



(12)

BREVET DE INVENȚIE

- (21) Nr. cerere: **a 2016 00502**
- (22) Data de depozit: **13/07/2016**
- (45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2023** BOPI nr. **2/2023**

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

(73) Titular:
• **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, SC.B, ET.6, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**AL. W. PETERSON, M. HALTER, AL.
TONA, A. L. PLANT, "HIGH RESOLUTION
SURFACE PLASMON RESONANCE
IMAGING FOR SIGLE CELLS", 2014;
US 8743367 (B2); CN 104062750 (A);
US 5875032 (A)**

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



RO 132361 B1

1 Invenția se referă la o metodă și un dispozitiv de iluminare, simultan la mai multe
2 unghiuri de incidență având la bază iluminarea la distanțe diferite față de axa optică a unui
3 obiectiv de microscop și recepția imaginilor obținute pe aceleași direcții. Metoda și dispozi-
4 tivul au aplicații practice în microscopia de reflexie totală internă pentru obținerea de dis-
5 tribuții ale parametrilor optici (exemplu: indici de refracție) ai unor obiecte microscopice
6 (exemplu: celule vii) în timp real și la viteze ridicate de achiziție a datelor.

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

11 Un dezavantaj al metodelor actuale de microscopie care utilizează reflexia totală
12 internă cu iluminarea probei la mai multe unghiuri de incidență constă în realizarea iluminării
13 la unghiuri de incidență distincte, prin plasarea succesivă a fascicolului incident la distanțe
14 diferite față de axa optică a obiectivului, corespunzătoare unghiurilor individuale dorite.
15 Metodele sunt inerent lungi.

16 În brevetul **US 8743367 B2** se descrie un dispozitiv și o metodă de imagistică SPR
17 în care proba se iluminează simultan la mai multe unghiuri de incidență iar recepția se face
18 secvențial alegându-se de către utilizator domeniul unghiular sau unghiul de interes.

19 În aplicația de brevet **US 2015016830 A1** este descris un dispozitiv pentru imagistică
20 prin SPR în care proba se iluminează secvențial la diferite unghiuri de incidență iar recepția
21 se face secvențial alegându-se de către utilizator domeniul unghiular sau unghiul de interes.
22 De asemenea într-un exemplu, profilul fascicolului incident este de formă asimetrică, fiind
23 polarizat circular.

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

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

36 Invenția se referă la o metodă și un dispozitiv asociat de iluminare pentru microscopie
37 de reflexie totală internă, simultan la mai multe unghiuri de incidență și recepția imaginilor
38 obținute, având la bază iluminarea simultană la distanțe diferite față de axa optică a unui
39 obiectiv de microscop și recepția imaginilor obținute pe aceleași direcții.

40 Metoda de iluminare și recepție pentru aplicații de microscopie cuprinde etapele de
41 iluminare a probei în condiții de reflexie totală internă cu lumină incidentă polarizată (liniar,
42 radial sau circular), simultan după mai multe direcții, de recepționare a luminii reflectate și
43 de analizare a imaginilor pentru obținerea distribuției de indici de refracție.

44 Dispozitivul de iluminare și recepție este alcătuit dintr-o sursă de lumină care
45 generează un fascicul de lumină ce este transmis spre un divizor de fascicule, care ghidează
46 lumina într-un număr de m fibre optice, iar la ieșirea din fiecare fibră optică fasciculul
47 individual de lumină trece fiecare prin câte un element de colimare, apoi printr-un ansamblu
format dintr-o lamă $\lambda/2$, un polarizor, un obiectiv de focalizare și o lamă cu fețe plan paralele,

RO 132361 B1

o piramidă cu m fețe, un obiectiv de microscop. Dispozitivul constă într-un număr m de astfel de ansambluri care generează fascicule luminoase dispuse convergând după direcții radiale normale pe axul optic al obiectivului de microscop, incidente pe fețele unei piramide cu m fețe, care le reflectă către obiectivul de microscop plasat deasupra piramidei, pe aceeași axă, și mai departe către obiectul de analizat, care are proprietăți plasmonice și pe care este plasată proba de analizat, așezat în focarul obiectivului de microscop prin intermediul unui strat ajutător, fiecare fascicul fiind apoi reflectat către obiectivul de microscop, pe una din fețele piramidei ajungând la o oglindă care-l direcționează către prisma de deflecție, de unde ajunge la obiectivele de formare a imaginilor cu ajutorul cărora este focalizat pe detectorul de imagine. Piramida are axa centrală coincidentă cu axa optică a obiectivului de microscop, are 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.

Avantajele invenției sunt reprezentate de obținerea distribuției intensităților luminii reflectate simultan pentru mai multe unghiuri de incidență pentru fiecare punct de pe suprafața iluminată și extragerea unor parametri optici de interes (exemplu: indicii de refracție) în timp real pentru urmărirea unor procese (biologice) rapide.

În cele ce urmează este descris un exemplu nelimitativ de realizare a invenției în legătură cu fig. 1 - 4 care reprezintă:

- fig. 1, schema metodei de iluminare cu exemplificarea cazului în care, în același plan, se realizează simultan iluminarea obiectului la două unghiuri de incidență distincte cu fascicule ce provin din două direcții opuse (vedere laterală);

- fig. 2, detaliu recepția pe detector a fasciculelor provenite de la obiect (vedere de sus);

- fig. 3, celula HT29 măsurată prin SPR la diferite unghiuri de incidență în ordine crescătoare, de la stânga la dreapta ($64-70^\circ$);

- fig. 4, celula HT29 - distribuția indicelui de refracție obținută prin analiza imaginilor recepționate.

În conformitate cu fig. 1 care prezintă un exemplu de iluminare din două direcții opuse, radiația de la o sursă **1** de lumină (care poate fi coerentă sau incoerentă) este cuplată cu un optocuplor **2** (un dispozitiv de colimare) într-o fibră **3** optică apoi este divizată cu ajutorul unui element **4** divizor de fascicul care împarte fasciculul într-un număr m de fascicule de intensități egale printr-un număr m corespunzător de fibre **5**, **17** optice. Fiecare fascicul este colimat cu un obiectiv **6**, **18** de colimare și polarizat liniar cu un polarizor **8**, **20**. Polarizarea luminii poate fi rotită față de planul de iluminare cu ajutorul unei lame **7**, **19** $\lambda/2$. Apoi fiecare fascicul trece printr-un obiectiv **9**, **21** de focalizare, printr-o lamă **10**, **22** cu fețele plan paralele cu posibilitatea de înclinare, pentru obținerea înălțimii de deviere dorite față de baza prisme **12**. Astfel fiecare fascicul este poziționat, prin intermediul lamelor **10**, **22** cu fețele plan paralele cu înclinația specifică fiecărui fascicul, la o anumită distanță față de axa optică a obiectivului **13**, acesta fiind cea care determină unghiul de incidență. Fasciculul trece apoi printr-un divizor **11** pelicular și ajunge în final la prisma **12** reflectivă piramidală cu m fețe (unde m este numărul de fascicule). Această prismă deviază cele m fascicule, câte unul pe fiecare față, și le direcționează către obiectivul **13** de microscop. Fasciculele sunt focalizate în planul focal posterior al obiectivului de microscop de obiectivele **9**, **21** de focalizare. Astfel, în acest aranjament, fiecare fascicul va ieși din obiectiv către obiectul **15**

RO 132361 B1

1 sub un unghi de incidență care depinde de distanța dintre poziția fasciculului de intrare în
planul focal posterior al obiectivului **13** de microscop și axa optică principală a obiectivului
3 de microscop conform formulei

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

5 unde θ este unghiul de incidență pe probă, n - indicele de refracție al obiectivului,
 f - distanța focală a obiectivului de microscop, iar d - distanța dintre poziția fasciculului de
7 intrare în planul focal posterior al obiectivului **13** de microscop și punctul unde axa optică
intersectează planul focal.

9 Obiectul **15** este plasat pe obiectiv prin intermediul unui strat **14** ajutător (un fluid cu
indice de refracție egal sau apropiat de cel al obiectivului **13** de microscop e.g. ulei de
11 microscopie) și este alcătuit dintr-un suport cu proprietăți plasmonice. Peste obiectul **15** este
plasată proba **16** de analizat.

13 În conformitate cu fig. 2 fasciculul provenit de la obiect (reflectat și difractat) din
direcțiile **24**, **25** trece prin obiectivul **13**, ajunge din nou la piramida **12** reflectantă, este
15 reflectat și ajunge la divizorul **11**, **23**, **26** pelicular. O parte din fascicul este reflectat către
prismele **27** pentru formarea imaginii, ajunge la obiectivele **28** de formare a imaginilor cu
17 ajutorul cărora este focalizat pe detector **29**. Cealaltă parte din fascicul își continuă
deplasarea nedeviată fără a avea implicații în metoda de detecție.

19 În cele ce urmează se prezintă două posibile exemple de aplicare ale acestei metode,
care nu sunt limitative, după cum urmează:

21 Dispozitivul se compune în conformitate cu fig. 1 și 2 din:

- o sursă **1** de lumină (exemplu laser cu puterea de 200 mW), un optocuplor **2** (un
23 dispozitiv de colimare) pe fibră **3** optică, un divizor **4** de fascicule care ghidează lumina în **8**
fibre optice, de unde, la ieșirea din fiecare fibră **5** optică există câte un obiectiv **6** de colimare
25 ($f = 50$ mm), un ansamblu format dintr-o lamă **7** $\lambda/2$ (în sine cunoscută) și un polarizor **8** care
polarizează fiecare fascicul astfel încât acestea să aibă polarizarea paralelă cu planul format
27 din fasciculul incident și cel reflectat de obiect, un obiectiv **9** de focalizare ($f = 300$ mm) și o
lamă **10** cu fețe plan paralele. Fiecare ansamblu **5-10** este dispus convergând după direcții
29 **24**, **25**, **30-35** radiale către o piramidă **12** cu 8 fețe plasată în centru. Deasupra piramidei este
plasat un obiectiv **13** de microscop peste care, prin intermediul unui strat **14** de ulei de micro-
31 scop, este așezat obiectul **15** de analizat alcătuit dintr-un suport cu proprietăți plasmonice
și proba **16**.

33 Modul de funcționare al dispozitivului conform invenției.

Radiația de la sursa **1** laser este dirijată printr-un sistem de două oglinzi într-un opto-
35 cuplor **2** care o focalizează la capătul unei fibre **3** optice monomod ce constituie elementul
de intrare într-un divizor **4** de fascicul care împarte fasciculul în **8** fascicule de intensități
37 egale care sunt distribuite cu ajutorul a opt fibre optice. Fiecare fascicul care provine de la
una din cele opt fibre **5** optice este colimat de obiectivul **6** de colimare, printr-o lamă **7** $\lambda/2$,
39 printr-un polarizor **8** liniar care permite obținerea unor fascicule polarizate de orientare și
putere dorită. Apoi fasciculele trec prin obiectivele de focalizare, prin lame plan paralele cu
41 posibilitatea de înclinare controlată, prin divizoarele **11** peliculare și ajung în final la prisma
12 piramidală cu 8 fețe. Această prismă deviază cele 8 fascicule și le direcționează către
43 obiectivul **13** de microscop. Fasciculul, provenit de la obiectul **15** trece prin obiectivul **13**,
ajunge la piramida **12** reflectantă, este reflectat și ajunge la divizorul **23**. O parte din fascicul
45 (50%) este reflectat către prisma **27** pentru formarea imaginii, ajunge la obiectivul **28** de
formare a imaginilor, și ajunge la detectorul **29**. Cealaltă parte din fascicul își continuă
47 deplasarea nedeviată fără a avea implicații în metoda de detecție.

RO 132361 B1

Într-o altă posibilă metodă de implementare, fasciculul provenit de la sursa **1** este transformat într-unul de formă anulară utilizând un axicon (un tip special de lentilă care are o suprafață conică și care transformă un fascicul colimat într-unul cu distribuție inelară respectiv un inel luminos) și o lentilă sferică. Se creează un număr de m sectoare de coroană circulară proiectând inelul luminos inițial pe o piramidă cu m fețe înclinate la 45 de grade față de direcția de propagare a fasciculului inițial. Raza fiecărui sector determină valoarea unghiului de incidență a fasciculului care iluminează obiectul de analizat. 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 **13** de microscop de un obiectiv **9** de focalizare (de exemplu o lentilă de tip sferic sau toroidal). De aici, fasciculul este preluat de obiectivul **13** de microscop și focalizat pe obiectul **15**. Fasciculul provenit de la obiectul **15** (reflectat și difractat), trece prin obiectivul **13** de microscop, este preluat de un sistem de transport care translatează imaginea pe o piramidă reflectantă cu m fețe, este reflectat de acesta și ajunge la un sistem de oglinzi **23, 26** care-l direcționează către prisma **27** de deflecție, de unde ajunge la obiectivele **28** de formare a imaginilor cu ajutorul cărora este focalizat pe detectorul **29** de imagine.

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

O suprafață SPR este pregătită 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 sticlă tip BK7 ($n_{BK7} = 1,518$).

Celulele de tip HT29 (celule provenite dintr-o linie celulară de adenocarcinom colorectal uman) sunt incubate în mediu standard DMEM (în sine cunoscut), la 37°C și în atmosferă de CO₂ pe suprafața SPR, timp de 24 h pentru atașare. Măsurătorile se realizează în soluție Ringer (NaCl 130 mM, KCl 1mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Hepes 10 mM, glucoza 10 mM, 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 pentru fiecare fascicul, polarizat liniar cu polarizarea paralelă cu planul format din fasciculul incident și cel reflectat de suportul obiectului. 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 fig. 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 asociată unghiului de incidență.

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 a propagării undelor electromagnetice în medii stratificate.

RO 132361 B1

1 După obținerea valorii unghiului la care are loc minimumul de intensitate denumit și
2 minimumul de rezonanță θ_{\min} , acesta este corelat cu indicele de refracție al probei
3 (corespunzător n_1 în formula de mai jos) conform formulei

5

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

7

9 unde ϵ_m^* este permitivitatea complexă a materialului plasmonic plasat pe suportul cu indice
10 de refracție n_2 , în exemplul dat n_{BK7} . Fiecare valoare obținută pentru fiecare pixel va avea o
11 corespondență în imaginea finală. Se va forma o imagine în care se reprezintă distribuția
indicalui de refracție m al celulei investigate - fig. 4.

RO 132361 B1

Revendicări

1. Metodă de iluminare și recepție pentru aplicații de microscopie care utilizează reflexia totală internă, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde următoarele etape: 3
- a. se iluminează o probă în condiții de reflexie totală internă, simultan după mai multe direcții, lumina incidentă fiind polarizată, iar planele de iluminare se intersectează pe axa optică a unui obiectiv de microscop; 5
- b. se recepționează razele de lumină reflectate de probă după direcții conjugate simetric direcțiilor de iluminare, opuse față de axa optică a obiectivului de microscop, pe detectori diferiți; 7
- c. se analizează simultan imaginile obținute și se extrage informația despre distribuția de indici de refracție a unei probe necunoscute dispuse în focarul obiectivului de microscop. 9
2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, polarizarea luminii poate fi liniară, radială sau circulară. 11
3. Dispozitiv de iluminare și recepție pentru aplicații de microscopie care utilizează reflexia totală internă alcătuit dintr-o sursă (1) de lumină care generează un fascicul de lumină ce este transmis spre un divizor (4) de fascicule care ghidează lumina într-un număr de m fibre optice, iar la ieșirea din fiecare fibră (5) optică fasciculul individual de lumină trece fiecare prin câte un element de colimare, apoi printr-un ansamblu format dintr-o lamă (7) $\lambda/2$, un polarizor (8), un obiectiv (9) de focalizare și o lamă (10) cu fețe plan paralele, o piramidă (12) cu m fețe, un obiectiv (13) de microscop, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din m ansambluri (5-10) care generează fascicule luminoase dispuse convergând după direcții radiale normale pe axul optic al unui obiectiv (13) de microscop, incidente pe fețele unei piramide (12) cu m fețe, care le reflectă către un obiectiv (13) de microscop plasat deasupra piramidei (12), pe aceeași axă, și mai departe către obiectul (15) de analizat, care are proprietăți plasmonice și pe care este plasată proba (16) de analizat, așezat în focarul obiectivului de microscop (13) prin intermediul unui strat (14) ajutător, fiecare fascicul fiind apoi reflectat către obiectivul (13) de microscop, pe una din fețele piramidei (12) ajungând la o oglindă (23) care-l direcționează către prisma (27) de deflecție, de unde ajunge la obiectivele (28) de formare a imaginilor cu ajutorul cărora este focalizat pe detectorul (29) de imagine. 13
4. Dispozitiv conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, piramida (12) are axa centrală coincidentă cu axa optică a obiectivului de microscop (13), are 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. 15
5. Dispozitiv conform revendicării 4, **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 (13) de microscop. 17

(51) Int.Cl.

G02B 21/06 (2006.01);

G01N 21/552 (2014.01)

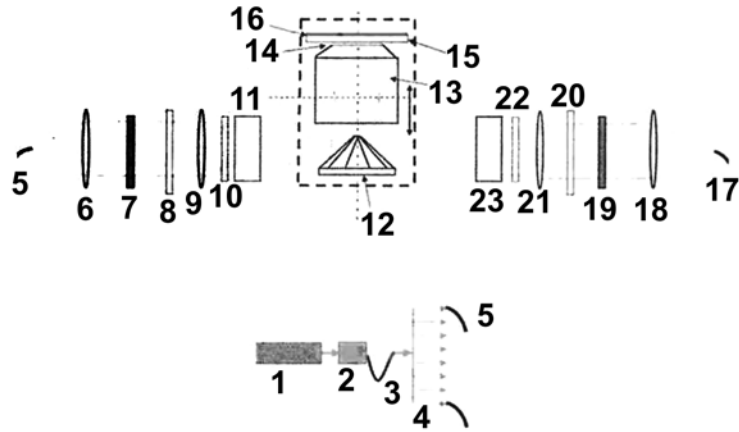


Fig. 1

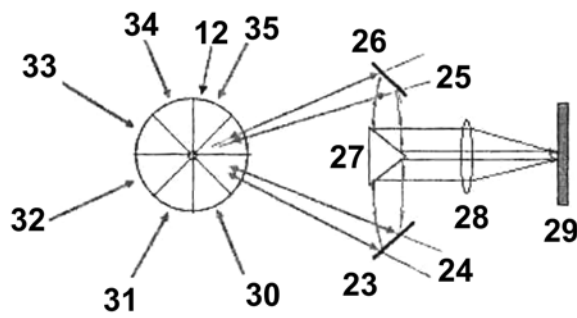


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G02B 21/06 (2006.01),

G01N 21/552 (2014.01)

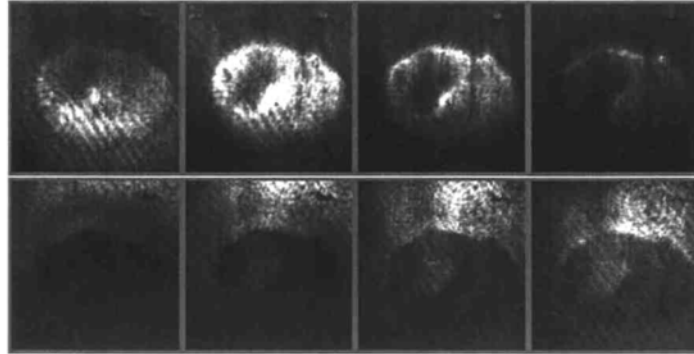


Fig. 3

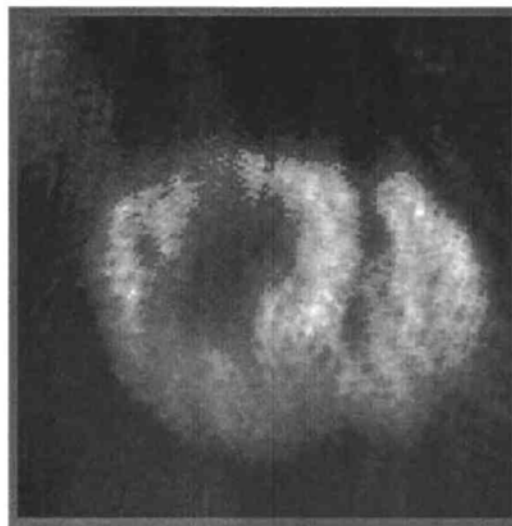


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 59/2023