



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00502**

(22) Data de depozit: **13/07/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/01/2018** BOPI nr. 1/2018

(71) Solicitant:  
• **CENTRUL INTERNAȚIONAL DE  
BIODINAMICĂ,**  
INTRAREA PORTOCALELOR NR.1 B,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• **GHEORGHIU EUGEN, BD. UNIRII NR.12,  
BL.7 C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DABU RĂZVAN, STR. BANUL MANTA  
NR. 12 BL. 26 SC. B AP. 50 SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **URSU DAN, ALEEA BARAJUL SADULUI  
NR.3-5, BL.N12-N13, AP.124, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **GHEORGHIU MIHAELA, BD. UNIRII  
NR. 12, BL.7C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DAVID MIHAI SORIN, STR. STANISLAV  
CIHOSCHI NR. 7, AP. 4, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **POLONSCHII CRISTINA,  
ȘOS. COLENTINA NR. 16, BL. A2, ET. 5,  
AP. 38, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **BRATU DUMITRU, STR. VLAICU VODĂ  
NR.4, BL.C 14, AP.13, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODĂ ȘI DISPOZITIV DE ILUMINARE ȘI RECEPȚIE  
PENTRU APLICAȚII DE MICROSCOPIE CARE UTILIZEAZĂ  
REFLEXIA TOTALĂ INTERNĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă și un dispozitiv de iluminare și recepție pentru aplicații de microscopie care utilizează reflexia totală internă. Metoda conform invenției constă în iluminarea unui obiect simultan, după mai multe direcții, și recepționarea imaginilor obținute, după direcții conjugate, simetric opuse față de axa optică a unui element refractiv, pe detectori diferiți sau pe zone diferite ale aceluiași detector. Dispozitivul conform invenției cuprinde o sursă (1) de lumină laser, un dispozitiv (2) de colimare care focalizează radiația de la sursa laser la capătul unei fibre (3) optice care constituie elementul de intrare într-un divizor de fascicul (4) care împarte fasciculul în opt fascicule de intensități egale ce sunt distribuite cu ajutorul a opt fibre optice, fiecare fascicul fiind colimat de un obiectiv de colimare (6), printr-o lamă  $\lambda/2$  (7) și printr-un polarizor (8) liniar care permite obținerea unor fascicule polarizate de orientare și putere dorită, apoi fiecare fascicul parcurge un obiectiv de focalizare, niște lame plan-paralele cu posibilitate de înclinare și un divizor pelicular, și ajunge la o prismă (12) piramidală cu opt fețe care deviază cele opt fascicule și le direcționează către un obiectiv de microscop (13) și, de aici, cad pe obiectul (15) de analizat, iar radiația provenită de la obiect (15) este preluată de obiectiv (13), ajunge la piramida (12)

reflectantă, este reflectată și ajunge la niște divizoare (26, 30), de unde o parte din radiație (50%) este reflectată către niște prisme (27) pentru formarea imaginii și ajunge în final la niște detectori de imagine, prin intermediul unor obiective (28) de formare a imaginilor și niște oglinzi.

Revendicări: 22  
Figuri: 4

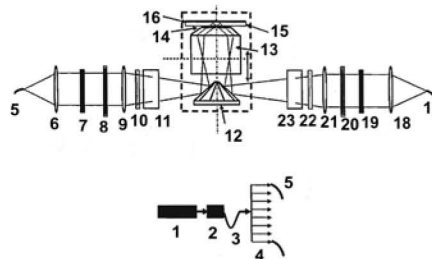


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## **Metodă și dispozitiv de iluminare și recepție pentru aplicații de microscopie care utilizează reflexia totală internă**

### **DESCRIERE**

Invenția se referă la o metodă și un dispozitiv de iluminare pentru microscopie de reflexie totală internă, simultan la mai multe unghiuri de incidență și recepția imaginilor obținute, având la bază iluminarea la distanțe diferite față de axa optică a unui obiectiv de microscop. Metoda și dispozitivul au aplicații practice în microscopia de reflexie totală internă pentru obținerea de distribuții ale parametrilor optici (ex. indici de refracție) ale unor obiecte microscopice (ex. celule vii) în timp real și la viteze crescute de achiziție a datelor.

Microscopia de reflexie totală internă și în particular microscopia bazată pe rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR) sunt metode utilizate cu succes în analiza proceselor de interfață care au loc în vecinătatea unor celule vii la interacția acestora fie cu suprafețe diferite fie cu diverși stimuli din mediul inconjurător.

Un dezavantaj al metodelor actuale de iluminare utilizează pentru obținerea parametrilor optici scanarea unghiurilor de incidență prin iluminarea succesivă la distanță variabilă față de axa optică a obiectivelor.

În brevetul US8743367B2 se descrie un dispozitiv și o metodă de imagistică SPR în care se iluminează simultan la mai multe unghiuri de incidență o probă iar recepția se face secvențial alegându-se de către utilizator domeniul unghiular sau unghiul de interes.

În aplicația de brevet US20150168300 A1 este descris un dispozitiv pentru imagistică prin SPR în care se iluminează secvențial la diferite unghiuri de incidență o probă iar recepția se face secvențial alegându-se de către utilizator domeniul unghiular sau unghiul de interes. De asemenea într-un exemplu, profilul fasciculului incident este de formă asimetrică polarizat circular.

Dezavantajul principal al metodelor și sistemelor descrise mai sus îl reprezintă iluminarea sau recepția imaginii la un singur unghi. Pentru trasarea unei curbe SPR și obținerea unor parametri optici de interes (i.e. indicele de refracție), este nevoie de înregistrarea reflectivității pentru mai multe unghiuri de incidență.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea că permite obținerea distribuției intensităților luminii reflectate simultan pentru mai multe unghiuri de incidență pentru fiecare punct de pe suprafața iluminată. Acest lucru permite trasarea unor curbe de intensitate versus unghi de incidență și obținerea de informații despre parametri optici ai suprafeței investigate. În cazul în care suprafața are proprietăți plasmonice se poate obține o curbă a rezonanței plasmonice de suprafață. Din această curbă se pot extrage parametri optici de interes (ex. indicele de refracție) în timp real pentru urmărirea unor procese (biologice) rapide.

Invenția se referă la o metodă de iluminare pentru microscopie de reflexie totală internă, simultan la mai multe unghiuri de incidență și recepția imaginilor obținute, având la bază iluminarea la distanțe diferite față de axa optică a unui obiectiv de microscop. În cele ce urmează se prezintă două posibile exemple de aplicare al acestei metode, care nu este limitativ, după cum urmează:

În conformitate cu figura 1, radiația de la o sursă de lumină (1-2) (care poate fi coerentă sau necoerentă) este divizată cu ajutorul unui element divizor de fascicul (3) care împarte fasciculul într-un număr  $n$  de fascicule de intensități egale. Fiecare fascicul este colimat (6, 18) și polarizat liniar (7, 19). Apoi fiecare fascicul trece printr-un obiectiv de focalizare (9, 21), printr-o lamă plan paralele (10, 22) cu posibilitatea de înclinare, printr-un divizor pelicular și ajunge în

final la prisma reflectivă piramidală cu  $n$  fețe (unde  $n$  este numărul de fascicule) (12). Această prismă deviază cele  $n$  fascicule și le direcționează către un obiectivul de microscop (13). Fasciculele sunt focalizate în planul focal posterior al obiectivului de microscop de obiectivele de focalizare (9,21). Fiecare fascicul este poziționat la o anumită distanță față de axa optică a obiectivului. În acest aranjament fiecare fasciculul va ieși din obiectiv către obiect (15) sub un unghi de incidență care depinde de distanța dintre poziția fasciculului de intrare în planul focal posterior al obiectivului de microscop și axa optică principală a obiectivului de microscop conform formulei

$$n \cdot \sin(\theta) \cdot f = d$$

unde  $\theta$  este unghiul de incidență pe obiect,  $n$  - indicele de refracție al mediului,  $f$  - distanța focală a obiectivului de microscop, iar  $d$  - distanța dintre poziția fasciculului de intrare în planul focal posterior al obiectivului de microscop și punctul unde axa optică intersectează planul focal.

Obiectul plasat pe obiectiv prin intermediul unui strat ajutător (14) și este alcatuit din-un suport cu proprietăți plasmonice (15) pe care este plasată proba de analizat (16).

Radiația provenită de la obiect (reflectată și difractată) (24, 25) trece prin obiectiv (13), ajunge din nou la piramida reflectantă (12), este reflectată și ajunge la divizorul pelicular (11, 22, 26, 30). O parte din radiație este reflectată către prisme pentru formarea imaginii (27), ajunge la obiectivele de formare a imaginilor (28) cu ajutorul cărora este focalizată pe detectorul de imagine (29).

Într-o altă posibilă metodă de implementare fasciculul provenit de la sursă (1) este transformat într-unul de formă anulară utilizând un axicon (în sine cunoscut și nefigurat) și o lentilă sferică. Se creează un număr de  $n$  sectoare de coroană circulară proiectând inelul de lumină inițial pe o piramidă cu  $n$  fețe înclinate la 45 de grade față de direcția de propagare a fasciculului inițial. Fiecare sector de coroană circulară este apoi mărit sau micșorat cu un sistem de lentile, polarizat radial (7, 8) și focalizat în planul focal posterior al obiectivului de microscop (12) de o lentilă de tip sferic sau toroidal (9). De aici radiația este preluată de obiectivul de microscop (12) și focalizată pe obiect (15). Radiația provenită de la obiect (15) (reflectată și difractată), trece prin obiectivul de microscop (12), este preluată de un sistem de transport care translatează imaginea pe o piramidă reflectantă cu  $n$  fețe, este reflectată de acesta și ajunge la ajunge la un sistem de oglinzi care o direcționează către prisme (26,30) pentru formarea imaginii de unde ajunge la obiectivele de formare a imaginilor (28) cu ajutorul cărora este focalizată pe detectorul de imagine (29).

În cele ce urmează este descris un exemplu nelimitativ de realizare a invenției în legătură cu figurile 1 și 2 care reprezintă:

Figura 1 Schema bloc a dispozitivului

Figura 2 Detaliu recepția pe detector a fasciculelor provenite de la obiect

Dispozitivul se compune în conformitate cu figura 1 din:

O sursă de lumină (laser cu puterea de 200mW) (1), un dispozitiv de colimare (2) pe fibră optică (3), un divizor de fascicule (4) care ghidează lumina în 8 fibre optice, de unde, la ieșirea din fiecare fibră optică (5) există câte un obiectiv de colimare (6) ( $f'=50\text{mm}$ ), un ansamblu format dintr-o lamă  $\lambda/2$  (în sine cunoscută) (7) și un polarizor (8), un obiectiv de focalizare ( $f'=300\text{mm}$ ) și o lamă cu fețe plan paralele (10). Fiecare ansamblu (5-10) este dispus convergând după direcții radiale (31 - 36) către o piramidă cu 8 fețe (12) plasată în centru. Deasupra piramidei este plasat un obiectiv de microscop (13) peste care prin intermediul unui

strat de ulei de microscop (14) este așezat obiectul de analizat (15) alcatuit dintr-un suport cu proprietăți plasmonice

Modul de funcționare al dispozitivului conform invenției.

Radiația de la sursa laser (1) este dirijată printr-un sistem de două oglinzi într-un obiectiv (2) care o focalizează la capătul unei fibre optice monomod (3) ce constituie elementul de intrare într-un divizor de fascicul (4) care împarte fasciculul în 8 fascicule de intensități egale care sunt distribuite cu ajutorul a opt fibre optice. Fiecare fascicul care provine de la una din cele opt fibre optice (5) este colimat de obiective de colimare (5), printr-o lamă  $\lambda/2$  (7), printr-un polarizor liniar (8) care permite obținerea unor fascicule polarizate de orientare și putere dorită. Apoi fasciculele trec prin obiectivele de focalizare, prin lame plan paralele cu posibilitatea de înclinare, prin divizoarele peliculare și ajung în final la prisma piramidală cu 8 fețe (12). Această prismă deviază cele 8 fascicule și le direcționează către obiectivul de microscop (13). Radiația provenită de la obiect (15) trece prin obiectiv (13), ajunge la piramida reflectantă (12), este reflectată și ajunge la divizoarele (26, 30). O parte din radiație (50%) este reflectată către prismele pentru formarea imaginii (27), ajunge la obiectivele de formare a imaginilor (28), se reflectă de oglinzi și în final ajunge la detectorii de imagine.

Un exemplu de utilizare a dispozitivului conform invenției pentru obținerea unei imagini este prezentat mai jos.

O suprafață SPR este regătită prin depunerea unui material cu proprietăți plasmonice (de exemplu Au cu grosimea între 20 și 50 nm) compatibil cu proba de analizat, pe un suport transparent de sticla tip BK7 ( $n_{BK7}=1,518$ ).

Celulele de tip HT29 sunt incubate în mediu standard DMEM (în sine cunoscut), la 37°C și în atmosferă de CO<sub>2</sub> pe suprafața SPR, timp de 24h pentru atașare. Măsurătorile se realizează în soluție Ringer (NaCl 130mM, KCl 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, Hepes 10mM, glucoză 10mM, pH 7.4), într-un domeniu unghiular corespunzător curbei SPR pentru celule (64-70°).

După montarea pe obiectiv (cu ulei de imersie), se realizează condițiile de iluminare în reflexie totală internă prin ajustarea unghiului de incidență. Pe fiecare detector se obține câte o imagine corespunzătoare iluminării la un unghi de incidență în domeniul de interes. Un exemplu de set de imagini obținute la 8 unghiuri diferite de incidență este prezentat în figura 3.

Pentru fiecare pixel (punct) din imagine se reprezintă intensitatea luminii reflectate în funcție de unghiul de incidență. Curbele rezultate se fitează cu o funcție rațională sau polinomială care poate fi de tipul

$$f(x) = \frac{a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4 + a_5x^5 + a_6x^6}{b_2x^4 + b_1x^2 + 1},$$

unde  $a_0$ - $a_6$  și  $b_1$ - $b_2$  sunt coeficienții polinomiali iar  $x$  este variabila de fit.

Apoi se determină minimul funcției (ce corespunde unghiului de rezonanță) prin calcularea primei derivate și rezolvarea ecuației pentru care aceasta este zero.

Pentru fit se poate utiliza și matricea de transfer – o metodă în sine cunoscută de calcul al propagării undelor electromagnetice în medii stratificate.

Dupa obținerea valorii unghiului la care are loc minimul de intensitate denumit și minimul de rezonanță  $\theta_{\min}$ , acesta este corelat cu indicele de refracție corespunzător  $n_1$  conform formulei

$$\theta_{\min} = \arcsin \frac{\sqrt{\frac{\epsilon_m^* n_1^2}{\epsilon_m^* + n_1^2}}}{n_2}$$

unde  $\epsilon_m^*$  este permitivitatea complexă a materialului plasmonic plasat pe suportul cu indice de refracție  $n_2$ . Fiecare valoare obținută pentru fiecare pixel va avea o corespondență în imaginea finală. Se va forma o imagine în care se reprezintă distribuția indicelui de refracție al celulei investigate - figura 4.

## Revendicări

1. Metodă de microscopie prin reflexie **caracterizată prin aceea că** iluminarea obiectului se face în condiții de reflexie totală internă simultan după mai multe direcții iar recepția se face după direcții conjugate simetric opuse față de axa optică a unui element refractiv, pe detectori diferiți sau pe zone diferite ale aceluiași detector.
2. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** elementul refractiv este un obiectiv de microscop
3. Metodă conform revendicării 2 **caracterizată prin aceea că** asigurarea iluminării se face prin îndeplinirea condiției de convergență a fiecărui fascicul de iluminare într-un punct din planul focal posterior al obiectivului de microscop
4. Metodă conform revendicării 3 **caracterizată prin aceea că** pentru fiecare direcție de iluminare lumina incidentă este polarizată cu un element de polarizare
5. Metodă conform revendicării 4 **caracterizată prin aceea că** polarizarea luminii poate fi liniară, radială sau circulară
6. Metodă conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** unghiul de incidență se obține prin poziționarea fasciculului de iluminare la o distanță corespunzătoare față de axa obiectivului.
7. Metodă conform revendicării 6 **caracterizată prin aceea că** include o piramidă dreaptă, a cărei axă centrale coincide cu axa optică a obiectivului de microscop, având la bază un poligon cu numărul de laturi egal cu numărul direcțiilor de iluminare, fiecare din fețele laterale ale piramidei constituind o suprafață reflectantă pe care se reflectă atât fasciculul incident pe obiect cât și fasciculul reflectat de către obiect, provenit de la un fascicul incident conjugat.
8. Metodă conform revendicării 7 **caracterizată prin aceea că** planele de iluminare se intersectează pe axa optică a obiectivului de microscop
9. Metodă conform revendicării 8 **caracterizată prin aceea că** modificarea unghiului de incidență se face prin translatarea unui fascicul incident pe piramidă
10. Metodă conform revendicării 4 **caracterizată prin aceea că** forma fasciculelor în planul focal posterior al obiectivului este de arc de cerc cu centrul coincident cu axa optică a obiectivului de microscop.
11. Metodă conform revendicării 10 **caracterizată prin aceea că** polarizarea fasciculelor de iluminare este radială
12. Dispozitiv optic de microscopie prin reflexie **caracterizat prin aceea că** iluminarea obiectului se face în condiții de reflexie totală internă simultan după mai multe direcții iar recepția se face după direcții conjugate simetric opuse față de axa optică a unui element refractiv, pe detectori diferiți sau pe zone diferite ale aceluiași detector.
13. Dispozitiv conform revendicării 12 **caracterizat prin aceea că** elementul refractiv este un obiectiv de microscop
14. Dispozitiv conform revendicării 13 **caracterizat prin aceea că** asigurarea iluminării se face prin îndeplinirea condiției de convergență a fiecărui fascicul de iluminare într-un punct din planul focal posterior al obiectivului de microscop
15. Dispozitiv conform revendicării 14 **caracterizat prin aceea că** pentru fiecare direcție de iluminare lumina incidentă este polarizată cu un element de polarizare

16. Dispozitiv conform revendicării 15 **caracterizat prin aceea că** polarizarea luminii poate fi liniară, radială sau circulară
17. Dispozitiv conform revendicării 16 **caracterizat prin aceea că** unghiul de incidență se obține prin poziționarea fasciculului de iluminare la o distanță corespunzătoare față de axa obiectivului.
18. Dispozitiv conform revendicării 17 **caracterizat prin aceea că** include o piramidă dreaptă, a cărei axe centrale coincide cu axa optică a obiectivului de microscop, având la bază un poligon cu numărul de laturi egal cu numărul direcțiilor de iluminare, fiecare din fețele laterale ale piramidei constituind o suprafață reflectantă pe care se reflectă atât fasciculul incident pe obiect cât și fasciculul reflectat de către obiect, provenit de la un fascicul incident conjugat.
19. Dispozitiv conform revendicării 18 **caracterizat prin aceea că** planele de iluminare se intersectează pe axa optică a obiectivului de microscop
20. Dispozitiv conform revendicării 19 **caracterizat prin aceea că** modificarea unghiului de incidență se face prin translatarea unui fascicul incident pe piramidă
21. Dispozitiv conform revendicării 15 **caracterizat prin aceea că** forma fasciculelor în planul focal posterior al obiectivului este de arc de cerc cu centrul coincident cu axa optică a obiectivului de microscop.
22. Dispozitiv conform revendicării 21 **caracterizat prin aceea că** polarizarea fasciculelor de iluminare este radială

Desene

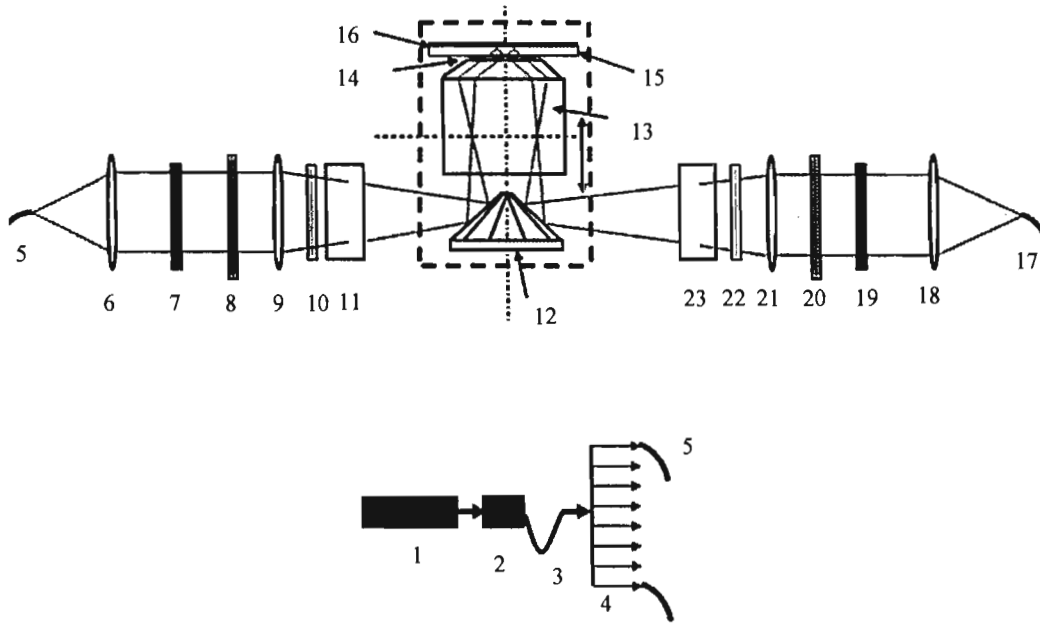
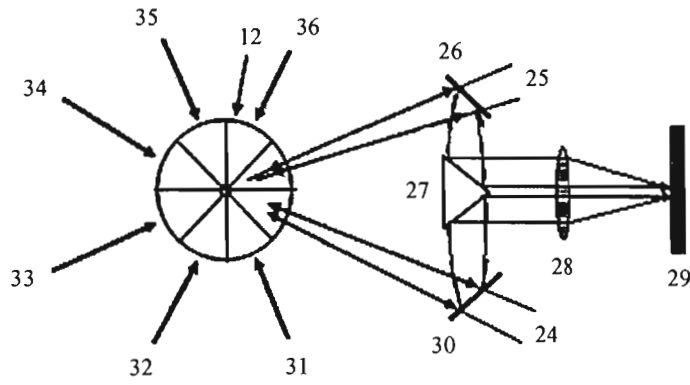
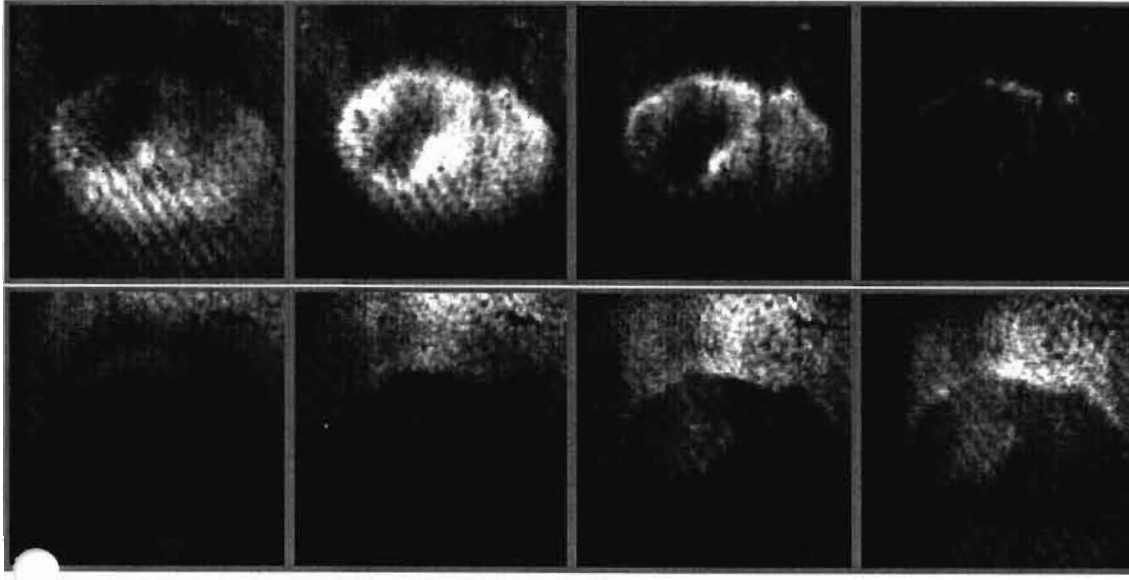


Figura 1 Schema bloc a dispozitivului

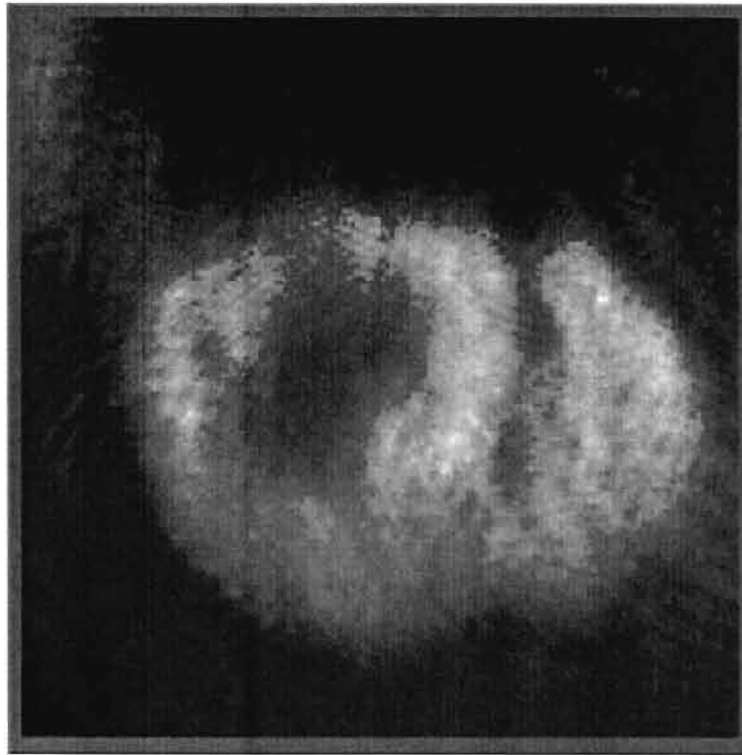




**Figura 2** - Detaliu receptia pe detector a fasciculelor provenite de la obiect



**Figura 3** Celula HT29 măsurată prin SPR la diferite unghiuri de incidență în ordine crescătoare, de la stânga la dreapta ( $64-70^\circ$ )



**Figura 4** Celula HT29 – distribuția indicelui de refracție