

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 088**

51 Int. Cl.:

G02B 21/16 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2002** **E 02742556 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2012** **EP 1399730**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo destinado a la obtención por microscopía de imágenes en tres dimensiones de una muestra**

30 Prioridad:

29.06.2001 EP 01870147

18.12.2001 EP 01870281

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.03.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES (100.0%)
50, AVENUE F.D. ROOSEVELT
1050 BRUXELLES, BE

72 Inventor/es:

DUBOIS, FRANK y
YOURASSOWSKY, CATHERINE

74 Agente/Representante:

ISERN CUYAS, María Luisa

ES 2 398 088 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo destinados a la obtención por microscopía de imágenes en tres dimensiones de una muestra.

La presente invención concierne a un procedimiento y un dispositivo que permiten obtener por microscopía imágenes en tres dimensiones de una muestra y obtener en tres dimensiones del campo de fluorescencia emitido por dicha muestra, siendo previamente marcada esta muestra fluorescente con la ayuda de uno o varios fluorocromos.

Una de las aplicaciones de dicho procedimiento y de dicho dispositivo concierne, más particularmente, a la obtención de imágenes en tres dimensiones de la fluorescencia emitida por las muestras biológicas que pueden ser de espesor, para observar su comportamiento dinámico y su evolución en el tiempo.

Estado de la Técnica

La microscopía de fluorescencia clásica supuso un progreso decisivo en el campo de la biología. En particular, la técnica de la inmunofluorescencia ha permitido realizar el marcaje específico de moléculas y su localización en los tejidos. Por otro lado, el descubrimiento de las GFP, las "proteínas verdes fluorescentes", revolucionó el estudio de la localización, de la dinámica y de las interacciones de las proteínas en las células vivas.

Sin embargo, uno de los problemas encontrados en la microscopía fluorescente clásica reside en la fluorescencia emitida por los elementos situados fuera del plano de nitidez. Esta luz parásita impide una buena lectura de la imagen, añadiendo un ruido de fondo importante. Las imágenes resultan muy difíciles de interpretar cuando se observa las muestras biológicas de espesor, como los embriones.

La microscopía confocal permite, mientras tanto, evitar este problema realizando una excitación de la fluorescencia de la muestra en una zona de muy pequeñas dimensiones, la cual barre la muestra, y el bloqueo por una pequeña abertura de la fluorescencia emitida fuera de la zona iluminada.

No obstante, la microscopía confocal presenta también sus propios inconvenientes.

Un primer inconveniente de la microscopía confocal es que dicha técnica requiere el barrido completo de la muestra por un dispositivo óptico-mecánico. Esta operación requiere de un tiempo relativamente importante para analizar un volumen (típicamente, del orden de unos segundos) antes de que la imagen esté disponible para su visualización.

Por otro lado, la fuerza excitatoria utilizada en microscopía confocal es generalmente un láser Argón ó Argón-Kriptón que pueda dañar las muestras biológicas.

Otro inconveniente es que las fuerzas excitatorias no permiten cubrir fácilmente toda la gama de longitudes de onda necesarias para la observación en fluorescencia.

Finalmente, la microscopía confocal es una técnica extremadamente sofisticada que requiere una gran precisión al manipularla y que también resulta costosa económicamente.

El documento US 6 038 041 propone una técnica alternativa a la microscopía de fluorescencia holográfica y describe un sistema óptico por barrido destinado a reconstruir la fluorescencia en tres dimensiones proveniente de una muestra. Por eso, barriendo la muestra con una figura de interferencia concreta en la zona de Fresnel, de acuerdo con un barrido de dos dimensiones, se detecta y luego analiza la luz fluorescente proveniente de la muestra.

Objeto de la invención

La presente invención está diseñada para proporcionar un procedimiento y un dispositivo que permitan obtener, por microscopía, imágenes en tres dimensiones y medir en tres dimensiones la fluorescencia emitida por una muestra, en particular una muestra espesa, y que no presente los inconvenientes de las técnicas de microscopía clásicas, incluyendo los de la microscopía confocal.

En particular, la presente pretende proporcionar un procedimiento y un dispositivo que permitan, al mismo tiempo, obtener imágenes en tres dimensiones de la muestra y del campo de fluorescencia de esta muestra; es decir, obtener información sobre la repartición de la fluorescencia a lo largo del volumen de la muestra, y eventualmente seguir su evolución en el tiempo, con un desfase de tiempo mínimo entre cada toma de imágenes.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento y un dispositivo que no necesiten una manipulación muy compleja y cuyo coste sea competitivo, especialmente con respecto a la microscopía confocal.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo que permitan obtener imágenes en tres dimensiones de una muestra, preferentemente una muestra biológica espesa, y obtener el campo de fluorescencia en tres dimensiones emitido por dicha muestra mediante la conexión de señales interferométricas obtenidas por holografía digital y señales de fluorescencia.

Por "muestra espesa" se entiende una muestra cuyas dimensiones son tales que es imposible tener una imagen nítida sobre toda la profundidad de la muestra por un procedimiento de microscopía clásica.

En realidad, un primer objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para obtener, por microscopía, imágenes en tres dimensiones de una muestra, en particular una muestra biológica espesa, y del campo de fluorescencia emitido por dicha muestra, caracterizado porque comprende:

- una etapa de medición y registro, durante la cual se mide y registra de manera secuencial e independiente, por una parte las señales interferométricas obtenidas por holografía digital y, por otra las señales de fluorescencia, resultante de la muestra;
- una etapa de tratamiento, en curso de la cual se combinan las citadas señales interferométricas obtenidas por holografía digital y las citadas señales de fluorescencia así registradas, con el fin de reconstruir imágenes nítidas, en tres dimensiones, de la muestra en sí misma y del campo de fluorescencia emitido por la muestra en un momento dado.

De preferencia, se repiten en el tiempo dichas etapas de medición y registro, y de tratamiento, de modo que sigan la evolución de las imágenes en tres dimensiones de la muestra y el campo de fluorescencia de dicha muestra.

De manera ventajosa, la combinación de las señales interferométricas obtenidas por holografía digital y de las señales de fluorescencia para reconstruir las imágenes nítidas en tres dimensiones de la muestra en estudio y del campo de fluorescencia de dicha muestra, se realiza mediante análisis numérico.

Un segundo objeto de la presente invención pretende proporcionar un dispositivo para la implementación del procedimiento arriba descrito, el cual comprende un microscopio funcionando en holografía digital, combinado con una fuerza de excitación de la fluorescencia.

De preferencia, la fuerza de excitación de la fluorescencia funciona en modo de reflexión o de transmisión.

Ventajosamente, el microscopio que funciona en holografía digital comprende una fuente de luz parcialmente coherente, o eventualmente coherente, funcionando en transmisión y que es capaz de generar una fuente de haz de luz.

Según una primera realización preferida de la invención, la fuente de luz parcialmente coherente de dicho microscopio comprende los siguientes elementos: una fuente emisora de luz de longitud espectral reducida, una primera lente, una primera abertura, una segunda lente, una segunda abertura y una tercera lente, siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, la luz emitida por la fuente emisora de luz encuentra sucesivamente la primera lente, la primera abertura, la segunda lente, la segunda abertura y la tercera lente y la luz en la salida de la tercera lente es una luz colimada.

Según otra realización preferida de la invención, la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos:

una fuente emisora de luz de longitud espectral reducida, una fibra óptica, una primera lente, una segunda lente, una tercera lente y una abertura con apertura ajustable, siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, la luz emitida por la fuente emisora de luz pasa primero a través de la fibra óptica a fin de tener un campo luminoso homogéneo, posteriormente encuentra la primera lente, luego la segunda y la tercera lente para obtener una luz colimada sobre la abertura.

Según otra realización preferida de la invención, la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos:

una fuente láser, una primera lente, un difusor giratorio, una segunda lente y una abertura, siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, el haz láser emitido por la fuente láser encuentra en primer lugar la primera lente, luego el difusor giratorio que está situado detrás el punto focal de la citada primera lente, posteriormente la segunda lente situada en la distancia focal con respecto al plano del difusor giratorio, y finalmente la citada abertura.

Según otra realización preferida de la invención, la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos: una fuente láser, una primera lente, un difusor giratorio tal como vidrio esmerilado, y una segunda lente, siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, el haz láser emitido por la fuente láser pasa primero a través de la primera lente, luego del difusor y

luego de la segunda lente, estando el haz láser de salida de la primera lente focalizado en un punto de focalización situado aguas arriba del difusor a una distancia regulable del mismo. Una de estas fuentes se utiliza con el microscopio holográfico de la presente invención sin la presencia de las lentes de dicho microscopio.

De preferencia, el microscopio que funciona en holografía digital comprende además:

- un primer subconjunto, móvil, comprendiendo un separador de haz y un espejo, para formar dos haces paralelos, un haz objeto y un haz de referencia a partir de la fuente de haz luminosa;
- medios, preferentemente espejos, para dirigir la fuente de haz luminosa sobre el primer subconjunto, del separador de haz;
- un segundo subconjunto, fijo o móvil, que comprende igualmente un separador de haz y un espejo, para combinar dicho haz objeto y dicho haz de referencia en un haz luminoso recombinado;
- una célula objeto que comprende una muestra a estudiar, dispuesta sobre el trayecto óptico del haz objeto entre el primer y el segundo subconjunto;
- un primer objetivo del microscopio, sobre el trayecto óptico del haz objeto entre el primer y el segundo subconjunto, aguas debajo de la célula objeto;
- medios de compensación del trayecto óptico, dispuestos sobre el trayecto óptico del haz de referencia entre el primer y el segundo subconjunto;
- un segundo objetivo del microscopio, dispuesto sobre el trayecto óptico del haz de referencia entre el primer y el segundo subconjunto, aguas debajo de los citados medios de compensación del trayecto óptico;
- primeros medios de focalización capaces de focalizar el haz objeto sobre la célula objeto;
- segundos medios de focalización capaces de focalizar el haz de referencia sobre los citados medios de compensación del trayecto óptico.

De preferencia, los citados medios de compensación del trayecto óptico comprenden una célula de referencia comparable con la célula objeto aunque no comprenden la muestra a estudiar.

De preferencia, los citados medios de compensación del trayecto óptico comprenden un material transparente de espesor y composición adecuada.

Unos medios de registro y tratamiento, tal como preferentemente una cámara CCD acoplada a medios informáticos de tratamiento y análisis de imágenes, pueden igualmente estar previstos para registrar y tratar las mencionadas señales interferométricas y de fluorescencia, así como medios de focalización adicionales para focalizar el citado haz luminoso recombinado sobre los citados medios de registro.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una primera forma de realización de una fuente parcialmente coherente espacial según la presente invención y realizada a partir de una fuente espacialmente incoherente.

La figura 2 representa una segunda forma de realización de una fuente parcialmente coherente espacial según la presente invención y realizada a partir de una fuente espacialmente incoherente.

La figura 3 representa una tercera forma de realización de una fuente parcialmente coherente espacial según la presente invención y realizada a partir de una fuente coherente espacial.

La figura 4 representa una cuarta forma de realización de una fuente parcialmente coherente espacial según la presente invención y realizada a partir de una fuente coherente espacial.

La figura 5 representa una forma de realización preferida del dispositivo según la presente invención, utilizando una fuente parcialmente coherente espacial como la descrita en la figura 2.

Descripción detallada de varias formas de realización de la invención

Fuentes luminosas utilizadas para la holografía digital

Un primer tipo de fuente luminosa utilizable en el dispositivo según la presente invención corresponde a una fuente parcialmente coherente tal como aparece representada en la figura 1. Una lente L1 acromática colima los haces luminosos emitidos por una fuente incoherente espacial de alcance filtrado en longitud de onda, por ejemplo un LED (diodo emisor de luz), hacia un primer iris A1 de abertura regulable. La abertura A1 limita el espectro angular de la fuente a fin de aumentar la coherencia espacial de la luz. Una segunda lente L2 acromática crea una fuente secundaria en el plano focal donde un segundo iris A2 limita el tamaño de la fuente. Una tercera lente L3 forma un haz colimado. Las distancias focales de L1, L2, L3 son, por ejemplo, de 100 mm para la holografía digital.

Un segundo tipo de fuente luminosa utilizable en el dispositivo según la presente invención corresponde a una fuente parcialmente coherente tal como aparece representada en la figura 2. Una lente L1 colima los haces

luminosos emitidos por una fuente incoherente espacial de alcance filtrado en longitud de onda, por ejemplo un LED (diodo emisor de luz). Con el fin de obtener un campo luminoso homogéneo, los haces luminosos de esta fuente pueden ser transportados por una fibra óptica, cuyo núcleo sea líquido, desde el LED hacia la lente L1. El juego de lentes L2 y L3 forma un haz colimado. El filtro espacial A1 limita el espectro angular de la fuente a fin de aumentar la coherencia espacial de la luz.

Es igualmente posible utilizar, en el dispositivo según la presente invención, una fuente láser hecha parcialmente incoherente. La figura 3 representa el principio de funcionamiento de una de las fuentes clásicamente utilizadas en óptica. Un haz láser de haz paralelo es focalizado por una lente L1. Se sitúa un difusor giratorio D detrás del punto focal de manera que forme un punto de luz cuyo diámetro es suficiente como para iluminar el campo de visión del microscopio. El difusor crea un campo de "speckle" (granularidad láser) que varía con la rotación del difusor. Un lente L2 está situada a la distancia focal con respecto al plano del difusor giratorio.

Se sitúa entonces una abertura A detrás de la lente de manera que se pueda ampliar la dimensión del tamaño de los gránulos de "speckle". Utilizando una rotación del motor suficientemente rápida con respecto al tiempo de exposición del sistema de registro de imágenes, se muestra que una de tales fuentes es equivalente a una fuente parcialmente coherente espacial como las arriba descritas. La longitud de la coherencia espacial está directamente conectada a la dimensión de los gránulos de "speckle", que es ajustado por el diámetro de la abertura.

Otro tipo de fuente colimada y parcialmente coherente a partir de una fuente coherente utilizable en el dispositivo según la presente invención está representado en la figura 4. Se focaliza un haz láser en la proximidad de un vidrio esmerilado (D) por una lente (L1). El esmerilado difunde la luz. Una lente (L2) situada detrás del vidrio esmerilado colima la luz difundida por el esmerilado. Ajustando la distancia (d) entre el punto de focalización y el vidrio esmerilado, se regula la dimensión de los gránulos de speckle del haz colimado.

Microscopio funcionando en holografía digital

La figura 5 esquematiza el plan del microscopio utilizado en el dispositivo según la invención. El interferómetro del microscopio que funciona en holografía digital es del tipo Mach Zehnder y comprende dos subconjuntos SE1 y SE2. Cada uno de los cuales incluye un separador de haz, respectivamente BS1 y BS2, y un espejo, respectivamente M1 y M2. La fuente S para la holografía digital es una fuente parcialmente coherente tal como una de las anteriormente descritas. Dicha fuente S ilumina el separador de haz BS1. Una parte del haz es transmitido por BS1 y una parte es reflejada hacia el espejo M1.

El primer subconjunto SE1 permite formar dos haces luminosos paralelos, el haz objeto O y el haz de referencia R. Este primer subconjunto SE1 está montado sobre una tabla de rotación, mientras que el segundo subconjunto SE2 es fijo o móvil. Esto permite regular la igualación del trayecto óptico de los dos haces del interferómetro, el haz objeto O y el haz de referencia R.

En el haz objeto, una lente L4 focaliza el haz luminoso sobre el objeto o la muestra contenida en la célula de observación So. El objeto es observado con un objetivo de microscopio ML1 adecuado para la observación en fluorescencia (se pueden utilizar los distintos aumentos posibles en microscopía clásica). El par de lentes L4-ML1 forma un sistema afocal. El objetivo ML1 realiza, en combinación con la lente L6, la imagen de un plano pasando a través de la muestra.

Paralelamente, en el haz de referencia R, la lente LF focaliza el haz luminoso, ya sea sobre una célula de observación Sr, idéntica a la que incluye la muestra pero sin la presencia de esta última, o ya sea sobre un material transparente de composición y espesor adecuados, como por ejemplo el vidrio. Esta disposición permite optimizar la igualación del trayecto óptico de los dos haces del interferómetro.

Un objetivo de microscopio ML2, idéntico a ML1, está dispuesto sobre el haz de referencia. El par de lentes L5-ML2 constituye igualmente un sistema afocal. Se ajustan los trayectos ópticos ML1-L6 y ML2-L6 para que sean idénticos.

El segundo subsistema SE2, que incluye el espejo M2 y el separador de haz BS2, permite combinar el haz objeto O y el haz de referencia R. Los haces objeto O y de referencia R combinados, interfieren en el plano sensible de la cámara (referenciado como C en la figura 5).

Como se indica arriba, la implantación de la holografía digital requiere el conocimiento de la amplitud óptica medida en un plano de nitidez interceptando la muestra. La amplitud óptica puede ser determinada a partir de las figuras de interferencia mediante dos métodos:

- (i) el método de portadora o transformada de Fourier. Por este método los haces objeto y de referencia son incidentes sobre la cámara CCD con un pequeño ángulo para obtener, aunque ninguna muestra sea analizada, una red de franjas de interferencia lineales. La medición del cambio de fase óptica introducida por la muestra se traduce entonces en una variación de la forma de las franjas. La determinación de la amplitud resulta de un análisis por transformada de Fourier.

- (ii) el espejo (M2) del subconjunto SE2 es provisto de un sistema de desplazamiento piezoeléctrico a lo largo de su eje óptico que permite cambiar el trayecto óptico de referencia por fracciones precisas de longitud de onda. Esto permite implantar la técnica llamada de "phase-stepping" consistente en registrar varias imágenes desfasadas de una fracción constante de longitud de onda. Mediante un tratamiento informático, la combinación de estos interferogramas permite calcular la amplitud luminosa emergente de la muestra.

El microscopio puede funcionar en modo microscopio directo o inverso, según las necesidades.

Dispositivo para la fluorescencia

En la figura 5, la fuente de excitación S' de la fluorescencia está situada en modo de reflexión. Como se ha indicado arriba, se puede situar esta fuente para que funcione en modo de transmisión.

Fluorescencia en la luz reflejada

En esta configuración, que se corresponde con la representada en la figura 5, la fuente S', ya sea una lámpara de vapor de mercurio ó una lámpara de cuarzo halógena, es todavía una fuente que emite una luz de una gama de longitudes de onda cortas necesarias para la excitación de la fluorescencia. Esta fuente puede, en cualquier caso, un láser. Los rayos luminosos, colimados por una lente, llegan a un filtro de excitación F1 seleccionado en función del fluorocromo utilizado y son reflejados por un espejo dicróico adecuado MD sobre la muestra a través del objetivo.

La luz fluorescente emitida por los fluorocromos contenidos en la muestra atraviesa el espejo dicróico MD, transparente en estas longitudes de onda más largas, cruza un filtro de detención F2 situado para bloquear las eventuales longitudes de onda corta, y es registrada por la cámara.

Los materiales de composición y espesor adecuados, por ejemplo el vidrio, pueden también ser añadidos al haz de referencia para optimizar la igualación del trayecto óptico de los dos haces del interferómetro.

Fluorescencia en la luz transmitida

Para esta configuración, existen dos realizaciones posibles:

- (i) una realización de una sola fuente: la fuente única utilizada es la prevista para el microscopio que funciona en holografía digital pero es simultáneamente utilizada como fuente de excitación de la fluorescencia porque emite en una gama de longitudes de onda cortas. Esto permite realizar a la vez el holograma del objeto y la excitación de los fluorocromos de la muestra.
- (ii) una realización de dos fuentes: se combina, la fuente específica para el microscopio que funciona en holografía digital con la fuente que emite la luz necesaria para la excitación de los fluorocromos, de las dos maneras siguientes: o la fuente necesaria para la fluorescencia está situada justo antes del separador de haz BS1, ó está situada justo antes de la lente L4 que focaliza los rayos luminosos sobre la muestra.

Conexión de las señales obtenidas en holografía digital y en fluorescencia para la reconstrucción 3D de las señales de fluorescencia

Como se ha descrito más arriba, el instrumento incluye dos subsistemas ópticos acoplados que permiten:

- (i) el registro de las imágenes interferométricas en la transmisión de la muestra
- (ii) el registro de la imagen fluorescente de la muestra activada por la fuente de excitación de la fluorescencia

Estas imágenes están formadas por el sistema afocal constituido por el acoplamiento de las lentes ML1-L6 que realiza la imagen nítida de un plano perpendicular al eje óptico de la muestra en la cara sensible de la cámara C. Las imágenes interferométricas y de fluorescencia son registradas secuencialmente:

- (i) la fuente de fluorescencia está oculta por un obturador y se registra la ó las imágenes interferométricas.
- (ii) la fuente que permite el registro interferométrico está oculta o apagada y se registra la olas imágenes de fluorescencia.

Cuando el espesor de la muestra es más pequeño que la profundidad del campo del dispositivo de imágenes, la

imagen de la muestra es nítida en todas partes. Por el contrario, y es el caso que concierne al presente desarrollo, cuando el espesor de la muestra excede la profundidad del campo, las partes de la muestra más allá de la zona de profundidad del campo dan partes borrosas en la imagen.

Como la muestra es observada por una cámara C gracias al sistema afocal de lentes ML1-L6, las señales interferométricas y de fluorescencia son perfectamente superpuestas a nivel de sensor y los planos de nitidez son comunes para los dos tipos de iluminación gracias a la utilización de los componentes ópticos ML1-L6 acromáticos.

Función del registro interferométrico u holográfico

El registro interferométrico permite la medición precisa de la amplitud óptica compleja en el plano nítido de la muestra. La fuente interferométrica coherente o parcialmente coherente S se activa e ilumina en un haz colimado el separador de haz BS1.

Una parte de ese haz, llamada haz objeto, sigue el trayecto BS1-M1-L4-So-ML1-BS2-L6-C. La fase y la amplitud de ese haz son modeladas por la muestra contenida en la célula objeto So.

La otra parte del haz, llamada haz de referencia, sigue el trayecto BS1-L5-Sro-ML2-M2-BS2-L6-C. La fase y la amplitud de ese haz son modelados por la célula de referencia Sr.

Los haces objeto y de referencia interfieren sobre la cara sensible de la cámara (C). La forma de la figura de interferencia está influenciada por los cambios relativos de fase óptica introducidos por las muestras So y Sr. Como la célula de referencia Sr es una célula experimental comparable con la célula objeto So pero sin la muestra estudiada, la forma de la figura de interferencia se ve influenciada de manera significativa por los cambios de fase óptica introducidos por la muestra estudiada.

El primer objetivo es medir la amplitud óptica compleja emergente de la muestra a partir de la figura ó figuras de interferencia medida/s por la cámara. Por esto, están disponibles dos métodos clásicos en interferometría:

- (i) el método de transformada de Fourier [1]
- (ii) el método de retardo de fase.

Conociendo la amplitud óptica compleja en el plano de nitidez de la muestra, los métodos de holografía digital permiten calcular las amplitudes complejas en planos paralelos [2-6]. Estos métodos consisten en calcular mediante métodos numéricos el campo óptico utilizando las leyes de propagación de la óptica de Fourier (Ecuación de Kirchhoff-Fresnel). Así se puede calcular las amplitudes luminosas complejas en los planos que se encuentran fuera de la zona de profundidad de campo inicial del sistema de imágenes. Estos métodos permiten así volver nítidas las zonas de imagen que han sido registradas borrosas.

Una amplitud óptica compleja $u(x, y)$ en un plano (x, y) se escribe:

$$u(x, y) = \sqrt{I(x, y)} \exp\{i\alpha(x, y)\} \quad (1)$$

donde

$I(x, y)$ es la intensidad luminosa en el punto (x, y)

$\alpha(x, y)$ es la fase óptica en el punto (x, y)

i es el número imaginario tal como $i^2 = -1$

El método interferométrico vuelve por lo tanto a determinar, en el plano en el que se realiza la imagen, las cantidades $I(x, y)$ y $\alpha(x, y)$ de manera que se pueda calcular, por holografía digital, la amplitud óptica $u(x', y')$ en los planos paralelos separados por distancias d . esta operación se escribe formalmente:

$$u_d'(x', y') = R[d]u(x, y) \quad (2)$$

donde $R[d]$ es el operador de Kirchhoff-Fresnel.

En la literatura [2], existen varias implantaciones numéricas de esta expresión.

Registro de la señal de fluorescencia

Estando activada la fuente de la excitación de la fluorescencia, las sustancias fluorescentes repartidas por la

muestra emiten luz de manera isotrópica, lo que da lugar a una señal detectada por la cámara de video (CCD). Si se considera la emisión por un punto (x_0, y_0) de la muestra situada a una distancia d del plano en el que se realiza la imagen por el par de lentes ML1-L6, el hecho de que el objetivo del microscopio tenga una abertura terminada, el punto emisor de fluorescencia produce, en el plano objeto en el que se realiza la imagen, un disco luminoso observable por la cámara de video.

Esta repartición de la intensidad luminosa se denota $I_p(x-x_0, y-y_0)$ donde el índice p indica que se considera la señal de fluorescencia.

El diámetro D del disco luminoso se expresa, en una primera aproximación, por:

$$D = \frac{d}{fnumber_{ML1}} \quad (3)$$

donde $fnumber_{ML1}$ es el informe de la distancia focal de ML1 por el diámetro de su abertura.

Ha de notarse que la ecuación (3) debe ser corregida para distancias d muy pequeñas con las que debemos tener en cuenta los efectos de la difracción en la iluminación incoherente. Sin embargo, para esas distancias d , la imagen del punto de origen se halla en la zona de profundidad de campo y no necesita por tanto ninguna manipulación ulterior con respecto a la nitidez.

En el caso de muestras más complejas que incluyen varias zonas de emisión que pueden encontrarse a distancias d diferentes del plano de nitidez, se obtiene una repartición de la intensidad luminosa que se expresa como la suma de contribuciones elementales $I_p(x-x_0, y-y_0)$.

Conexión entre la amplitud compleja de la señal de holografía digital y de la señal de fluorescencia

El concepto que resulta ser el objeto de la presente solicitud de patente es la conexión de la señal de holografía digital y la señal de fluorescencia de forma que se pueda manipular la señal de fluorescencia y poder convertir en nítidas, mediante procedimiento numérico de holografía digital, las señales de fluorescencia que hubieran sido registradas borrosas.

Para que esta conexión pueda realizarse, es necesario que las regiones dentro de la muestra biológica que presenten una fluorescencia tengan propiedades ópticas (absorbancia óptica y/o índice de refracción) distintas de las regiones no fluorescentes que las rodean. Es preciso remarcar que esta condición es satisfecha en numerosas aplicaciones en biología celular, ya que la fluorescencia permite el marcado de organelas celulares que son igualmente visibles por la microscopía óptica en contraste de fase. Esta puesta en evidencia mediante contraste de fase demuestra una variación local del índice de refracción y/o de absorbancia de organelas.

Si consideramos una zona limitada de fluorescencia en la muestra biológica, la cual es también una zona de cambio local del índice y/o absorbancia en comparación con un fondo constante y si suponemos que esta zona se halla a una distancia d del plano de nitidez de la muestra, la zona de fluorescencia, como se ha descrito previamente, da lugar a una mancha luminosa de intensidad $I_p(x-x_0, y-y_0)$. La amplitud luminosa medida por interferometría es dada por la ecuación (1):

$$u(x, y) = \sqrt{I(x, y)} \exp\{i\alpha(x, y)\}$$

En un primer paso, se construye una amplitud equivalente de fluorescencia para:

$$u_p(x, y) = A \sqrt{I_p(x-x_0, y-y_0)} \sqrt{I(x, y)} \exp\{i\alpha(x, y)\} \quad (4)$$

donde A es una constante multiplicativa que no tiene una función determinante en la presente discusión.

La ecuación (4) pondera la amplitud interferométrica para la intensidad de fluorescencia a fin de amplificar la zona influenciada por la fluorescencia.

Se aplica después la reconstrucción por holografía digital para reconstruir la imagen nítida de la fluorescencia:

$$u_p'(x', y') = R[-d]u_p(x, y) \quad (5)$$

Posteriormente, se calcula la intensidad luminosa $u_p'(x', y')$ para obtener la imagen nítida de la intensidad del punto de fluorescencia.

En la práctica, se mide la amplitud luminosa de interferometría y el punto de luz fluorescente sin conocer la distancia d . Se aplica entonces la técnica de reconstrucción por holografía digital de manera incremental para lograr la imagen más nítida del punto de fluorescencia.

Si se considera ahora el caso en el que dentro de la muestra hay varias zonas limitadas con variaciones del índice de refracción y/o absorbancia entre las cuales sólo algunas de estas zonas presentan una emisión de fluorescencia, se pueden dar dos casos:

- (i) 1^{er} caso: Las señales de interferometría y de fluorescencia son separadas en el plano nítido de la muestra. En este caso, se puede utilizar directamente el método como el arriba descrito.
- (ii) 2^o caso: Las señales de interferometría y de fluorescencia se superponen, al menos parcialmente, en el plano nítido de la muestra.

En este segundo caso, la utilización del método como el descrito arriba puede dar lugar a reconstrucciones falsas de zonas fluorescentes que en realidad no lo son. En efecto, si se consideran, por un lado, las señales de interferometría debidas a dos zonas de variaciones del índice y/o absorbancia que se superponen y, por otro lado, que una sola de esas dos zonas presenta fluorescencia, como el punto de fluorescencia recubre al menos parcialmente las señales interferométricas provenientes de las dos zonas, la utilización del método precedente aportará una contribución significativa a la fluorescencia para las dos zonas. En ese caso, pueden ser implantados numerosos métodos de corrección de manera para reconstruir únicamente la zona pertinente. Se puede citar, a modo de ejemplo, un procedimiento reiterado de corrección. La distribución de fluorescencia inicial en el plano de nitidez será llamado D0. A la primera reiteración, se utiliza el método precedente de reconstrucción holográfica, que contribuye con fluorescencia para las dos zonas. El resultado de esta reconstrucción se llamará la configuración C1. Utilizando las leyes de propagación de la óptica incoherente, se calcula después la distribución de luz de fluorescencia, llamada D1, en el plano de nitidez de la muestra que corresponde a C1. Se compara D1 y D0 a fin de aplicar una corrección para C1 y para obtener una segunda configuración C2. A partir de ahí se calcula una nueva distribución de fluorescencia D2 mediante las leyes de la óptica incoherente y se repite el proceso reiterativo de corrección hasta obtener una diferencia suficientemente baja entre la distribución de fluorescencia DN (N^{ésima} reiteración) calculada mediante las leyes de la óptica incoherente y la distribución de fluorescencia D0. Numerosos métodos de optimización numérica permiten la implantación de uno de esos procesos de optimización. A título de ejemplo se puede citar los métodos de recepción simulada basados en la búsqueda aleatoria de la minimización de una función de coste, que en el presente caso podría ser $(DN-D0)^2$ [7].

En resumen, la presente invención consiste en combinar un dispositivo de fluorescencia con un microscopio funcionando en holografía digital para la medición en tres dimensiones de las zonas fluorescentes de micro-muestras y ofrece numerosas ventajas en comparación con las técnicas actuales conocidas.

Una primera ventaja es que la presente invención, en comparación con la microscopía clásica en fluorescencia, permite obtener una imagen tridimensional de la fluorescencia sin que haya necesidad de mover la muestra siguiendo el eje óptico del sistema.

Por otra parte, en la presente invención, la información de fase y amplitud suministrada por la holografía digital permite eliminar, en cada punto, la fluorescencia parásita mediante tratamiento numérico.

En comparación con la microscopía confocal, la presente invención presenta igualmente particulares ventajas.

Una de estas ventajas consiste en que la invención resulta mucho menos compleja de poner en funcionamiento que la microscopía confocal.

Otra ventaja es que permite utilizar una amplia gama de fuentes luminosas para generar la señal de fluorescencia, y extiende por lo tanto la gama de longitudes de onda disponibles para cubrir las aplicaciones. Esto permite, por otro lado, utilizar fuentes menos agresivas en comparación con las muestras biológicas.

Se notará igualmente que, en comparación con la microscopía confocal, la presente invención permite registrar informaciones sobre toda la muestra de forma simultánea sobre el volumen y con un retardo muy bajo entre cada toma (típicamente 1/25 seg.) para el registro de la fluorescencia, de tal manera que se elimina la distorsión temporal introducida por la exploración de la microscopía confocal.

En conclusión, el método propuesto en la presente invención, que consiste en acoplar las señales de interferometría con las señales de fluorescencia, permite localizar en tres dimensiones, y hacer nítidas, las regiones que presentan una fluorescencia dentro de una muestra. Este método es susceptible de encontrar aplicaciones interesantes en el campo de la embriología, donde los biólogos buscan analizar la evolución y la dinámica de embriones vivos que tienen muy rápidamente espesores que exceden la profundidad del campo de los microscopios ópticos. La presente invención permite, por ejemplo, un análisis a posteriori en tres dimensiones del movimiento de las células marcadas por los fluorocromos.

Por otro lado, el microscopio holográfico, según la presente invención, tiene igualmente un cierto número de ventajas en comparación con los dispositivos del estado de la técnica, en particular comparado con el microscopio holográfico descrito en el artículo «Improved three-dimensional Imaging with digital holography microscope using a partial spatial coherent source», F. Dubois et al., Appl. Opt. 38, pp.7085-7094 (1999).

En efecto, comparativamente con el microscopio holográfico descrito en esa publicación, en el microscopio holográfico de la presente invención, la lente L4 y la lente L5 que permiten focalizar la luz, respectivamente, de la célula objeto y de la célula de referencia (o de otros medios de compensación del trayecto óptico), están situadas dentro del mismo interferómetro, concretamente antes de los objetivos, respectivamente ML1 y ML2, y no fuera del interferómetro. De esa manera, los rayos luminosos que llegan al separador de haz BS1 son colimados con la ayuda de los espejos M (figura 5) y la posición del punto de focalización no se modifica cuando la posición del rayo incidente varía con respecto al eje óptico. Esta característica permite una utilización mucho más eficaz de la tabla de rotación y una igualación más sencilla de los trayectos ópticos de los haces de referencia y objeto. Esta posibilidad de ajuste es esencial en un microscopio holográfico que incorpore una fuente de luz parcialmente coherente.

Además, en el microscopio holográfico según la presente invención, la presencia, ó de la célula de observación de referencia Sr, comparable con la célula So que contiene la muestra, ó de un material transparente de espesor y composición adecuados, permite mejorar aún más la igualación de los trayectos ópticos objeto O y de referencia R.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. M. Takeda, H. Ina, S. Kobayashi, "Fourier transform method of fringe pattern analysis for computer based topography and interferometry", J. Opt. Soc. Am. 72, 156-160 (1972)
2. F. Dubois, L. Joannes, J.-C. Legros, "Improved three-dimensional imaging with digital holography microscope using a partial spatial coherent source " Appl. Opt. 38, 7085-7094 (1999)
3. E. Cuhe, F. Bevilacqua and C. Depeursinge, "Digital holography for quantitative phase contrast imaging", Opt. Lett. 24, 291-293 (1999)
4. T. Zhang and I. Yamaguchi, "Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography", Opt. Lett. 23, 1221-1223 (1998).
5. Skarman, Wozniac and Becker "Simultaneous 3D-PIV and temperature measurement using a New CCD based holographic interferometer", Flow Meas. Instr. 7, N°1, pp 1-6 (1996)
6. Y. Takaki and H. Ohzu, "Hybrid holographic microscopy: Visualization of three-dimensional object information by use of viewing angles", Appl. Opt. 39, 5302-5308 (2000)
7. S. Kirkpatrick, C.D. Gelatt, Jr., M.P. Vecchi, "Optimization by Simulated Annealing", Sciences 220, 671-679 (1983)
8. B. W. Schilling, T-C Poon, G. Indebetouw, B. Storrie, K. Shinoda, Y. Suzuki and M. H. Wu, "Three-dimensional holographic fluorescence microscopy", Optics Letters 22, n°19, 1506-1508 (1997)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener por microscopía imágenes en tres dimensiones de una muestra, en particular una muestra biológica espesa, y del campo de fluorescencia emitido por dicha muestra, caracterizado porque comprende:

- una etapa de medición y registro, durante la cual se mide y registra de manera secuencial e independiente, por una parte las señales interferométricas obtenidas por holografía digital y, por otra las señales de fluorescencia, resultante de la muestra;
- una etapa de tratamiento, en curso de la cual se combinan las citadas señales interferométricas obtenidas por holografía digital y las citadas señales de fluorescencia así registradas, con el fin de reconstruir imágenes nítidas, en tres dimensiones, de la muestra en sí misma y del campo de fluorescencia emitido por la muestra en un momento dado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se repiten en el tiempo dichas etapas de medición y registro, y de tratamiento, de modo que sigan la evolución de las imágenes en tres dimensiones de la muestra y el campo de fluorescencia de dicha muestra.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la combinación de las señales interferométricas obtenidas por holografía digital y de las señales de fluorescencia para reconstruir las imágenes nítidas en tres dimensiones de la muestra en estudio y del campo de fluorescencia de dicha muestra, se realiza mediante análisis numérico.

4. Dispositivo adaptado a la puesta en funcionamiento del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque incluye un microscopio funcionando en holografía digital, combinado con una fuente de excitación de la fluorescencia.

5. Dispositivo según la reivindicación 4, caracterizado porque la fuente de excitación de la fluorescencia funciona en modo de reflexión o transmisión.

6. Dispositivo según la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque el microscopio que funciona en holografía digital comprende una fuente de luz parcialmente coherente, o eventualmente coherente, funcionando en transmisión y que es capaz de generar una fuente de haz de luz.

7. Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos:

una fuente emisora de luz de longitud espectral reducida (S), una primera lente (L1), una primera abertura (A1), una segunda lente (L2), una segunda abertura (A2) y una tercera lente (L3), siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, la luz emitida por la fuente emisora de luz encuentra sucesivamente la primera lente (L1), la primera abertura (A1), la segunda lente (L2), la segunda abertura (A2) y la tercera lente (L3) y la luz en la salida de la tercera lente es una luz colimada.

8. Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos:

una fuente emisora de luz de longitud espectral reducida (S), una fibra óptica, una primera lente (L1), una segunda lente (L2), una tercera lente (L3) y una abertura (A1) con apertura ajustable, siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, la luz emitida por la fuente emisora de luz pasa primero a través de la fibra óptica a fin de tener un campo luminoso homogéneo, posteriormente encuentra la primera lente (L1), luego la segunda (L2) y la tercera lente (L3) para obtener una luz colimada sobre la abertura (A1).

9. Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos:

una fuente láser (S), una primera lente (L1), un difusor giratorio (D), una segunda lente (L2) y una abertura (A), siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, el haz láser emitido por la fuente láser encuentra en primer lugar la primera lente (L1), luego el difusor giratorio (D) que está situado detrás el punto focal de la citada primera lente (L1), posteriormente la segunda lente (L2) situada en la distancia focal con respecto al plano del difusor giratorio (D), y finalmente la citada abertura (A).

10. Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de luz parcialmente coherente del citado microscopio comprende los siguientes elementos:

una fuente láser (S), una primera lente (L1), un difusor giratorio (D) tal como vidrio esmerilado, y una segunda

lente (L2), siendo tal la disposición relativa de estos diferentes elementos que cuando la fuente opera, el haz láser emitido por la fuente láser pasa primero a través de la primera lente (L1), luego del difusor (D) y luego de la segunda lente (L2), estando el haz láser de salida de la primera lente (L1) focalizado en un punto de focalización situado aguas arriba del difusor a una distancia (d) regulable del mismo (D).

11. Dispositivo según una de las reivindicaciones 4 a 10, en el que el microscopio que funciona en holografía digital comprende además:

- un primer subconjunto (SE1), móvil, comprendiendo un separador de haz (BS1) y un espejo (M1), para formar dos haces paralelos, un haz objeto (O) y un haz de referencia (R) a partir de la fuente de haz luminosa;
- medios (M), preferentemente espejos, para dirigir la fuente de haz luminosa sobre el primer subconjunto (SE1), del separador de haz (BS1);
- un segundo subconjunto (SE2), fijo o móvil, que comprende igualmente un separador de haz (BS2) y un espejo (M2), para combinar dicho haz objeto (O) y dicho haz de referencia (R) en un haz luminoso recombinado;
- una célula objeto (So) que comprende una muestra a estudiar, dispuesta sobre el trayecto óptico del haz objeto (O) entre el primer (SE1) y el segundo subconjunto (SE2);
- un primer objetivo del microscopio (ML1), sobre el trayecto óptico del haz objeto (O) entre el primer (SE1) y el segundo subconjunto (SE2), aguas debajo de la célula objeto (So);
- medios de compensación del trayecto óptico, dispuestos sobre el trayecto óptico del haz de referencia (R) entre el primer (SE1) y el segundo subconjunto (SE2);
- un segundo objetivo del microscopio (ML2), dispuesto sobre el trayecto óptico del haz de referencia (R) entre el primer (SE1) y el segundo subconjunto (SE2), aguas debajo de los citados medios de compensación del trayecto óptico;
- primeros medios de focalización (L4) capaces de focalizar el haz objeto (O) sobre la célula objeto (So);
- segundos medios de focalización (L5) capaces de focalizar el haz de referencia (R) sobre los citados medios de compensación del trayecto óptico.

12. Dispositivo según la reivindicación 11, caracterizado porque los citados medios de compensación del trayecto óptico comprenden una célula de referencia (Sr) comparable con la célula objeto (So) aunque no comprenden la muestra a estudiar.

13. Dispositivo según la reivindicación 11, caracterizado porque los citados medios de compensación del trayecto óptico comprenden un material transparente de espesor y composición adecuada.

14. Dispositivo según la reivindicación 11, caracterizado porque comprende además unos medios de registro y tratamiento, tal como preferentemente una cámara CCD acoplada a medios informáticos de tratamiento y análisis de imágenes, pueden igualmente estar previstos para registrar y tratar las mencionadas señales interferométricas y de fluorescencia, así como medios de focalización adicionales (L6) para focalizar el citado haz luminoso recombinado sobre los citados medios de registro (C).

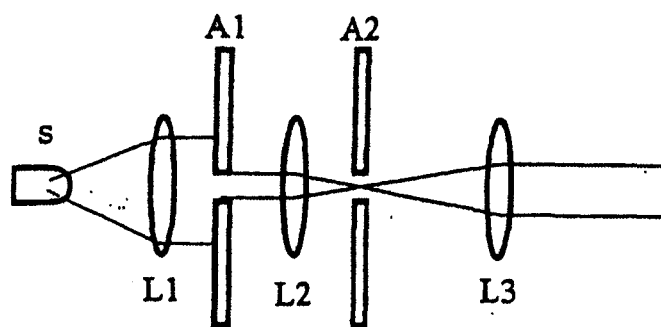


FIG. 1

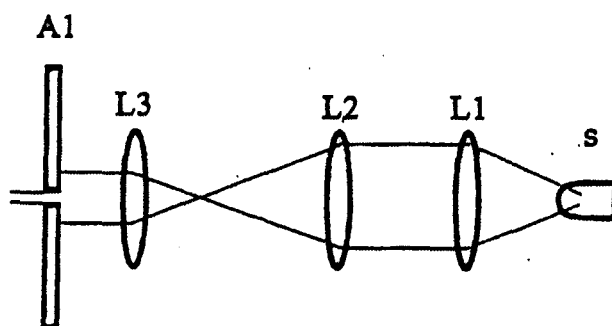


FIG. 2

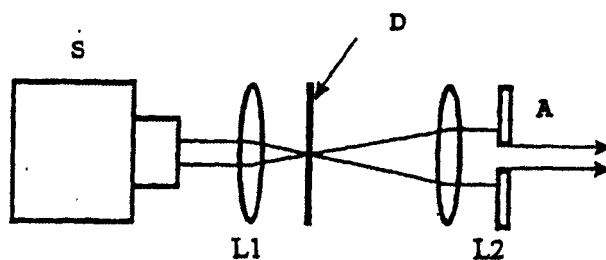


FIG. 3

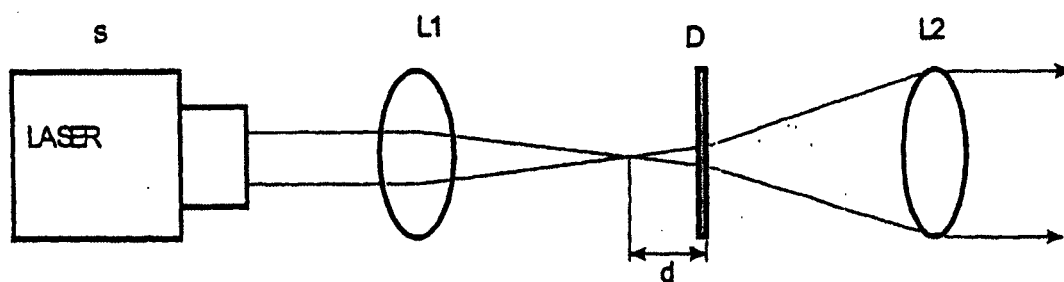


FIG. 4

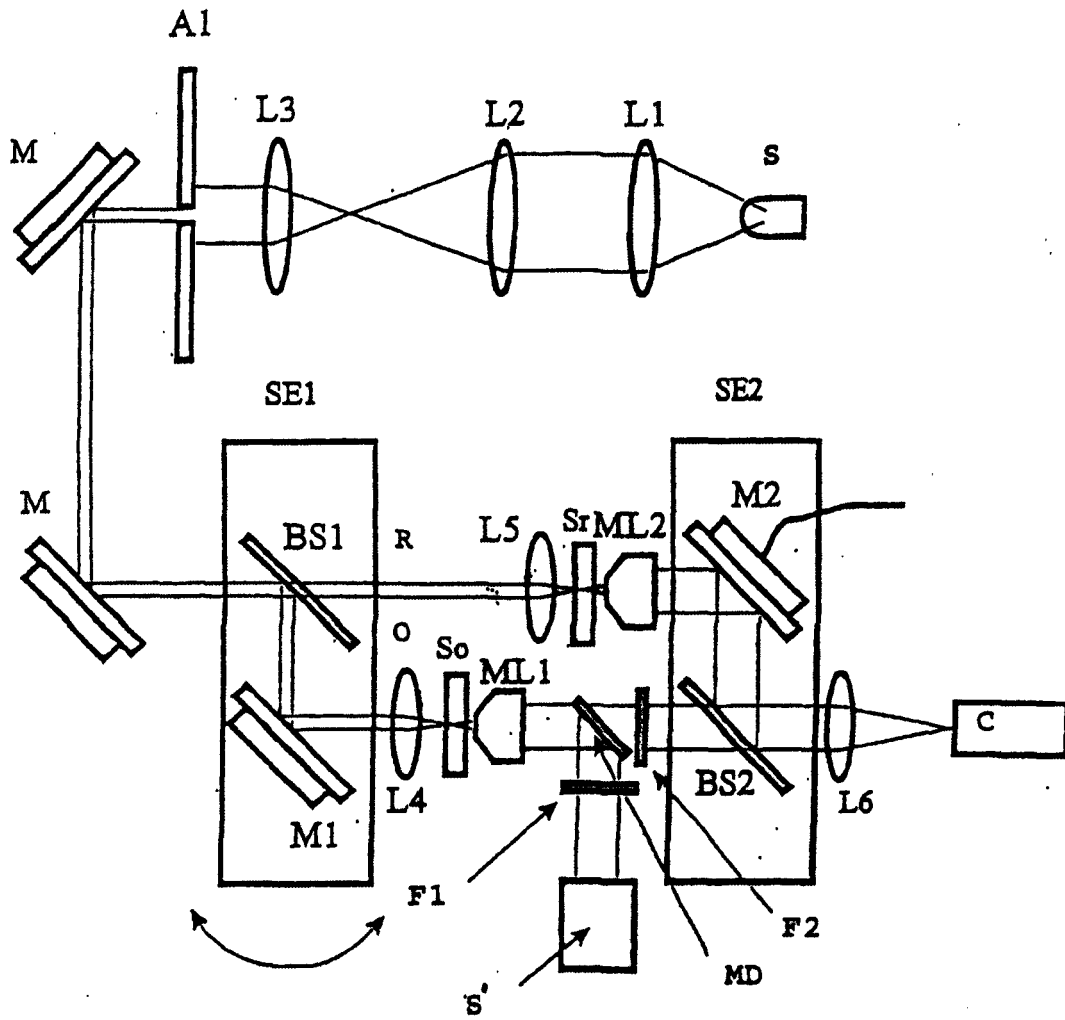


FIG. 5