

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 853 354**

21 Número de solicitud: 202030209

51 Int. Cl.:

G01N 21/49 (2006.01)

G01J 1/40 (2006.01)

G02B 21/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

12.03.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.09.2021

Fecha de concesión:

26.01.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.02.2022

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID (100.0%)

Av. Gregorio Peces Barba, 1

28919 Leganés (Madrid) ES

72 Inventor/es:

MARCOS VIDAL, Asier;

RIPOLL LORENZO, Jorge y

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Roberto

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

54 Título: **Procedimiento para corregir el efecto de la dispersión de la luz en medidas de microscopio de haz láser plano**

57 Resumen:

La invención describe un procedimiento para corregir el efecto de dispersión de la luz en un microscopio de haz láser plano que comprende: calcular, mediante simulaciones Monte Carlo, la función de transferencia de un medio para diferentes coeficientes de dispersión y profundidades de escaneo, creando una base de datos de funciones de transferencia; estimar experimentalmente el coeficiente de dispersión de una muestra suponiendo que es uniforme en toda la misma; escanear la muestra mediante el microscopio de haz láser plano para obtener un conjunto de imágenes correspondientes a diferentes secciones de la muestra; y deconvolucionar cada imagen de la muestra obtenida en el escaneo usando la función de transferencia de la base de datos que corresponde al coeficiente de dispersión de la muestra y a la profundidad de escaneo de cada imagen, corrigiéndose así en cada imagen el efecto de la dispersión de la luz.

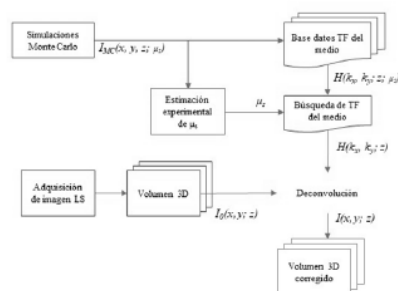


FIG. 4

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 853 354 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para corregir el efecto de la dispersión de la luz en medidas de microscopio de haz láser plano

5

OBJETO DE LA INVENCION

La invención pertenece en general al campo de la óptica, y más particularmente a la microscopía de haz láser plano.

10

El objeto de la presente invención es un procedimiento para revertir los efectos causado por la dispersión de la luz al atravesar la muestra en las imágenes de microscopía de haz láser plano.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los estudios de embriones y muestras biológicas de gran tamaño a través de microscopio óptico presentan, a diferencia de lo que sucede con muestras pequeñas, problemas particulares relacionados con las propiedades ópticas del tejido, absorción y dispersión de la luz, que causan una acusada pérdida en la resolución de las imágenes. Para solucionar estos problemas, en los últimos años se han desarrollado mejoras importantes sobre los microscopios de haz láser plano, cuya invención data del 1903.

20

Un microscopio de haz láser plano está formado por un medio de iluminación capaz de emitir una lámina delgada de luz según una dirección, denominada "*dirección de iluminación*" (x), y un medio de detección compuesto por una cámara acoplada a un objetivo de gran apertura numérica dispuestos según una dirección denominada "*dirección de detección*" (z), que es perpendicular a la dirección de iluminación, siguiendo la configuración original de Siedentopf y Zsigmondy.

30

Con esta configuración, la cámara puede obtener una imagen 2D de la fluorescencia emitida por la sección de la muestra excitada por el plano de iluminación. Si además se traslada la muestra en la dirección del eje de detección y se toman imágenes en diferentes posiciones, se genera un conjunto o pila de imágenes 2D donde cada una de las imágenes 2D corresponde a la fluorescencia emitida por la sección excitada por el plano de iluminación en cada posición con respecto a la muestra. Esta pila de imágenes 2D contiene información de

35

la posición en z (profundidad de la muestra según la dirección de detección) obtenida al mover la muestra, y de las posiciones x e y, presentes en cada imagen 2D. La pila de imágenes 2D puede entonces fusionarse para generar una imagen 3D de la muestra, como se describe en el documento US 7,554,725 de Stelzer et al. Posteriormente, se propuso hacer rotar la muestra alrededor de su propio eje, normalmente vertical, para captar varias pilas de imágenes 2D (comúnmente denominadas “medidas angulares”) y fusionarlas posteriormente, lo que permite mejorar la anisotropía y la calidad de las imágenes (S. Preibisch et al, Nature Methods 7 (2010)).

Para una comprensión más clara de esta técnica, se adjuntan las Figs. 1a y 1b que muestran un primer ejemplo de microscopio (100) de haz láser plano. La muestra (107) se dispone en un soporte (101) dentro de una cubeta (102) rellena con un líquido. Un haz (103) de iluminación lineal Gaussiano, Bessel, Airy o similar, incide sobre una lente (104) cilíndrica que lo enfoca gracias a un objetivo (105) de iluminación para generar la lámina (106) de iluminación plana vertical. Esta lámina (106) de iluminación plana vertical incide sobre la muestra (107) según la dirección de iluminación (DI), y la luz fluorescente (108) emitida por ese plano concreto de la muestra (107) es recogida por un objetivo (109) de detección orientado según la dirección de detección (DD), que es perpendicular a la dirección de iluminación (DI). Se obtiene así una imagen correspondiente a la porción de muestra (107) iluminada por la lámina (106) de iluminación. Para obtener una imagen completa de la muestra (107), es posible desplazar el soporte (101) según la dirección de detección (DD) para la toma de medidas correspondientes a varias secciones de la muestra (107), o bien el soporte (101) puede girar alrededor de su eje vertical para permitir la toma de varias medidas angulares de acuerdo con la técnica propuesta por Preibisch.

Desde el año 2015, los inventores de la presente solicitud han presentado varias solicitudes de patente dirigidas a diversas mejoras en este tipo de microscopios. Estas solicitudes de patente son las siguientes:

PCT/ES2015/070455 titulada “*Microscopio y procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras*” que describe un nuevo microscopio que combina la técnica de haz láser plano de tipo SPIM (Selective Plane Illumination Microscope) con la técnica de la tomografía de proyección óptica (OPT, Optical Projection Tomography).

PCT/ES2016/070714, titulada “*Dispositivo de carga múltiple para microscopio de haz*”

láser plano” que describe un dispositivo de carga múltiple para la alimentación a un microscopio de haz láser plano de un flujo continuo y secuencial de muestras.

5 PCT/ES2017/070028, titulada “*Dispositivo automático de cambio de objetivo para microscopio de haz láser plano*”, que describe un dispositivo que permite cambiar de manera automática el objetivo de adquisición de imágenes de un microscopio de haz láser plano en función de la magnificación deseada en cada momento.

10 PCT/ES2017/070028, titulada “*Dispositivo rotativo de cambio de objetivo para microscopio de haz láser plano*”, que describe un dispositivo donde el cambio de objetivo se realiza a través de rotaciones de la propia cubeta.

15 PCT/ES2017/070184 titulada “*Dispositivo de sujeción de muestras para microscopio*”, que describe un dispositivo para poder montar las muestras y medirlas en un equipo de haz láser plano.

20 PCT/ES2019/070629 titulada “*Microscopio y procedimiento de haz láser plano para muestras extensas*”, que describe un sistema para permitir la obtención de imágenes 3D de gran tamaño sin necesidad de desplazarla muestra.

En sistemas de microscopía de haz láser plano, el tamaño de la muestra condiciona la calidad máxima de imagen que puede ser obtenida. A medida que se obtienen imágenes de planos a mayor profundidad la resolución de las mismas se ve afectada, entre otros factores, por la dispersión que sufre la luz en su camino hasta el objetivo de detección.

25 En efecto, la fluorescencia emitida por un plano excitado de la muestra debe propagarse por la misma una determinada distancia. Por ello, cuanto más lejos del objetivo de detección esté dicho plano, mayor es la distancia que recorre la luz a través de la muestra, y por tanto mayor es el deterioro de las imágenes. Por ese motivo, actualmente el uso de esta técnica está
30 limitado al estudio de muestras muy transparentes (previamente clareadas) o de tamaño lo suficientemente pequeño como para que la pérdida de resolución por dispersión sea casi despreciable.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35 La presente invención describe un procedimiento que permite revertir el efecto de la dispersión

de la luz en imágenes de microscopía de haz plano con el objetivo de mejorar la calidad de las mismas. Para ello, en primer lugar se estima el grado de dispersión de la luz en la muestra y, posteriormente, se aplica un post-procesado a las imágenes obtenidas para recuperar parte de la resolución perdida. Esta mejora permite el uso de técnicas de haz láser plano para estudiar muestras cuyo tamaño o limitada transparencia impiden su visualización con las técnicas de haz láser plano actuales.

En este documento se define un sistema de coordenadas x , y , z donde: la “*dirección x*” se refiere a la dirección de iluminación; la “*dirección z*” se refiere a la dirección de detección, o dirección de profundidad de la muestra; y la “*dirección y*” es perpendicular a las direcciones x y z , es decir, es la dirección vertical en la posición natural de uso de un microscopio de haz láser plano tal como muestran las figuras.

En este documento, el término “*profundidad*” referido a una imagen o plano de la muestra se refiere a la distancia entre el plano de la muestra excitado por la lámina de iluminación y la cámara de detección. Cuanto mayor sea esta distancia, mayor será la profundidad de dicha imagen o plano. La profundidad, por tanto, se corresponde con la dirección z .

En este documento, el término “*haz gaussiano*” se refiere a un haz monocromático cuyo perfil de intensidad transversal al eje de propagación sigue una función Gaussiana. Este tipo de haces es la salida más común de cualquier fuente luz láser, correspondiendo al modo fundamental TEM_{00} .

La presente invención describe un procedimiento para corregir el efecto de dispersión de la luz en un microscopio de haz láser plano que comprende fundamentalmente los siguientes pasos:

a. Generación de una base de datos de funciones de transferencia para medios semitransparentes

El objetivo de este paso es caracterizar la pérdida de resolución de una imagen al propagarse en un medio semitransparente con baja dispersión. Para ello se realizan simulaciones con el objetivo de estimar una función de transferencia $H(k_x, k_y; z)$ para el medio que cuantifique la atenuación que sufre cada componente espectral (k_x, k_y) de una imagen para una profundidad z .

En este contexto, los parámetros k_x y k_y se refieren a frecuencias espaciales en una imagen. Éstas se expresan como ciclos o pares de línea por milímetro. En técnicas de microscopía limitadas por difracción, la frecuencia máxima en la imagen corresponde con el límite teórico de Abbe.

El método de Monte Carlo permite la simulación de la propagación de la luz en medios con dispersión con gran precisión. Además de estimar la distribución espacial de la intensidad lumínica, esta técnica puede ser empleada para calcular la respuesta en frecuencia del medio a un impulso unitario. Para ello, se realiza una simulación de la propagación de una fuente colimada de tipo 'pencil', en la cual los fotones son generados en dirección z en un punto $(x, y) = (0, 0)$ en un volumen tridimensional. Una vez completada la simulación, se calcula la transformada de Fourier para cada plano z para obtener así la respuesta en frecuencia del sistema.

Este proceso se repetirá para distintos valores del coeficiente de dispersión con el objetivo de crear una base de datos de funciones de transferencia correspondientes a cada coeficiente de dispersión.

En definitiva, en este paso se calcula, mediante simulaciones usando el método de Monte Carlo, la función de transferencia de un medio para diferentes coeficientes de dispersión y profundidades de escaneo, creando una base de datos de funciones de transferencia correspondientes a cada coeficiente de dispersión y profundidad de escaneo.

b. Estimación experimental del coeficiente de dispersión de la muestra empleando un microscopio de haz plano

Para poder realizar la deconvolución correctamente es necesario emplear la función de transferencia de un medio con un coeficiente de dispersión equivalente al de la muestra. Dado que el valor del mismo es desconocido a priori, se debe realizar una estimación experimental *in situ* del mismo. Es importante recalcar que la medida se realizará en el microscopio de haz láser plano con la muestra montada como procedimiento previo a la adquisición de imagen.

Así, asumiendo que la muestra tiene un coeficiente de dispersión relativamente

homogéneo, antes de escanear la muestra y una vez montada en el microscopio de haz plano, se ilumina la misma con un haz gaussiano en diferentes profundidades (z) y posiciones (y) respecto a la cámara. Esto se puede hacer bien de manera simultánea o bien de manera secuencial, dependiendo de si la frecuencia de proyección es mayor que la frecuencia de medidas de la cámara (frames per second, fps).

La cámara (sin filtro) captura la distribución de la luz dispersada por la muestra como consecuencia de la propagación de cada uno de los haces tal y como se muestra en la Fig. 2. La divergencia de los haces en cada una de las imágenes debida a la dispersión permite estimar el coeficiente de dispersión. Para ello, durante el post-procesado se miden perfiles de intensidad en la imagen y se cuantifica el ensanchamiento del haz en varios puntos del eje x (el de propagación del haz), tal y como se muestra en la Fig. 3. Minimizando la medida del error entre las curvas experimentales y las de los datos de las simulaciones de Monte Carlo del paso anterior, se determina cuál es el coeficiente de dispersión que se ajusta mejor.

Para incrementar la precisión del procedimiento, este se repite para cada una de las posiciones de medida (y, z) con el fin de estimar un coeficiente de dispersión medio de la muestra.

En definitiva, este paso comprende estimar experimentalmente usando el microscopio de haz láser plano el coeficiente de dispersión de una muestra suponiendo que es uniforme en toda la misma, donde la estimación comprende los siguientes pasos:

- b1) montar la muestra en el microscopio de haz laser plano;
- b2) iluminar cada plano de la muestra con un haz gaussiano;
- b3) capturar imágenes de la propagación del haz gaussiano en la muestra y repetir el proceso en diferentes posiciones; y
- b4) estimar el coeficiente de dispersión de la muestra midiendo la divergencia de los haces causada por la dispersión;

c. Escaneo de la muestra

Se escanea ahora normalmente la muestra mediante el microscopio de haz láser plano, obteniendo un conjunto de imágenes correspondientes a diferentes secciones de la muestra. Es decir, la toma de imágenes de la muestra se realiza en un microscopio de haz láser plano siguiendo un protocolo convencional de adquisición,

bien sea iluminando con un haz plano o con escaneo digital.

Las imágenes obtenidas presentarán artefactos causados por la dispersión, especialmente en las que corresponden a planos de escaneo situados a mayor profundidad respecto al objetivo de detección.

d. Corrección del efecto de la dispersión en las imágenes del escaneo

Con el fin de revertir y reducir los efectos de la dispersión en las imágenes obtenidas, se debe calcular la deconvolución de cada imagen con su correspondiente función de transferencia del medio, calculadas en el paso a. Para ello, se buscará en la base de datos de simulaciones el volumen que corresponda con el coeficiente de dispersión estimado en el paso b, y se calculará para cada imagen la convolución con la función de transferencia para dicho volumen.

Es decir, se deconvoluciona cada imagen de la muestra obtenida en el escaneo con la función de transferencia de la base de datos que corresponde al coeficiente de dispersión de la muestra y a la profundidad de escaneo de cada imagen, revirtiéndose así en cada imagen el efecto de la dispersión de la luz.

La deconvolución puede se puede realizar con múltiples métodos, preferentemente la deconvolución de Wiener.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figs. 1a y 1b muestran respectivamente una vista en perspectiva y una vista superior de los elementos principales de un microscopio de haz láser plano de tipo convencional.

La Fig. 2 esquema experimental de medida para estimar el coeficiente de dispersión de la muestra.

La Fig. 3 muestra el procedimiento de estimación del coeficiente de dispersión a partir de las medidas experimentales.

La Fig. 4 muestra un diagrama de flujo simplificado del procedimiento de la presente invención.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Se describe a continuación un procedimiento completo. En cualquier estudio realizado con el método propuesto, se asume que las simulaciones de Monte Carlo han sido realizadas con anterioridad, por ello se dispone de una base de datos con la información espacial para estimar el coeficiente de dispersión y una base de datos con las funciones de transferencia para un amplio abanico de medios y tamaños de muestra.

Así, la Fig. 2 muestra un esquema del montaje de la invención donde se aprecia el objetivo de iluminación (OI), las posiciones de medida (PM), el objetivo de detección (OD), la muestra (M), las medidas de dispersión del haz (MD), un bloque de análisis de imagen (AI), un banco de simulaciones de Monte Carlo (MC), y la función de transferencia para el coeficiente de dispersión estimado ($TF(\mu_s)$), donde μ_s es el coeficiente de dispersión.

La Fig. 3 muestra un esquema del procedimiento de estimación del coeficiente de dispersión donde se aprecia la medida de dispersión experimental (MDE) y la medida de dispersión en simulaciones de Monte Carlo (MD-MC) para diferentes valores de μ_s . En las gráficas se muestra el valor del parámetro y frente a la intensidad (I)

La Fig. 4 muestra así un diagrama de flujo completo del procedimiento de la presente invención. En la Fig. 4 se aparecen los siguientes símbolos y parámetros:

LS – Microscopio de haz plano

H – Datos función de transferencia

I_{MC} – Intensidad simulada

I_0 – Imagen cruda sin procesar

I – Imagen después de deconvolución

Bajo estas condiciones, los pasos para el procedimiento serán los siguientes:

1. Montaje de la muestra en el microscopio

2. Captura de imagen sin filtro en el objetivo de detección e iluminación de la muestra con un haz gaussiano. Se capturan imágenes a diferentes profundidades z y posiciones en el eje y para estimar el coeficiente de dispersión medio de la muestra.

3. Adquisición de imagen de la muestra usando el protocolo convencional de haz plano preferido por el usuario.
 4. Cálculo de la deconvolución de las imágenes obtenidas en el paso 3 con la función de transferencia del medio para el coeficiente de dispersión estimado experimentalmente en el paso 2.
- 5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para corregir el efecto de la dispersión de la luz en medidas de un microscopio de haz láser plano, caracterizado por que comprende los siguientes pasos:

5 a) calcular, mediante simulaciones usando el método de Monte Carlo, la función de transferencia de un medio semitransparente para diferentes coeficientes de dispersión y profundidades de escaneo, creando una base de datos de funciones de transferencia correspondientes a cada coeficiente de dispersión y profundidad de escaneo;

10 b) estimar experimentalmente usando el microscopio de haz láser plano el coeficiente de dispersión de una muestra suponiendo que es uniforme en toda la misma, donde la estimación comprende los siguientes pasos:

b1) montar la muestra en el microscopio de haz laser plano;

b2) iluminar cada plano de la muestra con un haz gaussiano;

b3) capturar imágenes de la propagación del haz gaussiano en la muestra y

15 repetir el proceso en diferentes posiciones; y

b4) estimar el coeficiente de dispersión de la muestra midiendo la divergencia de los haces causada por la dispersión;

c) escanear normalmente la muestra mediante el microscopio de haz láser plano, obteniendo un conjunto de imágenes correspondientes a diferentes secciones de la muestra;

20 y

d) deconvolucionar cada imagen de la muestra obtenida en el escaneo con la función de transferencia de la base de datos que corresponde al coeficiente de dispersión de la muestra y a la profundidad de escaneo de cada imagen, revirtiéndose así en cada imagen el efecto de la dispersión de la luz.

25 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la deconvolución se realiza utilizando el método de Wiener.

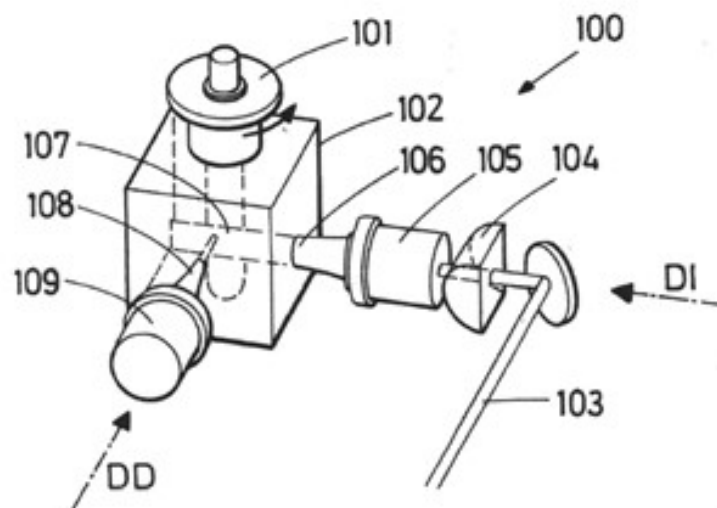


FIG. 1A
TÉCNICA ANTERIOR

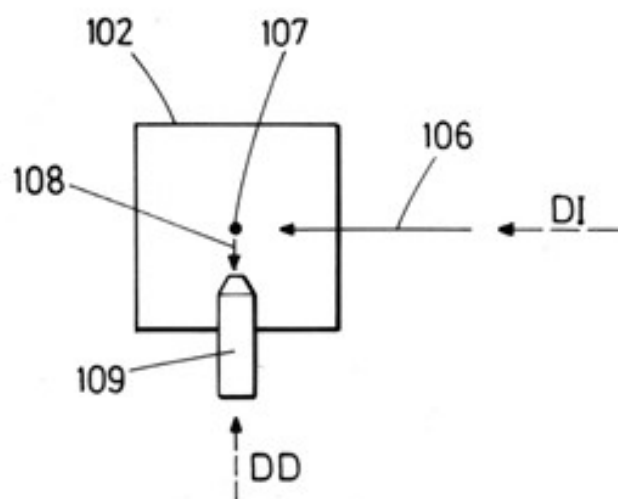


FIG. 1B
TÉCNICA ANTERIOR

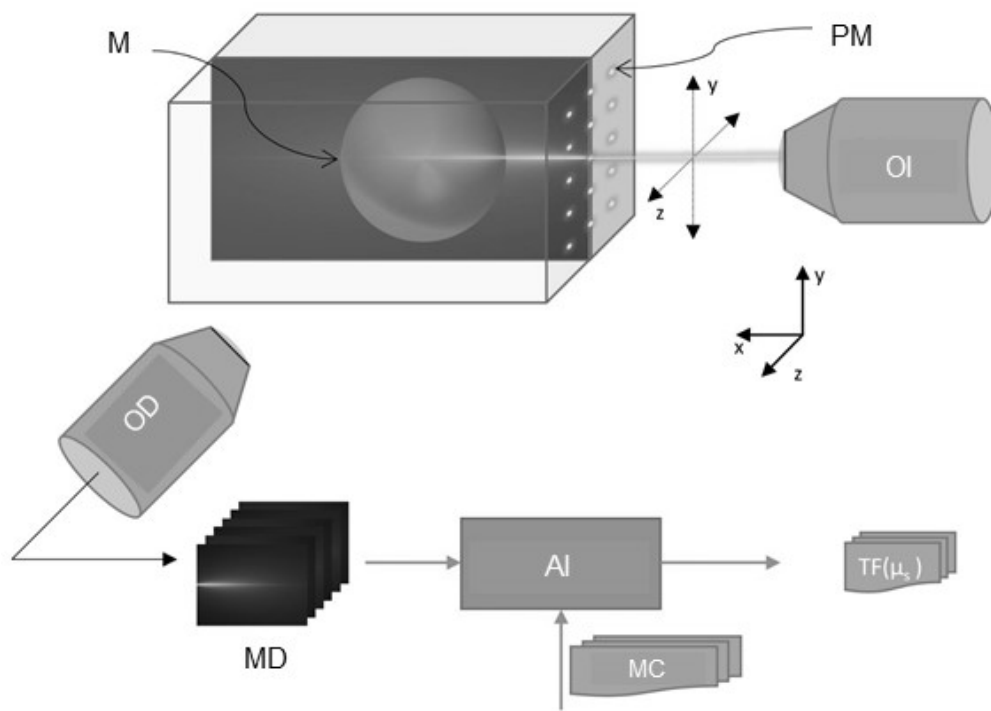


FIG. 2

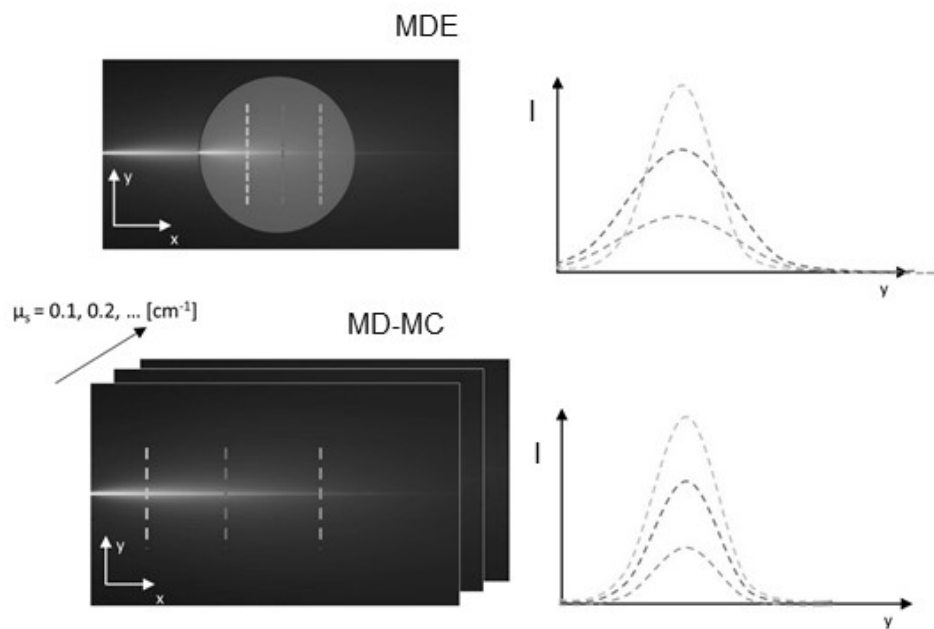


FIG. 3

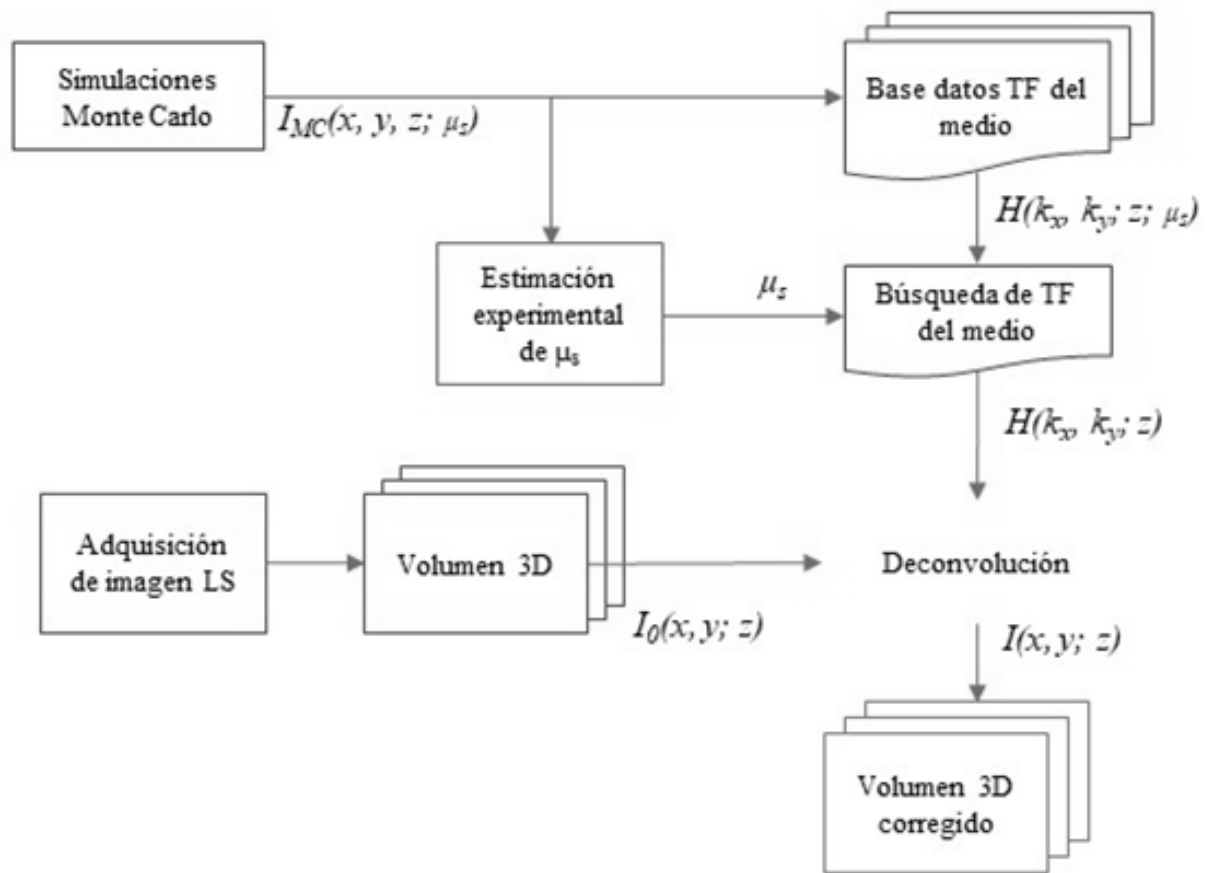


FIG. 4