

Universitatea POLITEHNICA din București
Facultatea de Științe Aplicate
Specializarea Inginerie Fizică

PROIECT DE DIPLOMĂ

FOCALIZAREA ȘI FILTRAREA SPAȚIALĂ ÎN MICROSCOPIA HOLOGRAFICĂ DIGITALĂ PENTRU DETERMINAREA CARACTERISTICILOR PROBELOR BIOLOGICE

Absolvent: Elena-Luiza Teleanu

Coordonator științific: Ș.l.dr.fiz. Mona Mihăilescu

Scopul lucrării

- Analiza tehnicii de microscopie holografică digitală ca instrument în studiul probelor biologice
- Îmbunătățirea imaginilor preluate prin utilizarea unor filtre spațiale
- Analiza focalizării în imaginile celulelor studiate
- Reconstituirea unei imagini 3D a celulelor printr-o tehnică de decuplare

Cuprinsul lucrării

- Capitolul 1 – Introducere
- Capitolul 2 – Principii optice utilizate în studiul holografiei
- Capitolul 3 – Reconstrucția numerică
- Capitolul 4 – Descrierea experimentului
- Capitolul 5 – Prelucrarea digitală a hologramelor
- Capitolul 6 – Concluzii

Principiile holografiei

- Are la bază fenomenele de :
 - interferență – înregistrarea hologramei
 - difracție – înregistrarea și reconstrucția

- Înregistrarea:

$$I_H(x, y) = |R|^2 + |O|^2 + OR^* + RO^*$$

- Holograma conține atât informația de amplitudine cât și de fază

$$O_{dev} = |I_o| \exp[i(\varphi(x, y) + \Delta\varphi(x, y))]$$

Fig.1 Configurația prin reflexie

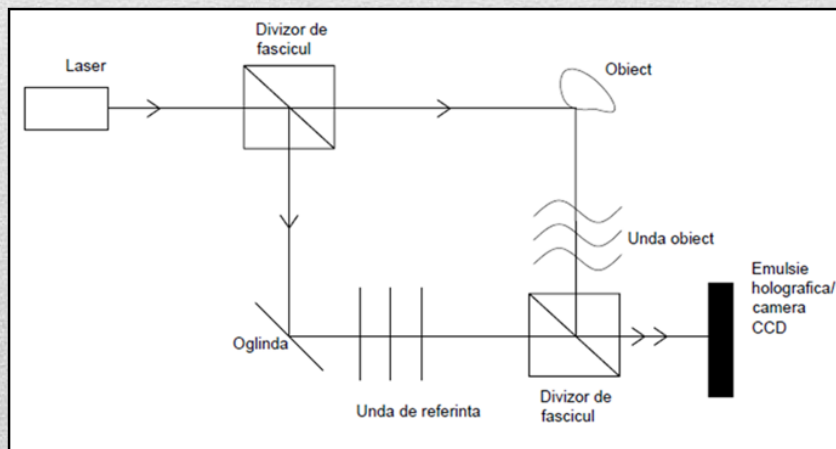
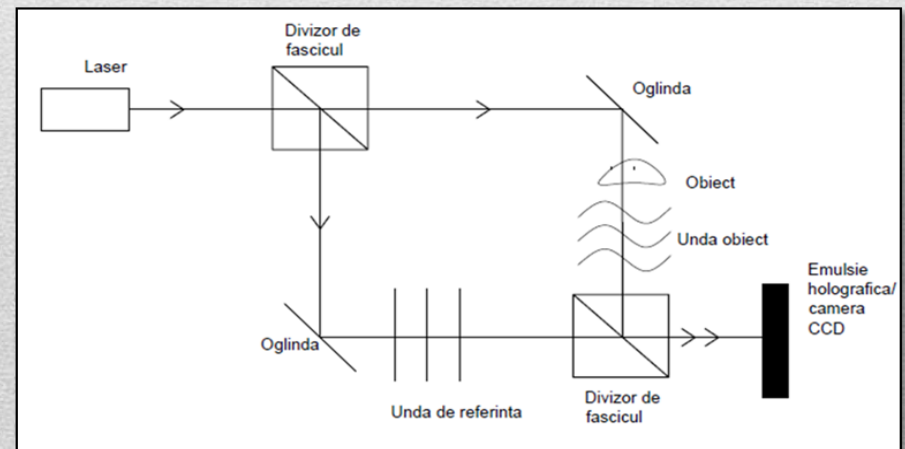


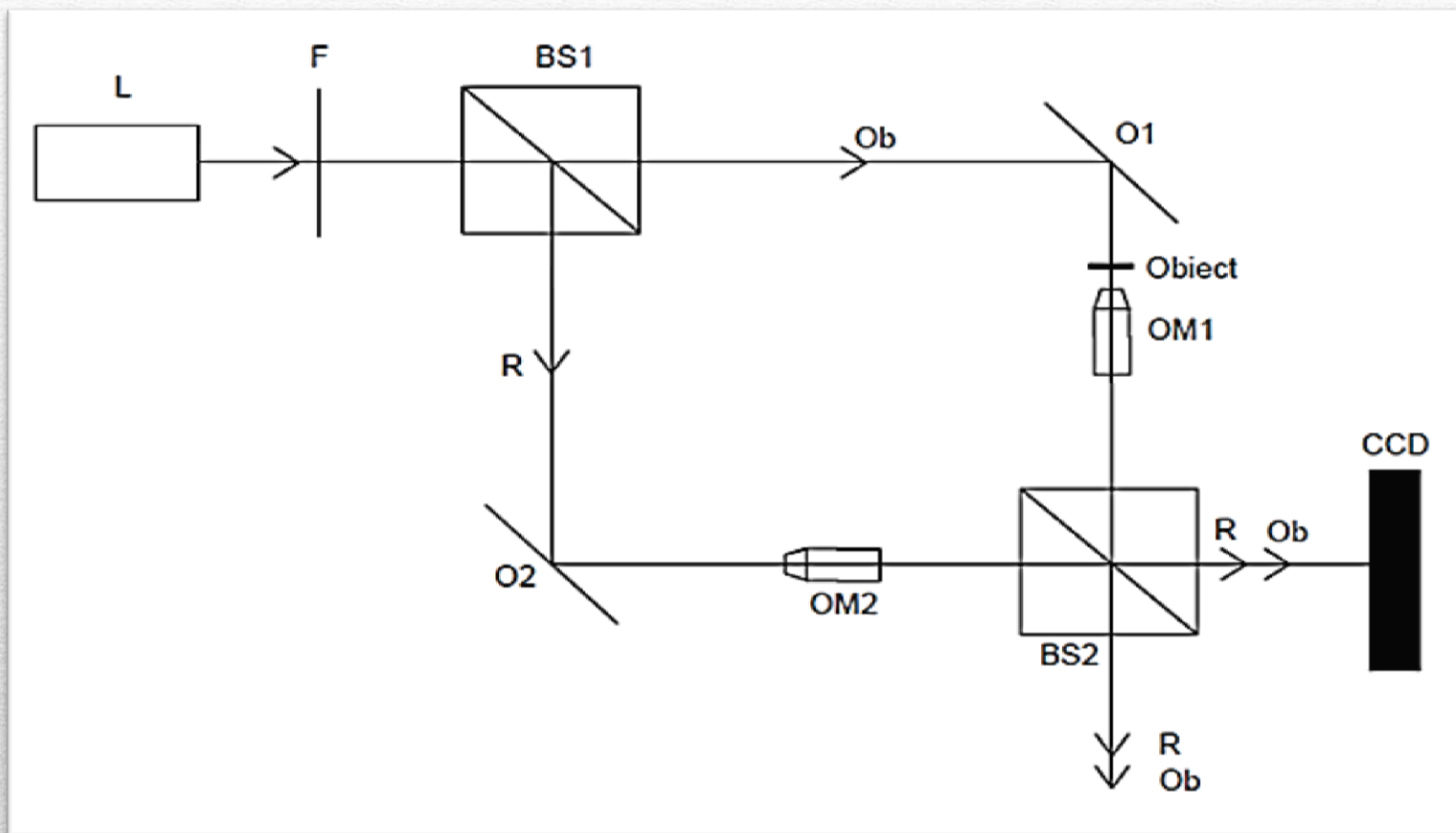
Fig.2 Configurația prin transmisie



Reconstrucția

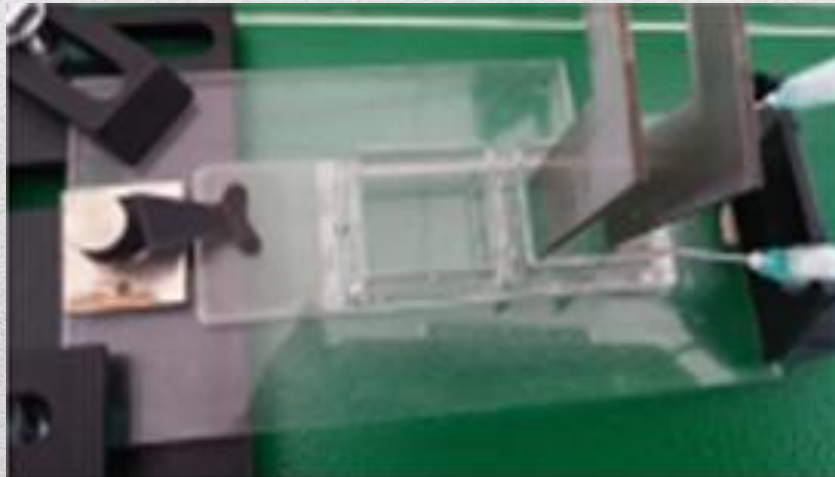
- Holografia optică – prin iluminarea hologramei
– se pot înregistra mai multe holograme pe același suport
- Holografia digitală – simularea numerică a difracției
- Figura de difracție calculată în aproximația Fresnel
- $$E_{rec}(\xi, \eta) = \frac{\exp\left(\frac{i2\pi z}{\lambda}\right)}{i\lambda z} \iint_{\Sigma} I_H(x, y) R(x, y) \exp\left\{i \frac{\pi}{\lambda z} [(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2]\right\} dx dy$$
- Este ulterior eliminat termenul DC din imaginea reconstruită

Montajul experimental



Probele biologice

- Fac parte din linia celulară B16F10
- Electroporarea - aplicarea unor diferențe de potențial de scurtă durată și cu amplitudini mari asupra probelor
- Două medii de cultură:
 1. Soluție de manitol 300mM
 2. Mediu de cultură fără fenol roșu – DMEM



Reconstrucția digitală

- Holograma înregistrată (Fig.3)
- Imaginea cu nivele de gri obținută din hologramă (Fig.4)

Fig.3

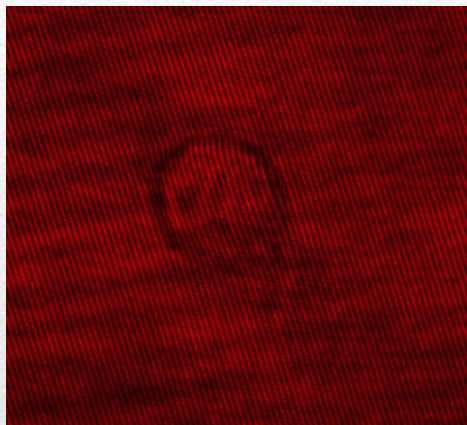


Fig.4



- FFT a imaginii cu tonuri de gri (Fig.5)
- Ordinul +1 din FFT (Fig.6)

Fig.5

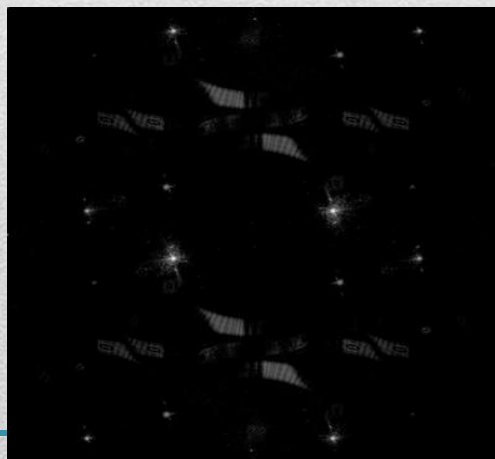
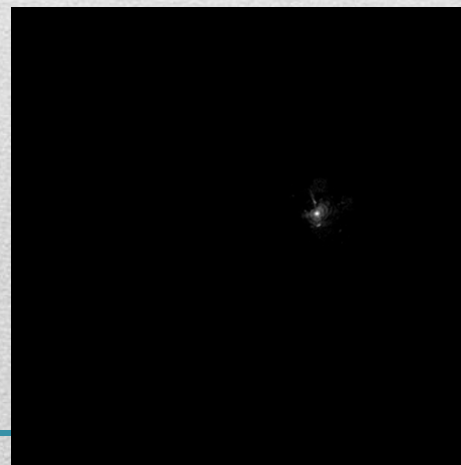
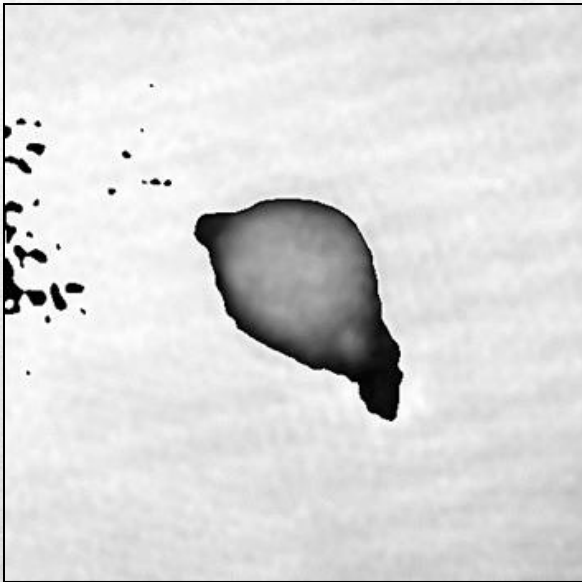


Fig.6

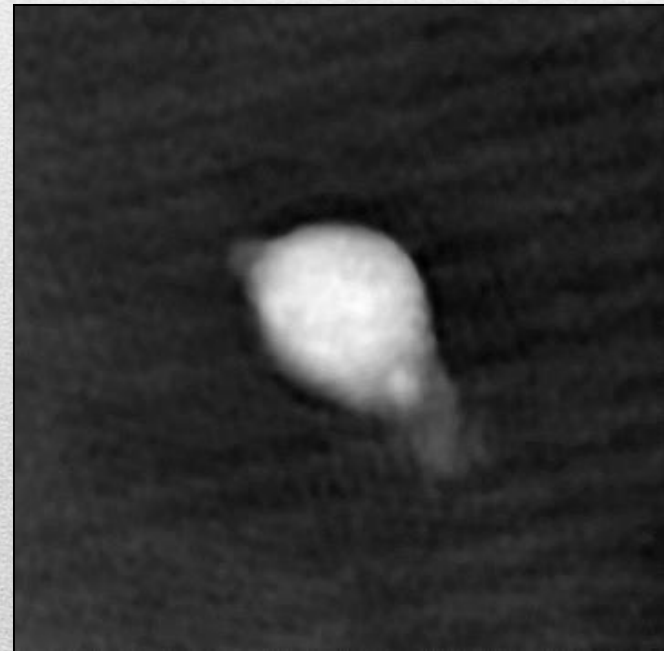


Reconstrucția digitală

- Imaginea de fază wrap

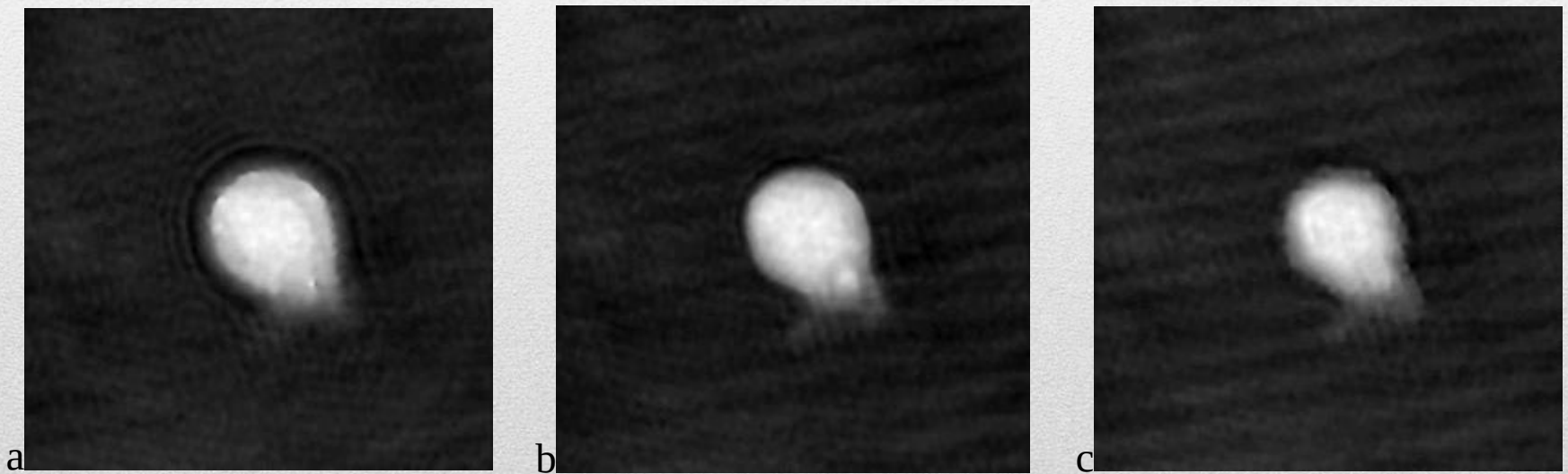


- Faza după aplicarea funcției unwrap

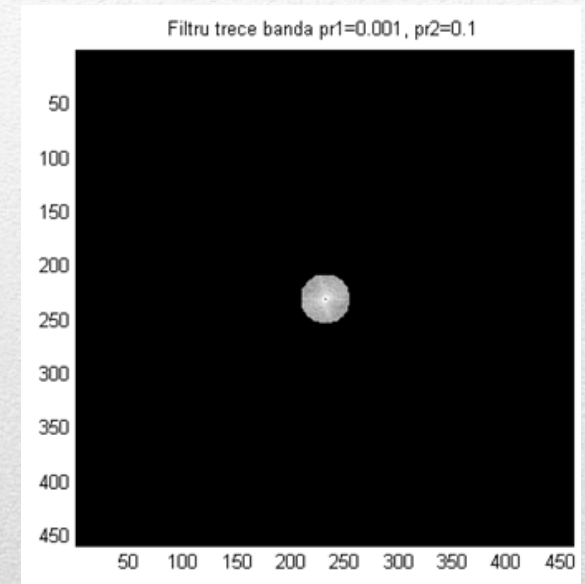
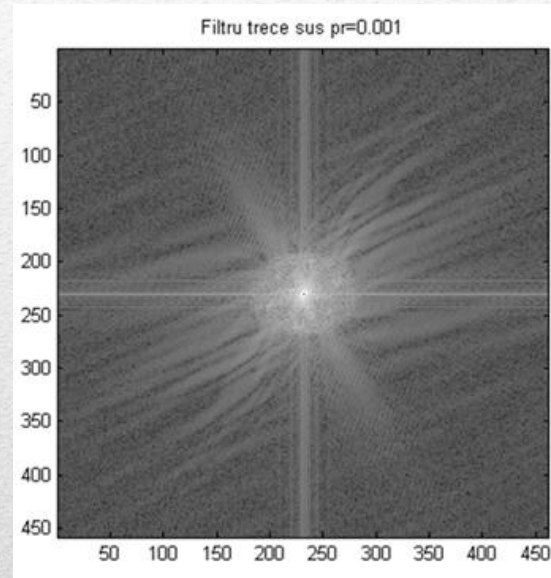
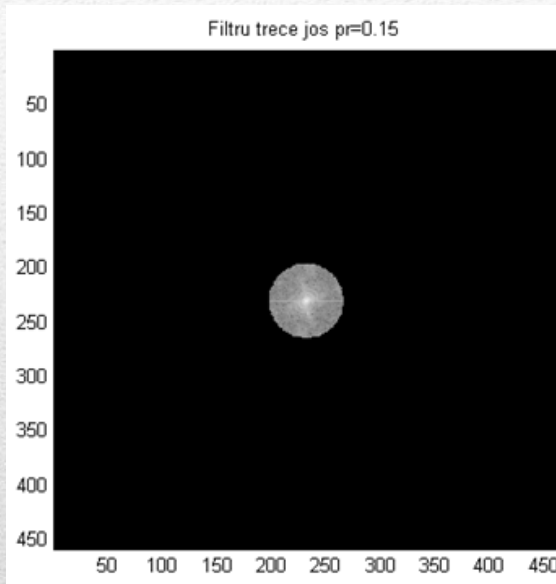


Reconstrucția digitală

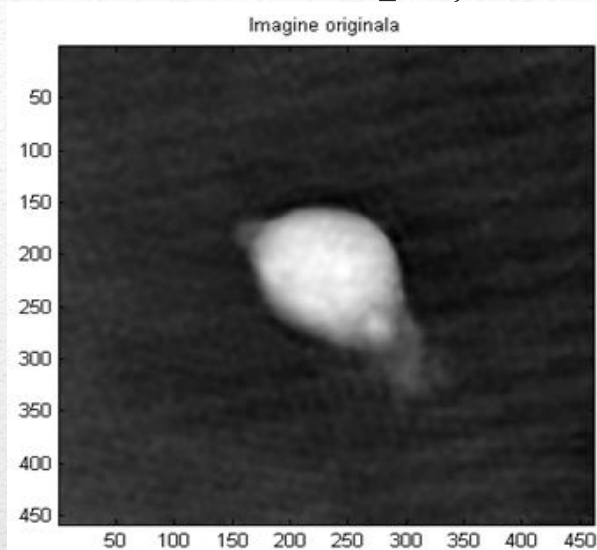
Imagini reconstruite la diferite distanțe pentru aceeași celulă



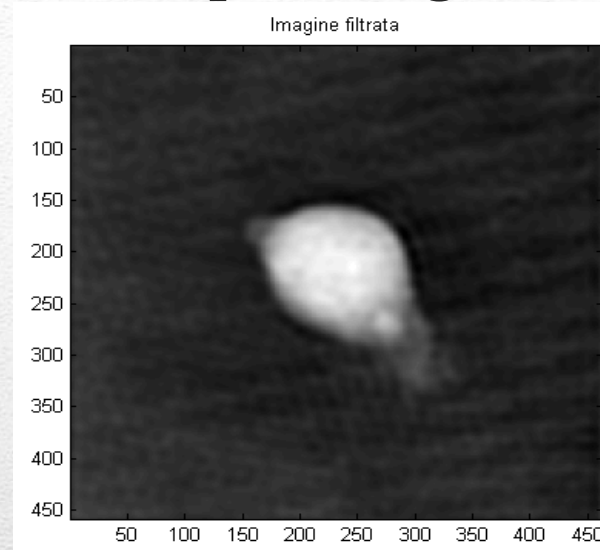
Filtrări în spațiul Fourier ale imaginilor reconstruite



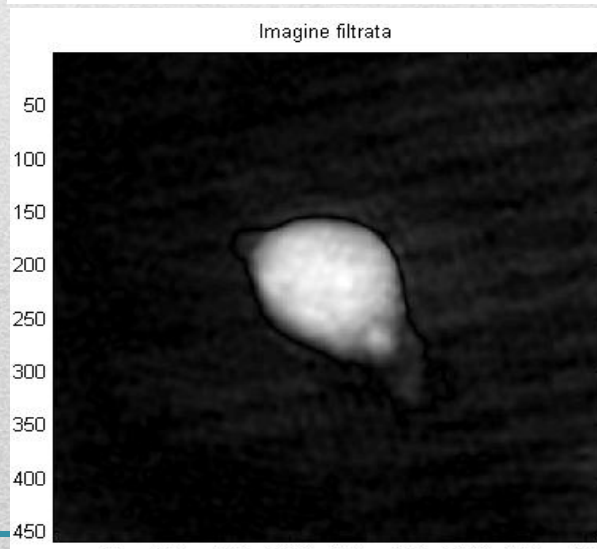
Efecte ale filtrării în spațiul Fourier asupra imaginilor reconstruite



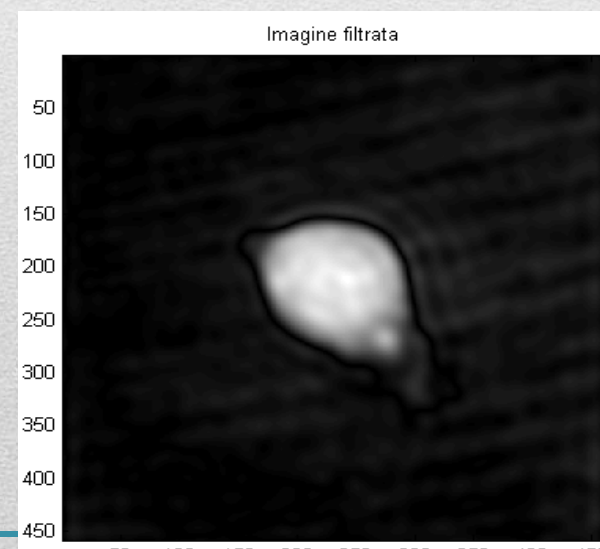
b1)



b2)



b3)



b4)

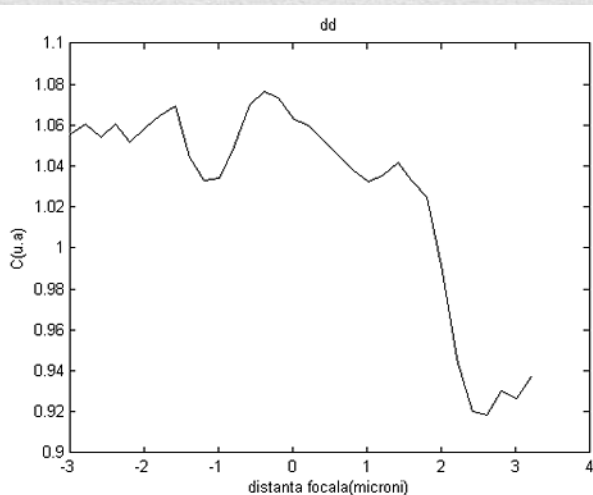
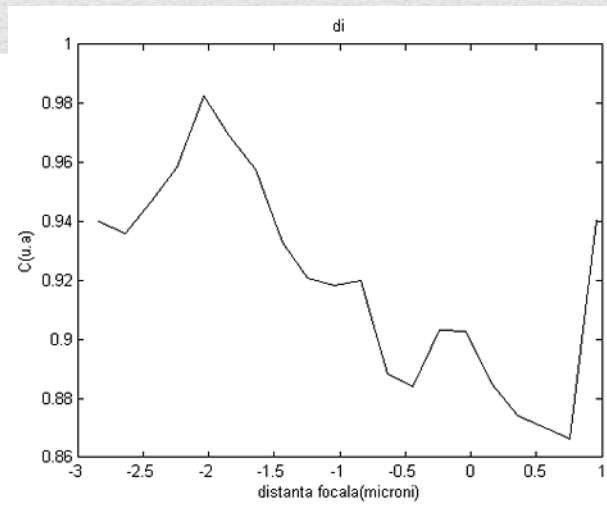
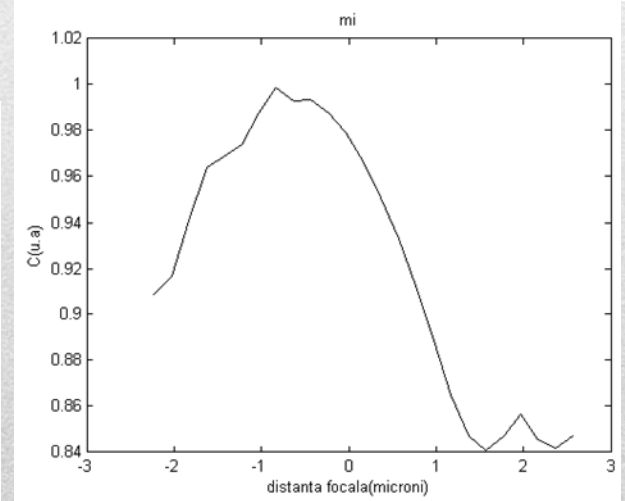
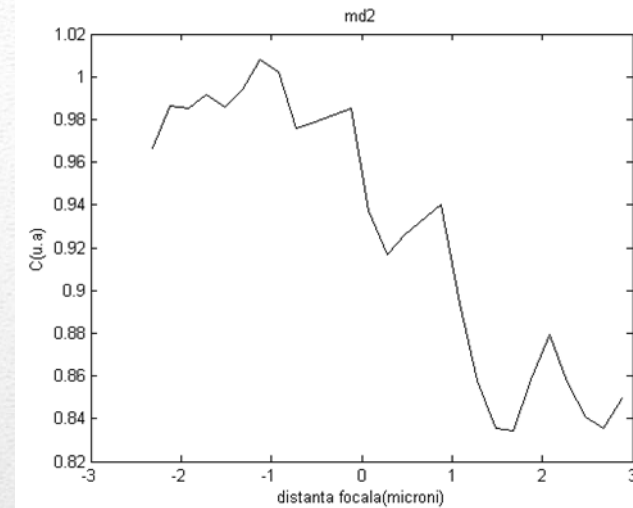
Criteriul de focalizare

- Coeficientul Tamura:

$$C = \sqrt{\frac{\sigma(I)}{m(I)}}$$

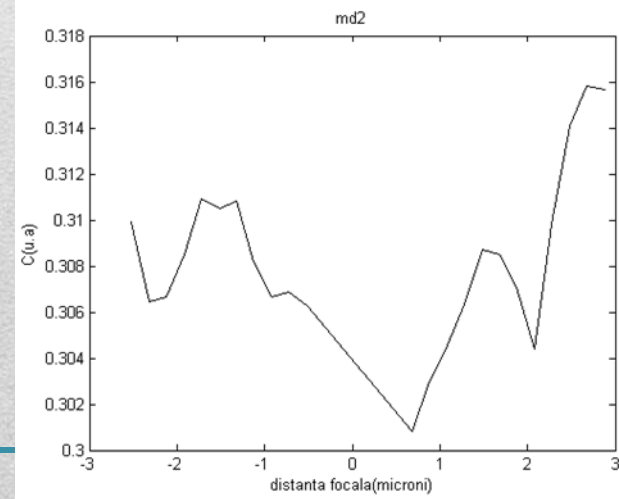
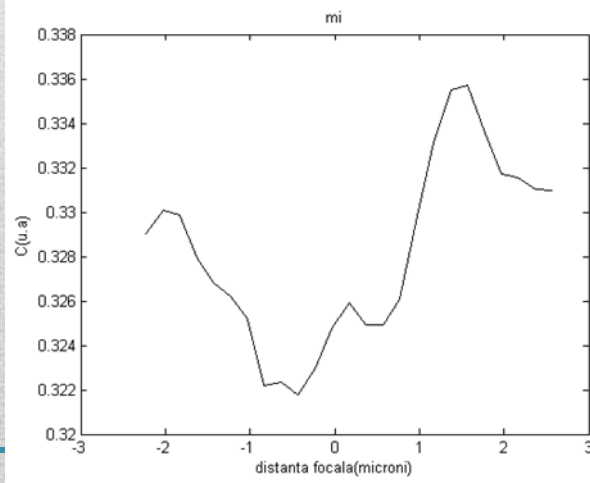
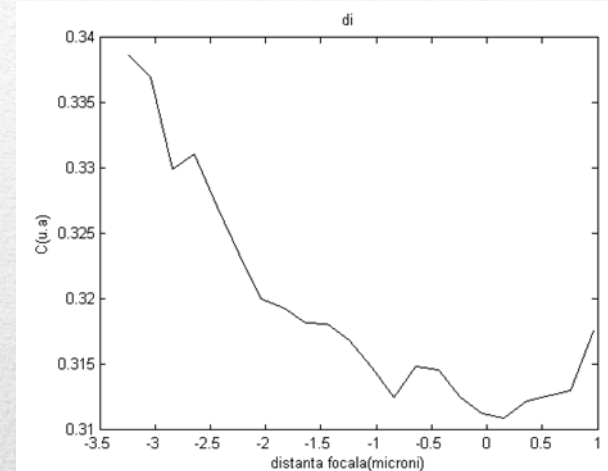
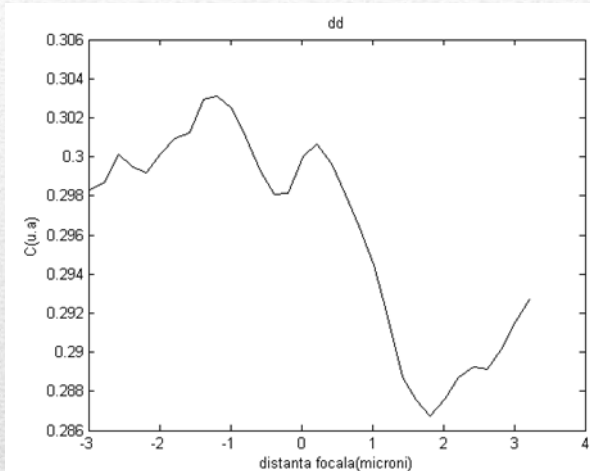
$$d_{foc} = d(C_{minim})$$

- Aplicarea criteriului după folosirea unui filtru trece jos



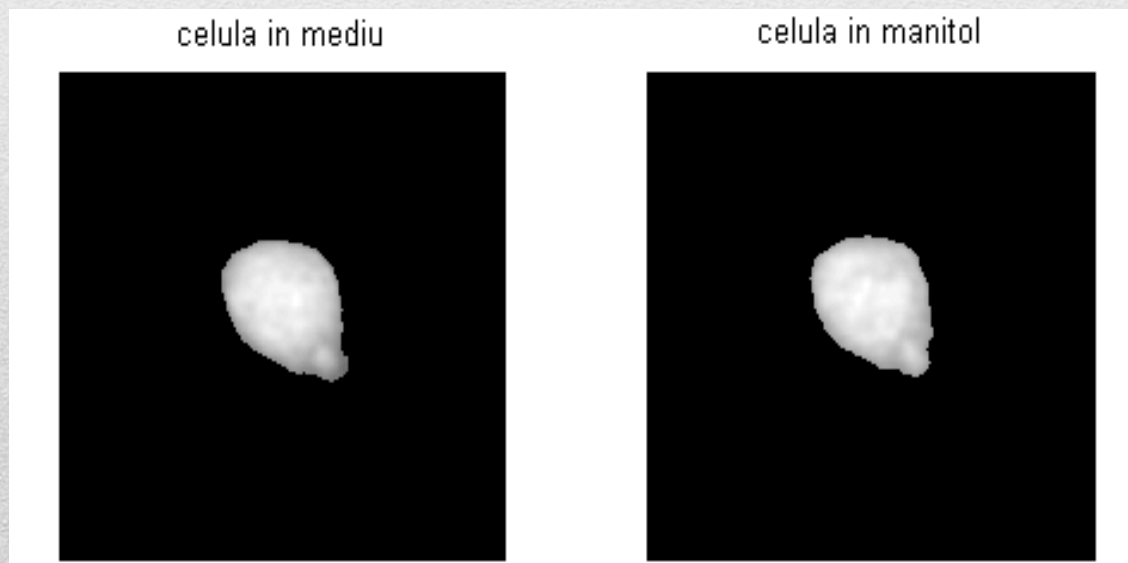
Criteriul de focalizare

- Aplicarea criteriului după eliminarea fundalului

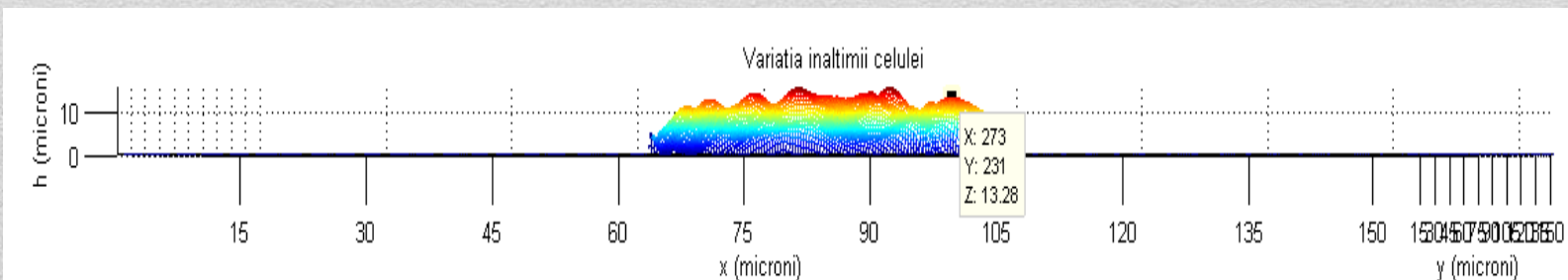
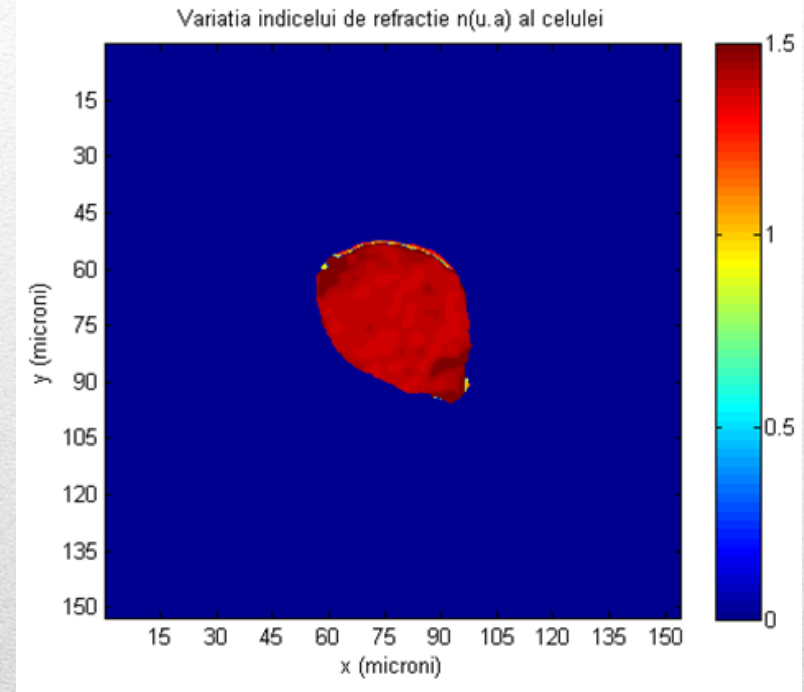
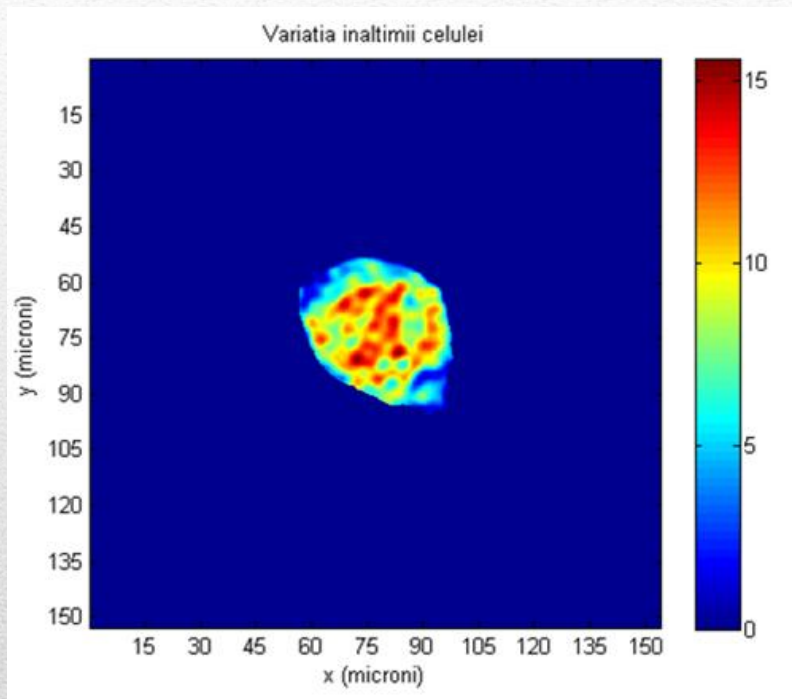


Determinarea înălțimii și a indicelui de refracție al probei din informația de fază

$$\Delta\varphi_d = \frac{2\pi}{\lambda} (n_{cel} - n_d) h_c$$
$$\Delta\varphi_m = \frac{2\pi}{\lambda} (n_{cel} - n_m) h_c$$



Determinarea înălțimii și a indicelui de refracție al probei din informația de fază



CONCLUZII

- Metoda are numeroase avantaje
 - vizualizare în timp real
 - observarea unor probe biologice care suferă anumite modificări în timpul experimentului
 - oferă informații cantitative pe a treia axă
 - tehnică nedistructivă și nu necesită markeri
- Reconstrucția numerică ne-a permis corectarea unor aberații din montajul experimental eliminând necesitatea unor elemente optice suplimentare
- Algoritmul de focalizare elimină necesitatea de a aduce modificări ale montajului în timpul experimentului
- Cu ajutorul software-ului MATLAB am realizat un program în care am obținut informații cantitative asupra probelor studiate

BIBLIOGRAFIE

- U. Schnars, W. Juptner, “Digital recording and numerical reconstruction of holograms”, Measurement Science and Technology 13 (2002)
- R.C. Gonzalez, R.E. Woods, S.L. Eddins, „Digital Image Processing Using MATLAB”, Editia a 2-a, Gatesmark Publishing, USA, 484-498 (2009)
- T. Colomb, „Numerical aberrations compensation and polarization imaging in digital holographic microscopy”, EPFL, Lausanne (2006)
- P. Memmolo, C. Distanto, M. Paturzo, A. Finizio, P. Ferraro, B. Javidi, „Automatic focusing in digital holography and its application to stretched holograms”, Optics Letters, Vol. 36, Nr. 10 (2011)

**Vă mulțumesc pentru
atenție!**