie ukrwioną sieć o strukturze „oczkowej”, umiejscowioną bezpośrednio pod nabłonkiem barwnikowym (RPE)



Rys.7. Wynik półautomatycznej segmentacji naczyń krwionośnych zarejestrowanych na obrazach trójwymiarowych otrzymanych w obrazowaniu angiograficznym OCT. a. Rendering danych trójwymiarowych. b. Model szkieletowy naczyń krwionośnych wewnętrznych warstw siatkówki (między warstwą siatkówką oraz warstwą zwojową zewnętrzną). Widoczne są trzy warstwy naczyń: siatkówkowe (kodowane kolorem niebieskim), wewnętrzna warstwa naczyń włosowatych (kolor żółty), zewnętrzna warstwa naczyń włosowatych (kolor czerwony) oraz naczynia łączące. Segmentacja została wykonana z wykorzystaniem półautomatycznej metody *Simple Neurite Tracker* dostępnej w programie ImageJ [126]. Trójwymiarowa wizualizacja została wykonana z wykorzystaniem programu ParaVIEW [127]. Pełna animacja jest dostępna w repozytorium obrazów naukowych Figshare, pod adresem: <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.2008674>

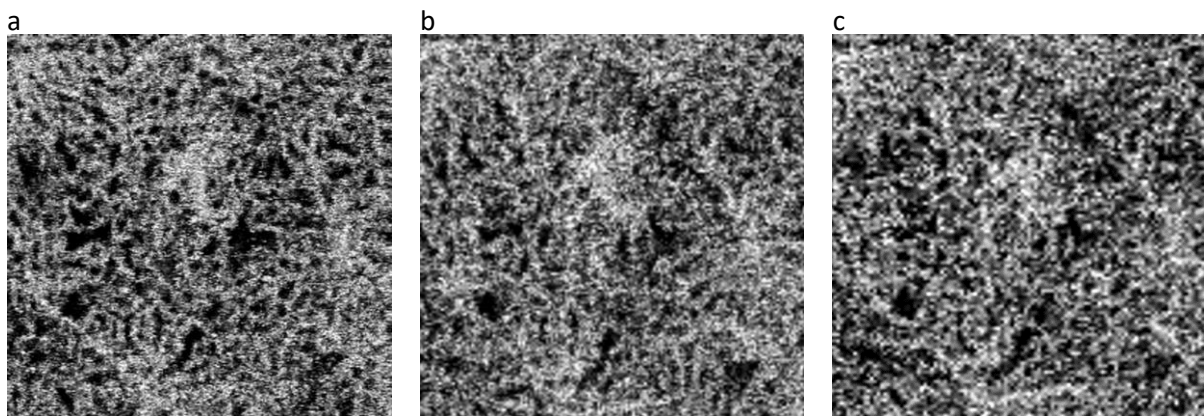
i błoną Brucha. Biorą one bezpośredni udział w wymianie substancji odżywczych i produktów procesów fototransdukcji zachodzących w komórkach fotoreceptorowych. Obecnie trwa debata naukowa dotycząca ich roli w rozwoju chorób degeneracyjnych siatkówki (np. starczego zwyrodnienia plamki żółtej), jednak brakuje metod obrazowania przyżyciowego, które pozwoliłyby na szczegółową analizę *choriocapillaris*. Klasyczne metody obrazowania: angiografia ICG i angiografia fluoresceinowa, są stosowane do obrazowania błony naczyniowej tylko w przypadku podejrzenia jej zmian chorobowych (angiografia ICG) lub wywołanych rozwojem chorób zmian wysiękowych (angiografia fluoresceinowa). Żadna z tych metod nie pozwala jednak na odróżnienie *choriocapillaris* od pozostałych warstw błony naczyniowej (warstwy naczyń Sattlera i warstwy naczyń Hallera). Możliwość taką daje angiografia OCT. W moich pracach zaproponowałam metody ilościowe porównania kontrastu obrazowania warstwy naczyń włosowatych błony naczyniowej. Z ich wykorzystaniem pokazałam eksperymentalnie, że stosowane obecnie metody angiografii OCT różnią się co prawda kontrastem uzyskiwanych obrazów *choriocapillaris*, jednak znacznie bardziej istotny wpływ na możliwość wizualizacji tej warstwy mają sposób przeprowadzenia pomiaru i analiza danych [I.B.1, II.H.1]. W szczególności, istotny wpływ na poprawę kontrastu obrazowania ma uśrednianie wielu zestawów danych objętościowych zebranych z tego samego obszaru siatkówki. W przypadku obrazowania OCT, uśrednianie takie nie jest trywialne ze względu na obecność różnego typu artefaktów związanych z mimowolnym ruchem gałki ocznej. Uśrednianie wielu zestawów danych objętościowych wymagało zaproponowania metod numerycznych korekcji artefaktów związanych z ruchem. Wykorzystane przeze mnie metody podsumowałam w sekcji „Numeryczna analiza danych”.

Zastosowanie układu ssOCT wykorzystującego światło o centralnej długości fali  $\sim 1050$  nm i szybkości obrazowania 100 000 A-skanów/s pozwoliło na obrazowanie angiograficzne OCT warstwy naczyń włosowatych błony naczyniowej i fragmentów większych naczyń umiejscowionych bezpośrednio poniżej *choriocapillaris*. Nadal jednak nie było możliwe obrazowanie większych naczyń błony naczyniowej (warstwy Sattlera i Hallera) ani uzyskanie informacji o wartościach szybkości przepływu krwi w tych naczyniach. Nie było też możliwe uzyskanie informacji o morfologii *choriocapillaris*, tj. nie było możliwe zaproponowanie ich analizy morfometrycznej. Po raz kolejny w moich pracach badawczych pokazałam,

że rozwiązanie tych problemów jest możliwe dzięki zwiększeniu szybkości obrazowania OCT [II.B.4]. Prace te są związane z aktualnymi projektami badawczymi, które finalizuję w ramach stażu naukowego w University of California, Davis (w przygotowaniu do publikacji). Ich wyniki prezentowałam na konferencji Photonics West, BiOS, Ophthalmic Technologies 2017, na której moja praca została nominowana do nagrody Pascala Rola i wyróżniona jako wybitna przez członków komisji konkursowej.

W przeprowadzonych badaniach zastosowałam laser strojony, wykorzystujący technikę synchronizacji modów w dziedzinie fourierowskiej (ang. *Fourier domain mode locking, FDML*) [II.B.19, II.B.20], o repetycji przemiatania widma wynoszącej 1.7 MHz (szybkość obrazowania 1 700 000 A-skanów/s). Jest to szybkość  $\sim 17$  razy większa od typowych urządzeń badawczych OCT wykorzystywanych w zastosowaniach okulistycznych. Laser pozwolił na uzyskanie istotnego postępu w możliwości obrazowania błony naczyniowej oka, co udowodniłam eksperymentalnie w moich pracach badawczych, [II.B.4, II.H.8]. W pracach tych pokazałam doświadczalnie możliwość obrazowania angiograficznego OCT nie tylko warstwy choriocapillaris do poziomu pojedynczych kapilar, ale również głębiej położonych naczyń krwionośnych. Dodatkowo pokazałam, że jest możliwe uzyskanie informacji o osiowej wartości prędkości przepływu krwi w wybranych fragmentach naczyń błony naczyniowej z zastosowaniem metod dopplerowskiej tomografii OCT.

Wynikiem prac [II.B.4] była demonstracja doświadczalna zależności obrazowania morfologii naczyń włosowatych błony naczyniowej od gęstości skanowania. Obrazowanie struktury naczyniowej *choriocapillaris* wymaga co najmniej zachowania warunku Nyquista (krok skanowania mniejszy od połówkowej wartości rozdzielczości poprzecznej obrazowania). Im mniejszy jest krok skanowania, tym lepsza jest wizualizacja morfologii *choriocapillaris* (Rys. 8.), przy czym zmniejszenie kroku skanowania poniżej  $\sim 0,35$  wartości rozdzielczości poprzecznej nie miało istotnego wpływu na możliwość wizualizacji struktury naczyniowej. W celu ilościowej oceny wizualizacji morfologii *choriocapillaris* zaproponowałam analizę widma częstości przestrzennych ich projekcji *en face* (podsumowanie w sekcji „Numeryczna analiza danych”).



Rys.8. Wpływ gęstości skanowania na wizualizację naczyń włosowatych błony naczyniowej oka w obrazowaniu angiograficznym FDML ssOCT. Krok skanowania: a. 3  $\mu\text{m}$ , b. 5  $\mu\text{m}$ , c. 7  $\mu\text{m}$ . Rozdzielczość poprzeczna obrazowania wynosiła 14  $\mu\text{m}$ . Ze wzrostem kroku skanowania pogarsza się jakość wizualizacji *choriocapillaris*. Obrazy zostały wygenerowane z trzech zestawów danych zebranych z tego samego obszaru dna oka zdrowego ochotnika. Położenie obrazowanego obszaru,  $3,5^\circ$  w kierunku nosowym względem dołka środkowego. Rozmiary obrazów 0.8 mm<sup>2</sup>.

Szybkość obrazowania wynosząca 1.7 mln. A-skanów/s pozwoliła na zebranie danych trójwymiarowych o rozmiarze 390 A-skanów x 390 B-skanów x 1024 punktów/A-skan, z obszaru dna oka 1.2mm x 1.2mm w czasie  $\sim 2\text{s}$ . W celu umożliwienia obrazowania angiograficznego OCT, każdy z B-skanów



był powtarzany 20-sto krotnie w kolejnych pozycjach wzdłuż osi wolnego skanowania (oś pionowa), tj. całkowita liczba zebranych w czasie  $\sim 2$ s B-skanów wynosiła 7800. Krok skanowania w tym protokole pomiarowym wynosił  $3 \mu\text{m}$  (w obu kierunkach skanowania), przy rozdzielczości poprzecznej obrazowania  $14 \mu\text{m}$ . Dla porównania, rejestracja takiego samego zestawu danych z wykorzystaniem typowych urządzeń angiografii OCT wynosiłaby  $\sim 30$  s, co nie jest akceptowalne w przyżyciowym obrazowaniu oka. Uzyskiwane obrazy kapilar błony naczyniowej były na tyle szczegółowe, że stało się możliwe zaproponowanie ich analizy morfometrycznej [II.B.4]. W moich pracach zaproponowałam cztery metryki, które mogą być wykorzystane do opisu ilościowego struktury naczyń włosowatych błony naczyniowej zarówno w oczach zdrowych ochotników jak i w przypadku wczesnych stadiów rozwoju chorób (np. starczego zwyrodnienia plamki żółtej). Są to: mapowanie odległości między warstwą choriocapillaris i nabłonkiem barwnikowym, wyznaczenie średniej odległości między naczyniami, wyznaczenie pasma częstości przestrzennych choriocapillaris oraz wyznaczenie współczynnika wypełnienia przepływem (proporcja obszaru objętego przepływem krwi do całkowitego obszaru objętego obrazowaniem OCT) (Rys.11.-13.). Mapowanie odległości między choriocapillaris i RPE wymagało opracowania metod numerycznych wykrywania warstwy kapilar błony naczyniowej i segmentacji nabłonka barwnikowego. W celu wyznaczenia średniej odległości między naczyniami i pasma częstości przestrzennych zaproponowałam analizę widma mocy częstości przestrzennych w obrazach *en face choriocapillaris*. W celu wyznaczenia współczynnika wypełnienia przepływem zastosowałam metody morfologiczne analizy obrazów prowadzące do binaryzacji obrazu sieci naczyniowej.

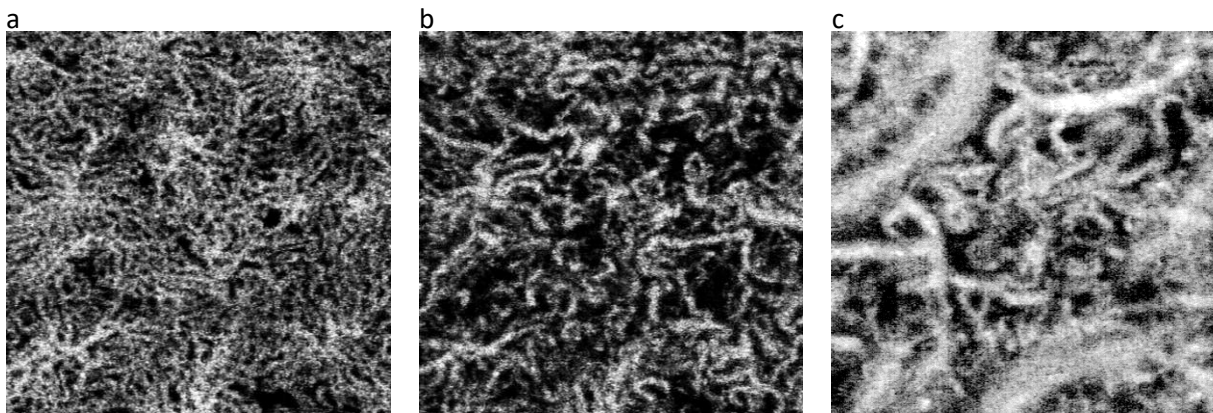
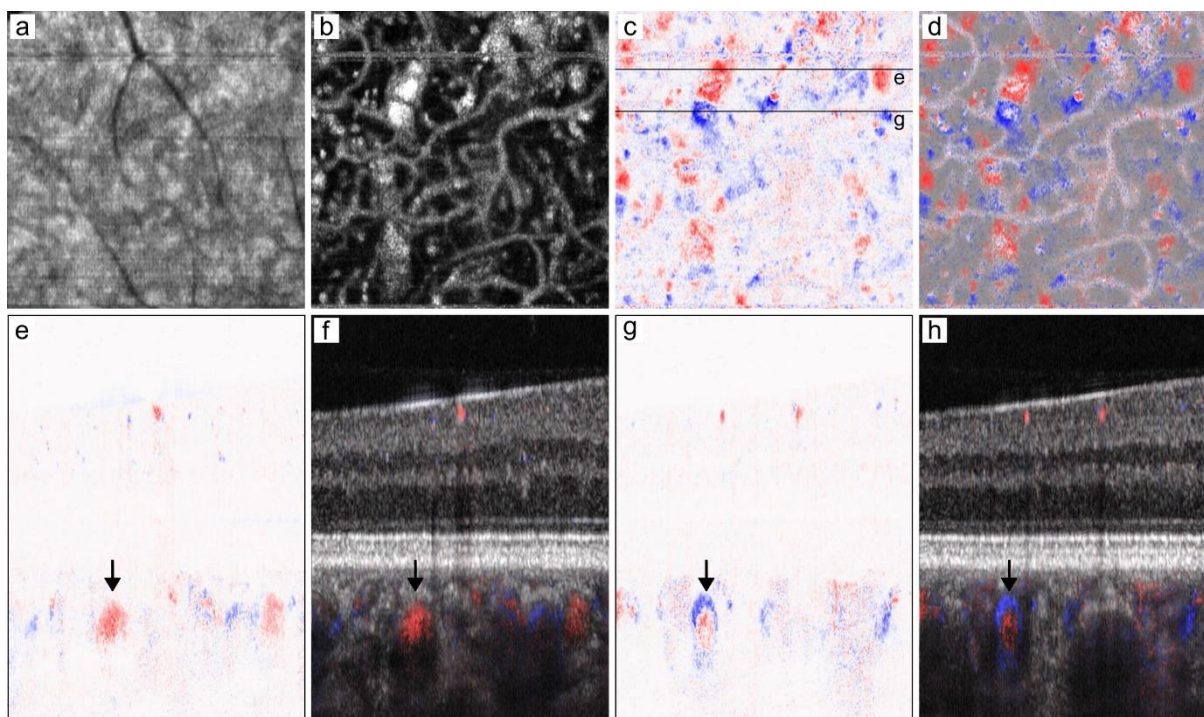


Fig. 9. Obrazowanie angiograficzne OCT błony naczyniowej oka z wykorzystaniem FDML ssOCT, z szybkością obrazowania 1.7 mln. A-skanów/s. a. Obraz *en face* warstwy naczyń włosowatych (*choriocapillaris*) zlokalizowanej  $16 \mu\text{m}$  poniżej nabłonka barwnikowego (RPE), grubość warstwy:  $10 \mu\text{m}$ . b. Warstwa naczyń zlokalizowanych  $28 \mu\text{m}$  poniżej RPE, grubość warstwy  $10 \mu\text{m}$ . c. Naczynia głębokich warstw błony naczyniowej:  $90 \mu\text{m}$  poniżej RPE, grubość warstwy  $98 \mu\text{m}$ . Rozmiary obrazów:  $1.22\text{mm} \times 1.22 \text{mm}$ .

Obrazowanie angiograficzne OCT z szybkością  $1.7$  mln. A-skanów/s pozwoliło na wizualizację nie tylko warstwy kapilar, ale również głębiej położonych, większych naczyń krwionośnych błony naczyniowej (naczynia warstw Sattlera i Hallera) (rys.9.). Może się to wydawać sprzeczne z intuicją, ponieważ zwiększenie szybkości obrazowania OCT powoduje zmniejszenie liczby fotonów rejestrowanych przez detektor w pojedynczej ekspozycji, tj. zmniejszenie czułości obrazowania. Dodatkowo, im głębiej położone są obrazowane warstwy siatkówki, tym mniej dociera do nich fotonów ze względu na rozproszenie w płytszych warstwach, i tym samym proporcjonalnie mniej fotonów dociera do detektora. Wydaje się więc, że zwiększenie szybkości obrazowania powinno pogorszyć, a nie polepszyć możliwość wizualizacji głębokich warstw błony naczyniowej. Jednak zwiększenie szybkości obrazowania powoduje poprawę widzialności prążków interferencyjnych (zmniejszenie rozmycia prążków

spowodowanego skanowaniem, artefaktami ruchowymi i mechanicznymi niestabilnościami układu pomiarowego), oraz pozwala na rejestrację większej ilości danych i zastosowanie metod ich uśredniania. Czynniki te wyjaśniają dlaczego, mimo niemal dwudziestokrotnie większej szybkości obrazowania, udało się uzyskać wizualizację głębokich warstw błony naczyniowej, do tej pory nie możliwą do osiągnięcia z wykorzystaniem innych układów pomiarowych OCT. Co więcej, niski szum fazowy światła emitowanego przez wykorzystany w układzie laser strojony z synchronizacją modów umożliwił rejestrację sygnału dopplerowskiego generowanego przez przepływ krwi w głębokich naczyniach błony naczyniowej. Udało się uzyskać ilościową informację o osiowej prędkości przepływu mniejszej niż 0.4 mm/s (analiza sygnału między B-skanami), zaobserwowanej w naczyniach zorientowanych pod kątami bliskimi 90° względem sanującej wiązki światła (Rys.10.). Co ciekawsze, udało się również zarejestrować sygnały o wartości osiowego przepływu krwi przekraczającej 100 mm/s (analiza między A-skanami), który został zaobserwowany w naczyniach najprawdopodobniej penetrujących twardówkę i zaopatrujących błonę naczyniową (tj. naczynia rzęskowe).

Najważniejszą konsekwencją możliwości detekcji przepływu krwi i pomiaru składowej osiowej wektora prędkości przepływu jest szansa lepszego zrozumienia mechanizmów ukrwienia błony naczyniowej i w przyszłości być może również modelowania tych mechanizmów w oczach zdrowych i obciążonych patologiami.



Rys.10. Obrazowanie angiograficzne i dopplerowskie OCT oka zdrowego ochotnika. a. Projekcja *en face* obrazów strukturalnych, b. – projekcja obrazów angiograficznych i c. dopplerowskich. d. Kombinacja obrazu b i c ułatwia identyfikację źródeł sygnału dopplerowskiego OCT (w tym przypadku są to duże naczynia głębokich warstw błony naczyniowej). e, g. Przykładowe obrazy przekrojów wygenerowane z danych przepływowych. f, h. Kombinacja dopplerowskich i strukturalnych tomogramów OCT. Groty strzałek na obrazach e i f wskazują sygnał dopplerowski OCT, którego źródłem jest przepływ krwi w zewnętrznej części światła naczynia. Groty strzałek w g i h wskazują naczynie, w którym osiowa wartość prędkości przepływu krwi nieznacznie przekracza górny limit mierzalnej prędkości. Kolor czerwony wskazuje przepływ krwi w kierunku nabłonka barwnikowego. Kolor niebieski wskazuje przepływ w kierunku twardówki. Położenie obrazowanego obszaru 7° w kierunku nosowym względem dołka środkowego. Rozmiary obrazów: 1.2mm x 1.2mm w kierunku poprzecznym i 787 μm w kierunku osiowym.

#### 4.5.3. NUMERYCZNA ANALIZA DANYCH

Fourierowska tomografia optyczna OCT jest techniką obrazowania wymagającą numerycznej analizy danych cyfrowych. Metody te można podzielić na kilka grup, m.in.:

- 1) generacja obrazów z zarejestrowanych widm interferencyjnych,
- 2) wizualizacja wybranych struktur obiektów, istotnych dla problemów badawczych realizowanych z wykorzystaniem OCT,
- 3) analiza jakościowa i ilościowa cech obiektów zarejestrowanych w danych OCT,
- 4) korekcja artefaktów wynikających z ograniczeń eksperymentalnych techniki OCT.

Istotną częścią przedstawianych w tym referacie ciągu prac badawczych było opracowanie metod pozwalających na wizualizację oraz analizę ilościową wybranych struktur obiektu oraz korekcję artefaktów związanych z mimowolnymi ruchami gałki ocznej.

##### a. Wizualizacja warstwowa danych trójwymiarowych OCT.

Wynikiem obrazowania strukturalnego oraz angiograficznego i dopplerowskiego OCT są dane trójwymiarowe. Zarówno w pracach badawczych jak i w klinicznej diagnostyce okulistycznej istotne jest uzyskanie informacji o wybranych strukturach oka, ukrytej w zarejestrowanych danych objętościowych. Siatkówka oka ma budowę warstwową, w której kolejne warstwy komórek pełnią specyficzne funkcje w procesie percepcji wzrokowej. Podobnie, rozwój chorób manifestuje się charakterystycznymi zmianami w wybranych warstwach anatomicznych oka. Intuicyjnie, metody wizualizacji danych trójwymiarowych powinny więc umożliwiać analizę wybranych warstw siatkówki. Moje prace skupiały się na opracowaniu metod analizy obrazów pozwalających na osiągnięcie tego celu [I.B.1, I.B.4]. Metody te opierają się na segmentacji wybranej warstwy, która odzwierciedla kształt siatkówki normalnego oka, zarejestrowany w obrazach OCT i jednocześnie charakteryzuje się wysokim współczynnikiem rozpraszania światła, tj. jest źródłem silnego sygnału OCT. Pozostałe warstwy są obrazowane względem tej powierzchni odniesienia poprzez sumowanie sygnału z wybranych zakresów głębokości. Wymagania warstwy odniesienia spełnia nabłonek barwnikowy (ang. *retinal pigmented epithelium* – RPE). Do jego segmentacji, tj. wyodrębnienia w serii zarejestrowanych B-skanów, wykorzystywałam metody analizy gradientowej, które pozwalają na znajdowanie obszarów o wysokiej zmianie natężenia sygnału, tj. na znajdowanie granic obiektów. Główną trudnością w bezpośrednim zastosowaniu metod gradientowych do analizy obrazów OCT jest obecność szumu. Jest to szum śrutowy, którego źródłem są źródło światła i układ detekcji, oraz szum plamkowy wynikający z interferometrycznej detekcji światła rozproszonego w obiektach o niejednorodnym rozkładzie współczynnika załamania. Wpływ szumu na wyniki segmentacji można częściowo ograniczyć poprzez zastosowanie metod uśredniania obrazów oraz metod numerycznej filtracji obrazów [I.B.2]. W większości przypadków całkowite usunięcie szumu, zwłaszcza plamkowego, za pomocą metod numerycznych jest trudne do osiągnięcia ponieważ skutkuje utratą rozdzielczości obrazowania, tj. utratą informacji o drobnych strukturach obiektu. Jeśli jednak celem analizy jest znalezienie kształtu siatkówki, który ma pełnić funkcję kształtu odniesienia do wizualizacji warstwowej (tak jak w opracowanych przeze mnie metodach) wówczas utrata informacji o drobnych strukturach nie ma wpływu na uzyskany wynik.

Zastosowanie metod gradientowych do analizy obrazów poddanych filtracji pozwala na uzyskanie informacji o położeniach granic wszystkich warstw siatkówki. Istotnym wyzwaniem dla metod segmentacyjnych w OCT jest prawidłowa identyfikacja granic konkretnej, wybranej warstwy. W danych

OCT najwyższe wartości gradientu odpowiadają typowo krawędziom nabłonka barwnikowego. Jednak obecność innych struktur o silnym sygnale (np. warstwa nerwowa, siatkówkowe naczynia krwionośne) może generować wartości gradientu natężenia sygnału wyższe od gradientu RPE. Dla większości danych OCT siatkówki (z wyjątkiem zaawansowanych patologii nabłonka barwnikowego, jak np. atrofia geograficzna) sytuacja taka występuje w małym podzbiornie A-skanów i można ją uznać za nietypową. W opracowanych przeze mnie metodach, identyfikacja granic RPE odbywa się poprzez analizę statystyczną położenia gradientu o najwyższej wartości, która pozwala na znalezienie najbardziej prawdopodobnego położenia granicy RPE [I.B.1, I.B.4]. W przypadku zdrowej siatkówki granica ta ma regularny, ciągły kształt. Jednak rozwój patologii często prowadzi do jego zaburzenia i koniecznym staje się znalezienie „normalnej” krzywizny dna oka poprzez dopasowanie funkcji matematycznych. Najczęściej stosowaną metodą jest dopasowanie krzywymi wielomianowymi w kolejnych B-skanach. Metoda ta jednak zawodzi w przypadku znaczących nieregularności kształtu granicy nabłonka barwnikowego i prowadzi do istotnych różnic dopasowanej krzywizny dna oka między sąsiednimi B-skanami (artefakty odzwierciedlenia krzywizny dna oka). Lepsze wyniki można uzyskać dopasowując kształt krzywizny dna oka powierzchniami. W opracowanych przeze mnie metodach wizualizacji, do takiego dopasowania wykorzystywałam wielomiany Zernikego.

Opracowane metody wykorzystujące dopasowanie wielomianowe wykorzystałam do wizualizacji zmian patologicznych siatkówki w szeregu chorób, włączając starcze zwyrodnienie plamki żółtej [I.B.4]. Pokazałam m.in., że tego typu uproszczone metody segmentacji warstw, w połączeniu z prezentacją w postaci projekcji *en face*, dobrze nadają się do wizualizacji zmian patologicznych zachodzących w nabłonku barwnikowym oraz w warstwie fotoreceptorowej siatkówki (występowanie druzów, atrofii, odwarstwienia siatkówki, uszkodzenia warstwy fotoreceptorów itp.) (rys.1). Wizualizacja warstwowa pozwala na klasyfikację zmian patologicznych charakterystycznych dla wybranych chorób oka oraz na ocenę jakościową tych zmian.

Rozwój metod warstwowej wizualizacji danych kontynuowałam podczas stażu naukowego w Vision Science and Advanced Retinal Imaging Laboratory, University of California, Davis. Metodę z wykorzystaniem wielomianów Zernikego zastosowałam do wizualizacji naczyń krwionośnych nabłonka barwnikowego oka [I.B.1]. W szczególności, wizualizacja w postaci projekcji *en face* naczyń włosowatych była podstawą dalszych analiz morfometrycznych.

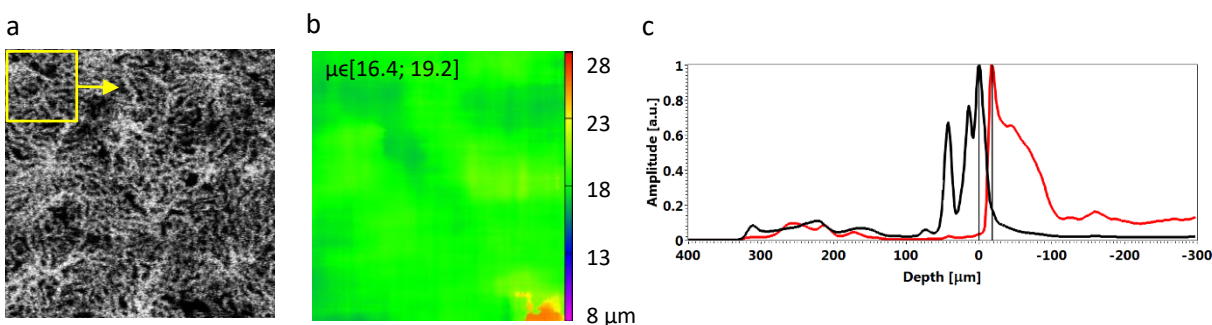
#### b. Morfometria naczyń włosowatych błony naczyniowej oka

Wizualizacja warstwowa obrazów trójwymiarowych OCT nie tylko ułatwia analizę jakościową badanych struktur oka, ale również stwarza możliwość analizy ilościowej wybranych ich cech. W pracach związanych z rozwojem i zastosowaniami szybkich metod obrazowania OCT skupiłam się na opracowaniu metod ilościowej analizy struktury naczyń włosowatych błony naczyniowej oka [II.B.4]. Dzięki zastosowaniu techniki FDML ssOCT o szybkości 1.7 mln. A-skanów/s, stało się możliwe obrazowanie ich morfologii. Stwarza to nowe możliwości analizy rozwoju patologii, w szczególności zmian wywołanych starczym zwyrodnieniem plamki żółtej. Rozwijając metody ilościowe pozwalające na takie analizy brałam pod uwagę znane konsekwencje rozwoju AMD związane z *choriocapillaris*:

- akumulacja produktów procesów fototransdukcji w obrębie błony Brucha oraz pomiędzy błoną Brucha i nabłonkiem naczyniowym (różnego typu druzy, w szczególności druzy laminarne – ang. *basal laminar drusen*),

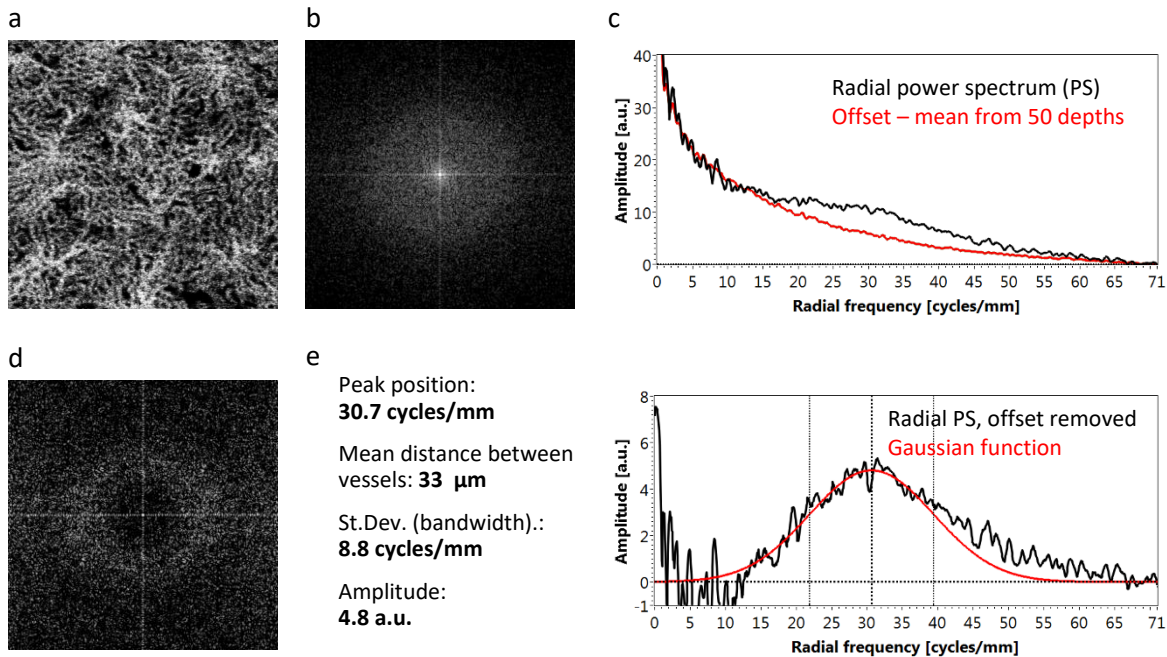
- zanik naczyń włosowatych błony naczyniowej, przy czym hipotezuje się, że jest on poprzedzony zmianami w strukturze sieci naczyniowej *choriocapillaris*.

W celu umożliwienia analizy narastania warstwy produktów ubocznych procesów fototransdukcji pod nabłonkiem barwnikowym, zaproponowałam pomiar odległości między RPE i warstwą naczyń włosowatych błony naczyniowej. W celu jego dokonania należy wyznaczyć położenie nabłonka barwnikowego w obrazach natężeniowych OCT i położenie warstwy *choriocapillaris* w obrazach angiograficznych OCT. Analiza polega na znalezieniu pików przekraczających empirycznie wyznaczone progi natężenia sygnału i zlokalizowane na określonych głębokościach, w średnich profilach osiowych wygenerowanych z trójwymiarowych danych natężeniowych i angiograficznych. Średnie profile osiowe wyznacza się poprzez uśrednianie A-skanów w podzbiorach wyodrębnionych z danych trójwymiarowych (średnia krocząca). Pik RPE jest zdefiniowany jako najgłębiej położony pik w średnich, natężeniowych profilach osiowych. Pik *choriocapillaris* jest zdefiniowany jako pik w średnich profilach angiograficznych, położony najbliżej pikowi RPE. Odległości między RPE i *choriocapillaris* są znajdowane dla kolejnych poprzecznych pozycji w zebranych zestawie danych i przedstawiane w postaci mapy odległości (Rys.11.).



Rys.11. Pomiar odległości między nabłonkiem barwnikowym (RPE) i warstwą naczyń włosowatych błony naczyniowej oka. a. Projekcja *en face choriocapillaris* w obszarze dołka środkowego; kwadrat ilustruje rozmiar okna wykorzystanego do uśredniania A-skanów przed analizą położenia pików RPE i *choriocapillaris*; rozmiar obrazu 1.2mm<sup>2</sup>. b. Mapa odległości między RPE i *choriocapillaris*; podane wartości są granicami 95% przedziału ufności wartości średniej. c. Średnie profile osiowe: natężeniowy (kolor czarny) i angiograficzny (kolor czerwony) uzyskane przez uśrednienie wszystkich A-skanów w obrazach natężeniowych i angiograficznych OCT; pionowe linie wskazują pik RPE (czarna linia) oraz pik *choriocapillaris* (czerwona linia).

W celu umożliwienia analizy zmian struktury naczyniowej zaproponowałam analizę radialnego widma mocy częstości przestrzennych obrazów *en face choriocapillaris*. Proponując tą analizę uczyniłam założenie, że zmiany struktury naczyniowej mogą się uwidaczniać jako zmiany w widmie częstości przestrzennych tej warstwy naczyniowej. W celu dokonania tego typu analizy obrazy *en face* warstwy naczyń włosowatych nabłonka barwnikowego są poddawane dwuwymiarowej transformacji Fouriera, po czym dokonuje uśredniania kąтового uzyskanego widma częstości przestrzennych (uśrednianie po wszystkich kątach dla danych położenia radialnych względem początku układu odniesienia). W celu usunięcia „tła częstości”, podobnej operacji dokonuje się dla kolejnych projekcji *en face* w głąb danych trójwymiarowych błony naczyniowej i uśrednia wszystkie radialne widma mocy. Po odjęciu średniego radialnego widma mocy częstości przestrzennych od widma mocy *choriocapillaris* uzyskuje się „pik”, który można przybliżyć funkcją gaussowską (rys.12.). Położenie pików określa średnią częstość przestrzenną charakterystyczną dla naczyń włosowatych nabłonka barwnikowego w obrazowanym obszarze dna oka. Odwrotność tej charakterystycznej częstości odpowiada średniej odległości między naczyniami. Średnie odchylenie standardowe dopasowanej funkcji gaussowskiej może służyć jako pomiar pasma częstości przestrzennych *choriocapillaris*, a jej amplituda może być miernikiem widzialności *choriocapillaris*.

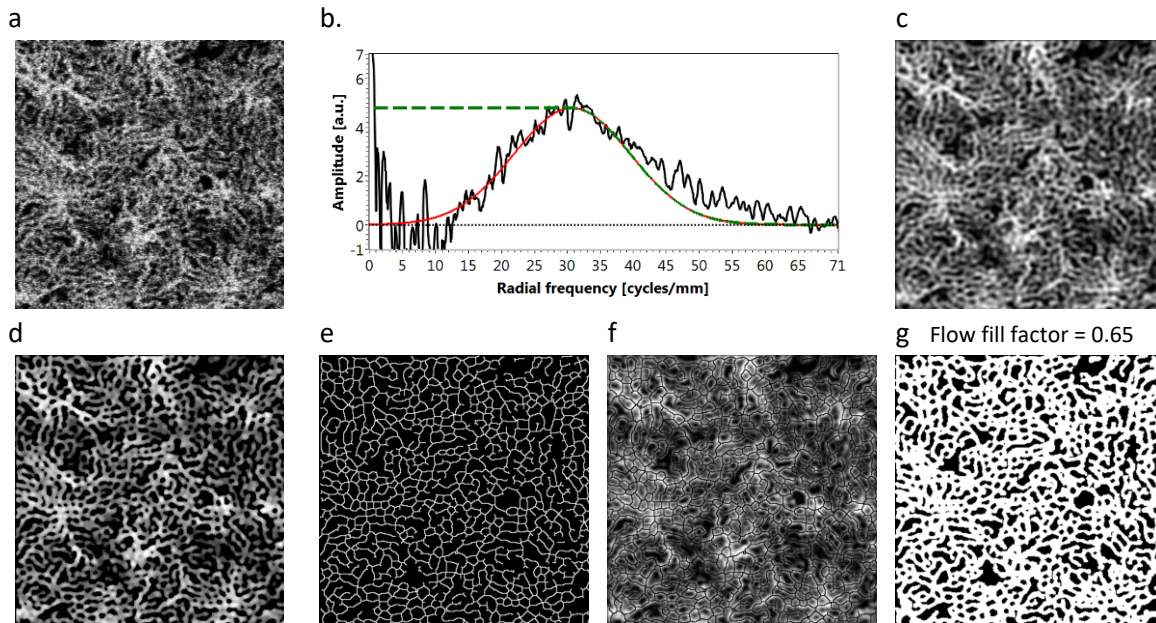


Rys.12. Analiza obrazów naczyń włosowatych błony naczyniowej zarówno oka z wykorzystaniem widma mocy częstości przestrzennych. a. Projekcja *en face choriocapillaris*. b. Dwuwymiarowe widmo mocy częstości przestrzennych. c. Radialne widma częstości przestrzennych: choriocapillaris – kolor czarny, średnie radialne widmo mocy wyznaczone dla błony naczyniowej – kolor czerwony. d. Dwuwymiarowe widmo mocy częstości przestrzennych po usunięciu „tła częstości”. e. Radialne widmo mocy częstości przestrzennych po usunięciu „tła częstości” (kolor czarny), oraz dopasowana funkcja gaussowska (kolor czerwony).

Inną miarą, którą można wykorzystać do ilościowej charakterystyki warstwy naczyń włosowatych błony naczyniowej jest wypełnienie przepływem, zdefiniowane jako proporcja obszaru obrazu odpowiadająca zarejestrowanemu sygnałowi przepływowemu do całkowitego obszaru obrazu. W celu jej wyznaczenia zaproponowałam filtrację przestrzenną obrazu z wykorzystaniem filtra zdefiniowanego na podstawie analizy radialnego widma mocy, po której zastosowałam szereg operacji morfologicznych prowadzących do skeletonizacji i binaryzacji obrazu *choriocapillaris* (Rys.13). Wypełnienie przepływem oblicza się jako stosunek sumy wartości pikseli obrazu binarnego do liczby wszystkich pikseli obrazu. Dodatkowo obraz szkieletowy może w przyszłości posłużyć do dalszej analizy mającej na celu zaproponowanie modelu przepływu krwi w sieci naczyń włosowatych błony naczyniowej.

c. Redukcja artefaktów związanych z ruchem i metody uśredniania danych trójwymiarowych OCT.

Przydatność danych OCT w obrazowaniu struktury tkankowej i naczyniowej dna oka zależy od jakości i szczegółowości uzyskiwanych danych. Zwiększanie szybkości obrazowania jest kluczowe m.in. dlatego, że pozwala na skrócenie czasu obrazowania i tym samym zmniejszenie liczby artefaktów ruchowych w zarejestrowanych obrazach. Całkowita ich eliminacja nie jest jednak możliwa. W większości przypadków, w zarejestrowanych obrazach obserwuje się nieciągłości w strukturach siatkówki związane z ruchami sakadowymi oraz mniej widoczne dystorsje związane z dryftem oka. W obrazowaniu angiograficznym lub dopplerowskim OCT ruchy gałki ocznej są one źródłem fałszywego sygnału maskującego informację o przepływie krwi w obszarze siatkówki, który był obrazowany w momencie wystąpienia ruchu. Tego typu artefakty mogą powodować utratę istotnej informacji diagnostycznej, utrudniać interpretację obrazów oraz uniemożliwiać ich analizę ilościową. W szczególności artefakty związane z ruchem powodują występowanie błędów w metodach segmentacji warstw siatkówki lub jej układu krwionośnego.



Rys.13. Wyznaczanie współczynnika wypełnienia przepływem. a. Projekcja *en face choriocapillaris*. b. Konstrukcja filtra przestrzennego (kolor zielony) z wykorzystaniem radialnego widma mocy. c. Obraz naczyń włosowatych błony naczyniowej po zastosowaniu filtracji przestrzennej. d. Obraz poddany lokalnemu progowaniu natężeniowemu. e. Obraz szkieletowy choriocapillaris uzyskany w wyniku morfologicznej operacji skeletonizacji. f. Nałożenie obrazu szkieletowego na obraz poddany filtracji przestrzennej – wskazanie położenia osi naczyń. g. Binaryzacja obrazu choriocapillaris z zastosowaniem operacji morfologicznej „rozszerzenia” obrazu szkieletowego na podstawie analizy lokalnego rozkładu natężenia sygnału. Podana wartość jest zmierzonym współczynnikiem wypełnienia obrazu przepływem.

Dwie główne metody redukcji artefaktów ruchowych stosowane w OCT, to:

- 1) śledzenie ruchów gałki ocznej i korygowanie w czasie rzeczywistym położenia wiązki światła skanującej dno oka [111-114],
- 2) korygowanie artefaktów ruchowych metodami numerycznymi, w zarejestrowanych wcześniej zestawach danych [11, 115-122].

W moich pracach związanych z rozwojem metod szybkiego obrazowania OCT opracowałam metodę korekcji artefaktów związanych z ruchem, w zarejestrowanych wcześniej zestawach danych [I.B.1]. Metoda ta wykorzystuje warstwową wizualizację danych trójwymiarowych, z zastosowaniem metod wcześniej opisanych w tym referacie. Jej celem jest minimalizacja artefaktów związanych z ruchami sakadowymi oka. Artefakty związane z dryftem oka są ignorowane. Opracowując metodę uczyniłam upraszczające założenie, że pomiędzy ruchami sakadowymi, podzbiory danych trójwymiarowych OCT zachowują się jak bryły sztywne i podlegają tylko ruchom translacyjnym. Założenie to jest w przybliżeniu prawdziwe, jeśli pomiar jest wystarczająco szybki (~100 000 A-skanów/s) i badany ochotnik nie ma trudności ze skupianiem wzroku na znaczniku fiksacyjnym wyświetlanym na LCD (ang. *liquid crystal display*) podczas pomiaru. Implementacja metody wymaga zebrania kilku (5ciu lub więcej) zestawów danych trójwymiarowych z tego samego obszaru oka. Z tych danych generowane są typowe obrazy OCT: przekroje strukturalne i angiograficzne, i stosowane są procedury generacji projekcji warstwowych. Wynikiem są dwuwymiarowe obrazy *en face* struktury naczyniowej siatkówki. Artefakty ruchowe są na nich widoczne w postaci łatwo identyfikowalnych poziomych linii o maksymalnym sygnale angiograficznym. Położenie tych artefaktów jest wykorzystywane do podzielenia obrazów *en face*, uzyskanych ze wszystkich zebranych zestawów danych, na mniejsze, wolne od artefaktów fragmenty oraz do podzielenia odpowiadających im danych trójwymiarowych na trójwymiarowe segmenty. Jednocześnie tworzona jest macierz mapująca

rozmiary segmentów i ich położenia w oryginalnych zestawach danych. W kolejnym kroku generowana jest macierz mapująca skorygowane położenia fragmentów. Procedura rozpoczyna się od znalezienia dwóch największych i najbardziej pokrywających się fragmentów pochodzących z dwóch różnych zestawów danych. Na podstawie korelacji uzyskuje się informację o ich wzajemnym położeniu i uśrednia się je w celu uzyskania obrazu odniesienia dla kolejnego fragmentu. „Kolejny fragment” jest największym i najbardziej pokrywającym się z obrazem odniesienia spośród wszystkich pozostałych fragmentów. Na podstawie korelacji uzyskuje się informację o jego położeniu względem dwóch poprzednich fragmentów. Procedurę powtarza się do momentu wyczerpania wszystkich fragmentów. Jej wynikiem jest macierz mapująca skorygowane wzajemne położenia fragmentów obrazów *en face* naczyń siatkówki. W kolejnym kroku wykorzystuje się ją do selekcji trójwymiarowych segmentów i ich właściwego wzajemnego umiejscowienia w kierunku poziomym. Skorygowane pod względem położenia w kierunku poziomym trójwymiarowe segmenty koreluje się w kierunku osiowym, w celu znalezienia ich prawidłowej lokalizacji głębokościowej. W ostatnim kroku umieszczone w skorygowanych pozycjach (poziomych i osiowych) segmenty są uśredniane. Wynikiem jest pojedynczy trójwymiarowy zestaw uśrednionych danych, który może być wykorzystany do dalszych analiz jakościowych lub ilościowych. W moich projektach uśrednione dane objętościowe OCT wykorzystywałam do poprawy wizualizacji naczyń krwionośnych siatkówki oraz naczyń włosowatych błony naczyniowej. Posłużyły one do segmentacji sieci naczyniowej siatkówki do poziomu naczyń włosowatych i generacji ich modelu szkieletowego (Rys.7.).

#### 4.6. PODSUMOWANIE

W moim autoreferacie przedstawiłam ciąg prac mających na celu opracowanie metod szybkiego, przyżyciowego obrazowania dna oka ludzkiego z wykorzystaniem technik tomografii optycznej OCT. Wynikiem ich realizacji były cztery generacje urządzeń OCT, które wykorzystywałam do obrazowania morfologii tkanek siatkówki oraz sieci naczyniowej dna oka. Układy pierwszej generacji (spektralnej tomografii OCT z szybkością obrazowania 25 000 A-skanów/s) pozwoliły na obrazowanie morfologii tkanek siatkówki i opracowanie metod wizualizacji danych trójwymiarowych ułatwiających ocenę zmian chorobowych. Układy drugiej generacji (spektralnej tomografii OCT z szybkością obrazowania 100 000 – 300 000 A-skanów/s) umożliwiły poprawę jakości uzyskiwanych obrazów i wizualizację szczegółów morfologii siatkówki do poziomu pojedynczych komórek fotoreceptorowych w obszarach peryferyjnych plamki żółtej oczu zdrowych ochotników, bez konieczności stosowania technik optyki adaptacyjnej. Co jednak ważniejsze, pozwoliły na obserwację procesów dynamicznych: śledzenie trójwymiarowych ruchów oka, rejestrację zmian sygnału OCT wywołanych przepływem krwi, pomiar osiowej wartości prędkości przepływu krwi w naczyniach siatkówki oka. Układy trzeciej generacji (OCT z wykorzystaniem laserów strojonych, z szybkością obrazowania 100 000 A-skanów/s) pozwoliły na zwiększenie głębokości obrazowania, trójwymiarową wizualizację naczyń siatkówkowych i detekcję sygnału angiograficznego OCT z warstwy naczyń włosowatych błony naczyniowej oka. Układ czwartej generacji (OCT z wykorzystaniem laserów strojonych FDML, z szybkością obrazowania 1 700 000 A-skanów/s) pozwolił na osiągnięcie przełomu w obrazowaniu błony naczyniowej oka. Po raz pierwszy stało się możliwe obrazowanie angiograficzne OCT naczyń warstw Sattlera i Hallera oraz obrazowanie struktury sieci naczyń włosowatych (*choriocapillaris*) i zaproponowanie ich analizy morfometrycznej. Stał się również możliwy pomiar osiowej wartości prędkości przepływu w wybranych naczyniach błony naczyniowej w reżimie wolnych przepływów



(wartości osiowe przepływu rzędu ułamków mm/s) oraz w głębokich naczyniach zasilających naczyniówkę, w reżimie przepływów szybkich (wartości osiowe przepływu powyżej 50 mm/s).

Moje prace obejmowały wszystkie etapy procesu badawczego: wybór tematyki i metodyki prowadzenia prac badawczych, planowanie i projektowanie eksperymentów, projektowanie i konstrukcję układów pomiarowych, przeprowadzanie eksperymentów (włączając obrazowanie pacjentów w klinikach okulistycznych), opracowywanie metod analizy danych oraz ich implementację numeryczną.

Wynikiem moich prac były wystąpienia konferencyjne oraz publikacje w międzynarodowych czasopismach naukowych, prototypowe urządzenia OCT wykorzystywane do badań pacjentów w klinikach, w których odbywałam staże naukowe oraz komercjalizacja badań naukowych [III.A.1-4].

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

### 5.1. PROJEKTY DOTYCZĄCE ROZWOJU METOD OBRAZOWANIA OCT DO ZASTOSOWAN OKULISTYCZNYCH

#### 5.1.1 Zastosowanie metod aktywnego śledzenia ruchów oka do obrazowania strukturalnego i angiograficznego OCT [II.B.5, II.H.26, II.H.29].

Poprawa szybkości obrazowania OCT jest kluczowym elementem umożliwiającym przyżyciowe badanie morfologii dna oka do poziomu pojedynczych komórek fotoreceptorowych oraz badanie procesów dynamicznych zachodzących w jego tkankach. Jednak jak opisano w głównej części autoreferatu, zwiększenie szybkości obrazowania nie eliminuje artefaktów obrazowania związanych z ruchem. Jedną z metod ich redukcji jest zastosowanie technik śledzenia i kompensacji ruchów oka w czasie rzeczywistym. Jej zastosowanie wymaga budowy urządzenia zapewniającego szybkie obrazowanie dna oka, automatyczną detekcję kierunku i wielkości ruchu oraz umożliwiającego sprzężenie zwrotne, tj. zastosowanie mierzonych wektorów ruchu do kompensacji ruchów oka. W moich pracach, do śledzenia ruchów oka wykorzystywałam urządzenie TSLO (ang. *tracking laser scanning ophthalmoscope*) zaprojektowane w Roorda Lab, University of California, Berkley, USA [113, 114, 123] i skonstruowane w VSRI, University of California, Davis. Urządzenie to było sprzężone optycznie i elektronicznie z układem obrazowania OCT z laserem strojonym (repetycja A-skanów: 100 kHz). Kompensacja ruchów oka była realizowana przez zastosowanie sygnałów sterujących, generowanych przez układ śledzenia TSLO do korekcji odchylenia skanerów optycznych układu OCT. Celem projektu była próba zastosowania metod aktywnej kompensacji ruchów oka do obrazowania angiograficznego OCT. W pracy tej pokazałam, że mimo poprawy jakości obrazowania strukturalnego, zastosowanie metod aktywnej kompensacji ruchów wprowadza istotne trudności w obrazowaniu angiograficznym OCT. Obarczona nawet małymi błędami kompensacja odchylenia skanerów optycznych w trakcie obrazowania OCTA prowadzi do generacji dodatkowych artefaktów dekorelacyjnych. Skutkuje to nie poprawą, a pogorszeniem jakości uzyskiwanych obrazów angiograficznych OCT. Głównym wynikiem tej pracy było rozpoznanie konieczności opracowania nowych metod aktywnego śledzenia ruchów oka w obrazowaniu OCT, w którym istotne jest zapewnienie niskiego szumu fazowego. Moją rolą w tym projekcie było planowanie, wykonanie eksperymentów, opracowanie i implementacja metod analizy danych angiograficznych OCT oraz analiza danych.

#### 5.1.2. Wykorzystanie technik optyki adaptatywnej do badania morfologii warstwy fotoreceptorowej w obrazowaniu OCT [II.A.28, II.H.27].

Poprzeczna rozdzielczość obrazowania w okulistycznych zastosowaniach techniki OCT jest określona przez aperturę numeryczną układu optycznego, którego częścią jest aparat optyczny oka.

Jak wiadomo z podstaw obrazowania optycznego, im wyższa jest apertura numeryczna, tym lepszą można osiągnąć rozdzielczość obrazowania. W obrazowaniu dna oka zwiększenie apertury numerycznej może być osiągnięte poprzez zwiększenie średnicy wiązki światła padającego na rogówkę (maksymalny rozmiar plamki światła jest zadany przez średnicę źrenicy oka po jej rozszerzeniu z zastosowaniem środków farmakologicznych). Jednak zastosowanie wiązek światła o średnicach plamki powyżej ~3 mm nie prowadzi to do poprawy rozdzielczości poprzecznej obrazowania ze względu na aberracje układu optycznego oka. Standardowe układy OCT obrazowania oka mogą osiągnąć poprzeczną zdolność rozdzielczą ~7- 10 $\mu$ m, w zależności od aberracji badanego oka. Osiągnięcie wyższych rozdzielczości wymaga zastosowania technik optyki adaptatywnej (ang. *adaptive optics* - AO). Podczas stażu naukowego w VSRI, UC Davis brałam udział w projekcie obrazowania OCT warstwy komórek fotoreceptorowych siatkówki z korekcją aberracji oka w czasie rzeczywistym [124]. W technice tej do analizy aberracji (do analizy frontu falowego) wykorzystuje się detektor Shacka-Hartmana. Korekcji aberracji dokonuje się z wykorzystaniem zwierciadeł deformowalnych, sprzężonych optycznie i elektronicznie z detektorem frontu falowego. Celem projektu była analiza morfologii warstwy komórek fotoreceptorowych w oczach zdrowych ochotników oraz jej zmian w rozwoju chorób degeneracyjnych siatkówki (głównie starczego zwyrodnienia plamki żółtej). W szczególności, celem było zaproponowanie analizy morfometrycznej pojedynczych komórek fotoreceptorowych oraz identyfikacja źródeł sygnału OCT dającego wkład do czterech pasm rozproszenia światła widocznych na obrazach OCT w obrębie warstwy komórek fotoreceptorowych i nabłonka barwnikowego. Moją rolą w projekcie było rozwiązywanie problemów technicznych związanych z układem obrazowania, projektowanie metod pomiarowych i wykonywanie pomiarów.

5.1.3. Wykorzystanie techniki spektralnej tomografii OCT do obrazowania komory przedniej oka [II.A.10, II.A.19, II.A.20, II.B.23, II.B.26].

Zastosowania okulistyczne tomografii OCT obejmują nie tylko obrazowanie dna oka, ale również jego komory przedniej. W tym przypadku wyzwaniem było opracowanie metod eksperymentalnych, które powinny umożliwić pomiary o szerokim polu widzenia (kilkanaście milimetrów) i dużej głębokości obrazowania (kilka milimetrów). Po raz kolejny, osiągnięcie szerokiego pola obrazowania wymagało osiągnięcia wysokich szybkości obrazowania (~100 000 A-skanów/s lub wyższych). Zwiększenie głębokości obrazowania wymagało zaprojektowania spektrometrów o wysokich rozdzielczościach widmowych, pozwalających na rejestrację widmowych prążków interferencyjnych o wysokich częstościach. Mój udział w tych badaniach polegał na projektowaniu i konstrukcji układów obrazowania OCT, prowadzeniu pomiarów oraz analizie danych. Skonstruowane układy pomiarowe oraz opracowane metody eksperymentalne były wykorzystane do badania szeregu patologii komory przedniej oka oraz do analizy dopasowania soczewek kontaktowych, prowadzonych w klinikach okulistycznych, w których odbywałam staże naukowe.

## 5.2. ROZWOJU METOD OBRAZOWANIA OCT DO ZASTOSOWAŃ MIKROSKOPOWYCH

5.2.1. Obrazowanie układu naczyniowego mózgowi gryzoni oraz badanie sprzężenia naczyniowo – nerwowego w modelu zwierzęcym z wykorzystaniem mikroskopii OCT [II.A.1, II.A.3-5, II.A.9].

Jednym z możliwych zastosowań technik OCT jest przyżyciowe obrazowanie układu naczyń krwionośnych mózgowi gryzoni poddanych anestezji. Badania tego typu mają na celu m.in. lepsze zrozumienie procesów regulacji cyrkulacji krwi, zmian utlenowania, czy też sprzężenia naczyniowo-nerwowego w mózgu wykazującym normalną aktywność, jak również poddanego czynnikom zaburzającym normalną aktywność (np. udary). Technika OCT może dostarczyć szeregu informacji na temat procesów

zachodzących w korze mózgowej. Zastosowanie technik angiografii OCT pozwala na mapowanie przepływu krwi w sieci naczyniowej kory mózgowej, jak również jego zaniku wywołanego urazami. Dopplerowska tomografia OCT dostarcza informacji ilościowej o przepływie krwi i jego zmianach. Analiza widma światła rozproszonego w wybranych naczyniach krwionośnych pozwala na tzw. analizę spektroskopową OCT, co z kolei może pozwolić na pomiar stężenia hemoglobiny lub pomiar utlenowania krwi.

Podczas stażu podoktorskiego brałam udział w projekcie dotyczącym badania sprzężenia naczyniowo-nerwowego w korze mózgowej gryzoni. Projekt był wykonywany we współpracy z Photon Migration Laboratory, Martinos Center for Biomedical Imaging, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. Mój udział polegał na projektowaniu i konstrukcji układu pomiarowego do badań mikroskopowych OCT, z możliwością połączenia z układem mikroskopii dwufotonowej. Podczas mojego zatrudnienia w Instytucie Fizyki UMK, byłam zaangażowana w wykonanie projektu dotyczącego obrazowania sieci naczyniowej kory mózgowej gryzoni oraz jej zmian wywołanych udarami. Mój udział polegał na zaprojektowaniu i konstrukcji jednego z urządzeń mikroskopowej tomografii OCT wykorzystywanego do badań, jak również na planowaniu i konsultacji wykonywanych eksperymentów.

#### 5.2.2. Analiza elementów morfotycznych krwi z wykorzystaniem Dopplerowskiej tomografii OCT [II.B.12, III.A.1]

Jednym z efektów związanych z przepływem krwi w sieciach naczyniowych zlokalizowanych w obrębie silnie rozpraszających światło tkanek są tzw. projekcje przepływu. Światło propagujące się przez naczynia krwionośne ulega częściowemu rozproszeniu w przód na przemieszczających się komórkach krwi. Powoduje to zmiany w czasie zespolonej amplitudy sygnału OCT i w przypadku technik angiograficznych tomografii OCT lub technik Dopplerowskiej tomografii OCT manifestuje się fałszywym sygnałem przepływowym obserwowanym w tkankach rozpraszających światło poniżej naczyń krwionośnych (projekcja przepływu krwi w stacjonarnych tkankach) [125]. Ze względu na losowy charakter przepływu elementów morfotycznych krwi jak również losowy charakter rozproszenia światła w tkankach, projekcje przepływów mają losowy rozkład amplitudy zespolonej w poprzek oraz w głąb obrazowanego obiektu. Przy czym ich właściwości statystyczne (np. średnie odchylenie standardowe, średnie rozmiary plamek pola plamkowego, rozkład fazy w poprzek obiektu) zależą od właściwości rozpraszających komórek krwi i różnią się w zależności od typu komórek na których zachodzi rozproszenie światła. Ta obserwacja była podstawą rozwoju projektu dotyczącego opracowania metod identyfikacji wybranych elementów morfotycznych krwi (erytrocytów i leukocytów) na podstawie analizy statystycznej generowanych przez nie projekcji przepływowych.

Nad projektem tym pracowałam w ramach współpracy przemysłowej na podstawie umowy zawartej 02.04.2012, między spółką „spin-off” AM2M sp. z o.o. sp. k., której jestem współzałożycielem oraz spółką publiczną PZ CORMAY S.A. Moją funkcją było współkierownictwo projektem. Moja rola polegała na planowaniu eksperymentów, interpretacji wyników, opracowywaniu metod analizy danych, konsultacjach dotyczących przeprowadzania eksperymentów.

#### 5.2.3. Badanie aktywności tkanek nerwowych w modelu owadzie z wykorzystaniem mikroskopii OCT [II.B.7, II.B.9].

W fourierowskiej tomografii optycznej OCT informacje o badanym obiekcie uzyskuje się przez analizę zarejestrowanego widmowego sygnału interferencyjnego. W standardowym obrazowaniu strukturalnym OCT, informacja o wewnętrznej budowie obiektu jest zawarta w zmianach natężenia światła rozproszonego na kolejnych jego warstwach. W widmowym sygnale interferencyjnym zmiany te są zakodowane w postaci widzialności (głębokości modulacji) prążków interferencyjnych. Technika OCT

pozwała jednak nie tylko na obrazowanie przyżyciowe morfologii tkanek, ale również może pozwolić na badanie ich czynności. Informacje o funkcjonowaniu tkanek uzyskuje się poprzez analizę zmian sygnału OCT spowodowanych zmianami ich struktury lub właściwości optycznych, wywołanych zachodzącymi w tkankach procesami fizjologicznymi. W szczególności, aktywność tkanek nerwowych powoduje przemieszczanie cząsteczek wody i jonów biorących udział w propagacji potencjałów czynnościowych, co może powodować zmiany objętości komórek oraz zmiany współczynnika załamania światła. W wyniku rozproszenia światła na aktywnych komórkach nerwowych może dochodzić do zmian natężenia światła rejestrowanego w badaniu OCT, subtelnym zmian częstości prążków interferencyjnych widocznych jako zmiany fazy sygnału interferencyjnego lub zmian polaryzacji światła.

Opracowanie metod badania aktywności tkanek było jednym z celów kierowanego przeze mnie projektu zatytułowanego: „Rozwój metod badania aktywności tkanek nerwowych za pomocą tomografii optycznej OCT z detekcją fourierowską”. Projekt ten miał na celu badanie wpływu aktywności komórek nerwowych w modelu owadzie na rejestrowany sygnał OCT. Obiektem badań były wyizolowane łańcuszki nerwowe karaczanów amerykańskich. Wynikiem realizacji projektu była budowa urządzenia mikroskopii optycznej OCT do badań strukturalnych i czynnościowych w żywych tkankach biologicznych, demonstracja możliwości obrazowania OCM na poziomie komórkowym w konektywach łańcuszka nerwowego karaczana, opracowanie metod eksperymentalnych i metod analizy danych OCM pozwalających na detekcję aktywności nerwowej w konektywach łańcuszka nerwowego karaczana amerykańskiego, w korelacji z badaniami elektrofizjologicznymi. Projekt realizowałam we współpracy z Zakładem Biofizyki, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Moją rolą było uzyskanie środków finansowych na badania, kierownictwo projektem badawczym, projekt i konstrukcja układów pomiarowych, projektowanie i przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie metod analizy danych.

### 5.3. ZASTOSOWANIE METOD OBRAZOWANIA OCT DO BADAŃ KONSERWATORSKICH ZABYTKÓW [II.A.17, II.B.21, II.B.22].

Głównym obszarem zastosowania technik obrazowania OCT są badania biomedyczne. Jednak mogą być one również z powodzeniem zastosowane do badań materiałowych. W szczególności mogą być wykorzystywane do obrazowania obiektów zabytkowych, wspomagającego prace konserwatorskie lub badania historyczne dzieł sztuki. Podobnie jak w badaniach biomedycznych, w badaniach konserwatorskich wymagana jest bezinwazyjność i możliwość analizy warstw położonych w głębi obiektów. Jednak metody pomiarowe, w szczególności zakres widmowy światła stosowanego do obrazowania, muszą być dostosowane do znacznie szerszego zakresu właściwości optycznych materiałów stosowanych w procesie tworzenia dzieł sztuki.

W mojej pracy badawczej brałam udział w projekcie obrazowania OCT obrazów renesansowych na płótnie oraz panelach drewnianych [II.A.17]. Do badań wykorzystywany był układ OCT z laserem strojonym FDML, emitującym światło o centralnej długości fali 1300 nm, dostosowany do obrazowania obrazów umieszczony na sztalugach. Celem badań była analiza rysunków wstępnych zlokalizowanych pod warstwą werniksu i warstwami malarskimi oraz analiza profilometryczna złoceń w malarstwie panelowym. Nad projektem pracowałam podczas stażu podoktorskiego. Był on realizowany we współpracy z Harvard University Art Museums, Harvard University, Cambridge, MA, USA. Moja rola w projekcie polegała na prowadzeniu pomiarów oraz opracowaniu i zastosowaniu metod analizy danych pomiarowych.

  
Podpis wnioskodawcy

## 6. LITERATURA

### Legenda:

- I.B. – publikacje wybrane do prezentacji osiągnięcia naukowego,
- II.A. – pozostałe prace z autorstwem, opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC),
- II.B. – prace z autorstwem, opublikowane w czasopismach nie znajdujących się w bazie JRC,
- II.H. – referaty wygłoszone na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych,
- III.A. – komercjalizacja badań naukowych.

Lista powyższych prac została podana w załączniku 4 do wniosku habilitacyjnego.

### Pozostałe prace cytowane w autoreferacie.

1. D. Huang, et al., *Science* **254**(5035), 1178-1181 (1991).
2. A. F. Fercher, et al., *American journal of ophthalmology* **116**(1), 113-114 (1993).
3. E. A. Swanson, et al., *Opt Lett* **18**(21), 1864-1866 (1993).
4. J. Fujimoto, et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **57**(9), OCT1-OCT13 (2016).
5. K. Bizheva, et al., *PNAS* **103**(13), 5066-5071 (2006).
6. V. J. Srinivasan, et al., *Optics Letters* **31**(15), 2308-2310 (2006).
7. V. J. Srinivasan, et al., *Optics Express* **17**(5), 3861-3877 (2009).
8. R. S. Jonnal, et al., *Optics Express* **18**(5), 5257-5270 (2010).
9. T. Schmoll, et al., *J. Biomed. Opt.* **15**(4), 041513-041513-041518 (2010).
10. M. Pircher, et al., *Biomedical Optics Express* **2**(1), 100-112 (2011).
11. R. S. Jonnal, et al., *Biomedical Optics Express* **3**(1), 104-124 (2012).
12. E. Wei, et al., *Plos One* **8**(12), e81343 (2013).
13. H. Spahr, et al., *Optics Letters* **40**(20), 4771-4774 (2015).
14. M. M. Teussink, et al., *Biomedical Optics Express* **6**(5), 1632-1647 (2015).
15. D. Hillmann, et al., *PNAS* **113**(46), 13138-13143 (2016).
16. O. P. Kocaoglu, et al., *Biomedical Optics Express* **7**(11), 4554-4568 (2016).
17. S. Yazdanfar, et al., *Optics Letters* **25**(19), 1448-1450 (2000).
18. R. A. Leitgeb, et al., *Optics Express* **11**(23), 3116-3121 (2003).
19. B. R. White, et al., *Optics Express* **11**(25), 3490-3497 (2003).
20. L. Wang, et al., *Opt. Comm.* **242**(4-6), 345-350 (2004).
21. A. H. Bachmann, et al., *Opt. Express* **15**(2), 408-422 (2007).
22. Y. Wang, et al., *J. Biomed. Opt.* **12**(4), 041215-041215-041218 (2007).
23. A. Szkulmowska, et al., *Opt. Lett.* **33**(13), 1425-1427 (2008).
24. M. Szkulmowski, et al., *Opt. Express* **16**(9), 6008-6025 (2008).
25. Y. Wang, et al., *J. Biomed. Opt.* **13**(6), 064003-064003-064009 (2008).
26. T. Schmoll, et al., *Optics Express* **17**(5), 4166-4176 (2009).
27. A. Szkulmowska, et al., *Opt. Express* **17**(13), 10584-10598 (2009).
28. Y. K. Tao, et al., *Optics Express* **17**(5), 4177-4188 (2009).
29. B. Baumann, et al., *Biomedical Optics Express* **2**(6), 1539-1552 (2011).
30. B. Braaf, et al., *Opt. Express* **19**(21), 20886-20903 (2011).
31. H. C. Hendargo, et al., *Biomed. Opt. Express* **2**(8), 2175-2188 (2011).
32. W. Choi, et al., *Biomedical Optics Express* **3**(5), 1047-1061 (2012).
33. M. Miura, et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **53**(11), 7137-7141 (2012).
34. V. Doblhoff-Dier, et al., *Biomedical Optics Express* **5**(2), 630-642 (2014).
35. R. Haindl, et al., *Biomedical Optics Express* **7**(2), 287-301 (2016).
36. R. Leitgeb, et al., in *Conference on Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications V*, V. Tuchin, ed. (San Jose, Ca, 2001), pp. 123-127.
37. D. J. Faber, et al., *Optics Letters* **28**(16), 1436-1438 (2003).
38. C. Xu, et al., *Appl. Opt.* **44**(10), 1813-1822 (2005).
39. F. Robles, et al., *Optics Express* **17**(8), 6799-6812 (2009).
40. S. Chen, et al., *Biomedical Optics Express* **6**(8), 2840-2853 (2015).
41. J. Yi, et al., *Light Sci Appl* **4**e334 (2015).
42. C. W. Merkle, et al., *Biomedical Optics Express* **7**(10), 4289-4312 (2016).
43. S. Chen, et al., *Biomedical Optics Express* **8**(3), 1415-1429 (2017).
44. D. Koozekanani, et al., *IEEE Transactions on Medical Imaging* **20**(9), 900-916 (2001).
45. D. Cabrera Fernández, et al., *Optics Express* **13**(25), 10200-10216 (2005).
46. H. Ishikawa, et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**(6), 2012-2017 (2005).
47. M. Mujat, et al., *Optics Express* **13**(23), 9480-9491 (2005).

48. M. Szkulmowski, et al., *J. Biomed. Opt.* **12**(4), 041207-041207-041211 (2007).
49. T. Fabritius, et al., *Optics Express* **17**(18), 15659-15669 (2009).
50. M. K. Garvin, et al., *IEEE Transactions on Medical Imaging* **28**(9), 1436-1447 (2009).
51. A. Mishra, et al., *Optics Express* **17**(26), 23719-23728 (2009).
52. S. J. Chiu, et al., *Optics Express* **18**(18), 19413-19428 (2010).
53. M. A. Mayer, et al., *Biomedical Optics Express* **1**(5), 1358-1383 (2010).
54. H. Zhu, et al., *Optics Express* **18**(24), 24595-24610 (2010).
55. A. S. G. Singh, et al., *Biomedical Optics Express* **2**(5), 1328-1339 (2011).
56. K. A. Vermeer, et al., *Biomedical Optics Express* **2**(6), 1743-1756 (2011).
57. L. Duan, et al., *Optics Express* **20**(3), 3353-3366 (2012).
58. T. Torzicky, et al., *Optics Express* **20**(7), 7564-7574 (2012).
59. V. Kajic, et al., *Biomed. Opt. Express* **4**(1), 134-150 (2013).
60. A. Lang, et al., *Biomedical Optics Express* **4**(7), 1133-1152 (2013).
61. A. Carass, et al., *Biomedical Optics Express* **5**(4), 1062-1074 (2014).
62. D. Kaba, et al., *Optics Express* **23**(6), 7366-7384 (2015).
63. Z. Chu, et al., *J. Biomed. Opt.* **21**(6), 066008-066008 (2016).
64. S. B. Ploner, et al., *Retina* **36** Suppl 1S118-S126 (2016).
65. K. Kurokawa, et al., *Biomedical Optics Express* **8**(3), 1803-1822 (2017).
66. S. Makita, et al., *Opt. Express* **14**(17), 7821-7840 (2006).
67. R. K. Wang, et al., *Opt. Express* **15**(7), 4083-4097 (2007).
68. L. An, et al., *Opt. Express* **16**(15), 11438-11452 (2008).
69. A. Mariampillai, et al., *Opt. Lett.* **33**(13), 1530-1532 (2008).
70. J. Fingler, et al., *Opt. Express* **17**(24), 22190-22200 (2009).
71. L. An, et al., *J. Biomed. Opt.* **15**(2), 026011-026011-026019 (2010).
72. A. Mariampillai, et al., *Opt. Lett.* **35**(8), 1257-1259 (2010).
73. R. K. Wang, et al., *Opt. Lett.* **35**(9), 1467-1469 (2010).
74. L. Yu, et al., *J. Biomed. Opt.* **15**(1), 016029-016029-016024 (2010).
75. C. Blatter, et al., *J. Biomed. Opt.* **17**(7), 070505 (2012).
76. B. Braaf, et al., *Opt. Express* **20**(18), 20516-20534 (2012).
77. Y. L. Jia, et al., *Opt. Express* **20**(4), 4710-4725 (2012).
78. K. Kurokawa, et al., *Opt. Express* **20**(20), 22796-22812 (2012).
79. W. Choi, et al., *Plos One* **8**(12), (2013).
80. D. Y. Kim, et al., *PNAS* **110**(35), 14354-14359 (2013).
81. M. S. Mahmud, et al., *J. Biomed. Opt.* **18**(5), 050901 (2013).
82. R. Poddar, et al., *J. Biomed. Opt.* **19**(12), 126010-126010 (2014).
83. D. M. Schwartz, et al., *Ophthalmology* **121**(1), 180-187 (2014).
84. N. Uribe-Patarroyo, et al., *Opt. Express* **22**(20), 24411-24429 (2014).
85. S. S. Gao, et al., *Opt. Lett.* **40**(10), 2305-2308 (2015).
86. A. Lozzi, et al., *Biomed. Opt. Express* **6**(7), 2435-2447 (2015).
87. D. Ruminski, et al., *Biomed. Opt. Express* **6**(8), 2738-2754 (2015).
88. A. Zhang, et al., *J. Biomed. Opt.* **20**(10), 100901-100901 (2015).
89. S. Makita, et al., *Biomedical Optics Express* **7**(4), 1525-1548 (2016).
90. A. F. Fercher, et al., *Opt Commun* **117**(1-2), 43-48 (1995).
91. G. Ha<sup>u</sup>usler, et al., *J. Biomed. Opt.* **3**(1), 21-31 (1998).
92. M. Wojtkowski, et al., *J. Biomed. Opt.* **7**(3), 457-463 (2002).
93. S. R. Chinn, et al., *Optics Letters* **22**(5), 340-342 (1997).
94. B. Golubovic, et al., *Optics Letters* **22**(22), 1704-1706 (1997).
95. F. Lexer, et al., *Appl. Opt.* **36**(25), 6548-6553 (1997).
96. Y. K. Tao, et al., *Opt. Express* **16**(16), 12350-12361 (2008).
97. J. A. Izatt, et al., *Optics Letters* **22**(18), 1439-1441 (1997).
98. T. G. van Leeuwen, et al., *Optics Letters* **24**(22), 1584-1586 (1999).
99. V. X. D. Yang, et al., *Opt Commun* **208**(4-6), 209-214 (2002).
100. S. Yazdanfar, et al., *Archives of Ophthalmology* **121**(2), 235-239 (2003).
101. J. Tokayer, et al., *Biomed. Opt. Express* **4**(10), 1909-1924 (2013).
102. W. J. Choi, et al., *Biomedical Optics Express* **7**(7), 2709-2728 (2016).
103. Y. Zhao, et al., *Optics Letters* **25**(18), 1358-1360 (2000).
104. H. Ren, et al., *Optics Letters* **27**(6), 409-411 (2002).
105. D. Piao, et al., *Optics Letters* **28**(13), 1120-1122 (2003).
106. S. G. Proskurin, et al., *Optics Letters* **28**(14), 1227-1229 (2003).

107. A. Bouwens, et al., *Optics Express* **21**(15), 17711-17729 (2013).
108. N. Uribe-Patarroyo, et al., *Physical Review E* **94**(2), 022604 (2016).
109. J. Fingler, et al., *Opt. Express* **15**(20), 12636-12653 (2007).
110. F. Jaillon, et al., *Opt. Express* **20**(1), 385-396 (2012).
111. R. D. Ferguson, et al., *Optics Letters* **29**(18), 2139-2141 (2004).
112. D. X. Hammer, et al., *J. Biomed. Opt.* **10**(2), 024038-02403811 (2005).
113. K. V. Vienola, et al., *Biomed. Opt. Express* **3**(11), 2950-2963 (2012).
114. B. Braaf, et al., *Biomed. Opt. Express* **4**(1), 51-65 (2013).
115. S. Ricco, et al., in *Medical image computing and computer-assisted intervention : MICCAI*(2009), pp. 100-107.
116. O. P. Kocaoglu, et al., *Biomedical Optics Express* **2**(4), 748-763 (2011).
117. M. F. Kraus, et al., *Biomed. Opt. Express* **3**(6), 1182-1199 (2012).
118. H. C. Hendargo, et al., *Biomed. Opt. Express* **4**(6), 803-821 (2013).
119. M. F. Kraus, et al., *Biomedical Optics Express* **5**(8), 2591-2613 (2014).
120. Y. Wang, et al., *Biomedical Optics Express* **6**(11), 4302-4316 (2015).
121. P. Zang, et al., *Biomedical Optics Express* **7**(7), 2823-2836 (2016).
122. M. Heisler, et al., *J. Biomed. Opt.* **22**(3), 036007-036007 (2017).
123. C. K. Sheehy, et al., *Biomed. Opt. Express* **3**(10), 2611-2622 (2012).
124. R. J. Zawadzki, et al., *Biomedical Optics Express* **2**(6), 1674-1686 (2011).
125. P. Ossowski, et al., *Opt. Express* **23**(21), 27724-27738 (2015).
126. W. S. Rasband, "ImageJ," (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2015).
127. J. Ahrens, et al., *ParaView: an end-user tool for large data visualization, visualization handbook* (Elsevier, 2005).

J. Gorczyńska

Podpis wnioskodawcy