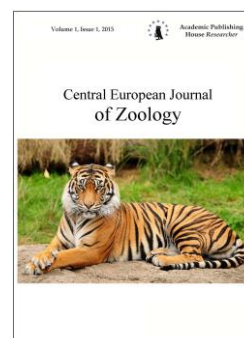


Copyright © 2018 by Academic Publishing House Researcher s.r.o.



Published in the Slovak Republic
Central European Journal of Zoology
Has been issued since 2015.
E-ISSN 2500-3739
2018, 4(1): 3-12

DOI: 10.13187/cejz.2018.1.3

www.ejournal40.com

Articles and Statements

Technical and Methodical Notes on the Lensless Holographic Microscopy Applications for Helminthology and Zooparasitology. Case I: Spectrozoal/Multispectral Analysis of *Ascaris Lumbricoides* based on Coherent and Incoherent Light Sensor Platforms

Brief communication

Phillip A. Nasirov ^a, Arthur G. Jablokov ^a, Oleg V. Gradov ^a

^aTalroze Institute of Energy Problems of Chemical Physics, Moscow, Russian Federation

Abstract

The article considers the novel method and device for helminthology and zooparasitology for applied problem, known as the laser spectrozoal lens-less holographic ascariscope/ascarimeter (and consequently the concept approach – laser spectrozoal lens-less ascariscopy or ascarimetry). Our device was approbated using *Ascaris lumbricoides* cross-section micropreparete/sample for visualization in different spectrozoal channels. It is obvious, that the basic principle of laser-based analysis may be distributed not only as a simple laser ascariscopy and ascarimetry, but in frames of laser holographic, laser fluorescence, laser interferometric, laser speckle imaging (ESPI) and laser velocimetric setup schemes.

Keywords: ascariscope, ascarimeter, lens-less microscope, lens-less holography, electronic speckle pattern imaging (ESPI), spectrozoal imaging, multispectral mapping, colocalization.

1. Введение

Общезвестно, что, наряду с такими высокоразвитыми, доступными лишь небольшому числу пользователей техниками, как аналитическая электронная микроскопия (Hemphill, Croft, 1997) и лазерная микроскопия и микродиссекция (Jones et al., 2004), в паразитологии активно используются стандартные рутинные методы оптической микроскопии, причем для ряда массовых задач, таких, например, как анализ фекального биоматериала на индикаторы инвазий (Petithory and Ardoin-Guidon, 1995), такие, например, как яйца *Ascaris lumbricoides*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Schistosoma sp.*, крючки для *Echinococcus granulosus*, личинки нематод, *Strongyloides stercoralis*, как правило, использование даже элементарных средств исследовательской микроскопии (специальные виды контраста, флуорохромирование и т.д.) является избыточным. Более того, часто перед производителями оборудования ставится не задача увеличения числа диагностических дескрипторов, а задача упрощения оборудования для массовости анализа (пример – так называемые гельминтоскопы, оптическая сложность которых не превышает сложность микроскопической оптики начала XIX века). В цифровую эпоху, на пути к массовой телемедицине, это приводит к созданию паразитологических или гельминтологических систем и средств виртуальной микроскопии (Alcala-Canto et al., 2012; Abdul-Ghani, 2015), в частности – основанной на веб-интерфейсе (Linder et al., 2008). Если в

начале данного тренда комбинированные устройства телемедицинской паразитологической диагностики представляли собой обычные микроскопы с упрощенной оптической системой, снабженные веб-камерой, а затем и собственно короткофокусные веб-камеры с программой, позволявшей транслировать изображение через сеть в реальном времени, то впоследствии, с развитием разрешающей способности светочувствительных матриц и уменьшением размера пикселей, был произведен переход к безлинзовой микроскопии. Безлинзовая микроскопия настолько малобюджетна, что её внедрение смогли позволить себе азиатские и африканские государства, в которых ранее развитая микроскопия являлась существенной материальной и организационной помехой внедрению микроскопического скрининга в протоколы системы массовой паразитарной диагностики. Пионером движения за демократизацию диагностики на основе безлинзовой микроскопии является Айдоган Озкан из UCLA. Были исследованы и внесены в базы данных для машинного обучения (обучение с учителем – supervised learning) морфометрические диагностические паттерны, релевантные для паразитологии, такие, как трипаномы (возбудители сонной болезни) и малярийный плазмодий; в качестве образцов гельминтологической практики для свободноживущих круглых червей были исследованы и идентифицированы свободноживущие нематоды вида *Caenorhabditis elegans* (Coskun et al., 2011; Isikman et al., 2010, 2011, 2012; Bishara et al., 2010, 2012; Shimogawa et al., 2018). Методы машинного обучения были реализованы с использованием волонтеров на базе пакетов типа BIOGAMES, созданных для решения этой задачи (Mavandadi et al., 2012; Ozcan, 2014). Нужно отметить, что технологически удавалось достичь объёмной/ псевдообъёмной репрезентации гельминтологических и паразитологических объектов за счет использования голографии на чипе и лазерных многоугловых технологий проецирования. В силу контактной локализации и возможностей программного обеспечения впоследствии была устранена дефокусировка и потребность в Y-позиционировании с помощью ручки тонкой настройки (Trujillo, Garcia-Sucerquia, 2014). Рекордные времена экспонирования были достигнуты на терагерцовой или фемтосекундной лазерной технике (Mendoza-Yero et al., 2013), но, в целом, измерения такого типа и регистрация псевдотрёхмерных голографических паттернов и паттернов паразитов в лазерных шпирен-методах и спекл-опосредованных методах проецирования не требует этой экзотики и может быть реализована на лазерах из обычных лазерных указок. Поэтому, даже для полевых исследований в сверхнизкобюджетных условиях не представляет существенной проблемы проведение безлинзовых микроскопических и голографических исследований на чипе. Нами был проведен комплекс исследований для не исследовавшихся таким методом в секционированном состоянии представителей семейства *Ascaridae*, представляющих особое паразитологическое значение в случае *Ascaris lumbricoides*.

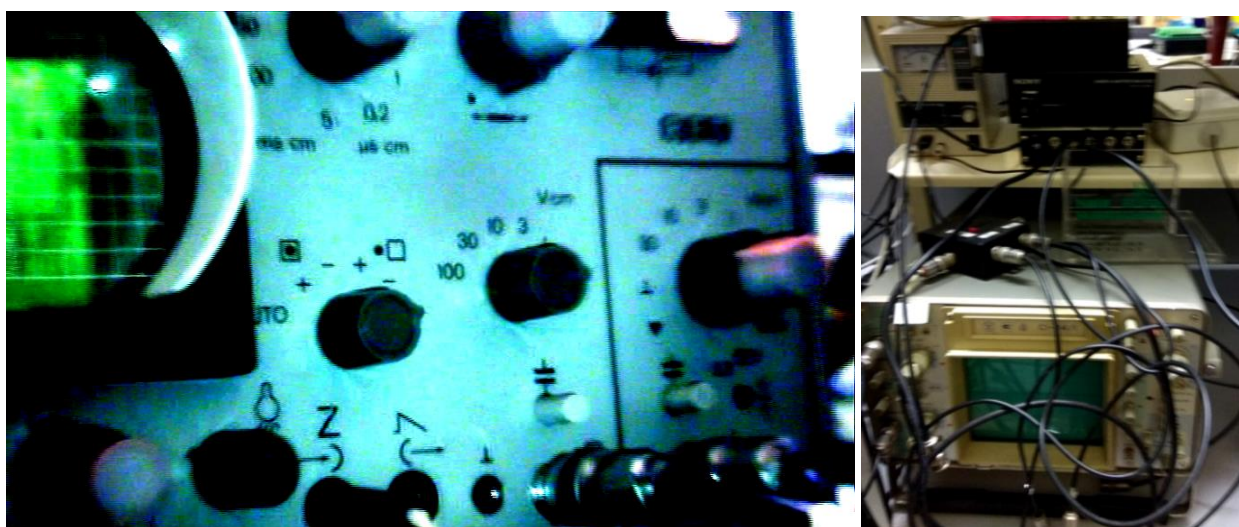


Рис. 1. Визуализация видеосигнала аскарископии возможна на модернизированном осциллокопе-стереогониометре (слева) или осциллографе с XYZ- входами с сепаратором

2. Материалы и методы

Нами были реализованы несколько систем лазерной спектрозональной аскарископии и аскарископии на чипе. Аскарископии базировались на аналоговых матрицах – приборах с зарядовой связью (ПЗС) и выводом на осциллограф-стереогониометр с X-, Y- и Z-каналами или обычный высокочастотный осциллограф с X-, Y- и Z-каналами (см. [Рисунок 1](#)). Селективно выводить сигналы на многоканальный высокочастотный осциллограф позволял сепаратор с несколькими VNC-разъёмами конструкции Ф.А. Насирова, как это показано на приведенном выше рисунке. Цифровая версия (т.н. «аскарископии») была имплементирована на основе КМОП-матриц стандартных веб-камер и КМОП-сенсоров камерофонов. Облучение образца осуществляли двумя способами – с помощью некогерентных источников (светодиодов, LED, спектрозональная область эффективности которых подбиралась по соответствующему типу/составу полупроводника, как это показано в [Таблице 1](#)) и с помощью полупроводниковых или твердотельных лазеров, лазеров с диодной накачкой (DPSS) – как источников когерентного излучения. Если в первом случае являлись возможными только шпирен-техники аналитики объёма среза, то во втором случае – можно было производить расчеты по спекл-паттернам в области проекции отдельных анатомических структур. Измерения проводились синхронно – с визуализацией по трёхканальной схеме в RGB-каналах (красный, зелёный, синий) в случае использования LED «белого цвета» и в последовательном режиме, если источники спектра в различных поддиапазонах были разделены (т.н. «оптическое мультиплексирование»). При использовании матриц типа Foveon X3 имелась возможность измерения спектрозональных сигналов в одной точке, но в случае использования фильтров Байера использовались только отдельные, разнесенные на размер пикселя (порядка микрон) для R, G и B каналов.

Таблица 1. Принцип подбора LED разных длин волн для спектрозонального аскарископа

Цвет	Длина волны (нм)	Материал полупроводника
Инфракрасный	$\lambda > 760$	Арсенид галлия (GaAs) Алюминия галлия арсенид (AlGaAs)
Красный	$610 < \lambda < 760$	Алюминия-галлия арсенид (AlGaAs) Галлия арсенид-фосфид (GaAsP) Алюминия-галлия-индия фосфид (AlGaInP) Галлия(III) фосфид (GaP)
Оранжевый	$590 < \lambda < 610$	Галлия фосфид-арсенид (GaAsP) Алюминия-галлия-индия фосфид (AlGaInP) Галлия(III) фосфид (GaP)
Жёлтый	$570 < \lambda < 590$	Галлия арсенид-фосфид (GaAsP) Алюминия-галлия-индия фосфид (AlGaInP) Галлия(III) фосфид (GaP)
Зелёный	$500 < \lambda < 570$	Индия-галлия нитрид (InGaN) / Галлия(III) нитрид (GaN) Галлия(III) фосфид (GaP) Алюминия-галлия-индия фосфид (AlGaInP) Алюминия-галлия фосфид (AlGaP)
Синий	$450 < \lambda < 500$	Селенид цинка (ZnSe) Индия-галлия нитрид (InGaN) Карбид кремния (SiC) в качестве субстрата Кремний (Si) в качестве субстрата
Фиолетовый	$400 < \lambda < 450$	Индия-галлия нитрид (InGaN)

Ультрафиолетовый	$\lambda < 400$	Нитрид бора (215 нм) Нитрид алюминия (AlN) (210 нм) Нитрид алюминия-галлия (AlGaIn) Нитрид алюминия-галлия-индия (AlGaInN) — (менее 210 нм)
------------------	-----------------	---

3. Результаты

Результаты визуализации приводятся на серии [Рисунков 2 А-Е](#), для расшифровки которых предлагается воспользоваться поперечно-секционной схемой на [Рисунке 3](#):

При использовании красного спектрального диодного источника, который, в отличие от ОКГ (лазера) с узкой единичной длиной волны, имеет полуширину полосы в десять-двадцать нанометров, хорошо градиентно визуализируются не только оптически плотные контуры окрашенных границ препарата, но и почти все субкутикулярные структуры, причём, в силу градиентного отображения, они могут являться предметом микрофотометрического/-фотоколориметрического анализа. Уровень яркости некогерентного диодного источника не пересвечивает центральную зону препарата, вследствие чего эффекты «контрастной отсечки», свойственные лазерной безапертурной микроскопии, не обнаруживаются. Нами было проведено компаративное изучение возможностей визуализации в канале R для некогерентного и когерентного источника, как это показано на [Рисунке 2-а](#) и [Рисунке 2-б](#).

Качественно иная картина наблюдается при использовании зеленого диапазона – G-канала, так как гистологическая окраска препарата обладает существенным оптическим поглощением в зеленой области, вследствие чего контрастирование очень ярко выражено, как при шлирен-методе, причём затемненными являются те области, которые не проявлялись активно в красном (R) спектральном канале – например, гиподерма и, особо, боковые валики гиподермы. Аналитика микрофотометрического уровня при таком градиенте и контрасте произведена быть не может. Однако, что характерно, отдельные неоднородности иммерсии и свободные, в том числе – артефактные, неокрашенные клеточные элементы при этом визуализируются хорошо, так как их показатель преломления эффективен в зеленой области. Это показано на [Рисунке 2-В](#).

Для установления вклада различных пигментированных компонент в градиент оптической плотности на двух вышеуказанных спектральных диапазонах, а также для подбора оптимального аскарископического режима измерений, нами был проведен цикл экспериментов по подбору оптимальных источников: белого / псевдо-белого (в аддитивном и субтрактивном аспекте) излучения. Принципы измерений на лазерных источниках континуума и суперконтинуума являются, с очевидных экономических позиций, избыточными для аскарископических либо более общих гельминтоскопических задач, поэтому был принят протокол RGB-измерений при попеременно-изменяемых комбинациях диодных источников с различными длинами волн. Для двух вышеуказанных (R+G) каналов результат измерений приведен на [Рисунке 2-Г](#). С позиций рефракционного и шлирен-метода как источника гистометрических данных, можно заключить, что применение в аскариметрии на чипе комбинированно двух спектральных источников (R, G) позволяет не только сепарировать тени и, тем самым, выявить по формулам, общеизвестным из курса инженерной оптики, объём препарата и высоту неких отдельно взятых органов над стеклянной подложкой, но и в чисто аналоговом (в отсутствие возможности компьютерной обработки по каналам) формате, выдать спектроморфологическую и гистохимическую картину образца, в том числе – на препаратах с многоцветным нефлуоресцентным окрашиванием устаревшими и редкими красителями с установлением колокализации на уровне, качественно не уступающем флуоресцентно-микроскопическим (а раз шлирен-техника даёт в объёме – то и конфокальным) методам визуализации.

Использование флуоресцентных, особо – аутофлуоресцентных и, в частности – хемилюминесцентных методов, необходимых для «безметочного» (“label-free”) анализа возможно проиллюстрировать следующим образом: так как известны и хорошо изучены спектральные диапазоны и точные длины волн возбуждения флуоресценции и испускания фотонов флуоресценции (эмиссии), можно, зная в качестве пререквизита оптимальные

длины волн возбуждения, анализировать с помощью небольшого сдвига относительно этих длин волн нефлуоресцентную и флуоресцентную картину в колокализации. При этом значение дельт длин волн могут быть пренебрежительно малы или располагаться в едином субдиапазоне и детектироваться единым детектором (например, отдельным каналом – типа R или G или B). На [Рисунке 2-д](#) показана «шлирен-фотограмма» поперечного среза аскариды в В-канале, выполненная с применением синего диодного источника («коротковолновая спектрзональная аскариграмма»). Часть компарментов на данной иллюстрации очевидно переэконтрастирована. Однако, при сдвиге далее в коротковолновую область, в пучке фиолетового DPSS-лазера соответствующие этим местам микроанатомические детали порождают высвечивание (эмиссию) в более длинноволновой/более «красной» области, проецируемую не как тень, а как свечение источника. Это показано на [Рисунке 2-Е](#) – вполне очевидно, что в районе 400 нм хорошо флуоресцируют многие естественные и гистохимические агенты.

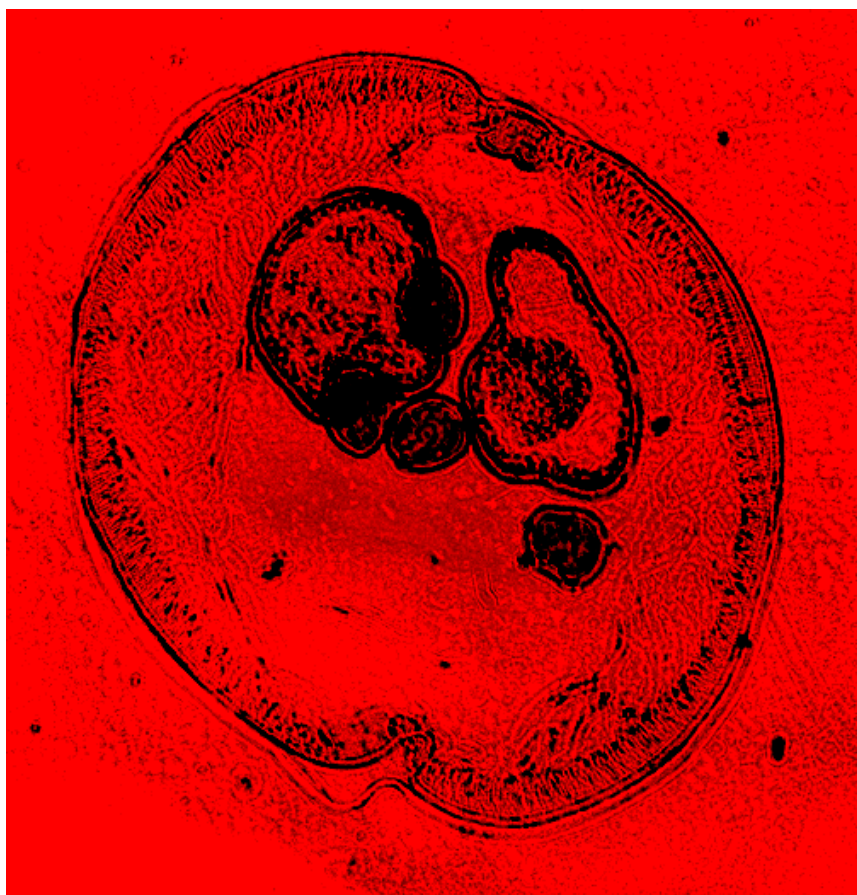


Рис. 2-а. Срез аскариды. R-канал. Некогерентный источник

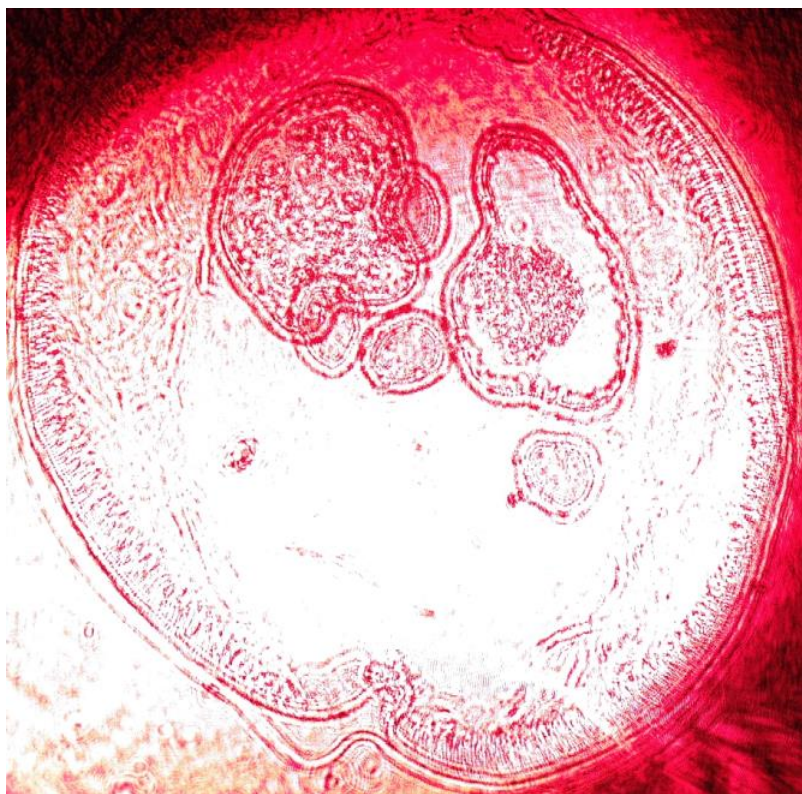


Рис. 2-б. Срез аскариды. R-канал. Лазерный безапертурный источник

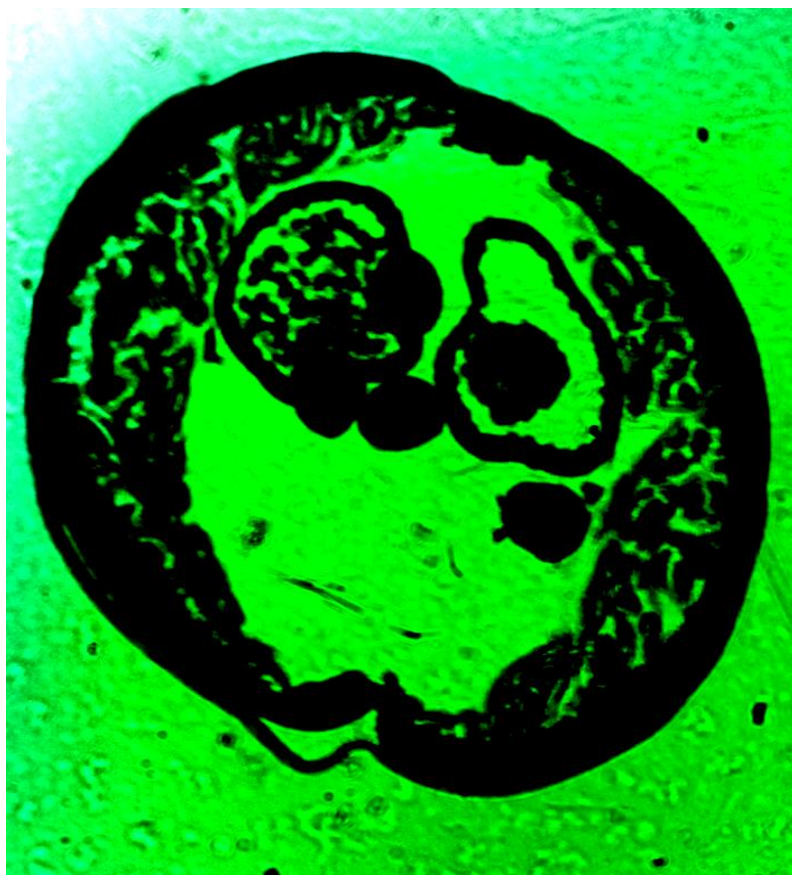


Рис. 2-в. Срез аскариды. G-канал. Некогерентный источник

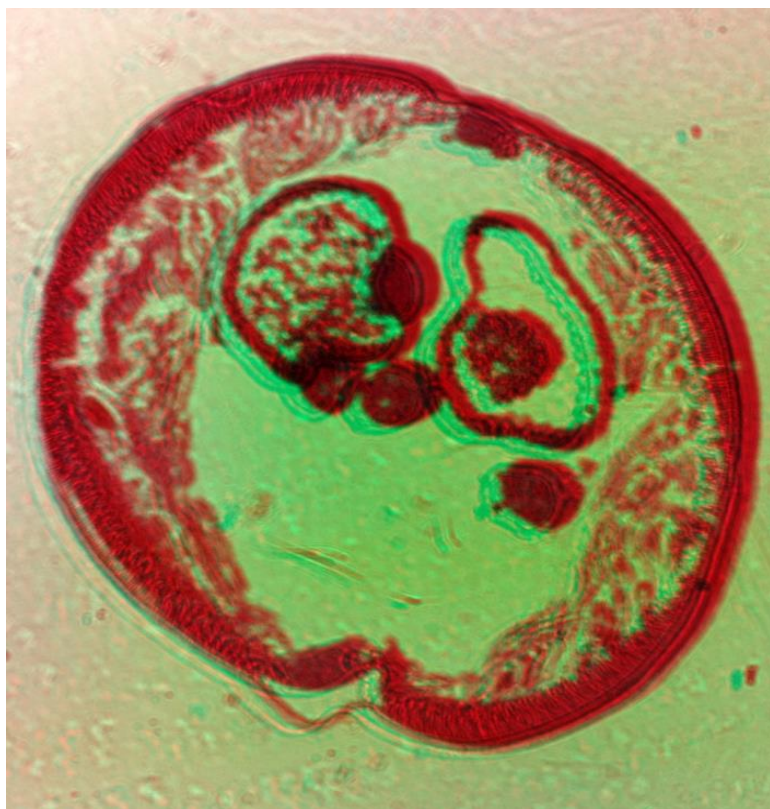


Рис. 2-г. Срез аскариды. Неполный псевдоконтиннум (RG...-LED)

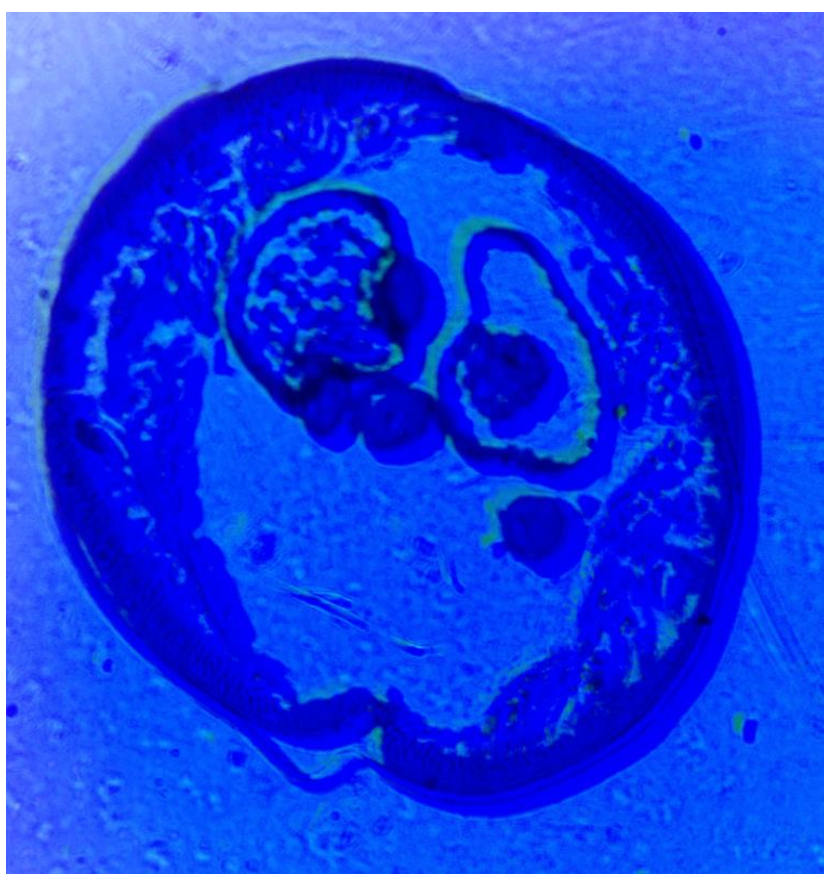


Рис. 2-д. Срез аскариды. В-канал. Некогерентный источник



Рис. 2-е. Срез аскариды. В-канал при источнике ближнего УФ-диапазона

4. Обсуждение



Рис. 3. Анатомическая схема поперечного среза

Существенную проблему для достаточно эффективной визуализации аскарид является подбор спектральных источников, так как, как можно видеть из приведенных в разделе «Результаты» изображений, не все спектральные диапазоны характеризуются точной и достаточно высокоразрешающей и контрастной прорисовкой структур. Вместе с тем, как это видно из [Рисунка 2-г](#), неполные спектральные выборки не дают качественного результата в той мере, в какой бы это хотелось видеть, исходя из резольвометрических соображений (ср. с [Рисунка 2-а](#), [Рисунка 2-б](#)) либо несут избыточную информацию, нерелевантную для измерений целевых показателей. Решение этой задачи является предметом описания одной из наших ближайших статей, существующей в настоящее время только в виде препринта с датасетами ([Nasirov et al., 2018](#)) и планирующихся к публикации в

журнале настоящего издательства. В качестве некоторых базовых возможностей развития метода можно назвать ряд вариантов:

1. Аскариметрия с использованием лазеров на парах металлов. Позволяет реализовать в устройстве также функции лазерной проекционной микроскопии.

2. Аскариметрия с использованием терагерцовых фемтосекундных лазеров. Позволяет с высокой степенью достоверности характеризовать хиральные структуры в ткани.

3. Аскариметрия на химических лазерах. Не требует высоковольтного питания – в силу чего может быть имплементирована в полевых / полигонных условиях.

4. Экцимерная лазерная аскариметрия. Может быть реализована как «тераностика», где синхронизируются микропучковые манипуляции на препарате и измерение свойств.

5. Квантронно-лазерная аскариметрия или лазерная аскариметрия (ЛА) с квантронной накачкой. Позволяет инициировать термические процессы в образце, благодаря чему может быть также использована как средство термоаналитической тераностики.

6. Иразерная и ИК-мазерная (нем. *infrarotmaser*) аскариметрия. За исключением чисто физических аспектов может быть приближена к задачам п. 5. Квантово-каскадная (с использованием полупроводниковых QCL) аскариметрия также относится к методам инфракрасного диапазона зоопаразитологического назначения. Газодинамическая лазерная аскариметрия с тепловой накачкой подразумевает лишь накачку тепловым, т.е. инфракрасным источником.

7. Перестраиваемая по длине волны лазерная аскариметрия с использованием лазеров – таких, как титан-сапфировый лазер (690–1100 нм), Cr:ZnSe лазер (1970–2760 нм), Fe:ZnSe лазер (3950–5050 нм) и жидкостные лазеры на красителях (400–700 нм). Ту же функцию возможно реализовать оптические параметрические генераторы в схеме с лазерной накачкой заданной длиной волны, мехатронным изменением ориентации кристалла, термической регуляцией состояния кристалла.

5. Благодарности

Работа инициирована в рамках конкурса на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских проектов, реализуемых на базе ФГАОУ ВО РУДН с возможностью создания структурных подразделений на базе ФГАОУ ВО РУДН по тематике «Исследование механизмов патогенеза социально значимых, инфекционных и паразитарных заболеваний в целях повышения эффективности их диагностики и терапии», 2017 года (ныне – в правовых рамках академической единицы САЕ2 РУДН); без финансовой поддержки ФГАОУ ВО РУДН и иных структур.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 16-32-00914 (2016-2017 гг.) «Создание новых физических методов комплексной биомедицинской диагностики, базирующихся на принципах позиционно-чувствительного картирования с угловым разрешением на тканевом и клеточном уровне организации в аналитических чипах» полностью в рамках средств этого проекта.

References

[Abdul-Ghani, 2015](#) – *Abdul-Ghani R.* (2015). Towards e-parasitology: making use of virtual microscopy. *Tropical Medicine & International Health*. Т. 20. №2. pp. 227-229.

[Alcala-Canto et al., 2012](#) – *Alcala-Canto Y., Ibarra-Velarde F., Vera-Montenegro Y., Alberti-Navarro A.* (2012). Virtual microscopy for studying veterinary parasitology. *Comparative Parasitology*. Т. 79. №1. pp. 138-142.

[Bishara et al., 2010](#) – *Bishara W., Zhu H., Ozcan A.* (2010). Holographic opto-fluidic microscopy. *Optics express*. Т. 18. №26. pp. 27499-27510.

[Bishara et al., 2012](#) – *Bishara W., Isikman S. O., Ozcan A.* (2012). Lensfree optofluidic microscopy and tomography. *Annals of biomedical engineering*. Т. 40. №2. pp. 251-262.

[Coskun et al., 2011](#) – *Coskun, A. F., Sencan, I., Su, T. W., Ozcan, A.* (2011). Lensfree fluorescent on-chip imaging of transgenic *Caenorhabditis elegans* over an ultra-wide field-of-view. *PloS one*. Т. 6. №1. Art. No. e15955. DOI: 10.1371/journal.pone.0015955

Hemphill, Croft, 1997 – Hemphill A., Croft S.L. (1997). Electron microscopy in parasitology. *Analytical parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 227-268.

Isikman et al., 2010 – Isikman, S.O., Sencan, I., Mudanyali, O., Bishara, W., Oztoprak, C., Ozcan, A. (2010). Color and monochrome lensless on-chip imaging of *Caenorhabditis elegans* over a wide field-of-view. *Lab on a Chip*. T. 10. №9. pp. 1109-1112.

Isikman et al., 2011 – Isikman, S.O., Bishara, W., Mavandadi, S., Frank, W. Y., Feng, S., Lau, R., Ozcan, A. (2011). Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. T. 108. № 18. pp. 7296-7301.

Isikman et al., 2012 – Isikman S. O., Bishara W., Ozcan A. (2012). Lensfree on-chip tomographic microscopy employing multi-angle illumination and pixel super-resolution. *Journal of visualized experiments: JoVE*. №66. Art. No. 4161. DOI: 10.3791/4161

Jones et al., 2004 – Jones M.K., Randall L.M., McManus D.P., Engwerda C.R. (2004). Laser microdissection microscopy in parasitology: microscopes meet thermocyclers. *Trends in parasitology*. T. 20. №11. pp. 502-506.

Linder et al., 2008 – Linder E., Lundin M., Thors C., Lebbad M., Winiacka-Krusnell J., Helin H., Leiva B., Isola J., Lundin J. (2008). Web-Based Virtual Microscopy for Parasitology: A Novel Tool for Education and Quality Assurance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. T. 2. №10. Art. No. e315. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000315

Linder et al., 2008 – Linder E., Lundin M., Thors C., Lebbad M., Winiacka-Krusnell J., Helin H., Leiva B., Isola J., Lundin J. (2008). Correction: Web-Based Virtual Microscopy for Parasitology: A Novel Tool for Education and Quality Assurance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. T. 2. №10. Art. No. e315. DOI: 10.1371/annotation/1f73ee39-9e3c-4ce4-9c35-2a6ab393de7d

Mavandadi et al., 2012 – Mavandadi, S., Feng, S., Yu, F., Dimitrov, S., Yu, R., Ozcan, A. (2012). BioGames: a platform for crowd-sourced biomedical image analysis and telediagnosis. *GAMES FOR HEALTH: Research, Development, and Clinical Applications*. T. 1. №5. pp. 373-376.

Mendoza-Yero et al., 2013 – Mendoza-Yero, O., Calabuig, A., Tajahuerce, E., Lancis, J., Andrés, P., Garcia-Sucerquia, J. (2013). Femtosecond digital lensless holographic microscopy to image biological samples. *Optics letters*. T. 38. №17. pp. 3205-3207.

Nasirov et al., 2018 – Nasirov P.A., Jablovkov A.G., Gradov O.V. (2018). Datasets for spectrozonal and multispectral ascariscopic and ascarimetric techniques. Preprint.

Ozcan, 2014 – Ozcan A. (2014). Educational games for malaria diagnosis. *Science Translational Medicine*. T. 6. №233. Art. No. 233ed9. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009172

Petithory, Ardoin-Guidon, 1995 – Petithory J.C., Ardoin-Guidon F. (1995). Parasitology: true and false parasites in faecal microscopy. *Cahier de Formation. Biologie Médicale (Parasitology: true and false parasites in faecal microscopy)*. Issue 3. 184 p.

Shimogawa et al., 2018 – Shimogawa M.M., Ray S.S., Kisalu N., Zhang Y., Geng Q., Ozcan A., Hill K.L. (2018). Parasite motility is critical for virulence of African trypanosomes. *Scientific reports*. T. 8. № 1. Art. No. 9122. DOI: 10.1038/s41598-018-27228-0

Trujillo, Garcia-Sucerquia, 2014 – Trujillo C.A., Garcia-Sucerquia J. (2014). Automatic method for focusing biological specimens in digital lensless holographic microscopy. *Optics letters*. T. 39. №9. pp. 2569-2572.