

4D SVETLOBNA MIKROSKOPIJA ŽIVIH CELIC

VALENTINA FURLAN

Fakulteta za matematiko in fiziko
Univerza v Ljubljani

Opazovanje razvoja dogodkov v živih celicah je ključnega pomena za razvoj medicine in biologije, zato ta članek opisuje zajem takih posnetkov v prostoru in času oz. v 4D. Ker slikanje pogosto temelji na uporabi fluorescenčnih mikroskopov, se članek v prvem delu osredotoča na pojav fluorescence in osnove mikroskopije, v drugem delu pa na dve novi metodi fluorescenčne mikroskopije, ki omogočata hitro in natančno slikanje celotne debeline vzorca.

4D LIGHT MICROSCOPY OF LIVING CELLS

The observation of processes inside of living cells is key to the further development of medicine and biology. This article examines the techniques needed to capture such images in space and time, in other words in 4D. This type of imaging depends on fluorescent microscopes, so the first half of the article focuses on fluorescence and the basics of microscopy. In the second half it examines two new methods of fluorescent microscopy, which enables us to take faster and more precise images through the whole sample.

1. Uvod

Za razumevanje delovanja človeškega telesa in drugih živih organizmov je pomembno, da razumemo, kako ti delujejo na mikroskopski ravni. Ključnega pomena so osnovni gradniki organizmov oz. celice, ki so premajhne, da bi jih opazovali s prostim očesom. V ta namen so se razvili prvi svetlobni mikroskopi, ki so omogočili opazovanje celic znotraj tanke plasti raznih tkiv in ostalih bioloških vzorcev. Za opazovanje celičnih procesov znotraj vzorca potrebujemo metodo, kjer bi lahko v vzorcu, polnem raznovrstnih struktur, izpostavili le zaželeno – zato so se razvili prvi mikroskopi, ki temeljijo na pojavu fluorescence.

Fluorescenco je leta 1845 opisal Sir J.F.W. Herschel [1]. V knjigi *'On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless'* je zapisal, da UV svetloba povzroča moder izsev na površini raztopine kinina (model molekule prikazan na sliki 1). Kinin je sicer znan kot prvo uspešno zdravilo proti malariji, danes pa ga bolj poznamo kot komponento, ki daje grenkobo tonikom. Podobno se danes uporablja vrste snovi, ki kažejo znake fluorescence. Ena izmed bolj znanih je fluorescein, ki s svojim zelenkastim izsevom še danes služi za ugotavljanje poteka vodnih tokov, odkrivanje krvnih madežev in označevanje lokacije v primeru nesreče na morju.

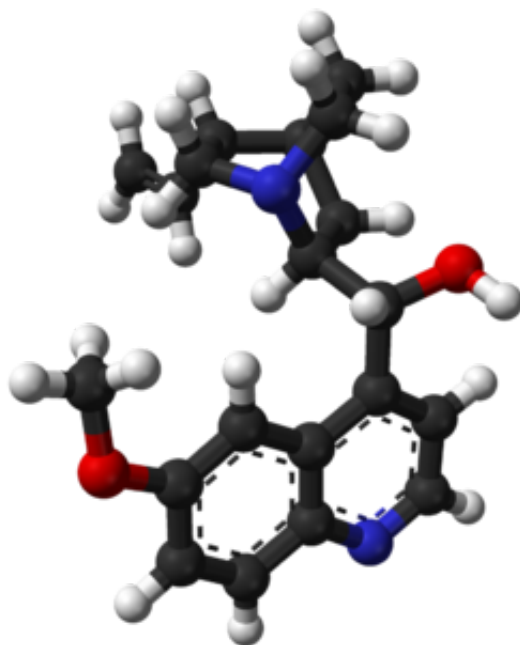
Preučevanje kinina in ostalih fluorescenčnih snovi je bilo bistveno za razvoj prvih fluorescenčnih mikroskopov. Pojav fluorescence namreč omogoča močen kontrast med osvetljenim vzorcem in temnim ozadjem. Hkrati pa z izbiro ustreznih fluorescenčnih snovi lahko označimo le željeni del vzorca.

Klasični fluorescenčni mikroskopi so omogočili opazovanje dogodkov v tanki plasti znotraj celice z visoko krajevno ločljivostjo. Za sledenje procesov po celotni celici je potrebno slike iz mnogih ravnin zajeti zaporedoma, kar proces opazovanja močno upočasni. Ker so mnogi biološki procesi hitri v primerjavi s hitrostjo zajemanja posnetkov, je pomembno, da so se na področju fluorescenčne mikroskopije živih celic razvile nadgradnje, ki pospešujejo zajemanje časovnih zaporedij tridimenzionalnih oz. 4D posnetkov s pomočjo konfokalne mikroskopije. V članku bomo zato predstavili dva novejša načina sočasnega slikanja v volumnu.

1.1 Opis pojava

Luminiscenca je spontano oddajanje svetlobe kot posledica sprostitve elektronov iz vzbujenih stanj v osnovno stanje [2], ki so prikazana na sliki 2. Luminiscenco delimo glede na vrsto dovedene energije, in sicer: fotoluminiscenco (do vzbujanja pride zaradi osvetljevanja snovi s svetlobo), kemiluminiscenco (vzrok za vzbujanje je kemijska reakcija) in vrsto drugih skupin, kot so elektroluminiscenca, mehanoluminiscenca, itn. Ker fluorescenčni mikroskopi delujejo na osnovi osvetljevanja vzorca s svetlobo, je za nas zanimiva fotoluminiscenca, katere dinamiko jasno prikazuje diagram Jablonskega na sliki 3.

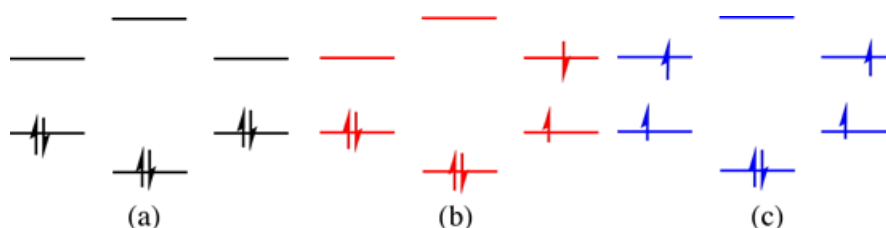
Do pojava fotoluminiscence pride v snoveh, kjer se vzbujanje molekule iz osnovnega v vzbujena stanja sproži s svetlobo. Pri tem je ključna velikost razlike v energiji med osnovnim S_0 in prvim vzbujenim stanjem S_1 ali T_1 molekule, ki mora biti primerljiva z energijo vidnih fotonov (od 1.7 eV do 4.1 eV za valovne dolžine od 300 nm do 700 nm). Taka stanja imajo nekatere molekule in kristali z delokaliziranimi elektroni, kot je prikazano na sliki 1, saj nižja energija vezave elektrona na jedro atoma zmanjša energijsko razliko med možnimi kvantiziranimi stanji.



Slika 1. Tridimenzionalni kroglični model molekule kinina. Modre kroglice predstavljajo atome dušika, rdeče atome kisika, temno sive atome ogljika in svetlo sive atome vodika. V molekuli sta še dva aromatska obroča, kjer se nahajajo delokalizirani elektroni (označeno z črno črtkasto črto). Vir: [3].

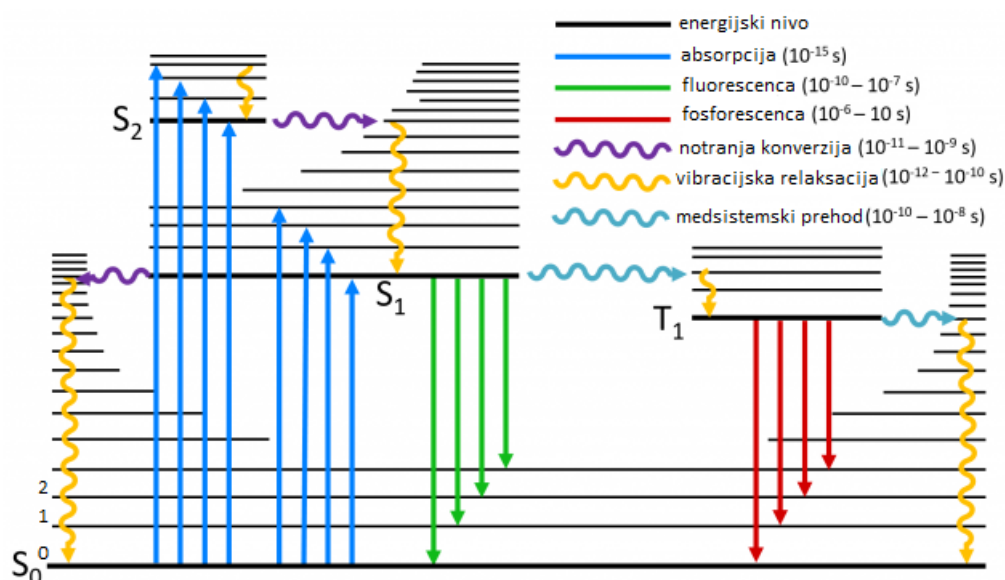
Po vzbujanju molekule iz osnovnega v vzbujena singletna stanja s spinskim kvantnim številom $s = 0$, kot je prikazano na molekuli benzena na sliki 2a in 2b, pride do vibracijske relaksacije. To je pojav, kjer molekula preide v osnovno vibracijsko stanje znotraj istega vzbujenega elektronskega stanja, kar se zgodi v približno 10^{-12} s. Ko se elektron nahaja v najnižjem vibracijskem nivoju v S_1 , prehod v osnovno stanje S_0 ni mogoč s postopno relaksacijo preko vibracijskih stanj (ponazorjene na sliki 3 z rumeno puščico skrajno levo). Taka molekula ob prehodu elektrona v osnovno stanje S_0 odda energijo v obliki svetlobe. Pri tem lahko pride do dveh pojavov – prvi je možnost pojava fluorescence. Ker je fluorescenca spontan proces, verjetnost za izsevanje eksponentno pada, značilni življenjski čas vzbujenega stanja je v tem primeru 10^{-9} s. Lahko pa pride do spremembe spina, ki singletno stanje spremeni v tripletno s spinskim kvantnim številom $s = 1$, kot prikazuje slika 2c. Pri tem pride do prehoda med stanji in sistem singletnega stanja se sprosti v nižje energijsko

stanje – tj. prvo vzbujeno triplentno stanje T_1 . Znotraj T_1 se lahko snov nahaja na različnih vibracijskih energijskih nivojih in ponovno pride do relaksacije vibracijske energije v času 10^{-12} s na najnižje mogoče vibracijsko stanje. Ker je verjetnost za obrat spina majhna, so življenjski časi takih vzbujenih stanj občutno daljši kot v primeru fluorescence in vibracijskega sproščanja – tudi od nekaj milisekund do nekaj sekund, preden se elektron vrne iz osnovnega vibracijskega stanja v T_1 v stanje S_0 . Pojav označujemo kot fosforescenca.

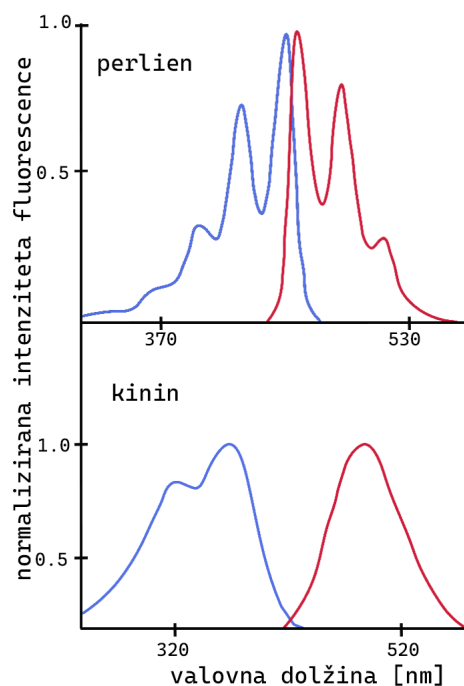


Slika 2. Različna energijska stanja molekule benzena (aromska spojina, prikazana na levi strani slike 1 z črtkasto črto): (a) osnovno singletno S_0 , (b) prvo vzbujeno singletno S_1 in (c) prvo vzbujeno triplentno stanje T_1 . Vir: [4].

Iz diagrama Jablonskega na sliki 3 je razvidno, da imajo oddani fotoni nižjo energijo od absorbiranih. Pojav imenujemo Stokesov premik, prikazan na sliki 4, kjer je valovna dolžina absorbiranih fotonov krajša od emitiranih. En razlog za pojav smo prej že omenili, tj. sproščanje med vzbujenimi stanji na osnovno vibracijsko stanje v S_1 . Nekateri elektroni se sproščajo na višja vibracijska stanja v S_0 , kar dodatno vpliva na izgubo energije, ki bi se morala oddati.



Slika 3. Diagram Jablonskega z možnimi prehodi med različnimi energijskimi stanji molekul (sklop črt ustreza istemu elektronskemu stanju). Prikazna so singletna stanja (spinsko kvantno število $s = 0$) z oznako S_i , kjer indeks i označuje osnovno $i = 0$ in vzbujena singletna stanja $i = 1, 2, 3, \dots$. Z oznako T_i in indeksom i pa enako označujemo triplentna stanja (spinsko kvantno število $s=1$). Dodatno se znotraj stanj molekule ločujejo po različnih vibracijskih energijah (stanja so označena s številkami $0, 1, 2, \dots$). Vir: [5].



Slika 4. Dva različna primera vzbujevalnega (modra črta) in izsevanega spektra (rdeča črta). V splošnem velja, da je oddani spekter zrcalna slika vzbujevalnega, kar velja v primeru perliena. Za kinin pa opazimo, da je med prehodom izginil vrh pri 315 nm. Do razlike pride zaradi hitrega sproščanja vzbujenega stanja S_2 v S_1 , kar poteče brez izsevanja svetlobe. Povzeto po: [1].

1.2 Fluorofori

V celici je malo snovi, ki spontano fluorescirajo, npr. aromatične kisline in koencim 1. Take snovi imenujemo intrinzični fluorofori. Večina celičnih struktur ne kaže znakov fluorescence, zato jim dodamo fluorescenčne označevalce, ki pri opazovanju služijo kot sonde. Sonde se lahko v opazovane strukture vgradijo nespecifično ali se nanje vežejo specifično. Specifični označevalci se vežejo na točno izbrane molekularne strukture npr. fluorescenčno protitelo na protein ali fluorescenčno označen odsek DNK na komplementarni del DNK v celici.

Primer je opazovanje nefluorescenčne membrane. V procesu se velikokrat uporablja hidrofobne fluorescenčne sonde, kot je DPH (1,6-diphenil-1,3,5-heksatrien), ki se spontano razporedi med maščobne molekule v nepolarnih območjih membrane in ko se popolnoma veže, opazimo njegovo fluorescenco.

Primer uporabe označevalcev je tudi opazovanje DNK, ki je v svoji osnovi intrinzični fluorofor, katerega emisijski spekter je prešibek in preveč premaknjen proti UV delu spektra, da bi ga opazili. Zato največkrat uporabljamo fluorescenčne označevalce kot so etidijev bromid, akridin oranžna in Hoechst 3342, ki se prilegajo žlebovom v zavojih DNK. Ti sicer v vodi kažejo šibke znake fluorescence, ob vezavi na DNK se njihov izsev in tudi življenjski čas znatno povečata. Na tak način ne opazimo sond, ki se niso vezale na želeno mesto.

2. Fluorescenčni mikroskop

Da bi razumeli novejša načina sočasnega slikanja po prostornini, se bomo v tem poglavju osredotočili na delovanje in zgradbo fluorescenčnega mikroskopa, ki se od presevnega mikroskopa razlikuje predvsem v osvetljevanju vzorca [6].

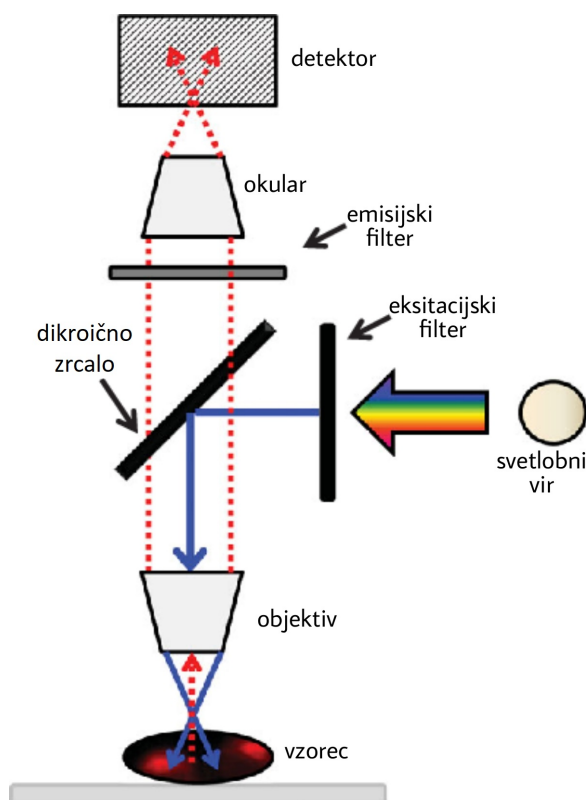
Pri presevnem mikroskopu potuje bela svetloba v celem vidnem delu spektra iz svetlobnega vira do zbiralne leče. Po prehodu vzorca jo zajame objektiv, ki s pomočjo okularja ustvari sliko

na površino našega očesa ali detektorja. V nadaljevanju bomo opisali dve izvedbi fluorescenčnega mikroskopa: epifluorescentni mikroskop, ki omogoča široko vidno polje pri slikanju vzorca, in konfokalni mikroskop, ki omogoča ostro slikanje majhnega volumna znotraj vzorca.

2.1 Epifluorescenčni mikroskop

Pri epifluorescenčnem mikroskopu potuje svetloba iz svetlobnega vira preko eksitacijskega filtra, kot je prikazano na sliki 5. Z ustrezno izbiro filtra prepustimo le tisti del spektra svetlobnega snopa, ki povzroča fluorescenco izbranega označevalca. Snop nato potuje do dikroičnega zrcala, ki je zasnovano tako, da prepušča le določene valovne dolžine, druge pa odbije [7]. Tu se snop svetlobe odbije in enakomerno osvetli celoten vzorec. Molekule se vzbujajo ter oddajajo svetlobo, ki gre ponovno preko objektiv in se prepusti skozi dikroično zrcalo do emisijskega filtra. Z izbiro slednjega prepustimo le svetlobo, ki ustreza izsevanemu spektru opazovanih delov vzorca. Prepuščeno svetlobo nato zaznamo na izbranem detektorju.

Ob taki postavitvi lahko hitro zajamemo večje območje vzorca. Dobljen posnetek prikazuje ostro sliko v goriščni ravnini vzorca. Ker pa vzbujevalna svetloba prodre tudi v globino, dobimo veliko ozadja na račun fluorescence izven goriščne ravnine, kar znižuje kontrast posnetih slik.

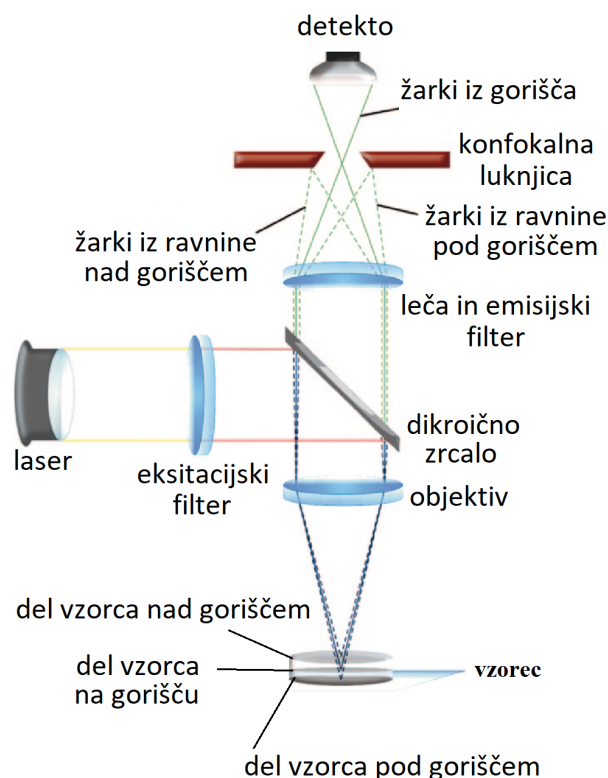


Slika 5. Postavitev optičnih komponent pri epifluorescenčnem mikroskopu. Vir: [8].

2.2 Konfokalni mikroskop

Za izboljšanje kontrasta se pri konfokalnem mikroskopu vzbujevalni žarek zbere v gorišču in tako osvetli le majhen del pripadajoče goriščne ravnine na vzorcu, kot je prikazano na sliki 6. Izsevana svetloba je nato prepuščena skozi dikroično zrcalo in nadaljuje pot preko emisijskega filtra do konfokalne luknjice. Luknjico postavimo tako, da prepusti večino svetlobe iz goriščne ravnine, večino svetlobe iz ostalih ravnin pa zadrži zaslon. Prepuščeno svetlobo zazna fotopomnoževalnik, kjer se signal posameznega zajetega fotona ustrezno ojača.

S predstavljeno postavitvijo osvetljujemo točno določen majhen volumen v izbrani goriščni ravnini – rezultat je ostra slika.



Slika 6. Postavitev optičnih komponent pri konfokalnem mikroskopu. V tem primeru osvetljujemo vzorec s pomočjo laserja, da lažje nadzorujemo kateri del vzorca bo na goriščni ravnini. Vir: [9].

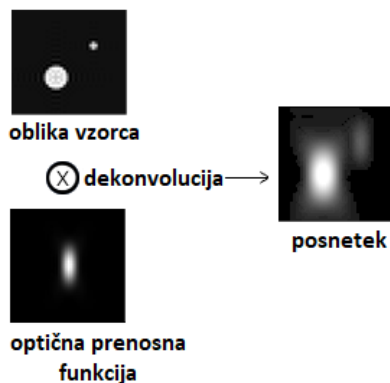
2.3 Optična prenosna funkcija pri analizi posnetkov

Ko s fluorescenčnim mikroskopom zajamemo sliko vzorca, na detektorju opazimo, da so opazovane molekule večje na sliki kot v vzorcu [10]. To spremembo velikosti nam opisuje optična prenosna funkcija oz. OP funkcija (angl. *point spread function*), ki je v osnovi tridimenzionalni uklonski vzorec oddane svetlobe iz točke na vzorcu, ki se preko objektivna preslika na detektor [11].

Ko emitirana svetloba iz točkastega izvora potuje iz vzorca, bi se v idealnem scenariju preko objektivna preslikala v točko na detektorju, vendar zaradi interference žarkov v gorišču nastane uklonski vzorec (Airyjeve disk oz. Airyjeva uklonska funkcija), kot je prikazano na sliki 9. V goriščni ravnini obliko koncentričnih obročev okoli močno osvetljenega območja.

Dobljena slika na detektorju je rezultat konvolucije oblike vzorca z optično prenosno funkcijo, kot je shematsko prikazano na sliki 7. Da s posnete slike pridobimo nazaj obliko vzorca, moramo posnetek predelati tako, da računsko obdelamo sliko oblike vzorca. Opisan matematični postopek, ki se imenuje dekonvolucija [12], je ključnega pomena pri tridimenzionalnem slikanju bioloških vzorcev, kjer vplivi iz ozadja in sama sestava mikroskopa vplivajo na kvaliteto slike.

Postopek je izvedljiv, če imamo posnetke visoke kakovosti (visok signal v primerjavi s šumom) in je optično prenosna funkcija natančno poznana. Načeloma pa oblika optične prenosne funkcije ni samoumevna. Večinoma se obliko določa s pomočjo zaporednega slikanja plasti nanokroglic v gelu, ki so razvrščene v različnih globinah vzorca [11], kar v prvem približku predstavlja točkast izvor emitirane svetlobe v homogenem mediju. Vendar imajo v bioloških vzorcih različni deli različne lomne količnike, kar nam lahko bistveno spremeni porazdelitev uklona svetlobe in posledično obliko optične prenosne funkcije.

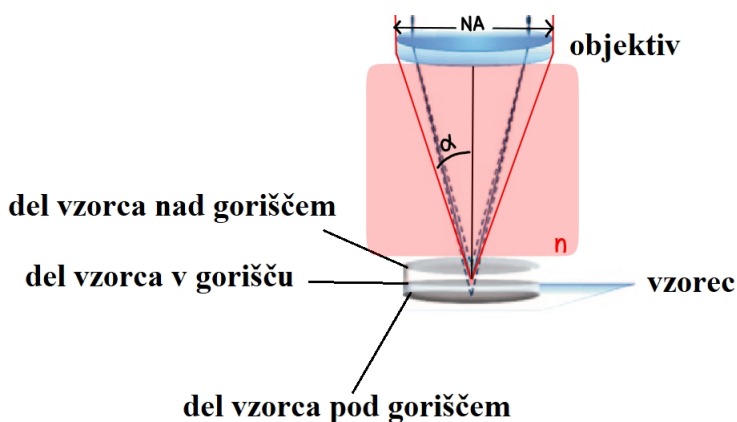


Slika 7. Shematski prikaz uporabe konvolucije na optični prenosni funkciji in obliki vzorca, da dobimo ustrezen posnetek. Vir: [13].

Obliko optične prenosne funkcije pogojujeta ločljivost v slikovni ravnini (lateralna ločljivost) in vzdolž optične poti (globinska ostrina) [14]. Nanju vpliva valovna dolžina svetlobnega vira λ , v največji meri pa numerična apertura objektiv oz. NA, ki pove velikost območja (prikazano na sliki 8) od kod objektiv lahko sprejema in oddaja svetlobo,

$$NA = n \sin \alpha.$$

Tu je n lomni količnik sredstva med objektivom in vzorcem in α je kot med optično osjo in premico, ki povezuje rob in gorišče objektiv.



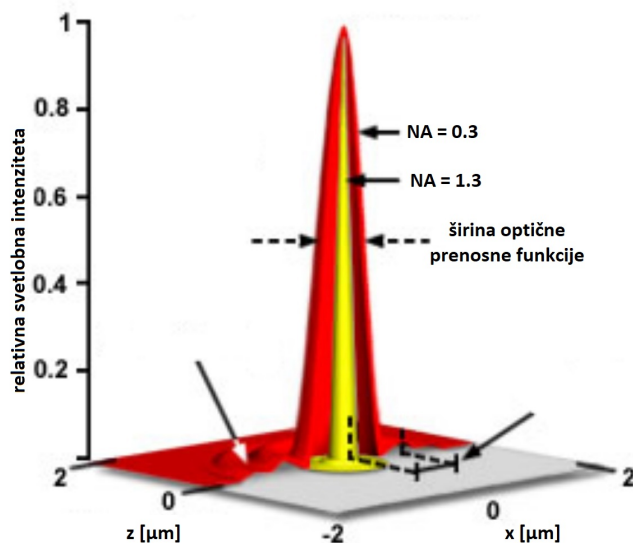
Slika 8. Velikost NA v epifluorescenčnem mikroskopu (podoben princip velja tudi za konfokalni mikroskop) glede na točko v delu vzorca v gorišču (označena z roza). Svetlo rdeče območje med vzorcem in objektivom označuje medij z lomnim količnikom n . Vir: [9].

Velikost NA vpliva na količino zbrane svetlobe, kjer večja NA pomeni več zbrane svetlobe, ki nosi informacije o razporeditvi objektov v vzorcu in posledično boljša ločljivost [15]. Ločljivost opisuje najmanjšo razdaljo $r_{x,y}$ med dvema točkastima izvoroma svetlobe, ko ju še ločimo,

$$r_{x,y} = \frac{0.6\lambda}{NA}.$$

Podobno je definirana tudi ločljivost vzdolž optične osi r_z , ki je odvisna tudi od lomnega količnika medija n ,

$$r_z = \frac{1.4\lambda n}{NA^2}.$$



Slika 9. Oblika optične prenosne funkcije v goriščni ravnini. Navpična os nakazuje relativno svetlobno intenziteto točkastega izvora svetlobe. Opazimo, da z manjšanjem NA večamo širino optične prenosne funkcije in s tem vplivamo na velikost slike vzorca. Vir: [16].

Večja NA torej pomeni večjo količino zbranih informacij o prostorski razporeditvi objektov v vzorcu, kar pomeni izboljšanje ločljivosti. Po drugi strani se zato manjša globinska ostrina, ki opisuje debelino izostrene optične rezine. Da zajamemo informacije iz celotne celice, moramo posneti več slik po globini, kar zniža časovno ločljivost metode in onemogoča spremljanje hitrih procesov.

3. Dve napredni metodi za slikanje v volumnu

Zgoraj opisan kompromis med krajevno in časovno ločljivostjo je spodbudil razvoj fluorescenčnih mikroskopov, ki omogočajo hitro in učinkovito zajemanje 3D posnetkov ter prikaz časovnega razvoja opazovane strukture.

Eden izmed najbolj preprostih in logičnih pristopov pri pridobivanju takih posnetkov je zaporedno slikanje različnih goriščnih ravnin vzdolž vzorca s pomočjo epifluorescenčnega in konfokalnega mikroskopa [17]. Vendar je tak postopek neučinkovit, saj je premikanje kamere po debelini vzorca prepočasno, da bi smiselno sledili večini bioloških procesov.

Zato je za današnje raziskave pomembno zajemanje slik vzorca končne prostornine v enem samem posnetku. V naslednjih poglavjih sta predstavljeni dve različni metodi takšnega slikanja, ki temeljita na nadgraditvi zaporednega slikanja z epifluorescenčnim mikroskopom z uporabo optičnega elementa, ki preoblikuje svetlobni signal. Prvi mikroskop uporablja večdimenzionalno prizmo, ki različne ravnine v vzorcu sočasno preslika na odseke istega detektorja. Pri drugem pa z modulatorjem podaljšamo optično prenosno funkcijo in s tem združimo signal iz vseh ravnin v vzorcu v ostro sliko.

3.1 Visokokontrastna večfokusna mikroskopija z delilno prizmo

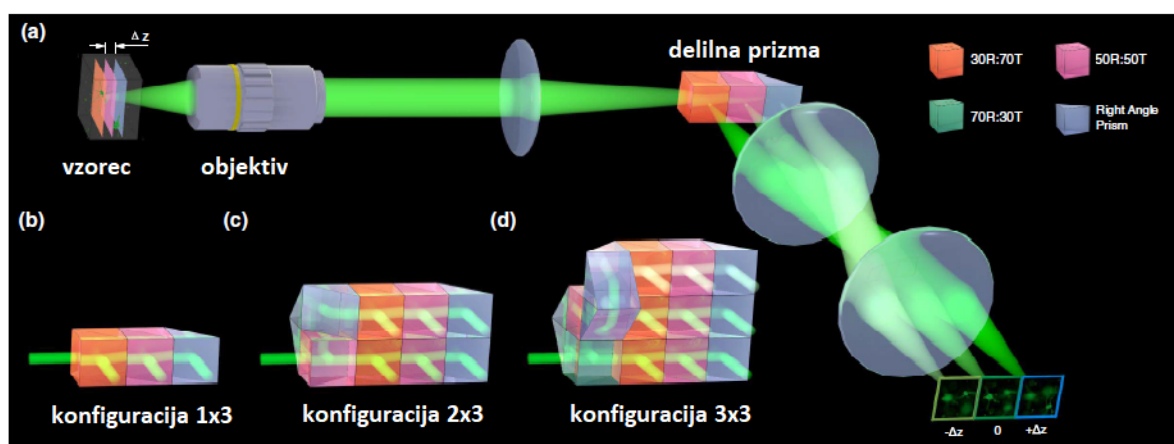
V tem poglavju bomo predstavili tip mikroskopa, ki namesto posameznega slikanja vsake izbrane ravnine, sočasno preslika več ravnin na detektor s pomočjo večdimenzionalne delilne prizme. Delilna prizma je postavljena na optični poti med objektivom in detektorjem, kot je prikazano na sliki 10. Njen namen je, da razdeli snop oddane svetlobe na več majhnih snopov [17]. Vsak snop, ki ustreza svoji goriščni ravnini, je nato usmerjen na svoj del površine detektorja.

Delilna prizma je sestavljena iz dveh steklenih kock in steklene prizme s pravim kotom - taka postavitev poda konfiguracijo 1×3 . Ti deli imajo različne lomne količnike in so postavljeni tako, da gre približno tretjina emitiranega svetlobnega curka skozi vsako komponento prizme in se preslika na ustrezen del **CMOS detektorja**¹. Posledično je vsak snop povezan z drugo goriščno ravnino v vzorcu, kjer so slednje ločene z razdaljo Δz , zaradi razlik v prepotovanih optičnih poteh posameznih snopov,

$$\Delta z = \frac{L}{M^2} \frac{n_{\text{vzorec}}}{n_{\text{steklo}}},$$

kjer je M povečava, ki se zgodi med potovanjem svetlobe od vzorca do prizme, L je dolžina vsake kocke (predpostavimo, da je za vsak del enaka) in n lomni količnik medija, skozi katerega potujejo svetlobni signali. Hkrati se spreminja tudi velikost zornega polja, ki je podana z razmerjem $\frac{L}{M}$.

Taka postavitev, ki je prikazana na sliki 10a, torej omogoča slikanje treh različnih ravnin v vzorcu.



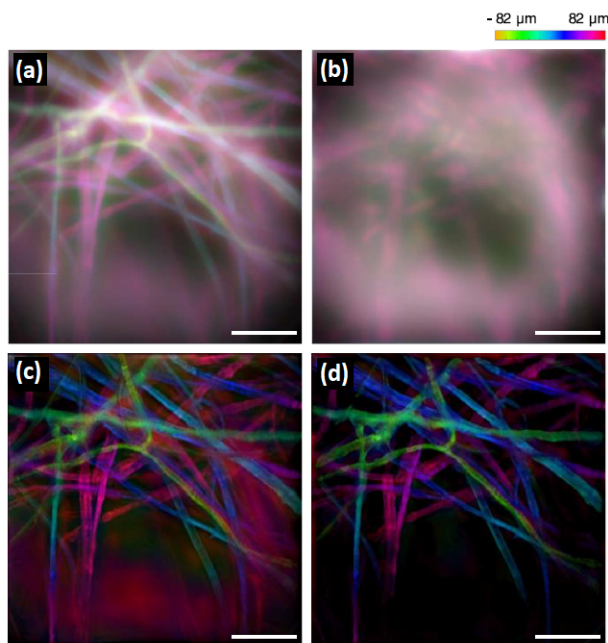
Slika 10. Na sliki (a) je prikazana postavitev in delovanje delilne prizme s konfiguracijo 1×3 . Pri tem je vidno potovanje svetlobe iz različnih ravnin v vzorcu preko objektivna in zbiralne leče do z-delilne prizme, kjer vsaka komponenta prizme preslika ustrežno ravnino v vzorcu. Ravnine in pripadajoče komponente prizme so ustrezno barvno označene. Pri tem ima vsaka komponenta drugačen lomni količnik, kar privede do vidnih razlik v dolžinah optičnih poti in do razmika med ravninami Δz . Nato se svetlobni žarki iz delilne prizme preslikajo preko sistema dveh leč na ustrezne dele detektorja. Na slikah (b), (c) in (d) pa imamo postavljene različne konfiguracije z-delilne prizme: 1×3 , 2×3 in 3×3 . Povzeto po: [17].

Na podoben način se sestavijo zahtevnejše konfiguracije prizme, npr. 2×3 , ki omogoča slikanje šestih ravnin, ali 3×3 , ki omogoča slikanje devetih ravnin. Izbira med konfiguracijami z-delilne prizme temelji na izbrani lastnosti, ki se jo želi izpostaviti pri poskusu. Današnji CMOS detektorji berejo signal po vrsticah in s spreminjanjem konfiguracije delilne prizme se lahko prilagaja hitrost zajemanja slik, kar se kompenzira z velikostjo slikanega območja. Tako prizma s konfiguracijo 3×3 zaobjame celotno območje detektorja in si podaljšala čas slikanja, prizma s konfiguracijo 1×3 pa zasede le tretjino senzorja in posledično omogoči hitrejše zajemanje slike. Te komponente se lahko zamenja in prilagaja glede na to, ali je prioriteta hitrejše slikanje ali večje zorno polje, kar predstavlja dodatno prednost prizme.

Ta postavitev, podobno kot pri epifluorescenčnem mikroskopu, ne izloči fluorescence izven slikane ravnine in razširitve slike predmeta zaradi uklona. Te se izloči po obdelavi posnetka z dekonvolucijo. Za tak tip postavitve se uporablja dekonvolucijski algoritem podaljšane globine (angl. *extended volume tridimensional*, EV-3D), ki s pomočjo posnete slike $b_0(\mathbf{r})$ in optične prenosne funkcije $h(\mathbf{r})$ želi obnoviti sliko oblike vzorca $o(\mathbf{r})$ tako, da upošteva tudi vpliv fluorescence vzorca izven posnete

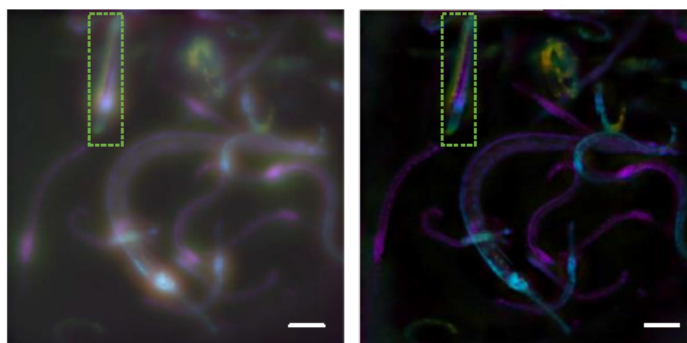
¹Komplementarni polprevodnik s kovinskim oksidom oz. CMOS je detektor, ki na osnovi polprevodnika pretvarja svetlobni v električni signal [18].

prostornine. Algoritem tako rešuje optimizacijski problem: $\min_{o(\mathbf{r})} \|(o \otimes h)(\mathbf{r}) - b(\mathbf{r})\|_2^2$. Tak tip algoritma poda veliko boljše rekonstruirano obliko vzorca kot npr. Richardson-Lucy tridimenzionalni algoritem [19], ki odstrani le motnje z znano optično prenosno funkcijo znotraj zajete prostornine.



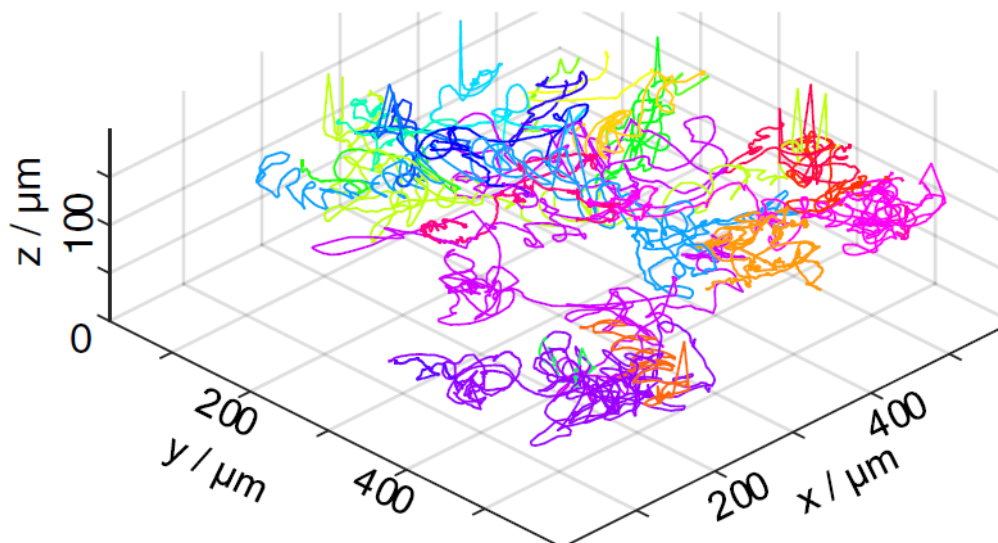
Slika 11. Simulirana razlika med dekonvolucijskima algoritmoma za podaljšano globino in Richardson-Lucy. Sliki (a) in (b) sta posnetka pred uporabo dekonvolucije, kjer ima slika (b) večjo zameglitev zaradi spreminjanja jakosti optične prenosne funkcije. Na sliki (a) je bil uporabljen Richardson-Lucy algoritem, rezultat je prikazan na sliki (c). Algoritem podaljšane prostornine je bil uporabljen na sliki (b), rezultat je na sliki (d). Iz teh posnetkov je prikazana prednost algoritma podaljšane prostornine, ki veliko bolje obnovi oblike vzorcev tudi pri večji jakosti optične prenosne funkcije. Pri Richardson-Lucy algoritmu se zameglitev nekoliko zmanjša, vendar ne izgine popolnoma, kar je razvidno iz ostankov svetlo vijoličnega obroča. V desnem spodnjem robu se nahaja merilo dolžine 100 μm , v zgornjem desnem robu pa barvna lestvica, ki prikazuje, kje v globini vzorca se nahaja izvor posnetega signala. Vir: [17].

Opisan tip algoritma in način slikanja predstavljata prednost pri slikanju gostih vzorcev. Primer tega je opazovanje premikov na podlagi živčnih vozlov v glavah črvov vrste *C. Elegans*, prikazanih na sliki 12. Na posnetku je bil uporabljen kalcijev indikator GCaMP7, ki se veže na ion Ca^{2+} , ki služi kot posredni merilec aktivnosti nevronov [20]. Ko akcijski potencial prispe na membrano živčnega končiča, se odprejo kalcijevi kanalčki. Posledično pride do vdora kalcijevih ionov v notranjost celice, kar povzroči verižno reakcijo, kjer je končen rezultat telesni odziv na dražljaj. Posredno lahko preko aktivnosti nevronov v glavah črvov gledamo tudi njihove premike, kar je bil glaven cilj teh posnetkov.



Slika 12. Posnetek celotnega vzorca, ki je zajel volumen $0.51 \times 0.51 \times 0.18 \text{ mm}^3$ s konfiguracijo 3×3 . Hitrost zajemanja je bila 30 Hz in čas zajemanja 104 s. Na levi je vidno stanje pred in na desni po uporabi EV-3D dekonvolucijskega algoritma. Vir: [17].

Pri tem poskusu je bilo posnetih več črvov, ki so jim spremljali položaj glave v času trajanja posnetka. Celotne trajektorije črvov je bilo nato mogoče prikazati na grafu, prikazanem na sliki 13.



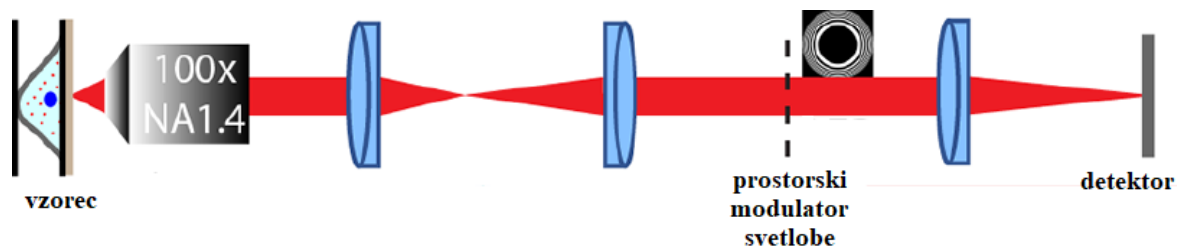
Slika 13. Z različnimi barvami označene trajektorije posameznih črvov. Skupno je bilo spremljanih 27 črvov. Vir: [17].

V tem primeru je bila izpostavljena tudi močna natančnost take postavitve, saj so s povečavo območja v zelenem pravokotniku na sliki 12 lahko prikazali natančno tridimenzionalno obliko dela enega črva.

3.2 2.5D mikroskopija s pomočjo volumetrične projekcije

V sledečem podpoglavju bomo predstavili mikroskop, katerega glavni cilj je spreminjanje globinske ostrine, da bi zajeli signale preko izbrane globine vzorca (tipično nekaj mikrometrov) [21]. V poglavju 2.3 smo omenili, da se z manjšanjem NA slabša ločljivost vzdolž optične osi. Sočasno pa vpliva tudi na globinsko ostrino, ki se veča z manjšanjem NA, in na širjenje optične prenosne funkcije oz. ojačanja zaznane relativne svetlobne intenzitete vzdolž optične osi, kot je prikazano na slikah 15a in 15e. Preprostejši model širjenja vrha optične prenosne funkcije v primeru točkastega izvora je prikazan tudi na sliki 9 za $NA = 0.3$ in $NA = 1.3$.

Mikroskop opisan v tem podpoglavju izkorišča omenjene lastnosti za učinkovito podaljšanje globinske ostrine brez večje izgube ločljivosti. Natančneje gre za reprodukcijo enakomernega ojačanja svetlobne intenzitete vzdolž izbrane dolžine optične osi in posledično boljšega svetlobnega izkoristka, kar zasledimo pri mikroskopih z nižjimi NA, ter brez izgube ločljivosti, ki jo prinaša višja NA.



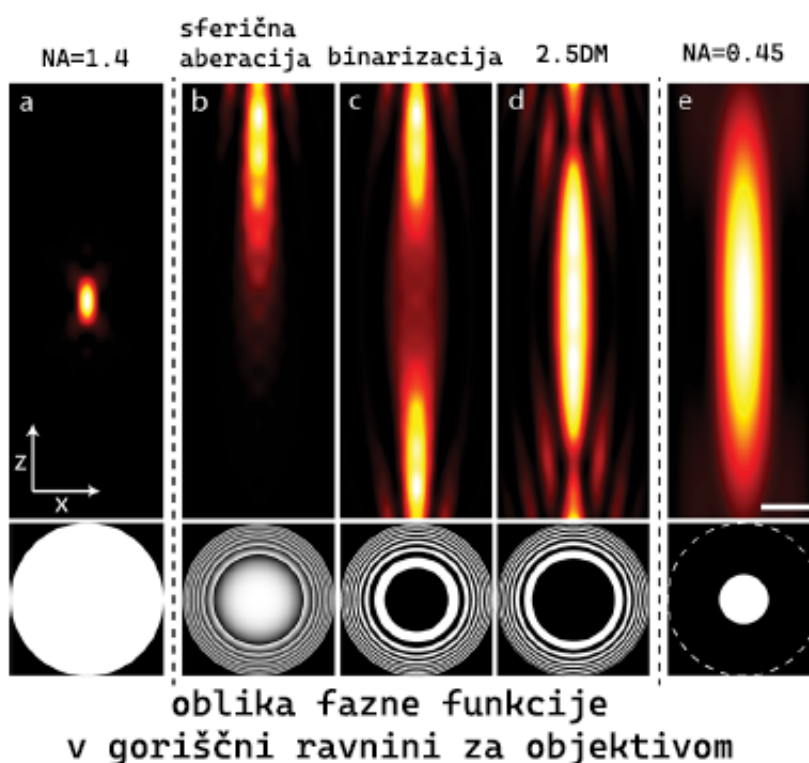
Slika 14. Postavitev prostorskega modulatorja svetlobe na optično os v epifluorescenčnem mikroskopu. Vir: [21].

V ta namen je bil na optično pot med objektivom in okularjem vstavljen prostorski modulator svetlobe (angl. *spatial light modulator*), kot je prikazano na sliki 14. To je tekočokristalna naprava,

ki lahko z izbrano fazno funkcijo oz. masko spreminja amplitudo, fazo in polarizacijo svetlobe, kar posledično vpliva na obliko optične prenosne funkcije.

Sprva so opazovali odziv optične prenosne funkcije na fazno masko s krožno simetrično fazno funkcijo v kombinaciji s členoma s kontrolirano sferično aberacijo in razostritvijo. Sferična aberacija je namreč pogosta napaka na realnih lečah, ki se izraža kot postopna zameglitev slike z oddaljenostjo žarkov od optične osi. Do tega pride zaradi ukrivljenosti površine leče, ki povzroča, da se žarki zbirajo na razdaljah manjših od gorišča. Razdalja, na kateri se žarki zbirajo je tem krajša, kolikor je vhodni žarek ob prehodu skozi lečo oddaljen od optične osi. Omenjena prilagoditev torej omogoča, da se optična prenosna funkcija razširi vzdolž optične osi in s tem omogoči visok izkoristek ob prenosu svetlobne intenzitete od izvira do zaznave na detektorju.

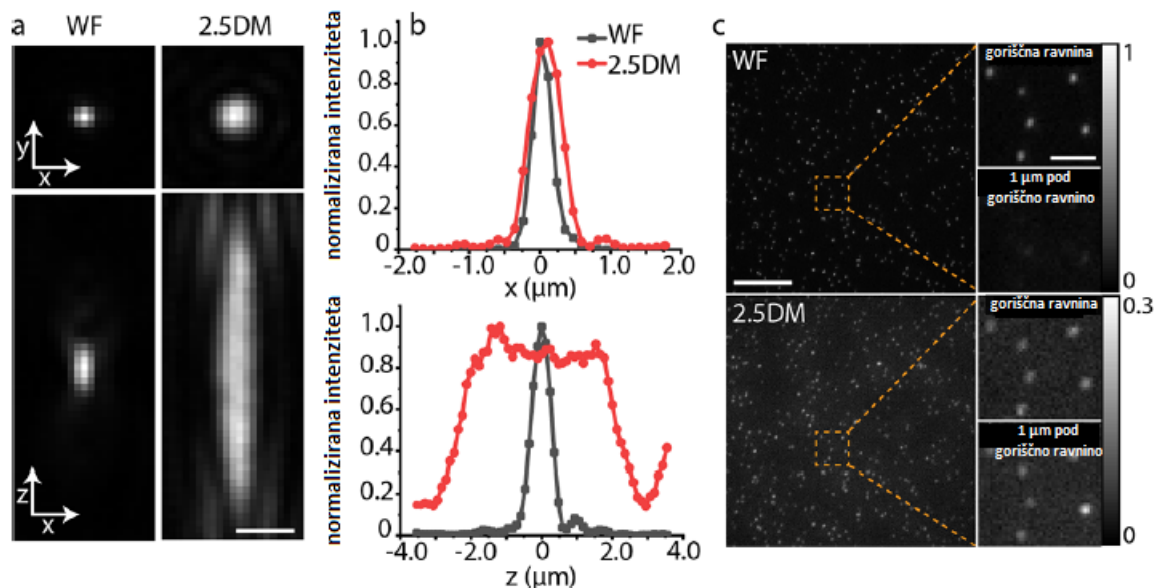
Opisan postopek so nato ponovili s simuliranim odzivom svetlobne intenzitete vzdolž optične osi z večjo NA ($NA = 1.4$), prikazano na sliki 15a. Optična prenosna funkcija take postavitve kaže na dobro ločljivost vzdolž optične osi, vendar manjšo optično globino, saj je svetlobna intenziteta izrazitejša le okoli goriščne ravnine. Rezultat je podaljšana, vendar nesimetrična in premaknjena optična prenosna funkcija vzdolž optične osi, kot je prikazano na sliki 15b. Nato so krožno simetrično fazno funkcijo binarizirali – zvezno fazno porazdelitev so preoblikovali na diskretno z omejitvijo izbire faze na 0 in π . Optična prenosna funkcija se pri tem preslika preko goriščne ravnine, kot je prikazano na sliki 15c. Taka postavitev sicer razširi optično prenosno funkcijo, vendar je ta še vedno precej nehomogena vzdolž optične osi.



Slika 15. Spreminjanje oblike optične prenosne funkcije se dogaja na optični poti med objektivom in detektorjem s pomočjo faznih mask na prostorskem modulatorju svetlobe. Spodnji set slik prikazuje obliko fazne funkcije v goriščni ravnini, ki jo oblikuje prostorski modulator svetlobe. Zgornji set slik prikazuje simuliran odgovor svetlobne intenzitete v ravnini pravokotni na goriščno. Prikazani so primeri z $NA = 1.4$ z različnimi modulacijami (slike a, b, c in d) v primerjavi z $NA = 0.45$ (slika e). Vir: [21].

Fazni maski je nato bila ponovno dodana razostritvena funkcija, kateri je sledila binarizacija in prilagajanje parametrov členov za aberacijo ter razostritvijo. Prilagajanje se zaključuje, ko je optična prenosna funkcija vzdolž optične osi enakomerna do zelene globine in ko je invariantna na razostritev.

Predstavljena fazna maska je nato dobila ime 2.5D fazna maska. Očitna prednost 2.5D fazne maske v primerjavi z modelom z $NA = 1.4$ je razvidna s slike 16. V zameno za 1.8-krat nižjo ločljivost v primerjavi s postavitvijo z $NA = 1.4$ so pridobili osemkrat večjo globinsko ostrino. Veliko prednost ima tudi v primerjavi z modelom z $NA = 0.45$, kjer je sicer ločljivost 2.5D fazne maske 2.8-krat nižja, vendar se globinska ostrina ponovno osemkrat poveča. Hkrati pa je bolje izkoriščen tudi svetlobni vir, saj je v tem primeru izkoristek desetkrat višji.

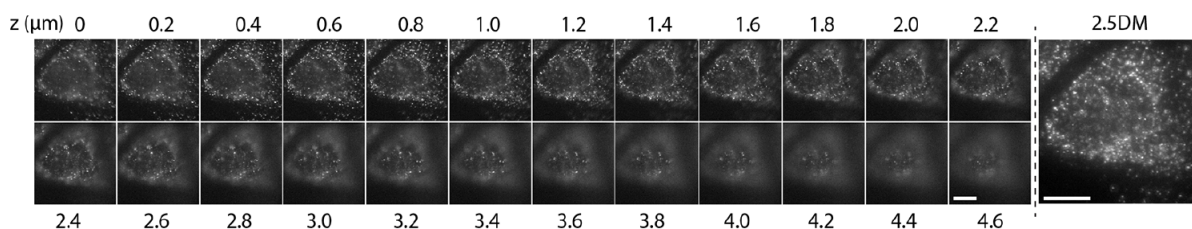


Slika 16. Rezultati eksperimenta s fluorescenčnimi kroglicami z $NA = 1.4$ (WF) in 2.5D fazno masko (2.5DM).

(a) Na zgornjih dveh slikah je prikazana optična prenosna funkcija v goriščni ravnini, na spodnjih dveh pa njen prerez vzdolž optične poti. (b) Na zgornji sliki je razvidno, da doseže 2.5DM podobno ločljivost oz. širino optične prenosne funkcije v goriščni ravnini kot v WF. S spodnje slike pa je razvidna homogena razporeditev intenzitete 2.5DM po globini vzorca preko 8-krat večje razdalje v primerjavi z WF, ki ima očitno lokalizirano intenziteto v izbrani goriščni ravnini. (c) Slike na levi strani sta posneti pri istih intenzitetah in istem časovnem zajemu. S slik na desni strani, ki prikazujejo svetlobno intenziteto v goriščni ravnini in v ravnini $1 \mu\text{m}$ pod goriščno ravnino, je razvidno, da 2.5DM učinkovito ohranja svetlobno intenziteto. Vir: [21].

V primerjavi z $NA = 0.45$ omogoča 2.5D fazna maska tudi bolj homogeno intenziteto svetlobe po globini. Učinkovitost 2.5D fazne maske, v primerjavi z zaporednim slikanjem z epifluorescenčnim mikroskopom, so pokazali s slikanjem fluorescenčnih molekul mRNA v U2OS celicah sesalcev, ki se vežejo na točno določeno zaporedje nukleotidov. V tem primeru je bil uporabljen AF647 indikator.

Na pridobljenem posnetku z 2.5D fazno masko so bile jasno razvidne lokacije molekul mRNA, ki so se v celoti ujemale z molekulami na nizu slik, zaporedoma posnetih na različnih globinah, prikazanih na sliki 17. Potreben čas za zajem informacij po celotni prostornini z uporabo 2.5D fazne maske je bil približno desetkrat krajši.



Slika 17. Posnetki pri slikanju s pomočjo različnih optično prenosnih funkcij. Levi niz slik prikazuje fazno funkcijo po modelu z $NA = 1.4$, kjer so $5 \mu\text{m}$ debel vzorec slikali v 25 korakih in zbirali svetlobne signale 400 ms pri vsaki izmed ravnin. Desna slika prikazuje slikanje z 2.5D fazno masko kjer je bil čas zajemanja posnetka 1 s. Vir: [21].

4. Zaključek

Predstavljeni napredni metodi za slikanje v volumnu izpolnjujeta zahteve po časovnem in prostorskem učinkovitem zajemanju slik. To storita tako z dodanimi optičnimi elementi v samem mikroskopu kot z napredno matematično analizo posnetkov. Kljub napredku imata taki izboljšavi določene slabosti: zoženje vidnega polja v primeru delilne prizme in izguba podatka o globini vira svetlobe v primeru 2.5D fazne maske, zato je izbira optimalne metode vedno odvisna od namena posameznega poskusa. Nadaljnji razvoj mikroskopov in posledična izboljšava zajetih posnetkov sta ključnega pomena za boljše razumevanje osnov delovanja živih sistemov in za napredke v medicini.

LITERATURA

- [1] J.R. Lakowicz: *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3. izdaja (2006). Springer Science+Business Media
- [2] Luminiscenca: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Luminiscenca> [ogled: 17.3.2022]
- [3] Kinin: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kinin> [ogled: 10.3.2022]
- [4] H. Rzepa: *Longer is stronger*: <https://thewinnower.com/papers/453-longer-is-stronger> [ogled: 17.3.2022]
- [5] Jablonski diagram: <https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram/> [ogled: 15.2.2022]
- [6] IF imaging- widefield versus confocal microscopy: <https://www.labclinics.com/2019/04/30/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy/?lang=en> [ogled 15.2.2022]
- [7] Dichroic filter: https://en.m.wikipedia.org/wiki/Dichroic_filter [ogled: 22.3.2022]
- [8] J-C. G. Bünzli *Lightingup cells with lanthanide self-assembledhelicates* (2013), Interface Focus 3, 20130032.
- [9] K. Cyzmek, T. Dahms, *Future Directions in Advanced Mycological Microscopy* (2015)
- [10] P. Bankhead: *Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ* (2014), Nikon Imaging Center
- [11] The point spread function: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/psf.html> [ogled: 5.3.2022]
- [12] Deconvolution in optical microscopy: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/digitalimaging/deconvolution/deconvolutionhome/> [ogled: 17.3.2022]
- [13] Point spread function: https://en.wikipedia.org/wiki/Point_spread_function [ogled: 5.3.2022]
- [14] Resolution and contrast in confocal microscopy: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/resolutionintro/> [ogled: 22.3.2022]
- [15] Resolution and contrast in cono ali microscopy: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/resolutionintro/> [ogled: 22.3.2022]
- [16] Introduction to Digital Imaging in Microscopy: <https://hamamatsu.magnet.fsu.edu/articles/microscopyimaging2.html> [ogled: 5.3.2022]
- [17] S.Xiao, H. Gritton, H. Tseng, D.Zemel, X. Han in J. Mertz:*High-contrast multifocus microscopy with a single camera and z-splitter prism* (2020). Optica 7, 1477-1486
- [18] CMOS: <https://en.wikipedia.org/wiki/CMOS> [ogled: 10.3.2022]
- [19] Richardson-Lucy deconvolution algorithm https://en.m.wikipedia.org/wiki/Richardson-Lucy_deconvolution
- [20] Calcium influx: <https://web.williams.edu/imput/synapse/pages/IIA1.htm>
- [21] J. Ren, K.Y. Han: *Fast, High-Throughput Imaging via Volumetric Projection for Quantitative Subcellular Analysis* (2021). ACS Photonics, 8, 3, 933–942