

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

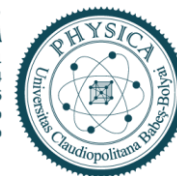
Taşnadi Teodora

2023



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY
TRADITIO ET EXCELLENTIA

FACULTATEA DE FIZICĂ
Str. Mihail Kogălniceanu nr.1
Cluj-Napoca, RO-400084
Tel: +4(0)264-405300 | FAX: +4(0)264-591906
secretariat.phys@ubbcluj.ro
www.phys.ubbcluj.ro



LUCRARE DE LICENȚĂ

DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR COLAGENULUI DIN PRODUSE COSMETICE CU AJUTORUL MICROSCOPULUI HIPERSPECTRAL

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

Tașnadi Teodora

Abstract

Introducere

Obiectivul principal al acestei lucrări a fost acela de a determina proprietățile colagenului din două produse cosmetice și anume, o cremă hidratantă și un ser de refacere. Diferențele dintre cele două probe au putut fi determinate și vizualizate atât optic, cu ajutorul microscopului îmbunătățit în câmp întunecat, cât și prin imaginile hiperspectrale obținute.

Colagenul este o proteină structurală din organism, reprezentând 25 % - 30 % din cantitatea totală de proteine. Acesta are efecte benefice asupra pielii, oferindu-i elasticitate și hidratare.

Materiale și metode

Am utilizat microscopul hiperspectral de la CytoViva îmbunătățit cu câmpul întunecat pentru a observa dacă există diferențe între cele două produse analizate și pentru a le observa caracteristicile. În cadrul experimentului, prima dată am obținut un set de date pentru cremă, iar apoi am obținut un set de date pentru ser, ambele urmând să fie analizate.

Pentru lucrare am folosit o cremă antirid de noapte MULTI-COLLAGEN și un ser de refacere cu colagen REVUELE. Pentru fiecare experiment, am pus un vârful de pipetă cu cremă respectiv 10 μL de ser pe lamele.

Rezultate

Optic, am observat o diferență destul de evidentă în numărul de particule apărute și mărimea acestora. În cremă particulele sunt mai puține, dar de dimensiuni mai mari, în timp ce în ser am descoperit mult mai multe particule, dar de dimensiuni reduse. În ambele cazuri este de preferabil să fie o încăpere cât mai întunecoasă pentru a analiza optic, în timp real cele două probe. Totuși, este de menționat că, particulele de colagen din cremă au fost mult mai ușor de găsit comparativ cu cele din ser.

Concluzie

Am demonstrat importanța utilizării imaginilor hiperspectrale pentru integrarea colagenului în produse cosmetice. Astfel, am oferit o explicație pentru ca această metodă să fie utilizată ca referință pentru a analiza proprietățile colagenului în produsele cosmetice.

Abstract

Background

The main objective of this paper was to determine the properties of collagen in two cosmetic products, a moisturizing cream and a replenishing serum. The differences between the two samples could be determined and visualized both optically, using dark-field enhanced microscopy, and through the hyperspectral images obtained.

Collagen is a structural protein in the body, accounting for 25 % - 30 % of the total protein. It has beneficial effects on the skin, giving it elasticity and hydration.

Material and methods

I used CytoViva's hyperspectral darkfield-enhanced microscope to see if there are differences between the two products analyzed and to observe their characteristics. In the experiment, I obtained a data set for the cream and then a data set for the serum, both of which were to be analysed.

For the paper I used a MULTI-COLLAGEN night anti-wrinkle cream and a REVUELE collagen replenishing serum. For each experiment, I put a pipette tip of cream respectively 10 μ L of serum on the slides.

Results

Optically, I noticed an obvious difference in the number of particles appearing and their size. In the cream, the particles are fewer but larger in size, while in the serum there are more particles but smaller in size. In both cases it is preferable to have a workplace as dark as possible in order to analyze more easily the two samples in real time. However, it is worth mentioning that the collagen particles from the cream were much easier to find compared to those from the serum.

Conclusion

I have demonstrated the importance of using hyperspectral imaging to integrate collagen into cosmetic products. Thus, we have provided an explanation for this method to be used as a reference to analyze the properties of collagen in cosmetic products.

Cuprins

Introducere	6
Capitolul 1. Imagistică hiperspectrală în câmp întunecat	7
1.1 Scurt istoric	7
1.2 Introducere	8
1.3 Imagistică hiperspectrală	9
1.4 Microscopia în câmp întunecat	10
1.5 Condensorul în câmp întunecat	11
1.6 Sistemul CytoViva	13
1.7 Componentele sistemului	13
1.8 Achiziția imaginilor hiperspectrale. Cubul de date tridimensional	14
Capitolul 2. Colagen	21
2.1 Prezentare generală	21
2.2 Tipuri de colagen	22
2.3 Proprietățile colagenului și rolul acestuia în corpul uman	24
2.4 Integrarea colagenului în produse cosmetice	25
Capitolul 3. Materiale și metode	28
3.1 Procurarea și pregătirea probelor	28
3.2 Achiziția datelor	29
3.3 Procesarea datelor	30
Capitolul 4. Rezultate și discuții	32
4.1 Procesarea imaginilor	33
4.2 Discuție	40
Concluzii	41
Bibliografie	43
Anexa 2. Declarație pe proprie răspundere	47

Introducere

Microscopul în câmp întunecat îmbunătățit cu spectrometru imagistic reprezintă o tehnologie relativ nouă, care a avansat continuu în ultimii ani. Aceasta metodă combină două abordări puternice, și anume microscopia în câmp întunecat și imagistica hiperspectrală, pentru a permite detectarea particulelor micro și nano în medii complexe.

Obiectivul acestei lucrări este acela de a detecta particule de colagen din componența unui ser de refacere pentru piele și a unei creme hidratante cu ajutorul acestei tehnici. Particulele de colagen sunt integrate în formularea produselor cosmetice deoarece ajută la refacerea pielii, conferă acesteia rezistență, elasticitate și capacitate de regenerare.

Capitolul 1 – începe cu un scurt istoric, după care sunt prezentate noțiuni introductive despre metoda inovativă care combină două abordări, și anume microscopia optică în câmp întunecat și imagistica hiperspectrală; este prezentat sistemul de lucru CytoViva și de asemenea, achiziția imaginilor hiperspectrale.

Capitolul 2 – începe cu o prezentare generală a colagenului, tipurile de colagen care există și tipurile de colagen care s-au folosit în această lucrare, sunt prezentate proprietățile colagenului și rolul colagenului în formularea produselor cosmetice.

Capitolul 3 – prezintă descrierea în detaliu a materialelor folosite și a metodei experimentale, aici intrând procurarea probelor și pregătirea acestora, parametrii de achiziție a datelor și programele de analiză și procesare a informațiilor aflate.

Capitolul 4 – prezintă rezultatele obținute în urma imaginilor atât optice cât și hiperspectrale achiziționate a particulelor de colagen din produsele cosmetice studiate. Finalizând cu o scurtă discuție despre tehnica inovatoare folosită care deși are niste limitări, prezintă totuși progrese semnificative în domeniu.

Determinarea proprietăților colagenului cu ajutorul microscopului hiperspectral

Microscopia hiperspectrală este rezultatul combinației dintre imagistica hiperspectrală, microscopia în câmp întunecat și un software de calculator, având scopul de a identifica cât mai rapid materialele la scala micro și nano. Această tehnică nu este utilizată doar pentru verificarea prezenței nanomaterialelor, ci și pentru localizarea acestora, identificarea și caracterizarea lor. [1]

1. Imagistica hiperspectrală în câmp întunecat

1.1 Scurt istoric

Termenul „imagini hiperspectrale” a fost menționat pentru prima dată de Goetz (1985) pentru a realiza o identificare directă a materialelor de suprafață sub formă de imagini. Un factor cheie în avansarea tehnologiei hiperspectrale a fost inventarea primului CCD sau a dispozitivului cuplat la sarcină în 1969 de George Smith și Willard Boyle

Apariția imaginilor hiperspectrale în anii 1980 a reprezentat un pas important în tehnologia de imagistică și analiză a datelor. (AIS) spectrometrul de imagistică aerospațial dezvoltat de Alexander Goetz împreună cu echipa sa de la Laboratorul de propulsie cu reacție (JPL) al NASA și Institutul de Tehnologie din California a fost una dintre primele inovații în acest domeniu.

În anul 1983, JPL a creat spectrometrul hiperspectral Airborne Visible/Infrared Imaging (AVIRIS) pentru a extinde capacitatea de măsurare a spectrometrelor de la sol în spațiul aerian, pe platforme aflate în mișcare. AVIRIS a înregistrat pentru prima dată imagini spectrale în anul 1987 și a fost primul spectrometru de imagistică, care a măsurat spectrul reflectat de la soare în intervalul de lungimi de undă cuprins între 400 nm – 2500 nm, cu intervale de 10 nm (Goetz, 1995).

După succesul obținut de acesta, au apărut numeroase îmbunătățiri în sistemele de senzori, calibrare și colectare a datelor, ceea ce a permis dezvoltarea altor instrumente multispectrale și hiperspectrale, atât pentru utilizarea la sol, cât și în aer, pe platforme aeriene. Aceste sisteme au deschis noi perspective în ceea ce privește analiza detaliată a compoziției și proprietăților obiectelor și mediului înconjurător, având aplicații în diferite domenii precum monitorizarea mediului, cartografierea terenurilor, detectarea resurselor naturale, monitorizarea culturilor agricole și multe altele.

Pentru început, imagistica hiperspectrală a fost dezvoltată pentru aplicații de teledetecție, dar apoi și-a găsit rolul în multe alte aplicații, cum ar fi geologie, farmaceutic, medical. [2]

1.2 Introducere

Deși există alte metode convenționale disponibile, detectarea și identificarea cât mai rapidă și non-distructivă a probelor nanodimensionate în organisme, țesuturi și celule reprezintă încă o provocare continuă în domeniul cercetării. Aceste abordări pentru imagistică și caracterizarea nanoparticulelor, cum ar fi microscopia cu sondă electronică, ne oferă o rezoluție excelentă și capacități foarte bune de analiză chimică. Cu toate acestea, imagistica și detectarea nanoparticulelor în situ, de exemplu în celule vii izolate, microorganisme, etc. folosind microscopia electronică, sunt foarte greu de realizat deoarece este nevoie de o pregătire elaborată a probelor care necesită fixare chimică, colorare de contrast, etc. [3]

Prin urmare, este necesară o abordare diferită care să permită imagistica și diferențierea particulelor la scară nanometrică din probe. Imagistica hiperspectrală combinată cu microscopia în câmp întunecat reprezintă o abordare optică inovatoare care combină două tehnologii diferite pentru a obține informații detaliate despre mostrele analizate.

Optica în câmp luminos este o tehnică de microscopie care se bazează pe iluminarea luminii transmise prin probă. Această metodă este ideală pentru obiectele care absorb lumina și se deosebesc pe un fundal neabsorbant. În optica în câmp luminos, din cauza luminii transmise există unele limitări. Această metodă poate fi utilă pentru vizualizarea generală a probelor, dar există limitări în ceea ce privește rezoluția optică, raportul semnal-zgomot și focalizare.

Dimpotrivă, microscopia în câmp întunecat ia în considerare doar lumina reflectată de probă, eliminând astfel zgomotul de fond. Principiul de bază al acestei metode este iluminarea indirectă a probei și, la interacțiunea lor, este colectată doar lumina reflectată sau imprastiată. Un disc de dimensiuni speciale blochează iluminarea, astfel încât numai razele oblice lovesc proba, permițând vizualizarea distinctă a obiectelor cu indici de refracție similari ca fundalul. Această caracteristică prezintă interes mai ales pentru examinarea probelor biologice fără substanțe de contrast. [3]

Imagistica hiperspectrală este o aplicație care se regăsește într-o varietate de domenii științifice și tehnologice, cum ar fi geștiinte, astronomie, agricultură, supraveghere. HSI combină informațiile spectrale și spațiale într-o singură măsurătoare, furnizând un cub de date hiperspectral care conține informații detaliate despre proprietățile spectrale și distribuția spațială a obiectelor. Combinația între metodologia de imagistică hiperspectrală și microscopia în câmp întunecat oferă avantaje semnificative în studiile optice la scară nanometrică. Microscopia în câmp întunecat permite vizualizarea obiectelor care absorb lumina într-un fundal întunecat iar prin adăugarea capacităților HSI, este posibilă obținerea de informații spectrale detaliate despre proba analizată. Deși cele două metode au fost utilizate separat de mulți ani, combinația acestor două tehnici într-o modalitate unică a apărut mai recent. [4]

1.3 Imagistica hiperspectrală

O definiție comună a imagisticii hiperspectrale este combinarea informațiilor spațiale măsurate de la distanță cu analiza spectrală, furnizând o imagine completă și detaliată a obiectelor analizate. Prin măsurarea simultană a caracteristicilor fizice și chimice, acest sistem oferă o perspectivă cuprinzătoare asupra obiectelor cu privire la formă, dimensiune, aspect, culoare și compoziție.

Este de menționat că imagistica hiperspectrală este o divizie din 3 clase de imagini spectrale, celelalte două fiind imagistica multispectrală și ultraspectrală. În toate cazurile, un set de imagini ale aceluiași obiect reprezintă o imagine spectrală iar diferențele sunt caracterizate de numărul de benzi și forma spectrului obținut.

Imagistica hiperspectrală diferă față de imagistica multispectrală prin rezoluția obținută și numărul de benzi. În cazul sistemului multispectral, numărul de benzi este foarte mic (în general mai puțin de 10 benzi) în timp ce sistemul hiperspectral este caracterizat de sute de benzi plasate la distanțe egale. Prin urmare, sistemul multispectral ne oferă un spectru real pentru fiecare pixel al imaginii, în timp ce, fiecare pixel din imaginea hiperspectrală are propriul spectru complet. În concluzie, cantitatea de date obținute din imaginea hiperspectrală ne oferă informații calitative despre compoziția chimică și fizică a imaginilor de interes. [2]

Principiul de bază pe care se bazează imagistica hiperspectrală este acela că, datorită compoziției chimice și a structurii fizice, toate materialele reflectă, absorb, impraștie și emit energie

electromagnetică la diferite lungimi de undă. Această însușire se intitulează semnătură spectrală sau pur și simplu spectru.

Semnatura spectrală a unui material reprezintă un set unic de valori a caror comportament de reflexie, absorbție sau transmisie este reprezentat în funcție de lungimea de undă. Aceasta este reprezentată sub forma de curbă și se numește semnătură spectrală a materialului analizat. Analizând semnătura spectrală a unui material, putem să obținem informații despre proprietățile fizice sau compoziția chimică. Caracteristicile spectrale pot indica prezența anumitor substanțe, de exemplu, absorbția specifică aflată la anumite lungimi de undă poate să indice prezența unui anumit compus chimic.

După ce datele hiperspectrale sunt procesate, se poate identifica locația caracteristicilor care au anumite semnături spectrale și apoi se poate cartografia distribuția spațială și gradientul atributelor specifice. [5]

1.4 Microscopia în câmp întunecat

Atât microscopia în câmp luminos, cât și microscopia în câmp întunecat folosesc lumina pentru a vedea o probă și pentru a o analiza, dar asemănările se opresc aici. Principiul de funcționare al acestora este foarte diferit. [9]

Microscopia în câmp luminos este cea mai simplă microscopie bazată pe transmisia luminii. Proba este iluminată de jos și observată de sus iar contrastul în eșantion este generat de absorbția luminii în zonele dense ale specimenului. [10] Tehnic vorbind, această tehnică este perfectă pentru vizualizarea specimenelor care absorb radiația luminoasă și apar pe un fundal întunecat, non-absorbant. Totuși, această metodă are și ea limitările ei, cum ar fi rezoluție optică scăzută, raport semnal-zgomot scăzut, claritatea imaginii. [5]

Pe de altă parte, microscopia în câmp întunecat profită de iluminarea oblică pentru a spori contrastul specimenelor care nu pot fi vizualizate în condiții normale de iluminare. Un disc opac este plasat între sursa de lumină și lentila condensoare; acesta are rolul de a bloca o parte din lumină, astfel formându-se un "con gol de lumină". Razele oblice de lumină care trec prin specimen sunt refractate, reflectate sau împrăștiate rezultând o imagine luminoasă a specimenului pe un fundal întunecat. [11]

În următoarea imagine se poate observa cu ușurință în figura din dreapta îmbunătățirea contrastului prin suprapunerea unui semnal strălucitor pe fundalul întunecat.

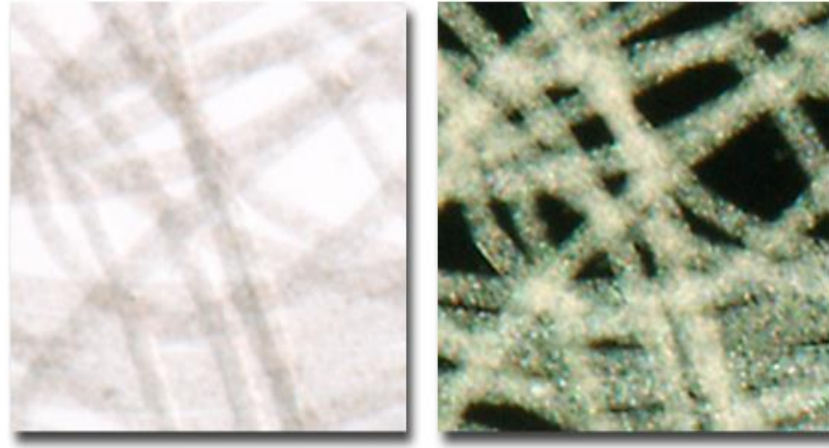


Fig. 1.1 Iluminare în câmp luminos (stânga) vs iluminare în câmp întunecat (dreapta) a unor fibre de nailon. [12]

1.5 Condensorul în câmp întunecat

Este cert că microscopia în câmp întunecat îmbunătățește limitele de detecție a imaginilor față de tehnicile utilizate standard. Din acest motiv, cu iluminatorul întunecat îmbunătățit (EDF) CytoViva a îmbunătățit performanța microscopiei în câmp întunecat. Pe scurt, optica îmbunătățită a câmpului întunecat de la CytoViva le permite oamenilor să vadă lucruri pe care nu le-au putut vedea până acum. Le permite oamenilor să observe la scală nanometrică rapid și ușor celule vii, țesuturi și matrici bazate pe materiale. În plus, celulele vii, nefluorescente și agenții patogeni pot fi observați cu ușurință la un nivel de detaliu care nu este posibil cu tehnicile normale de imagistică optică, de exemplu cum ar fi contrastul de fază sau contrastul de interferență diferențială. Cu această îmbunătățire, pot fi fotografiate până și nanomaterialele de 10 nm – 20 nm.

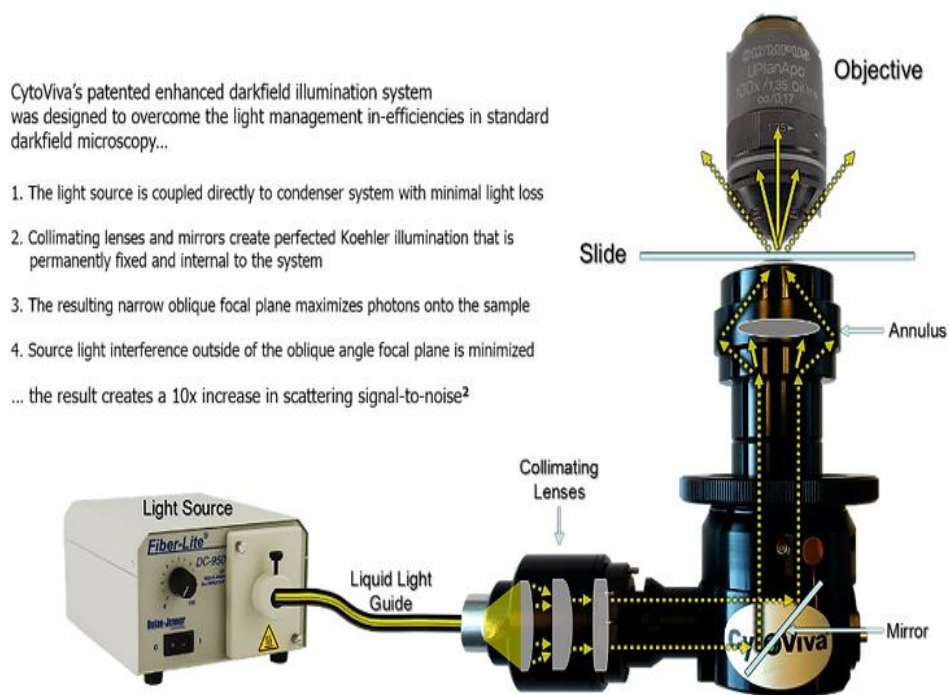


Fig. 1.2 Modul de funcționare a condensorului CytoViva [8]

Această îmbunătățire funcționează prin ghidajul luminii, adică cuplarea sursei de lumină direct la optica condensatorului de câmp întunecat. Lentilele și oglinzile speciale colimatoare fixează geometria luminii pentru a se potrivi cu cea a condensatorului. Se creează un unghi de lumină foarte îngust, oblic, care poate fi focalizat cu precizie asupra eșantionului. Rezultatul se poate observa în figura (b) de mai jos unde avem o împrăștiere intensă de la mostre pe un fundal întunecat. [8]

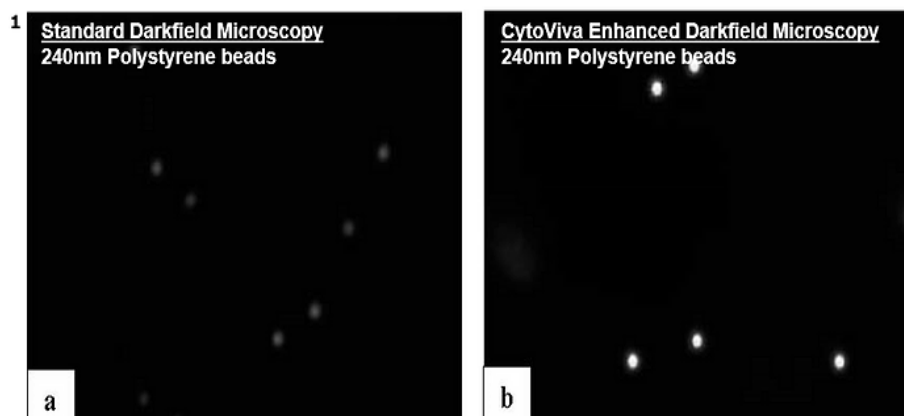


Fig. 1.3 (a) Microscopie în câmp întunecat standard; (b) Microscopie în câmp întunecat îmbunătățită [8]

1.6 Sistemul CytoViva

Tehnologia microscopului hiperspectral de la CytoViva îmbunătățită cu câmpul întunecat a fost special dezvoltată pentru caracterizarea spectrală și maparea spectrală a probelor la scală nanometrică. Cu ajutorul acestei tehnologii, se pot realiza măsurători de la scală micro, la scală macro.

Imaginile provenite de la microscopul hiperspectral sunt asemănătoare cu imaginile provenite de la un microscop optic tradițional, dar au o diferență importantă: fiecare pixel al unei imagini hiperspectrale oferă răspunsul spectral de reflectanță al zonei aceluși pixel. Acest lucru permite măsurători spectrale nedistructive ale probelor.

La o mărire de 100x, o imagine de microscop hiperspectral poate conține până la aproximativ 700.000 de pixeli, fiecare având o dimensiune de 128 nm. Aceste date sunt înregistrate la aproximativ 2 nm de rezoluție spectrală în domeniul VNIR, permițând măsurarea diferențelor spectrale minuscule de la pixel la pixel. Imaginile se pot achiziționa atât din probe biologice, cât și din probe nanometrice din materiale.

Prin intermediul sistemului de imagistică hiperspectrală de la CytoViva, este posibilă atât achiziționarea intervalelor la lungimi de undă în infraroșu apropiat (VNIR 400 nm – 1000 nm) cât și achiziționarea intervalelor în infraroșu în undă scurtă (SWIR 900 nm – 1700 nm). [6]

1.7 Componentele sistemului CytoViva

1. Sursă de lumină (de tip lampă cu halogen cu putere maximă de 150W. Emite radiație în domeniul electromagnetic de 400 nm - 2500 nm);
2. Ghidaj optic de transmitere a luminii;
3. Condensorul în câmp întunecat (se află sub masa motorizată);
4. Butoane de reglaj, reglaj fin;
5. Masă motorizată care se deplasează pe direcțiile x,y cu ajutorul joystick-ului de control;
6. Turelă rotativă, lentile obiectiv;
7. Cameră optică, care permite vizualizarea probei în timp real;

8. Spectrofotometru cu grilă de transmisie în intervalul 400-1000 nm;

9. Pe computer rulăm programul de vizualizare și analiza a imaginilor (ENVI 4.8).



Fig. 1.4 Componentele sistemului CytoViva – microscopul hiperspectral în câmp întunecat.

Iluminarea întunecată îmbunătățită CitoViva permite observarea rapidă și ușoară a probelor la scală nanometrică într-o gamă de mostre în starea lor nativă, fără a utiliza etichete sau alți markeri.

Această tehnică îmbunătățită a deschis noi posibilități, permițându-le cercetătorilor să vizualizeze nano construcții într-o varietate de matrici de probă translucidă cu claritate îmbunătățită. [7]

1.8 Achiziția imaginilor hiperspectrale. Cubul de date tridimensional.

Termenul de “imagistică hiperspectrală” a fost folosit pentru prima dată pentru aplicații de teledetecție (observarea unei ținte de către un dispozitiv fără contact). Abia la sfârșitul anilor 1990 această tehnologie a devenit disponibilă pentru alte aplicații (alimentație, agricultură, produse farmaceutice, arheologie, medicină, etc), când a fost aplicată în asociere cu spectroscopia NIR.

După cum știm, în spectroscopia NIR spectrele colectate sunt mediate pentru a furniza un singur spectru iar astfel se pierd informații importante referitoare la specimen.

Datorită dezvoltării imagisticii hiperspectrale NIR (care este o combinație între spectroscopia NIR și imagistica digitală) se pot obține simultan informații spațiale și spectrale. [7]

Analiza suprafeței unui eșantion în imagistica hiperspectrală poate fi realizată prin scanarea hiperspectrală pushbroom „prin măturare”, care implică deplasarea unei lamele sau a platformei motorizate în trepte mici de-a lungul unei direcții spațiale (de exemplu direcția x). Această mișcare aduce zonele adiacente ale probei în poziția reticulului, unde se înregistrează imaginea spectrală. În timpul acestui proces de scanare, se înregistrează o imagine digitală pentru fiecare linie scanată, în care sunt înregistrate spectrele punctelor de-a lungul direcției deplasării. Prin repetarea acestui proces pe suprafața eșantionului, se obțin spectrele dintr-o zonă bidimensională a specimenului. Această abordare de scanare permite capturarea imaginii complete a eșantionului și a spectrului corespunzător fiecărui pixel al imaginii. Acest lucru rezultă în obținerea unui cub de date spectral, în care avem două dimensiuni spațiale și una spectrală. [13]

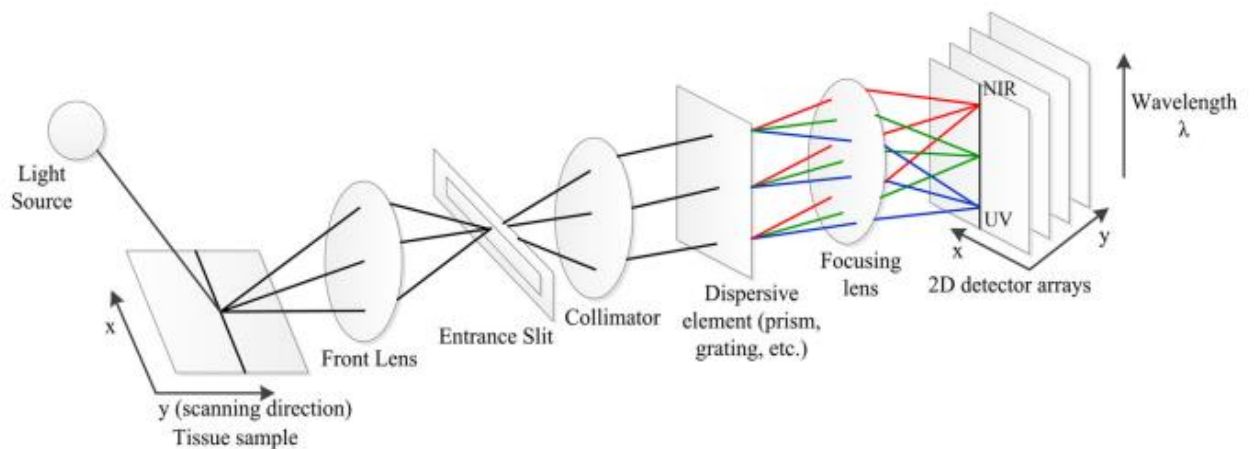


Fig. 1.5 Diagrama schematică a unui sistem de tip pushbroom [17]

La finalul scanării, cubul de date va fi format din sute de linii. (**Fig. 1.6**) Când scanarea este gata, programul deschide automat cubul de date hiperspectral, care prin definiție este o recreație RGB (roșu, verde, albastru). Această recreație se bazează pe intensitatea spectrală provenită din fiecare pixel. [13]

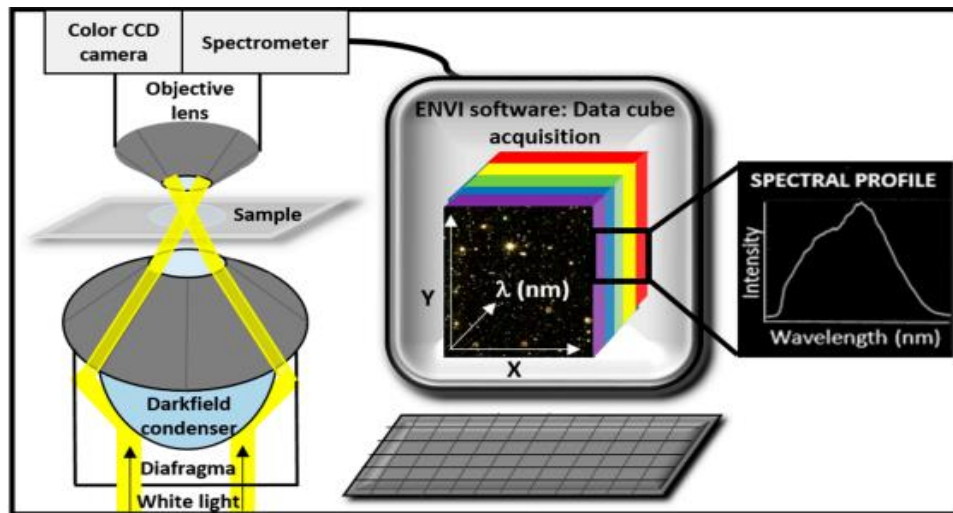


Fig. 1.6 Diagrama generalizată a sistemului hiperspectral cu tehnologie în câmp întunecat îmbunătățită. Ilustrarea aparaturii experimentale (stânga) + achiziție cub de date hiperspectral (dreapta)

Mai întâi de toate, pentru a achiziționa o imagine hiperspectrală, trebuie să fixăm lamela cu specimenul pe care vrem să-l analizăm pe măsura motorizată a microscopului; alegem obiectivul pe care îl dorim apoi începem achiziția imaginii optice în câmp întunecat și în timp real. (**Fig. 1.7**) (Atenție! Lumina trebuie să fie direcționată către ocularul microscopului). Astfel, putem să vizualizăm foarte ușor specimenul și să alegem zona de interes pentru pasul următor, și anume scanarea hiperspectrală.



Fig. 1.7 Imagine în timp real văzută prin microscopul CytoViva

Ca să putem începe scanarea hiperspectrală, trebuie să direcționăm lumina care merge spre ocularul microscopului, să meargă spre camera HSI.



Fig. 1.8 Instrumentul pentru ghidajul luminii in microscop

Pasul următor este să deschidem programul ENVI 4.8. Se deschide fereastra de control a microscopului hiperspectral (**Fig. 1.9**) unde avem de selectat următoarele:

- ❖ Mărirea obiectivului cu care urmează să scanăm proba. Lista prestabilită în program este: 10x; 20x; 40x; 50x; 60x; 100x;
- ❖ Timpul de expunere, în secunde, pentru fiecare punct;
- ❖ HSI filename – unde să salvăm fisierul;
- ❖ Câmpul vizual corespunzător pentru scanre:
 - ♦ Scanare full – vom avea o scanare a imaginii cu înălțime și lățime egale;
 - ♦ Scanare half – vom avea o scanare $1/2$ din imaginea totală;
 - ♦ Scanare quick – vom avea 21 de linii scanate;
 - ♦ Scanarea numarului de linii stabilit de utilizator.

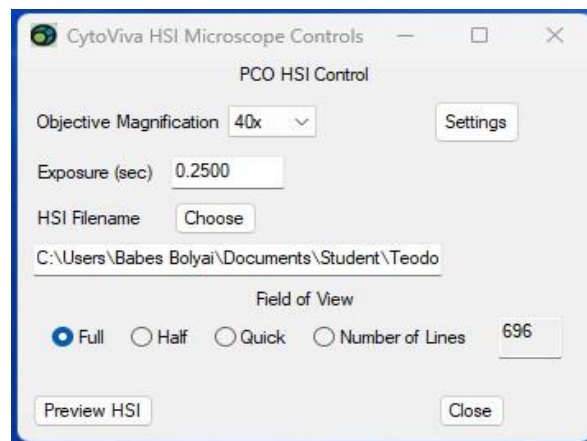


Fig. 1.9 CytoViva HSI Microscope Controls

După ce am introdus aceste setări, începe scanarea HSI, adică se deschide fereastra de previzualizare hiperspectrală (**Fig. 1.10**) care conţine histograma cu numărul de pixeli ai imaginii. Aceşti pixeli au valori cuprinse între 0-valoarea maximă. Axa y (verticală) reprezintă lungimile de undă capturate ale spectrelor iar axa x (orizontala) locaţia pixelilor.

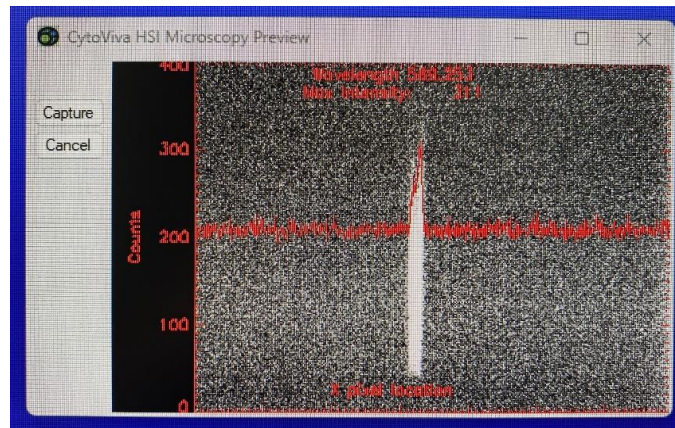


Fig. 1.10 Imagine cu fereastra de vizualizare când proba este focalizată

În mod normal, dacă obiectele din imagine sunt focalizate foarte bine în ocularul microscopului, atunci sunt focalizate și pe camera hiperspectrală. Această previzualizare are rolul de a ne asigura că imaginea hiperspectrală scanată o să fie clara și de calitate.

Apare o nouă fereastră. Aici avem posibilitatea să vedem cum cubul de date este construit în timp real, precum și un grafic de intensitate spectrală asociat. (**Fig. 1.11**)



Fig. 1.11 Imagine reprezentativă cu modul de captură a hipercubului în timp real

Acum începe scanarea (se achiziționează liniile individuale presetate ale imaginii HSI) până când se ajunge la sfârșitul zonei predeterminate. Când scanarea este finalizată, se deschide automat imaginea hiperspectrală. (**Fig. 1.12**)

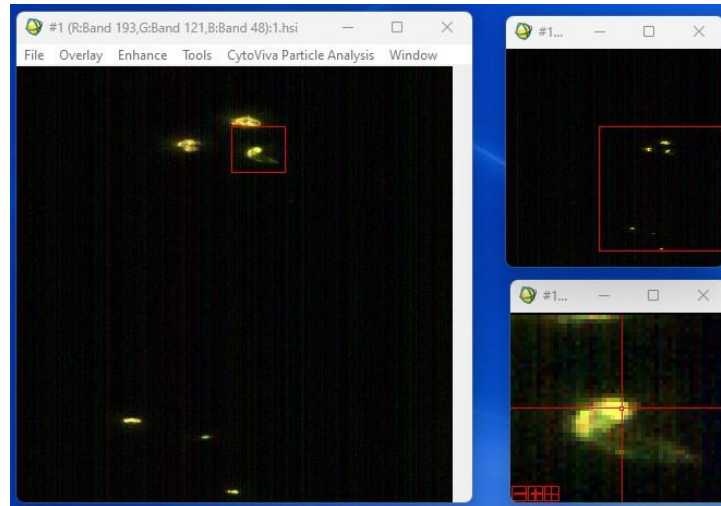


Fig. 1.12 Imagine reprezentativă pentru imaginea hiperspectrală cu 3 tipuri de zoom

După finalizarea scanării, software-ul ENVI 4.8 deschide cubul de date hiperspectral ca o recreere roșu, verde, albastru (RGB) care se bazează pe intensitatea spectrală măsurată pe fiecare pixel în parte din imagine.

Dând click dreapta și apoi ”Z profile” pe pixelii care se suprapun cu zona pe care vrem să o analizăm, putem să vizualizăm graficele spectrelor. (**Fig. 1.13**) Aceste spectre pot fi salvate mai apoi sub formă de fișiere pentru a crea o bibliotecă sau pentru a fi analizate mai amanunțit.

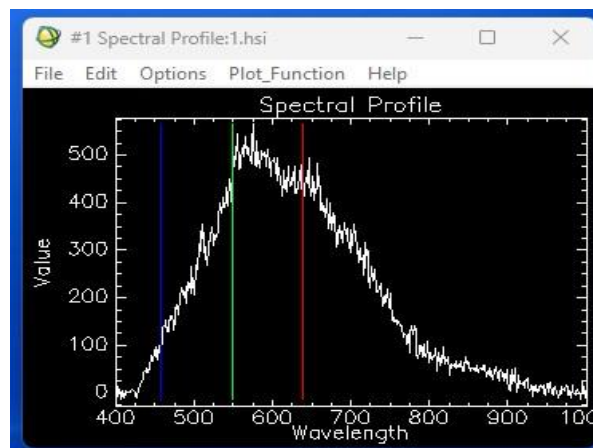


Fig. 1.13 Imagine reprezentativă pentru graficele spectrelor

Acest soft ne oferă posibilitatea de a compara spectrele dintr-o imagine cu un număr mare de probe sau cu un eșantion. Totodată, putem să construim o bibliotecă spectrală de elemente ale unor specimene, iar cu această bibliotecă să fie mapate în alte probe necunoscute.

Hipercub, cub spectral sau cub de date sunt termeni sinonimi folosiți pentru înțelegerea conceptului de imagine hiperspectrală. [2]

În mod normal, un cub de date este generat în intervale de timp de secunde sau minute (depinde de timpul de expunere folosit) și poate să conțină sute de mii de pixeli, fiecare având dimensiunea de câțiva nanometri. [3]

Imaginile hiperspectrale sunt prin definiție un cub de date tridimensional unde axele x și y reprezintă dimensiunile spațiale iar axa z reprezintă lungimea de undă. [14]

Principiul de bază pe care se bazează imagistica hiperspectrală este acela că, din cauza structurii fizice și a compoziției chimice, orice material interacționează cu radiația electromagnetică. Această proprietate se poate intitula amprentă spectrală, semnătură spectrală sau doar spectru. Putem folosi această amprentă spectrală pentru identificarea, compararea sau caracterizarea diferitelor tipuri de probe. [16] Spectrele obținute se pot folosi pentru analize sau se pot salva pe post de bibliotecă spectrală. [13]

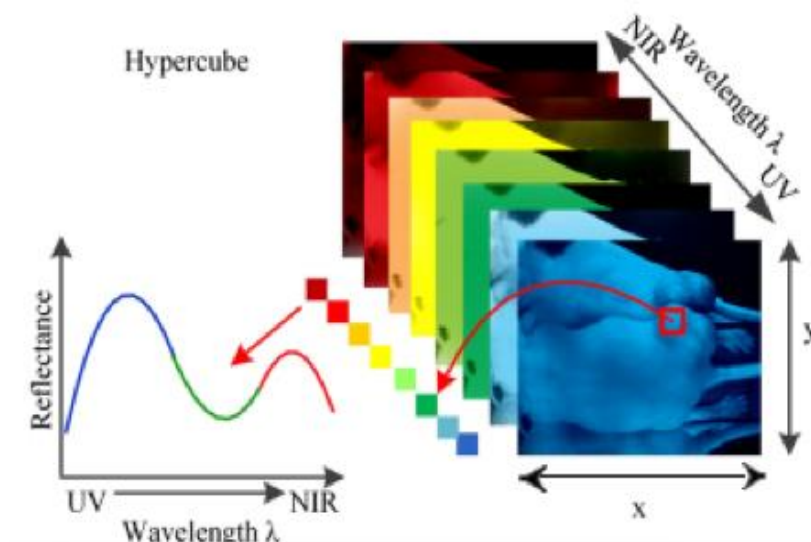


Fig. 1.14 Reprezentare grafică a cubului de date hiperspectral [15]

2. Colagen

Colagenul este cea mai abundentă proteină structurală din corpul mamiferelor și reprezintă aproximativ 25% - 30 % din cantitatea totală de proteine. Acesta se găsește în general în spațiul extracelular, adică în țesuturi conjunctive fibroase, cum ar fi pielea, ligamente sau tendoane. [18]

2.1 Prezentare generală

Denumirea de “colagen” este utilizată pentru a descrie o familie de proteine care au în comun capacitatea de a forma structuri în forma de triplu helix, care constau în trei lanțuri polipeptidice. Toate aceste structuri din familia colagenului formează aranjamente supramoleculare aflate în matricea extracelulară iar distribuția lor tisulară, forma și funcția lor variază. [25]

Colagenul este prezent în matricea extracelulară (ECM) din diferite țesuturi conjunctive, de exemplu pielea, cartilaje și tendoane sau oase. Acesta este principala proteină structurală regăsită în corpul mamiferelor.

Lanțurile de colagen menționate mai sus sunt alcătuite în mod normal din secvențe repetitive de aminoacizi Gly-X-Y unde avem aminoacidul glicină ”Gly”, iar X și Y sunt prolina și respectiv 4-hidroxi prolina, sau alți aminoacizi în funcție de tipul de colagen. Lanțurile alfa (α) ale colagenului variază în compoziție și lungime. Aceasta se datorează frecvenței de repetiție a secvenței Gly-X-Y și lungimii segmentelor care conțin această secvență. [20]

Cele trei lanțuri polipeptidice ale colagenului sunt înfășurate unul în jurul celuilalt (exemplu în **Fig. 2.1**) formând o triplă elice regulată iar molecula de colagen generată în final este asemanătoare unei coarde care are lungimea de 300 nm (3000 Å) și diametru de 1.5 nm (15 Å). [23]

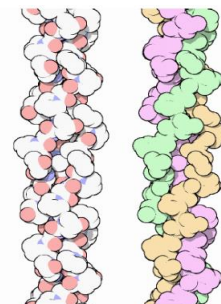


Fig. 2.1 O mică porțiune de colagen, colorată în funcție de atom (stânga) și colorată pentru a evidenția cele trei lanțuri polipeptidice (dreapta) [22]

2.2 Tipuri de colagen

Lungimea regiunilor elicoidale și a lanțurilor alfa variază în funcție de tipurile de colagen. Există 5 tipuri principale de colagen: colagen de tip I, II, III, IV și V. Primele 3 tipuri de colagen constituie 90% din totalul de colagen din organism, formează structuri ordonate, cum sunt fibrilele și se găsesc în țesutul conjunctiv. [23] Alte structuri ordonate sunt rețelele (colagen de tip IV). [19]

a) Fibrillar Collagen	
Collagen Type	Location
I	skin, bones, tendons, cornea
II	gristle, vitreous body
III	skin, vessels, intestine, uterus
V	skin, bones, cornea, placenta
XI	gristle, intervertebral disc
XXIV	bones, cornea
XXVII	gristle
b) Non-fibrillar Collagen	
Collagen Type	Location
IV	basal membrane, capillaries
VI	bones, vessels, skin, cornea, gristle
VII	mucous membranes, skin, bladder, umbilical cord, amniotic fluid
VIII	skin, brain, heart, kidneys, vessels, bones, gristle
IX	cornea, vitreous body, gristle
X	gristle
XII	gristle, tendons, skin
XIII	skeletal muscles, heart, eye, skin, endothelial cells
XIV	vessels, eye, nerves, tendons, bones, skin, gristle
XV	capillary vessels, ovaries, heart, testicles, skin, placenta, kidneys
XVI	heart, skin, kidneys, smooth muscle
XVII	skin
XVIII	kidneys, lungs, liver
XIX	skin, kidneys, liver, placenta, spleen, prostate gland
XX	corneal epithelium
XXI	stomach, kidneys, vessels, heart, placenta, skeletal muscles
XXII	tissue connections
XXIII	metastatic carcinogenic cells
XXV	eye, brain, heart, testicles
XXVI	testicles, ovaries
XXVIII	nervous system cells
XXIX	skin

Fig. 2.2 Localizarea **a)** fibrilară și **b)** nefibrilară a colagenului în țesuturi [24]

Colagenul de tip I (Col-I) este unic datorită biocompatibilității sale ridicate în țesutul uman. Acest tip de colagen este cel mai comun tip de proteină și se găsește în mod obișnuit în piele, oase, tendoane, cornee, etc. [26] Lanțul pro-alfa1(I) este produs de Gena COL1A1. Prin combinarea a două lanțuri pro-alfa1(I), un lant pro-alfa2(I) (produs de gena COL1A2) se formează o moleculă de pro-colagen de tip I care este procesată de enzime din afara celulei. În urma procesării acestor molecule, acestea urmează să se aranjeze formând fibrile subțiri și lungi care sunt legate între ele în jurul celulelor. Din legăturile formate se generează o fibră matură și puternică de colagen de tip I. [27]

Unul dintre colagenii fibrilari majori apare ca fiind colagenul de tip III, constituind aproximativ 5-20% din totalul de colagen din corpul uman. [29] Principala localizare tisulară a colagenului de tip III este în dermă și aortă. Structura moleculară a acestui tip de colagen este asemanatoare cu cea a colagenului de tip I. Colagenul de tip III este un homotrimer) care conține trei lanturi α 1(III) (monomeri) înfășurate unul în jurul celuilalt într-un triplu helix de dreapta (right-handed triple helix). Acești monomeri se numesc colagen de tip III și la oameni sunt codificați de gena COL3A1. [30]

Membranele bazale au rolul de a asigura suportul structural al epitelului, endoteliului, mușchilor, celulelor adipoase, etc. Toate membranele bazale conțin colagen de tip IV. [31] Structura fibrelor este legată în format „cap la cap” în loc să fie paralelă. De asemenea, îi lipsește o glicină la fiecare al treilea reziduu de aminoacid care este responsabil pentru helixul strâns al colagenului, ca urmare va fi mai flexibil decât alte tipuri de colagen. Colagenul de tip I se găsește în proporții mari în toate straturile dermice, în timp ce colagenul de tip IV se găsește doar la nivelul membranei bazale a joncțiunii epidermice. În ciuda acestei diferențe, ambele sunt alterate în timpul îmbătrânirii. [32]

Colagenul, ca și elastina, este una dintre proteinele primare ale pielii. Colagenul oferă structură și fermitate pielii dar din nefericire, nivelul lui începe să scadă odată cu îmbătrânirea. [34] Colagenul solubil apare ca fiind o proteina nativă și nehidrolizată, derivată din țesutul conjunctiv al animalelor tinere. Acesta constă, în esență, dintr-un amestec de precursori ai colagenului matur. Are o structură trihelică și nu este predominant reticulat. Colagenul solubil din creme provine de obicei din surse marine sau bovine. [35]

Colagenul hidrolizat este o proteină descompusă în aminoacizi individuali. Acest proces implică fragmentarea colagenului în peptide mici cu greutate moleculară redusă, cuprinsă între 0.3-8 kDa. Colagenul hidrolizat are avantajul de a fi mai ușor de digerat și absorbit de organism, datorită

dimensiunii moleculare reduse. Astfel, acesta poate fi eficient distribuit în diferite părți ale corpului după absorbție. Calitatea colagenului hidrolizat final depinde de metoda utilizată pentru extragerea sa, care poate influența dimensiunea moleculară medie a peptidei rezultate. [33]

2.3 Proprietățile colagenului și rolul acestuia în corpul uman.

Structura colagenului este similară cu cea a unei coarde. Trei lanțuri de molecule de colagen se înfășoară unul în jurul celuilalt, astfel formându-se coarda respectivă. Acestea se adună la rândul lor și formează corzi mai puternice numite fibrile. Fibrilele se combină mai apoi pentru a forma fibrele de colagen. În prezent există 29 de tipuri de colagen, iar localizarea lor apare în tabelul din **Fig. 2.2** de mai sus.

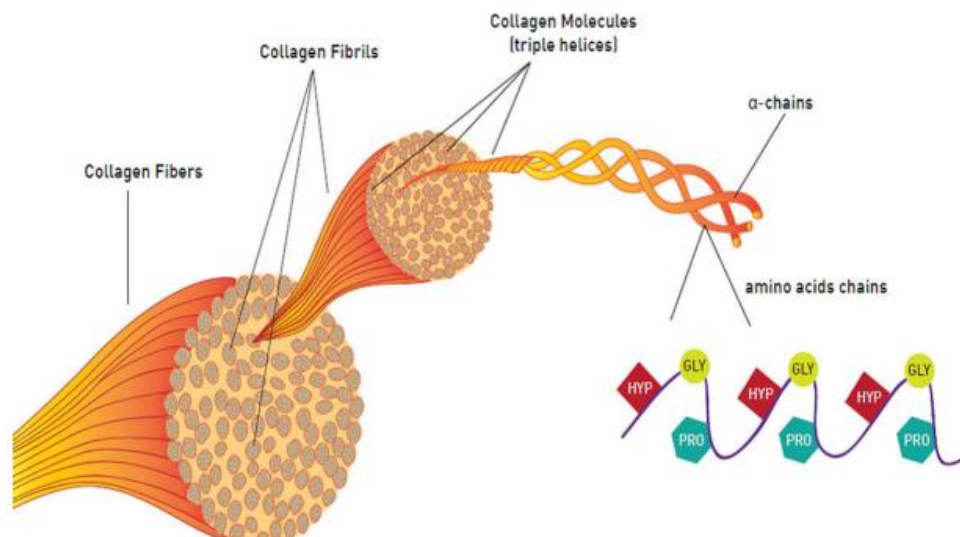


Fig. 2.3 Structura fibrelor de colagen [36]

Principala funcție a colagenului este aceea de a asigura elasticitate, stabilitate și suport pentru țesuturi. Aceste proprietăți au contribuit la rolul său fundamental în evoluția vieții multicelulare. De asemenea, o altă caracteristică importantă este rezistența fibrelor de colagen la forțele mecanice care crește în mod direct proporțional cu vârsta fibrelor. [28] Colagenul are rolul de a ajuta la repararea țesuturilor și îndeplinește, de asemenea, diverse roluri în tot corpul:

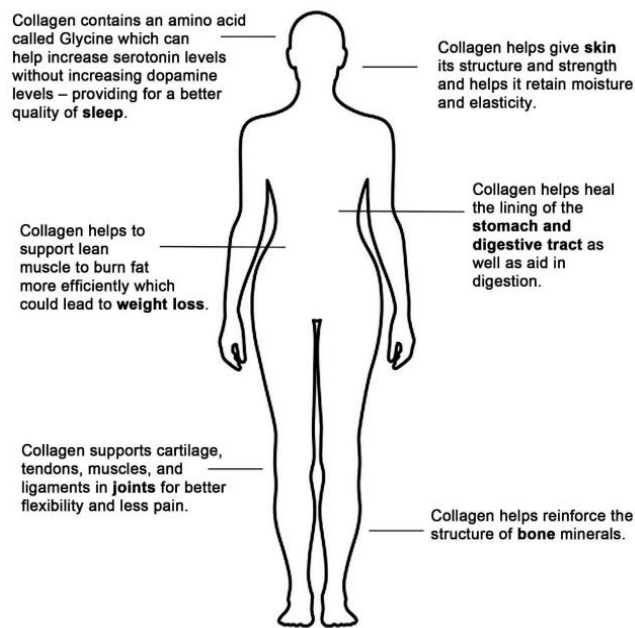


Fig. 2.4 Rolul colagenului în corpul uman [37]

Fibrele de colagen sunt componente cheie ale pielii și au proprietăți fizice unice care contribuie la integritatea structurală a acesteia, formând o rețea densă în derm. Această rețea oferă suport structural epidermei. Colagenul împreună cu elastina formează matricea extracelulară, iar aceasta conferă pielii structură, elasticitate și fermitate. [36]

Colagenul conține un aminoacid numit Glicină care poate ajuta la creșterea nivelului de serotonină fără a crește nivelul de dopamină – asigurând o mai bună calitate a somnului; susține cartilajele, tendoanele, mușchii și ligamentele pentru o mai bună flexibilitate; ajută la vindecarea mucoasei stomacului și a tractului digestiv; întărește structura osoasă. [37]

Pentru a suplimenta lipsa colagenului din organism, în comerț există o gamă largă de produse care conțin colagen sub diferite forme precum colagen pulbere, gel, lichid, fiole cu colagen.

2.4 Integrarea colagenului în produse cosmetice

Organismul nostru sintetizează colagenul încontinuu. În fiecare an, aproximativ 3 kg din colagenul nostru suferă degradare, în timp ce alte 3 kg sunt create. Totuși, va veni o vreme când cantitatea de colagen din corpul nostru va scădea. Procesul de reînnoire a acestuia poate fi perturbat din cauza

bolilor, a stresului, a razelor UV, a contactului cu substanțe chimice sau înaintarea în vârstă. După vârsta de 25 de ani, cantitatea de colagen din corpul nostru scade cu până la 1.5% pe an, asta însemnând că, până la vârsta de 45 de ani, va fi pierdut până la 30% din colagenul existent.

Având în vedere importanța colagenului în corpul nostru, nu este de mirare că știința lucrează de mult timp la metode de obținere a acestei proteine care să o faca aplicabilă în mod eficient atât în medicina cât și în cosmetică. [38]

Studiul sursei de colagen și încorporarea lui în produse cosmetice sunt aspecte importante în industria cosmetică, pentru a oferi produse eficiente și de înaltă calitate care să răspundă nevoilor consumatorilor și să contribuie la îmbunătățirea sănătății pielii. Colagenul reprezintă unul dintre principalii constituenți în cosmetică datorită proprietăților lui de hidratare și regenerare. Capacitatea acestuia de a lega moleculele de apă implicit duce la menținerea unui conținut de apă potrivit în piele. Pe lângă faptul că acesta păstrează hidratarea în mod natural, proprietățile de formare a colagenului reduc pierderea de apă transepidermică. În plus, hidratarea face pielea mai radiantă, mai luminată și mai netedă.

În urma cercetărilor, s-a dovedit că, colagenul grăbește procesul de vindecare al rănilor și ajută la regenerarea țesuturilor. Utilizarea lui poate fi benefică și pentru îngrijirea părului. Prin urmare, este important de menționat necesitatea colagenului în domeniul cosmetic.

Originea colagenului poate varia de la surse porcine și bovine, la surse marine. Colagenul obținut din surse bovine și porcine a ridicat îngrijorări cu privire la transmiterea unor boli precum TSE (transmisibile spongiform encephalopathy), BSE (bovine spongiform encephalopathy) și FMD (foot and mouth disease). În ultimele decenii, cercetările și dezvoltarea în domeniul colagenului au condus la descoperirea potențialului colagenului marin. Această descoperire a avut loc cu aproximativ 70 de ani în urmă, în timpul studiilor asupra bureților. [39] Colagenul de meduză este o bună alternativă la furnizarea de colagen pentru domeniul cosmetic sau medical. Procesul de izolare a colagenului din sursele marine poate fi împărțit în trei etape principale: preparare, extracție și recuperare. O metodă generală de preparare a colagenului marin și diferitele tehnici de extracție cum ar fi acid-soluble collagen (ASC) și pepsin soluble collagen (PSC) sunt prezente în figura **Fig. 2.5** [41]

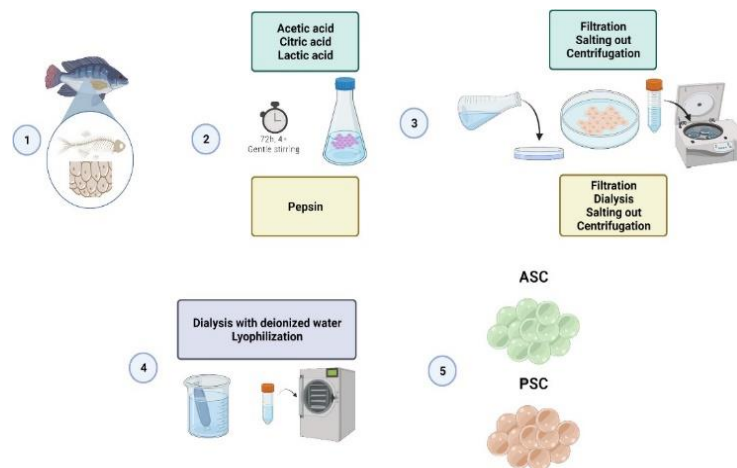


Fig. 2.5 Metoda generală de preparare a colagenului marin. **1.** Selectarea sursei de colagen; **2.** Tratament cu acid sau cu pepsină; **3.** Etapa de purificare; **4.** Dializa și liofilizare; **5.** ASC/PSC.

Meduzele sunt adesea denumite zooplancton gelatinos format din mezogloane bogate în colagen care au evoluat de peste 600 milioane de ani. Atunci când colagenul de meduză a fost comparat cu colagenul fibrilar uman în testele de citotoxicitate și aderență celulară, nu a apărut nici o diferență statistică, ceea ce înseamnă că efectul biologic al colagenului de meduză asupra celulelor umane este același cu cel al colagenului de tip I și II din corpul uman. [40]

Properties	Marine collagen	mammalian collagen
Water absorption	1.5x higher	Lower
Biocompatibility	Similarly high	Similarly high
Aminoacidic composition	Lower	Higher
Viscosity/ thermal stability	Lower due to lower concentration of proline concentration and hydroxyproline content	Higher
Denaturation	Lower (25–30°C)	Higher (39–40°C)
Flexibility	Higher	Lower
Molecular weight	Lower due to small molecular size	Relatively higher
Biodegradability	Similarly high	Similarly high
Porosity	Similarly high	Similarly high
Rigidity	Higher due to its triple helix	Lower
Solubility	Lower due to its triple helix	Higher

Fig. 2.6 Rezumat de bază al colagenului marin și de mamifere cu privire la proprietățile acestora.

3. Materiale și metode

3.1 Procurarea și pregătirea probelor

Pentru a atinge obiectivul acestei lucrări, au fost analizate o cremă antirid MULTI-COLLAGEN și un ser de refacere REVUELE COLLAGEN (comercializate în farmacii și supermarketuri) achiziționate în toamna anului 2022 pentru a detecta prezența colagenului în ele. Este de menționat faptul că, pe lângă colagen, ambele probe conțin și alte ingrediente cum ar fi: crema – aqua, cetearyl, glycerin, ethylhexyl stearate, capric triglyceride, dicaprylliglyceride, dicapryll ether, bisdiglyceryl polyacyladipate-2, dimethicone, glyceryl stearate, peg-100 stearate, sodium hyaluronate, allantoin, ascorbic acid, ascorbyl palmitate, butylene glycol, capryloyl glycine, cetearyl glucoside, citric acide, citrus limon fruit extract, diethylhexyl syringyldenemalonate, soluble collagen, disodium edta, glucose, glyceryl laurate, glycogen, hydrolyzed elastin, hydroxypropyl cyclodextrin, lecithin, palmitoyl tripeptide-38, parfum, passiflora edulis fruit extract ;

ser – aqua, propylene glycol, hydrolyzed collagen, hydroxyethyl cellulose, phenoxyethanol, PPG-1-PEG 9 lauryl glycol ether, disodium EDTA.

Pentru pregătirea probelor s-a folosit un proces de prelucrare standard pentru fiecare din ele. În cazul cremei, pe fiecare lamelă utilizată la măsuratori am depus în trei zone câte un strat cât se poate de subțire de cremă cu vârful unei pipete iar pentru a obține o suprafață întinsă pentru o regiune mai largă de analiză , am acoperit proba cu un “cover-glass”. În cazul serului, am depus o picătură de 10 μ L cu ajutorul unei micropipete pe lamelele utilizate și din nou, le-am acoperit cu “cover-glass”.

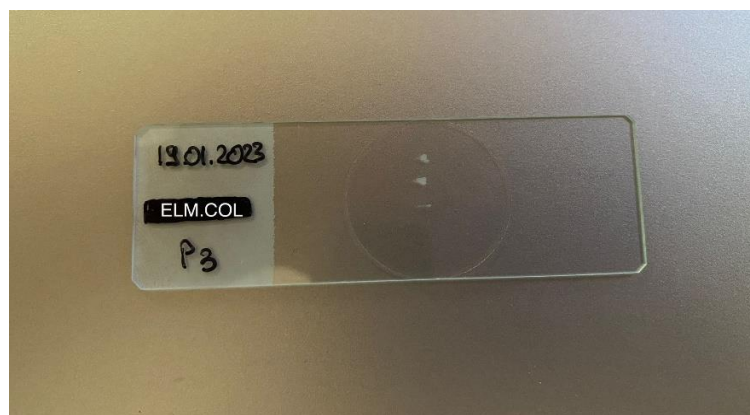


Fig. 3.1 Lamelă cu crema folosită pentru lucrare

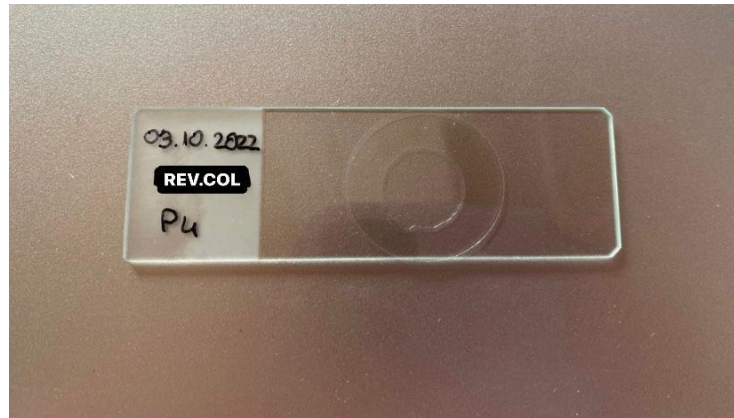


Fig. 3.2 Lamelă cu serul folosit pentru lucrare

3.2 Achiziționarea datelor

Probele au fost vizualizate cu ajutorul unui sistem de imagistică hiperspectrală CytoViva (Auburn, AL) montat pe un microscop Olympus BX43 echipat cu un condensor EDFM și o sursă de lumină de tip lampă cu halogen de putere 150W. (**Fig. 3.3**) Spectrofotometrul integrat este cu grid de difracție și o cameră CCD, și are rezoluția spectrală de 2 nm. Imaginile optice au fost achiziționate cu o cameră optică iar cu ajutorul programului Ocular au putut fi vizualizate în timp real pe calculator. Acest sistem hiperspectral CytoViva captează un spectru cu lungimi de undă cuprinse între 400 nm – 1000 nm pentru fiecare pixel din imagine.

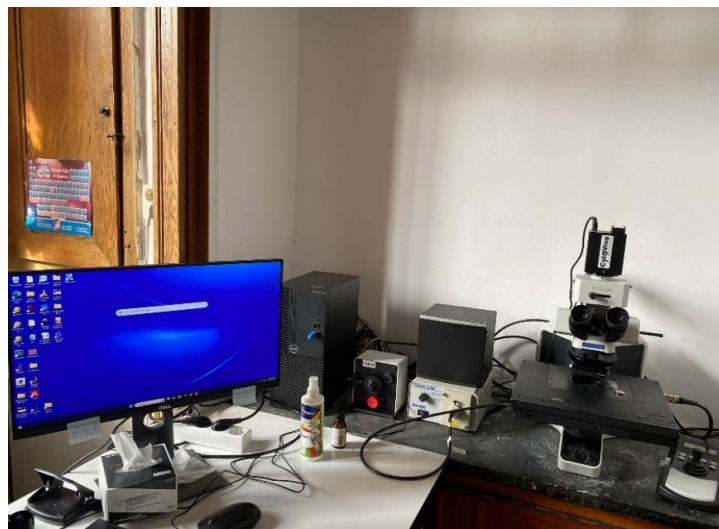


Fig. 3.3 Microscopul hiperspectral în câmp întunecat CytoViva utilizat pentru această lucrare

Pentru achiziția imaginilor din crema respectiv serul cu collagen s-a folosit obiectivul Plan FLUO 40x/0.60 al microscopului îmbunătățit în câmp întunecat. Măsurătorile au fost efectuate de câte 3 ori în zone diferite ale aceleiași probe. Acest lucru s-a repetat atât pentru cremă, cât și pentru ser. Setările pentru scanarea hiperspectrală sunt următoarele: s-a folosit scanarea a 696 de linii (scanare Full); și timpul de expunere 0.25 s. Microscopia îmbunătățită în câmp întunecat ne oferă un contrast fundal-probă îmbunătățit pentru a identifica zonele pe care vrem să le analizăm.

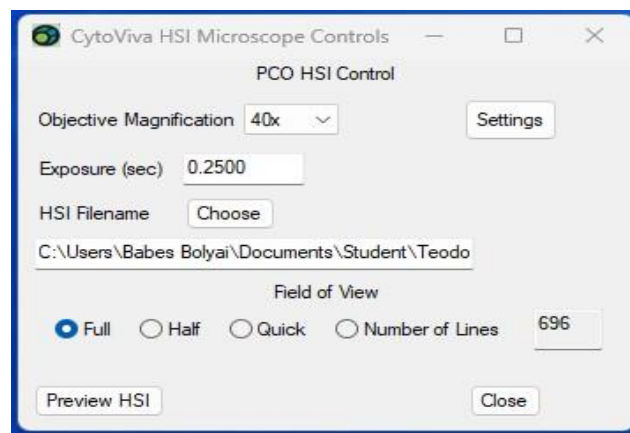


Fig. 3.4 Setări CytoViva HSI microscope

3.3 Procesarea datelor

După ce am obținut imaginile optice și respectiv cele hiperspectrale, ne-am asigurat de calitatea seturilor de date obținute. Pentru vizualizarea și procesarea datelor spectrale am folosit software-ul ENVI 4.8. Acest software analizează imaginile obținute și extrage informațiile spațiale și spectrale din datele furnizate.

Pentru detecția colagenului din cele două produse cosmetice s-a folosit ”Peak Location Classifier” din software-ul ENVI 4.8. Funcția aceasta găsește toți pixelii din imagine care au peak-ul maxim spectral la o anumită lungime de undă/un interval de lungimi de undă. Pentru această funcție este nevoie să setăm diferite valori pentru următorii parametri: lungime de undă, toleranță și zgomot. Parametrii aleși pentru găsirea peak-urilor de interes în cazul măsurătorilor făcute pentru această lucrare sunt prezentați în figura de mai jos:

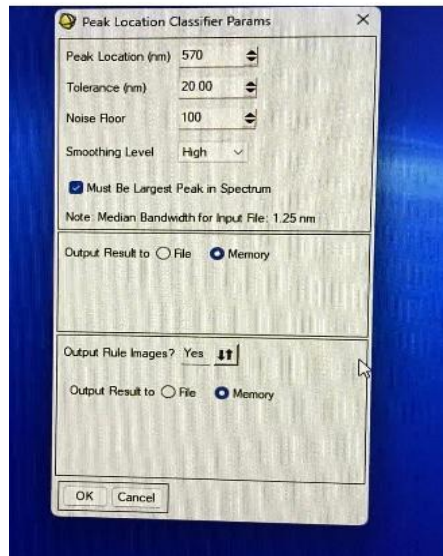


Fig. 3.5 Parametrii aleși pentru funcția "Peak Location Classifier" în cazul colagenului din produsele cosmetice

Imaginile rezultate pot fi salvate/arhivate în computer și în acest fel este permisă analiza semnalelor măsurate anterior. Așadar, cu ajutorul acestei funcții este posibilă găsirea unor regiuni a căror spectru prezintă un peak care se potrivește cu o caracteristică spectrală de referință.

Normalizarea spectrală este o tehnică utilizată pentru a corecta și a îmbunătăți acuratețea măsurătorilor. Prin normalizarea spectrală, se elimină amprenta sursei de lumină și astfel se evidențiază caracteristicile probei. Spectrele obținute conțin amprenta sursei de lumină folosite, iar datele reprezintă spectrul luminii sursei care este modificat de caracteristicile spectrale ale probei analizate. O metodă pentru a îmbunătăți acuratețea măsurătorilor este "Normalizarea Spectrală", iar spectrul lămpii este înregistrat și salvat în arhiva programului ENVI 4.8.

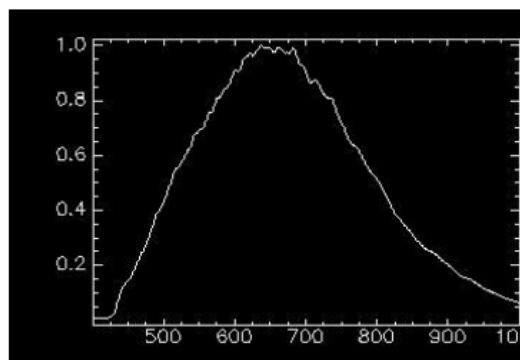


Fig. 3.6 Spectrul lămpii normalizat [44]

4. Rezultate și discuții

Pentru început, ca să determinăm proprietățile colagenului din produsele cosmetice studiate, una din etape este vizualizarea optică a acestuia cu ajutorul microscopului hiperspectral în câmp întunecat.



Fig.4.1 Imagine optică în timp real a colagenului din crema antirid de noapte MULTI-COLLAGEN realizată cu obiectivul de 40x



Fig. 4.2 Imagine optică în timp real a colagenului din serul de refacere cu colagen REVUELE COLLAGEN realizată cu obiectivul de 40x

4.1 Procesarea imaginilor

Urmatoarele două figuri reprezintă imaginile hiperspectrale ale probelor din cele două produse cosmetice achiziționate cu programul ENVI 4.8 vizualizate la microscop cu obiectivul de mărire 40x. Cu ajutorul chenarelor au fost puse în evidență zone din imagini care reprezintă colagenul din produsele respective.

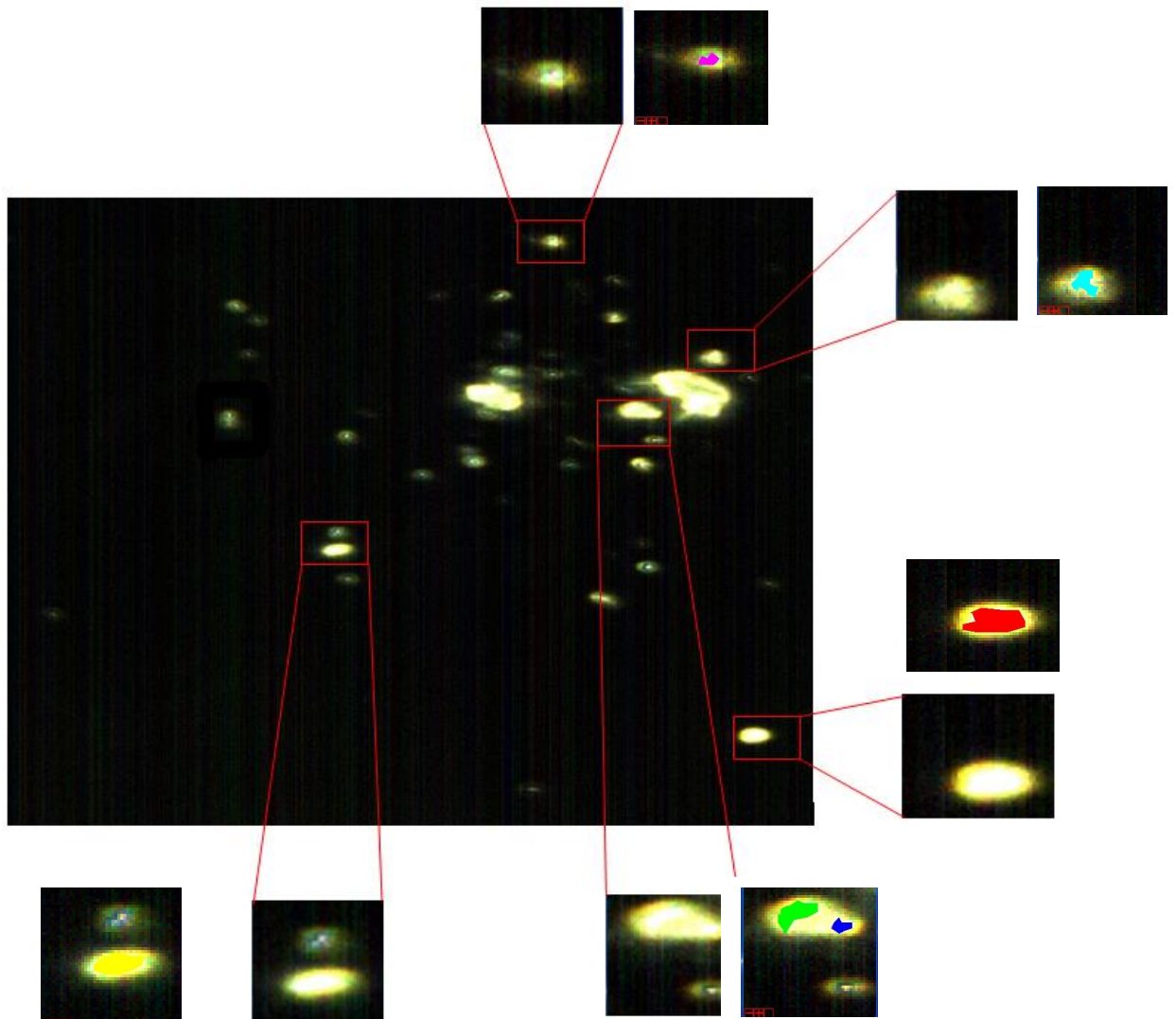


Fig. 4.3 Imagine hiperspectrală reprezentativă a colagenului din crema hidratantă realizată cu obiectivul de 40x

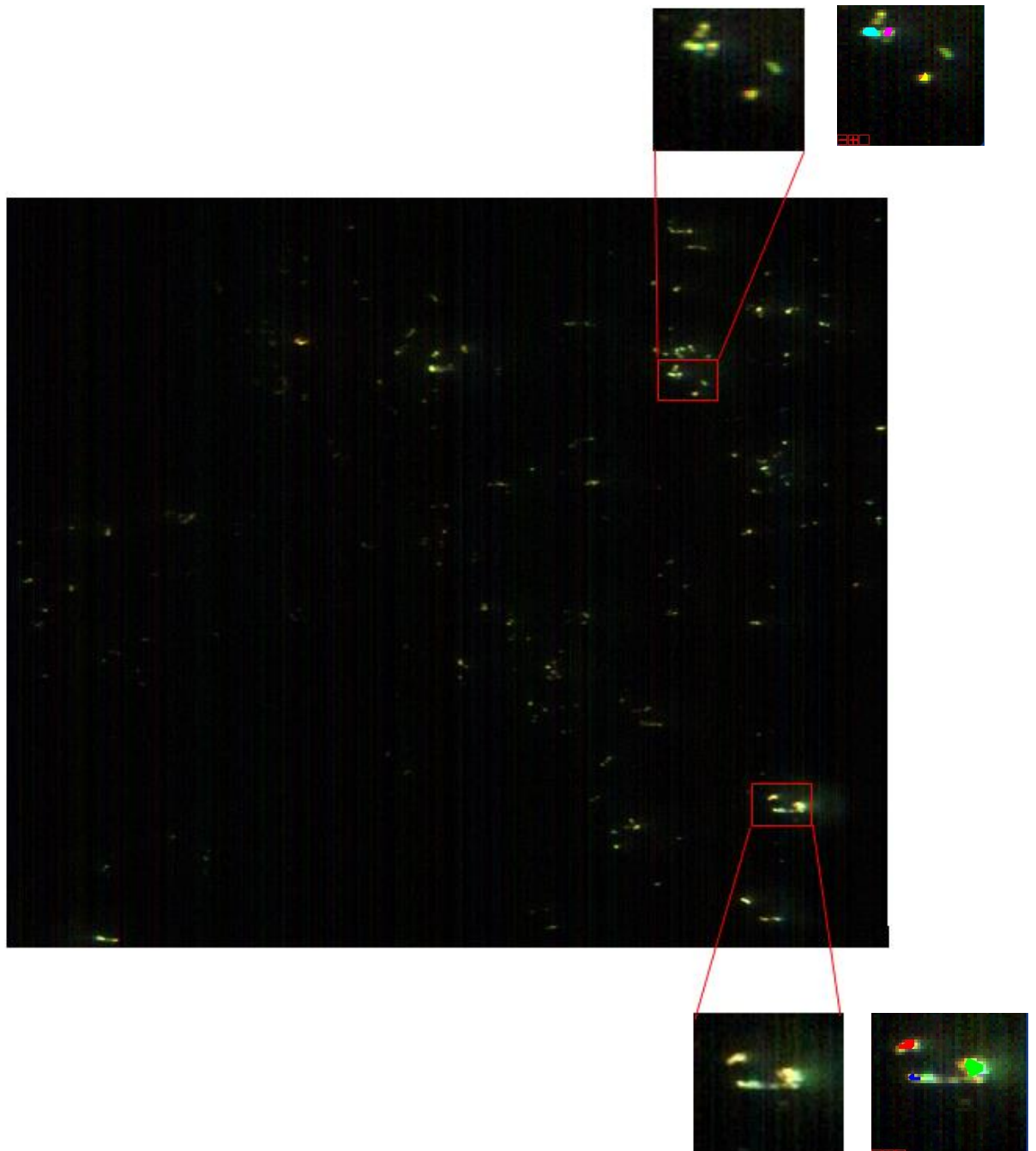


Fig. 4.4 Imagine hiperspectrală reprezentativă a colagenului din ser realizată cu obiectivul de 40x

După cum se poate observa, în ambele imagini hiperspectrale de mai sus (**Fig. 4.3** respectiv **Fig. 4.4**) am definit în programul ENVI 4.8 câte 6 regiuni de interes (ROI). Aceste regiuni de interes reprezintă o grupare de pixeli ai imaginii hiperspectrale care corespund zonelor care conțin colagen. Aceste regiuni pot avea forme prestabilite de program (dreptunghi/elipsă) sau formă

creată de utilizator și în același timp, programul le atribuie automat câte o culoare, cum ar fi în cazul nostru (red, green, blue, yellow, cyan, magenta).

Răspunsul spectral al fiecărei regiuni se poate vizualiza sub formă de grafic cu axa y reprezentând valoarea intensității (unități arbitrare) și axa x reprezentând lungimea de unda (nm).

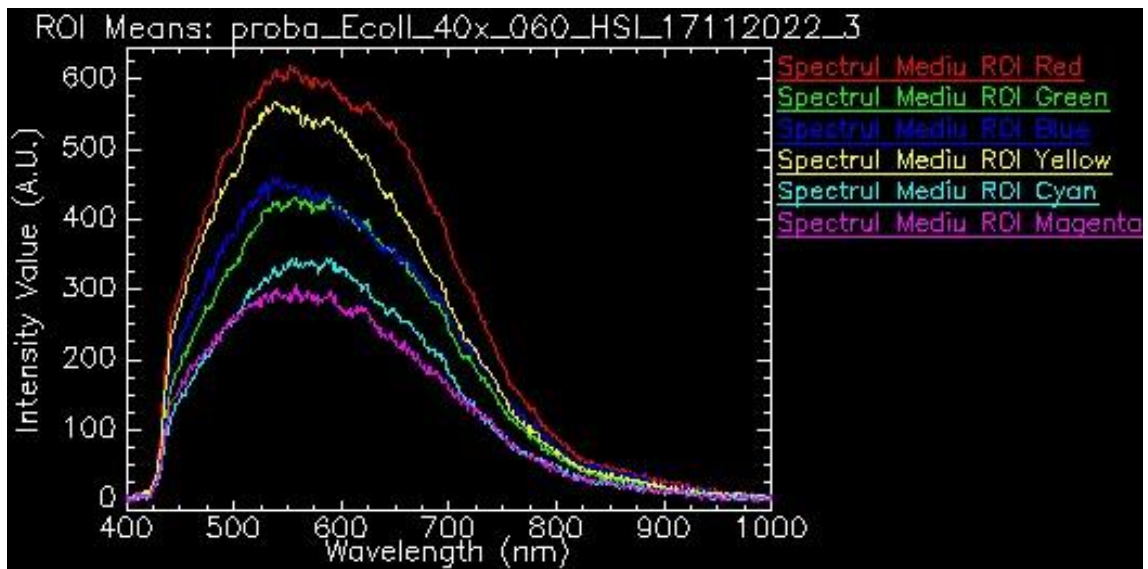


Fig. 4.5 Graficul spectrelor medii corespunzătoare pentru fiecare zona de interes – crema

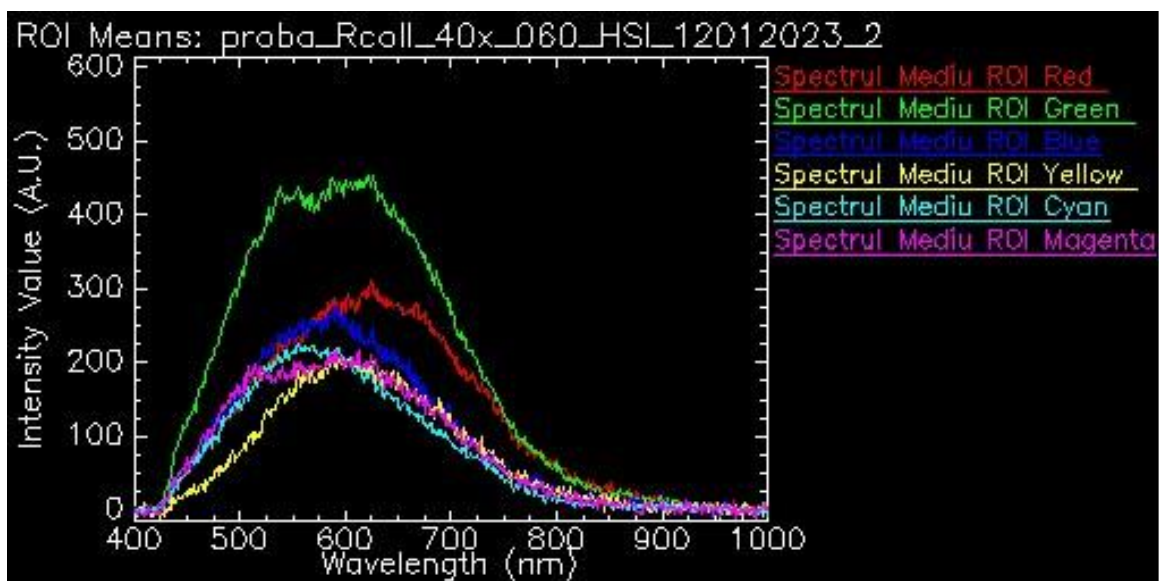


Fig. 4.6 Graficul spectrelor medii corespunzătoare pentru fiecare zona de interes – ser

Ambele probe au fost vizualizate și analizate, optic și hiperspectral cu microscopul hiperspectral în câmp întunecat CytoViva folosind obiectivul Plan FLUO 40x/0.60.

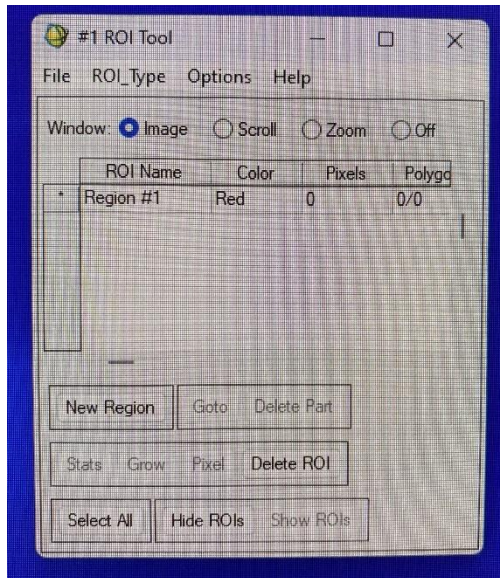


Fig. 4.7 Meniul din programul ENVI 4.8 folosit pentru selectarea regiunilor de interes a căror spectre urmează să fie reprezentate grafic.

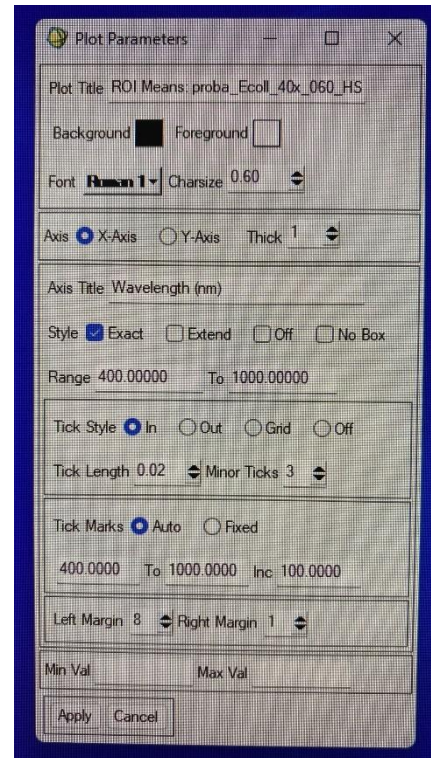


Fig. 4.8 Meniul folosit pentru a modifica graficul (fundal, titlul axelor, range, etc)

Fereastra de grafice care conține media răspunsului spectral al pixelilor din regiunile de interes se deschide după apăsarea butoanelor Select All și mai apoi Stats.

În următoarele figuri (**Fig. 4.7** respectiv **Fig. 4.8**) sunt prezentate imaginile optice reprezentative cremei/serului plus imaginile hiperspectrale obținute în urma scanării. Folosind funcția de procesare a imaginilor Peak Location Classifier, am scos în evidență pixelii din imaginile hiperspectrale achiziționate care prezintă maximul spectral la valoarea de 570 nm cu o toleranță de 20 nm. Pixelii care se potrivesc cerinței anterioare sunt colorați cu verde într-o imagine cu fundal negru. Imaginile optice vor fi notate cu **A**, imaginile hiperspectrale vor fi notate cu **B** iar imaginile prelucrate care au maximul spectral la 570 nm cu toleranța de 20 nm vor fi notate cu **C**. Primul set de 3 imagini corespunde cremei iar al doilea set de 3 imagini corespunde serului.

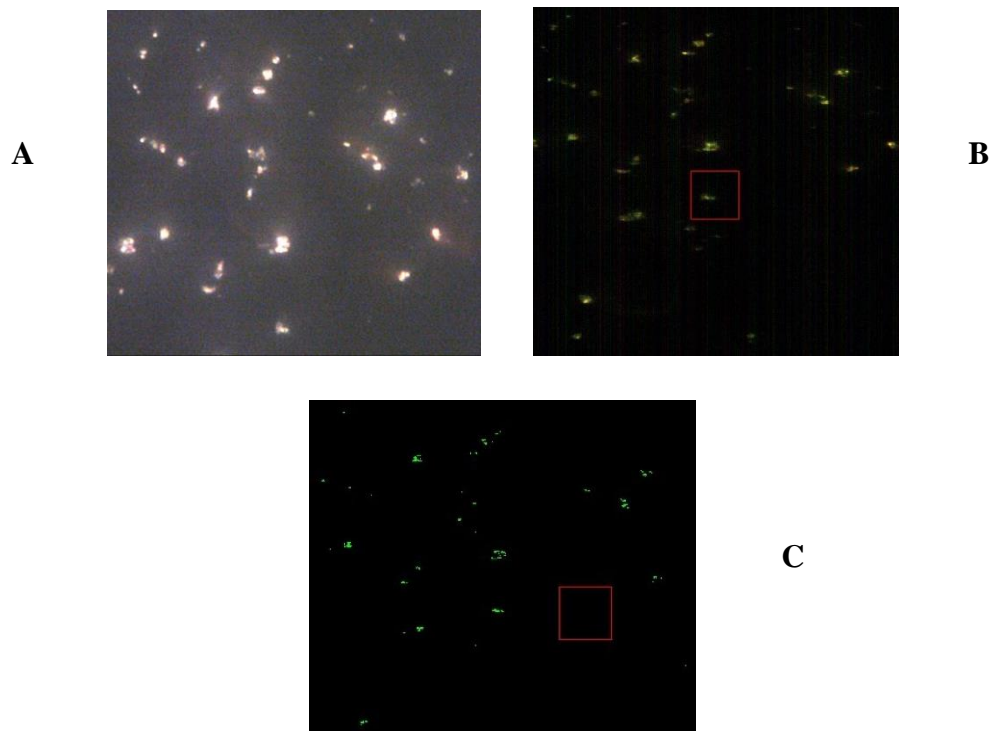


Fig. 4.9 Proba folosită – cremă. **A** – Imagine optică; **B** – imagine hiperspectrală; **C** - imagine prelucrată care are maximul spectral la 570 nm cu toleranță de 20

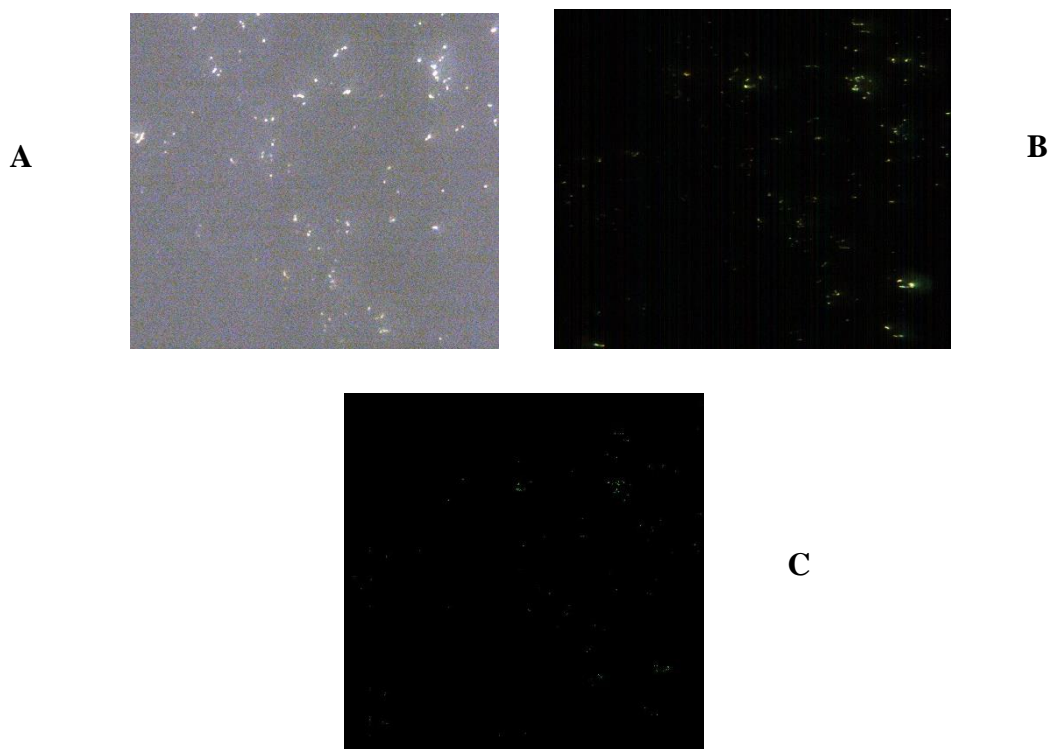


Fig. 4.10 Proba folosită – ser. **A** – Imagine optică; **B** – imagine hiperspectrală; **C** - imagine prelucrată care are maximul spectral la 570 nm cu toleranță de 20 nm

Se poate afirma că pixelii evidenţiaţi prin metoda de imagistică hiperspectrală se suprapun peste locul fizic din probele care prezintă particule de colagen, în cazul în care acestea sunt similare în proprietăţi și dimensiune cu cele folosite în formularea produselor cosmetice. Amprenta spectrală a acestor particule este în concordanță cu valoarea de referință, ceea ce sugerează că ele sunt prezente și în probele analizate. În continuare sunt prezentați pașii care trebuie urmați pentru aflarea procentajului mediu.

- ♦ IMAGE -> TYPE -> 8 BIT – trebuie să convertim imaginea din RGB în 8-bit. Această selecție transformă formatul colorat într-o imagine în scală de gri.
- ♦ IMAGE -> ADJUST -> THRESHOLD – trebuie să aplicăm threshold, acesta este utilizat pentru detectarea marginilor, numărarea particulelor sau măsurarea suprafețelor. Obiectele gri sunt amplificate într-o culoare mai deschisă.
- ♦ PROCESS -> BINARY -> MAKE BINARY
- ♦ PROCESS -> BINARY -> CONVERT TO MASK – următorul pas este să separăm obiectele din imagine.
- ♦ PROCESS -> BINARY -> WATERSHED – convertește obiectele care par să fie 2, 3 sau mai multe împreună și le separă.
- ♦ ANALYZE -> ANALYZE PARTICLES – acum putem analiza particulele.

În continuare, cu ajutorul programului de procesare de imagini ImageJ, am calculat procentajul pixelilor care au peak-ul maxim la 570 nm cu toleranța de 20 nm găsiți din numărul total de pixeli din imagine cu ajutorul funcției Peak Location Classifier.

Atât pentru cremă cât și pentru ser, având câte două seturi de imagini achiziționate, am calculat valorile medii. Valorile obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos.

	Zone	Procentaj pixeli evidențiați	
		Cremă	Ser
Proba 1	Zona 1	0.58 %	0.054 %
	Zona 2	0.63 %	0.049 %
	Zona 3	0.49 %	0.052 %
Procentaj mediu pixeli evidențiați		0.56 %	0.051 %
Proba 2	Zona 1	0.65 %	0.043 %
	Zona 2	0.55 %	0.021 %
	Zona 3	0.56 %	0.051 %
Procentaj mediu pixeli evidențiați		0.58 %	0.038 %

Tabel 4.1 Valori medii corespunzătoare pixelilor care au un peak maxim în intervalul 550-590 nm din numărul total de pixeli din imagine

În final, am evidențiat pixelii cu răspunsul spectral care prezintă un peak maxim la valoarea de 570 nm cu o toleranță de 20 nm. Rezultatele măsurătorilor sunt ilustrate în **Fig. 4.9 C** respectiv **Fig 4.10 C**, iar în **Tabelul 4.1** vedem valorile medii ale procentajelor pixelilor găsiți în cazul cremei și serului. Crema prezintă pixeli cu semnal în medie de **0.56 %** (proba 1) respectiv **0.58 %** (proba 2) în timp ce serul prezintă pixeli cu semnal în medie de **0.051 %** (proba 1) respectiv **0.038 %** (proba 2) După cum putem observa, concentrațiile de colagen din crema și serul studiate sunt diferite. Producătorii de produse cosmetice nu sunt obligați să afișeze aceste informații pe etichetă. Reglementările și cerințele specifice privind etichetarea produselor cosmetice pot varia în funcție de țară sau regiune. De asemenea, nu cunoaștem dimensiunea particulelor de colagen sau structura exactă a acestora. În general, producătorii sunt responsabili de siguranța și conformitatea produselor lor pe piață, iar aceste informații ar trebui dezvăluite pentru siguranță și eficacitate.

4.2 Discuție

Această tehnică se află încă la început de drum în ceea ce privește detectarea și caracterizarea materialelor nanometrice. Există anumite limitări în aplicarea acestei tehnici, iar pentru a le depăși și pentru a permite o utilizare mai largă și mai exactă, sunt necesare câteva considerații importante:

Este crucială o analiză detaliată a materialului ce urmează să fie detectat. Aceasta implică construirea unor biblioteci spectrale de referință cât mai extinse, care să cuprindă diferite tipuri de nanomateriale și să ofere informații specifice despre spectrele lor. Această etapă este esențială pentru a obține rezultate precise.

Particulele utilizate în produsele comerciale pot prezenta o serie de caracteristici, cum ar fi dimensiunea, forma, comportamentul de agregare, etc. Aceste aspecte pot afecta semnificativ spectrele HSI obținute și pot genera modificări.

Un alt factor important care trebuie luat în considerare sunt parametrii precum puterea sursei de iluminare și durata expunerii care pot provoca variații semnificative ale profilelor spectrale. Este de preferat ca experimentele să fie efectuate într-o încăpere întunecată deoarece lumina din cameră poate afecta achiziția imaginilor.

Deși tehnica are încă limitări și necesită dezvoltări suplimentare, există progrese semnificative în domeniu. Imagistica hiperspectrală este o tehnică avansată de imagistică, care capturează informații într-un spectru larg de lungimi de undă, permițând analiza și vizualizarea detaliată a diferitelor probe analizate. Prin aplicarea acestei tehnici asupra particulelor de colagen din produsele cosmetice, se poate obține o imagine multidimensională a acestora, care dezvăluie informații despre structura, concentrația, distribuția și interacțiunile cu alte componente.

Utilizarea imagisticii hiperspectrale în caracterizarea particulelor de colagen din produsele cosmetice aduce numeroase avantaje și oportunități care includ:

- ♦ Identificarea și autentificarea colagenului – poate detecta și identifica specific colagenul din compoziția produselor analizate;
- ♦ Analiza compoziției chimice – permite identificarea originii colagenului care poate fi de origine animală sau vegetală;

- ♦ Dezvoltarea de produse inovatoare – cunoașterea detaliată a caracteristicilor particulelor de colagen prin intermediul acestei metode poate stimula dezvoltarea de produse cosmetice inovatoare, cu performante superioare și beneficii îmbunătățite pentru piele.

Din analiza optică a imaginilor, putem observa ușor diferențele dintre particulele de colagen din cele două produse cosmetice analizate. Dimensiunea particulelor diferă, cele din ser având o dimensiune mai redusă decât cele din cremă. După cum se observă în imaginile din **Fig. 4.9** respectiv **Fig. 4.10**, crema conține mai puține particule, acestea având dimensiuni mai mari, iar serul conține mai multe particule de dimensiuni reduse. Semnătura spectrală a colagenului obținută cu ajutorul sistemului utilizat confirmă caracteristicile spectrale ale absorbției particulelor de colagen obținute în literatură, acestea situându-se în intervalul 500 nm -1700 nm. [43]

Concluzii

Particulele de colagen sintetizate sub forme sau dimensiuni diferite sunt sursa de proteine ale pielii, îi conferă rezistență, elasticitate și capacitate de regenerare. Odată cu vârsta, capacitatea pielii de a produce colagen începe încet să scadă rezultând apariția ridurilor și pierderea fermității conturului feței.

Imagistica hiperspectrală în câmp întunecat reprezintă o tehnică promițătoare pentru detectarea nanomaterialelor în produsele de consum. Această metodă microscopică permite vizualizarea rapidă a acestor materiale fără a necesita o manipulare sau pregătire extinsă a probelor. Tehnica utilizează captarea informațiilor spațiale și spectrale în domeniul vizibil și infraroșu apropiat (400-1000 nm) pentru fiecare pixel în parte, informațiile fiind compilate într-un cub de date hiperspectral. Utilizarea imaginilor hiperspectrale în câmp întunecat permite detectarea nanomaterialelor într-un mod neinvaziv și rapid, oferind informații detaliate despre distribuție și caracteristici spectrale. De asemenea, prin utilizarea unor algoritmi de analiză, este posibilă identificarea și caracterizarea diferitelor materiale.

În studiul de față sunt dovedite potențialul și capacitatea acestei metode de imagistică hiperspectrală în câmp întunecat pentru a caracteriza particule de colagen cu maximul spectrului de absorbție la 600 nm. Am ales această referință pentru a detecta particule de colagen cu

proprietăți asemănătoare din crema hidratantă și serul de refacere, iar ca rezultat am identificat pixelii din imagini care conțin particule cu aceste caracteristici. Timpul scurt de achiziție a imaginilor optice și hiperspectrale, instrumentele de procesare și analiza datelor obținute sunt câteva avantaje ale acestei tehnici.

În cadrul acestei lucrări am prezentat noțiunile introductive ale metodei de microscopie hiperspectrală în câmp întunecat, am achiziționat o serie de imagini optice și imagini hiperspectrale a unor probe prelevate dintr-o crema hidratantă și un ser de refacere. Am arătat datele obținute și apoi m-am folosit de programele OCULAR, ENVI 4.8 și ImageJ pentru a atinge scopul acestei lucrări. Caracterizarea particulelor de colagen din componența produselor cosmetice cu ajutorul imagisticii hiperspectrale deschide oportunități pentru dezvoltarea și controlul calității produselor cosmetice, abordarea tematicii și rezultatele obținute fiind amprenta personală a acestei lucrări.

Bibliografie

- [1] <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wnan.1330> accesat la data 03.01.2023
- [2] Gamal Elmasry, Mohammed Kamruzzaman, Da-Wen Sun & Paul Allen (2012): Principles and Applications of Hyperspectral Imaging in Quality Evaluation of Agro-Food Products: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:11, 999-1023
- [3] Rawil Fakhrullin, Läysän Nigamatzyanova, Gölnur Fakhrullina, Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research, *Science of The Total Environment*, Volume 772, 2021, 145478
- [4] Zamora-Perez P, Tsoutsi D, Xu R, Rivera Gil P. Hyperspectral-Enhanced Dark Field Microscopy for Single and Collective Nanoparticle Characterization in Biological Environments. *Materials (Basel)*. 2018;11(2):243. Published 2018 Feb 6.
- [5] Marena Manley, Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials - *Chemical Society Reviews (RSC Publishing)* *Chem. Soc. Rev.*, 2014,43, 8200-8214
- [6] <https://www.cytoviva.com/cytoviva-hyperspectral-microscope> accesat la data 03.01.2023
- [7] Enhanced Darkfield Illumination: Label-Free Imaging at the Nanoscale | Olympus LS (olympus-lifescience.com) accesat la data 04.01.2023
- [8] <https://www.cytoviva.com/cytoviva-enhanced-darkfield-microscopy> accesat la data 04.01.2023
- [9] <https://microscopewiki.com/brightfield-vs-darkfield-microscope/> accesat la data 04.01.2023
- [10] https://en.wikipedia.org/wiki/Bright-field_microscopy accesat la data 04.01.2023
- [11] <https://www.olympus-lifescience.com/en/discovery/what-is-darkfield-microscopy/> accesat la data 04.01.2023
- [12] <https://www.microscopyu.com/techniques/stereomicroscopy/darkfield-illumination> accesat la data 16.02.2023
- [13] <https://www.cytoviva.com/hyperspectral-image-acquisition> accesat la data 16.02.2023

- [14] Xingchen Dong, Martin Jakobi, Shengjia Wang, Michael H. Kohler, Xiaoxing Zhang, Alexander W. Koch, „A review of hyperspectral imaging for nanoscale material research”, pages 285-305, Volume 54, 2019
- [15] Akin Ozdemir, Kemal Polat (2020). Deep Learning Applications for Hyperspectral Imaging: A Systematic Review. *Journal of the Institute and Computer*, 2, 39-56
- [16] Shaw, Gary & Manolakis, Dimitris. (2002). Signal processing for hyperspectral image exploitation. *Signal Processing Magazine, IEEE*. 19. 12 - 16. 10.1109/79.974715.
- [17] Lu, Guolan & Fei, Baowei. (2014). Medical hyperspectral imaging: A review. *Journal of biomedical optics*. 19. 10901. 10.1117/1.JBO.19.1.010901.
- [18] <https://ro.wikipedia.org/wiki/Colagen> accesat la data 15.04.2023
- [19] Michael WH Kirkness, Kathrin Lehmann, Nancy R Forde, Mechanics and structural stability of the collagen triple helix, *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 53, 2019, Pages 98-105, ISSN 1367-5931
- [20] Matinong, Andrea & Chisti, Yusuf & Pickering, K. & Haverkamp, Richard. (2022). Collagen Extraction from Animal Skin. *Biology*. 11. 905. 10.3390/biology11060905.
- [21] Gelse, Kolja & Pöschl, Ernst & Aigner, Thomas. (2003). Collagens—Structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*. 55. 1531-46. 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- [22] <https://pdb101.rcsb.org/motm/4> accesat la data 25.04.2023
- [23] Brett, David W.. “A Historical Review of Enzymatic Debridement: Revisited A Historical review of Enzymatic Debridement: Revisited.” (2019)
- [24] Owczarzy A, Kurasiński R, Kulig K, Rogóż W, Szkudlarek A, Maciążek-Jurczyk M. Collagen - structure, properties and application. *Engineering of Biomaterials*. 2020;(156):17-23.
- [25] <https://incidecoder.com/ingredients/soluble-collagen> accesat la data 03.05.2023
- [26] Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H. Current Insights into Collagen Type I. *Polymers (Basel)*. 2021;13(16):2642. Published 2021 Aug 9
- [27] https://en.wikipedia.org/wiki/Type_I_collagen accesat la data 03.05.2023
- [28] Berillis, Panagiotis. (2015). Marine Collagen: Extraction and Applications.
- [29] Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*. 2019;707:151-171.

- [30] Hans Peter Bächinger, Kazunori Mizuno, Janice A. Vranka, Sergei P. Boudko, 5.16 - Collagen Formation and Structure, Editor(s): Hung-Wen (Ben) Liu, Lew Mander, Comprehensive Natural Products II, Elsevier, 2010, Pages 469-530, ISBN 9780080453828.
- [31] Ki. M Mak, Rena Mei, Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value Fibrosis Biomarkers of Liver Disease, The Anatomical Record, Volume 300, 2017, pages 1371-1390.
- [32] https://en.wikipedia.org/wiki/Type_IV_collagen accesat la data 05.05.2023
- [33] Sara Sibilla, Martin Godfrey, Sarah Brewer, Anil Budh-Raja, Licia Genovese, An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies, The Open Nutraceuticals Journal, 2015, 8, 29-42
- [34] <https://www.tiege.com/blogs/news/is-soluble-collagen-good-or-bad-for-your-skin> accesat la data 07.05.2023
- [35] https://www.ewg.org/skindeep/ingredients/706217-SOLUBLE_COLLAGEN/ accesat la data 07.05.2023
- [36] Sara Sibilla, Martin Godfrey, Sarah Brewer, Anil Budh-Raja, Licia Genovese, An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies, The Open Nutraceuticals Journal, 2015, 8, 29-42
- [37] <https://cdn2.hubspot.net/hubfs/2046348/Facebook/Files/WhatIsCollagen.pdf> accesat la data 07.05.2023
- [38] <https://theredtree.co.uk/articles/the-amazing-history-of-collagen/> accesat la data 07.05.2023
- [39] Sionkowska, A.; Adamiak, K.; Musiał, K.; Gadomska, M. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. *Materials* **2020**, *13*, 4217
- [40] Mearns-Spragg A, Tilman J, Tams D and Barnes A (2020) The Biological Evaluation of Jellyfish Collagen as a New Research Tool for the Growth and Culture of iPSC Derived Microglia. *Front. Mar. Sci.* 7:689
- [41] Meison Furtado, Liang Chen, Zehao Chen, Ao Chen, Wenguo Cui, Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery, *Engineered Regeneration*, Volume 3, Issue 3, 2022, Pages 217-231, ISSN 2666-1381
- [42] <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf> accesat la data 12.06.2023

- [43]** Sekar SK, Bargigia I, Mora AD, Taroni P, Ruggeri A, Tosi A, Pifferi A, Farina A. Diffuse optical characterization of collagen absorption from 500 to 1700 nm. J Biomed Opt. 2017 Jan 1;22(1):15006.
- [44]** https://cytoviva.cn/wp-content/uploads/2021/pdf/CytoViva-User-Manual_10022020.pdf accesat la data 23.06.2023

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnata, **Taşnadi Teodora**, declar că Lucrarea de licență/diplomă/disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de **Fizică**, secția **Fizică Medicala**, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea **Iulie 2023**, sub îndrumarea **Conf. Dr. Zoltán Bálint**, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

25.06.2023

Nume,

Taşnadi Teodora

Semnătură,

