

UTILIZAREA MICROSCOPULUI HOLOGRAFIC DIGITAL ÎN STUDIUL PREPARATELOR BIOLOGICE

Dr. Ludmila BATÎR

Dr., conf. univ. Aliona GLIJIN

Masterand Adriana ACCIU

Masterand Maria GORCEAG

*Universitatea Academiei de Științe
a Moldovei*

APPLICATION OF DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPY FOR IMAGING BIOLOGICAL SAMPLES

Summary. The paper reviews the current trends and practices of using digital holographic microscopy which in recent years has been increasingly used in visualization of biological objects. Also, it is outlined the principle of holography is the breakdown of the laser beam into two parts: one for reference and one of the object and then recording them overlap.

Using a digital holographic microscopy to generate three dimensional representations of samples observed in a microscope provides several advantages over confocal microscopy in terms of cost and speed of capture that could lend it usefulness in observing processes with timescales which are currently unable to be observed using other three dimensional techniques.

Keywords: digital holographic microscopy, biological preparations.

Rezumat. În articol sunt trecute în revistă tendințele și practicile actuale de utilizare a microscopiei holografice digitale, tot mai des utilizată în ultimii ani pentru vizualizarea obiectelor biologice. Este elucidat, de asemenea, principiul holografiei, care constă în descompunerea fascicolului laser în două: unul de referință și unul de obiect și apoi înregistrarea suprapunerii lor.

Utilizarea microscopiei holografice digitale pentru a genera imagini 3D ale probelor observate la un microscop oferă anumite avantaje față de microscopia confocală în ceea ce privește costul și viteza de captură, care ar putea fi mai utile în procesele ce nu pot fi observate prin folosirea altor tehnici 3D.

Cuvinte-cheie: microscopie holografică digitală, preparate biologice.

Istoria microscopiei holografice a început în 1948, când Dennis Gabor a propus o metodă de a evita aberația sferică și a îmbunătăți calitatea imaginii în microscopia electronică pentru a economisi lentilele din sistemul experimental [1, 2]. Holografia digitală evită prelucrarea chimică și alte proceduri atribuite holografiei clasice și permite post-procesarea digitală a hologramei înregistrate. Astfel, reconstrucția imaginii holografice, care conține informații despre frontul de undă al obiectului, se face numeric cu ajutorul calculatorului și poate furniza informații tridimensionale ale suprafeței obiectului sau datele grosimii optice [3, 4].

În ultimii ani, imaginile optice tridimensionale au apărut ca un instrument de ghidaj pentru descoperirile științifice dintr-un șir de domenii, inclusiv fizica materiei condensate, știința materialelor și științele biologice. Tehnicile microscopiei confocale permit caracterizarea cantitativă a structurii și dinamicii diferitor sisteme. Constituirea unei imagini tridimensionale, folosind microscopia optică, necesită o scanare mecanică printr-un eșantion foarte subțire, astfel aceste tehnici fiind limitate la anumite procese ce se desfășoară mai lent în timp.

Actualmente, microscopia holografică digitală se dezvoltă vertiginos și are drept scop depășirea multor obstacole în calea obținerii unor imagini de calitate înaltă. Un microscop holografic simplu constă dintr-un laser, aparat de fotografiat și lentile obiectiv. Laserul difuzează lumina pe structurile probei microscopice, iar imaginile de pe cameră interferează între lumina difuză și cea nestructurată. Acest fel de imagine este numit hologramă.

Pentru a vedea cum acest aparat tehnic asigură o imagine tridimensională, se utilizează un plan coerent difuzând într-un punct idealizat al particulei. Această particulă reprezintă elementul care difuzează lumina în proba microscopică, și ar putea fi o nanoparticulă în soluție, de exemplu, sau o structură subcelulară. În microscopia holografică digitală, holograma este capturată pe un aparat de fotografiat digital, iar reconstrucția se face prin trecerea luminii înapoi prin hologramă (Figura 1) [5, 6].

Microscopia holografică digitală poate fi, de asemenea, efectuată fără utilizarea lentilelor imagistice prin înregistrarea directă a unui front de undă difractat de un obiect mic. Astfel, holografia digitală oferă o serie de avantaje semnificative, cum ar fi: capacitatea de a obține rapid holograme, disponibilitatea de amplitudine completă.

Pentru multe domenii de aplicare, funcționarea în timp real este importantă, dar dificilă, cu utilizarea holografiei convenționale. Holografia digitală înlo-

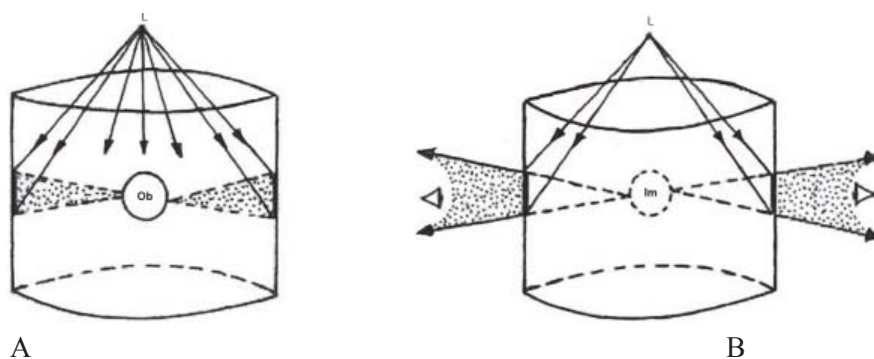


Fig. 1. Înregistrarea (A) și reconstrucția (B) imaginii tridimensionale a unui obiect [7]
(L – laser; ob – obiect; im – imagine)

cuieste procesele fizice și chimice de înregistrare cu cele electronice, precum și procesul de reconstrucție optică cu calculul numeric. Astfel, în cazul holografiei generate de un computer, holograma poate fi produsă prin calcul numeric în interiorul acestuia, urmată de imprimare sau alte ieșiri la spațiul real [5].

Dezvoltarea calculatoarelor și metodelor de prelucrare digitală a datelor a condus la o nouă etapă în microscopie. Astfel, problema de vizualizare 3D a microobiectelor a fost rezolvată prin combinarea metodelor holografice cu cele de prelucrare a imaginilor digitale.

Primul microscop digital holografic care asigură vizualizarea imaginilor 3D în timp real și măsurarea parametrilor geometrici ai obiectelor microscopice de fază, a fost creat în baza unui microscop holografic. Acesta integrează microinterferometrul holografic cu procesarea digitală a interferogramelor. În anul 1998, folosind microscopul holografic digital, pentru prima dată a devenit posibilă obținerea imaginilor 3D a eritrocitelor din sângele uman (Figura 2) [8, 9, 10].

La doi ani după realizarea primelor holograme plane, Leith și Upatnieks anunță procedeul de extindere a imaginilor tridimensionale, respectiv obține-

rea efectului în profunzime, de stereoscopie, în mod obiectiv. Succesul înregistrat se datorează proprietăților de coerență spațială și temporală a radiațiilor utilizate de laser. Astfel, un fascicul de raze paralele este îndreptat spre o oglindă plană ce le dirijează către placa fotografică, iar celălalt fascicul iluminează obiectul tridimensional ce poate fi considerat că este format dintr-o infinitate de puncte. O parte din lumina reflectată de obiect ajunge pe placa fotografică unde interferează cu lumina reflectată de oglindă. Astfel, are loc formarea unei figuri de interferență foarte complicată, alcătuită dintr-un ansamblu de figuri circulare a fondului coerent cu undele ce vin de la diferite puncte ale obiectului tridimensional. După dezvoltare, holograma obținută este iluminată cu un fascicul luminos coerent, dar identic cu cel ce a servit la înregistrare și imaginea obiectului tridimensional se reconstituie punct cu punct (Figura 3) [5, 10, 11].

La înregistrarea hologramei, unda obiect și unda de referință trebuie să fie reciproc coerente. Pentru a obține holograme de bună calitate, pe lângă gradul înalt de coerență este necesară o intensitate luminoasă bună. Înregistrarea hologramei necesită precauții experimentale destul de severe, cum ar fi stabilitate-

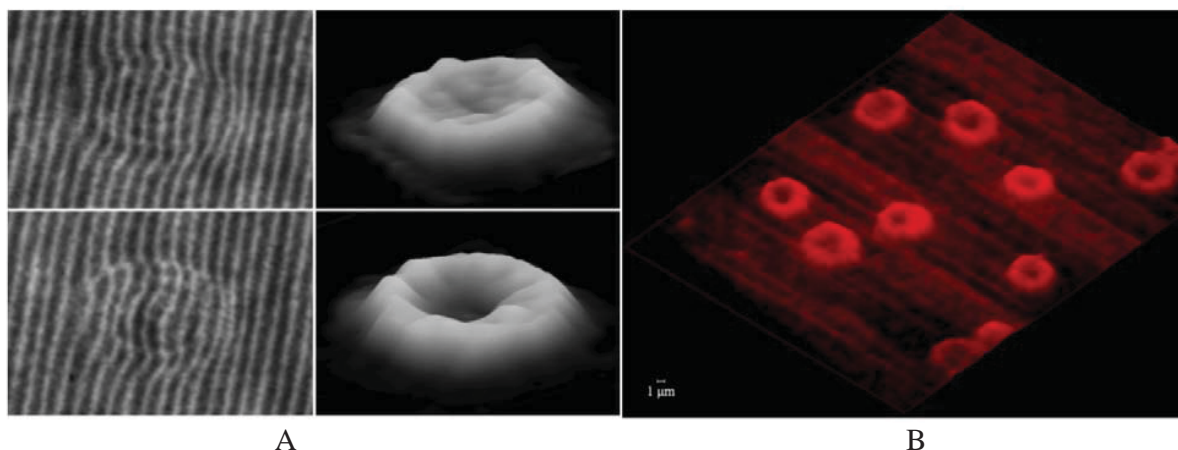


Fig. 2. Imagini 3D a eritrocitelor individuale netratate (A) și imaginea 3D a frotiului din sângele uman (B) obținut prin microscopia holografică digitală [10]

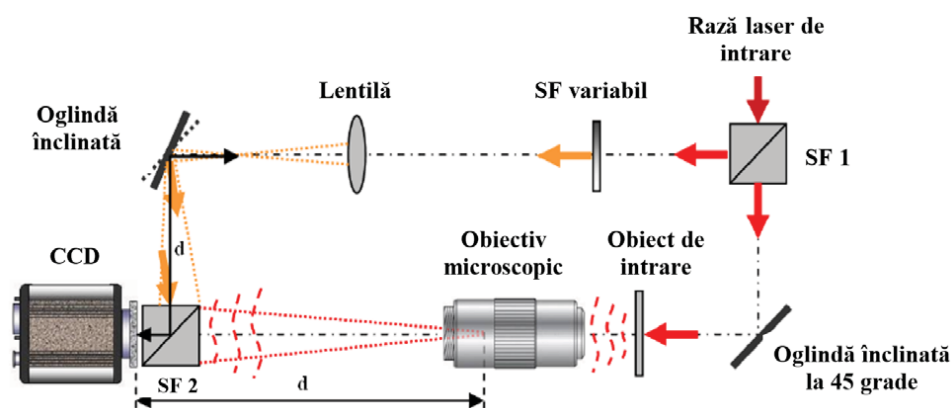


Fig. 3. Configurarea interferometrică a microscopului holografic digital de către Match-Zehnder [5] (SF – separator de fascicule; CCD – cameră digitală color)

tea foarte bună a instalației holografice, sau raportul (invers) dintre intensitatea luminoasă a fascicului laser și timpul de expunere. Pe de altă parte, timpul de expunere într-o astfel de situație depinde de o diversitate de factori, precum: capacitatea de reflectare a obiectului, distanțele și geometria instalației adoptate, caracteristicile filmului folosit etc. La utilizarea unor laseri în regim pulsatoriu, timpul de expunere poate coborî la nivelul nano- sau chiar picosecundelor, însă la utilizarea unor pulsuri laser gigantice obiectul se încălzește, iar proprietățile lui și configurația sa spațială se modifică, astfel având de suferit calitatea hologramei [5, 6, 11].

Principiul holografiei constă în descompunerea fascicului laser în două: unul de referință și unul de obiect și apoi înregistrarea suprapunerii lor. Marile avantaje ale tehnicilor de holografie digitală sunt: dintr-o singură hologramă achiziționată pe o cameră video (CCD sau CMOS) putem reconstrui simultan *amplitudinea și faza undei de la obiect și detalii ale obiectului din planurile situate la distanțe diferite de-a lungul direcției de propagare.*

Spre deosebire de holografia clasică, potrivit că-

reia figura de interferență dintre unda de referință și cea difractată de obiect se înregistrează pe o placă holografică, care ulterior era dezvoltată chimic pentru a obține holograma, iar imaginea virtuală a obiectelor se reconstitua experimental în montaje complexe, holografia digitală înregistrează holograma pe o matrice CCD sau CMOS, evitându-se procesele chimice consumatoare de timp. Obiectele sunt reconstruite digital, printr-un algoritm bazat pe simularea propagării, fiind disponibilă imaginea obiectelor în format electronic și oferindu-se posibilitatea comparării soft cu imaginea aceluiași obiect în diferite situații (Figura 4) [12].

Actualmente, se impune obținerea imaginilor obiectelor microscopice reale în lumină coerentă, avantajul fiind informația de fază care nu se pierde, iar detaliile în adâncime de ordinul câtorva *nm* sunt ușor puse în evidență. Generarea hologramelor pe computer pot permite obținerea imaginilor obiectelor virtuale folosind algoritmi specifici cu o reconstrucție experimentală utilizând un modulator spațial de lumină [12].

Metoda dată implică mai multe domenii știin-

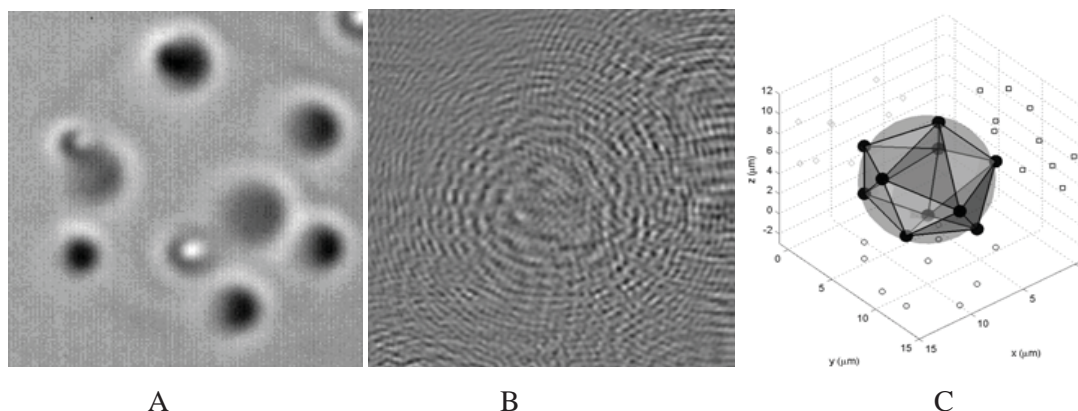


Fig. 4. Imaginile a 10 particule într-o picătură de emulsie văzute la un microscop cu iluminare intensă (A), holograma unui microscop holografic digital (B) și reconstrucția hologramei ce reprezintă poziția picăturilor date în emulsie și proiectarea lor în poziții plane coordonate (C) [2]

țifice și tehnice, incluzând un ansamblu mecanic și optic în montajele experimentale, dar și o complexitate computațională dată de algoritmi iterativi folosiți, de softurile specializate în filtrarea și prelucrarea imaginilor. Metoda este complexă, combinând optica, electronica, prelucrarea și transmiterea informației (imagini, baze de date numerice).

În prezent, diagnosticul medical și monitorizarea bolilor au o importanță deosebită pentru medicină, având în vedere că celulele biologice sunt obiecte dinamice microscopice cu dimensiuni tridimensionale și alte caracteristici biofizice. În cea mai mare parte celulele biologice sunt transparente, iar imaginile cu intensitatea luminii pe bază convențională nu oferă contrast optic adecvat. Astfel, microscopia digitală poate servi un puternic instrument de cercetare în studiul celulelor biologice și un potențial mijloc de diagnostic medical și de monitorizare a bolilor.

Studiul a fost efectuat în cadrul proiectului bilateral moldo-german (cifra 13.820.15.10/GA) din programul de colaborare bilaterală între Academia de Științe a Moldovei și Ministerul Federal al Educației și Cercetării din Germania.

Bibliografie

1. Bates, D., Kleckner N. *Chromosome and Replication Dynamics in E. coli: Loss of Sister Cohesion Triggers Global Chromosome Movement and Mediates Chromosome Segregation*. Cell, vol. 121(6), 2005, pp. 899-911.
2. Vinathan, N. M. *Digital Holographic Microscopy for 3D Imaging of Complex Fluids and Biological Systems*. Frontiers of Engineering: Reports on Leading-Edge

Engineering from the 2009 Symposium, 2010, pp. 1-8.

3. Discher, D. E., Janmey, P. et al. *Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate*. Science, vol. 310 (5751), 2005, pp. 1139-1143.

4. Ingber, D. E. *Mechanosensation through integrins: Cells act locally but think globally*. National Acad Sciences, 2003.

5. Micó, V., Ferreira, C., Zalevsky, Z., García, J. *Basic principles and applications of digital holographic microscopy*. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, 2010, pp. 1411-1418.

6. Myung, K. *Principles and techniques of digital holographic Microscopy*. SPIE Reviews an open access review journal, vol. 1, 2010, pp. 1-50.

7. Popescu, I., Uliu, Fl. S. *Bazele fizice ale opticii, Optica scalară*. 1998, vol. 1, 522 p.

8. Bergoënd, C., Arfire, N., Pavillon, C. *Diffraction tomography for biological cells imaging using digital holographic microscopy*. Laser Applications in Life Sciences, vol. 7376, 2010, pp. 1-8.

9. Ricardo, J., Muramatsu, M., Palacios, F., et al. *Photorefractive digital holographic microscopy*. RIAO-OPTILAS, 2010, pp. 1.

10. Tishko, T. V., Tishko, D. N., Titur, V. P. *Holographic methods for phase microscopic objects study*. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, 2010, pp. 2117-2128.

11. Sucerquia, J. G. *Microscopía holográfica digital sin lentes: una herramienta para estudiar el micromundo en cuatro dimensiones*. Dyna, Edición Especial, 2012, pp. 29-37.

12. Yethiraj, A., Blaaderen A. van. *A colloidal model system with an interaction tunable from hard sphere to soft and dipolar*. Nature, vol. 421(6922), 2003, pp. 513-517.



Tudor Zbârnea. *Dans arhaic*, u/p, 145 × 180 cm, 2008