



Лекция 7.

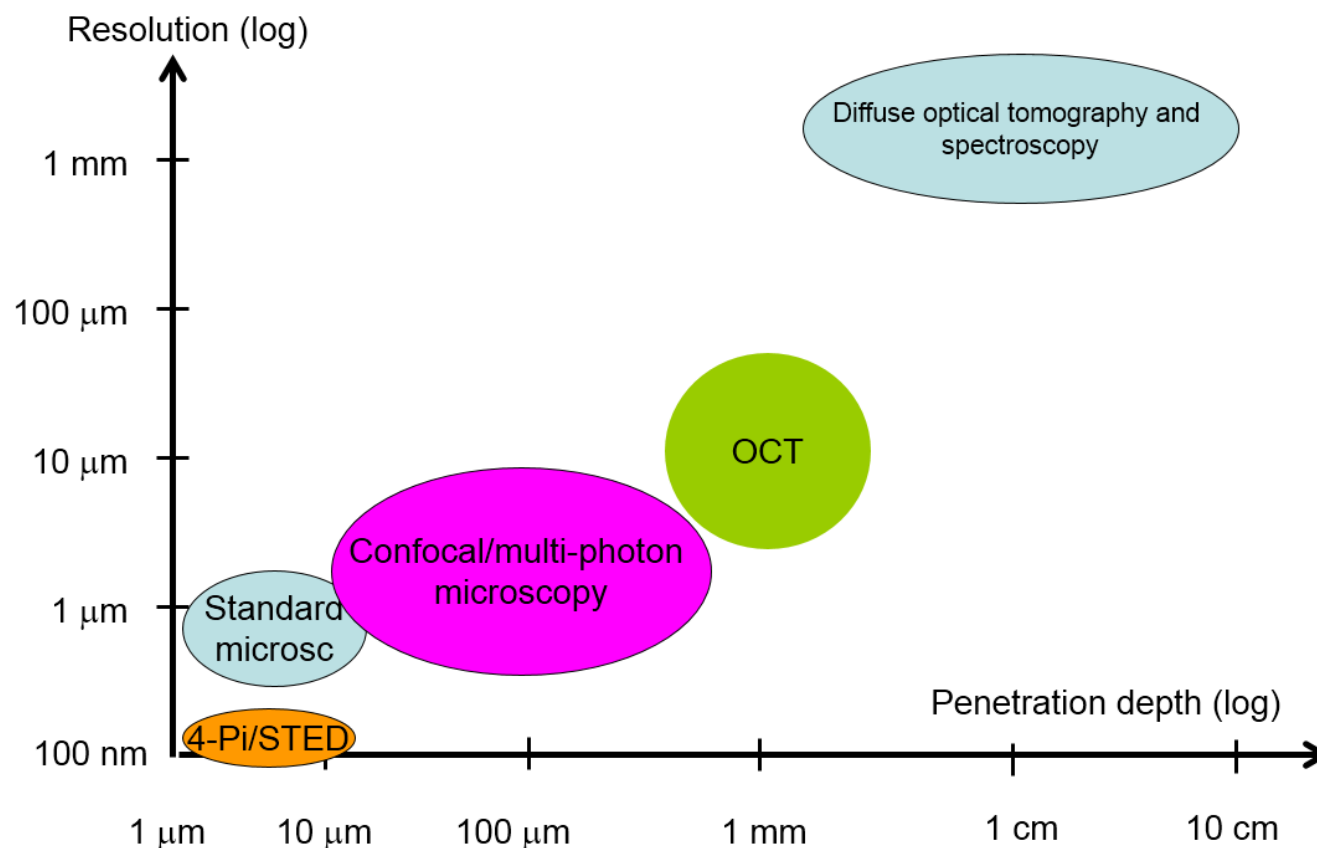
Часть 1. Оптическая микроскопия

Губарев Ф.А.

Оптические методы исследований

Основные вопросы:

- 1) Какова необходимая глубина проникновения?
- 2) Какое приемлемое разрешение?
- 3) Какой тип информации необходим?

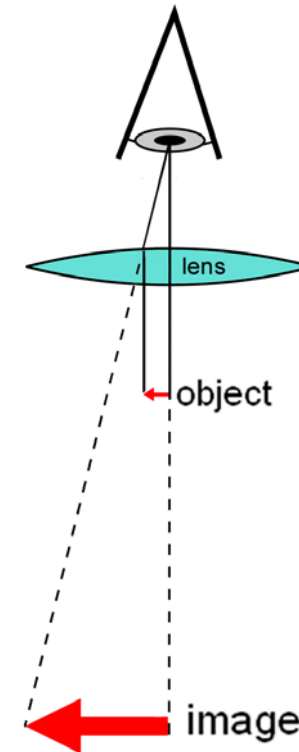


Оптическая микроскопия

Оптический микроскоп или световой микроскоп - это тип микроскопа, который использует видимый свет и систему линз для увеличения изображений небольших объектов.

Простой микроскоп использует объектив или набор линз для увеличения объекта только с помощью углового увеличения (рис.), что дает зрителю вертикальное увеличенное виртуальное изображение.

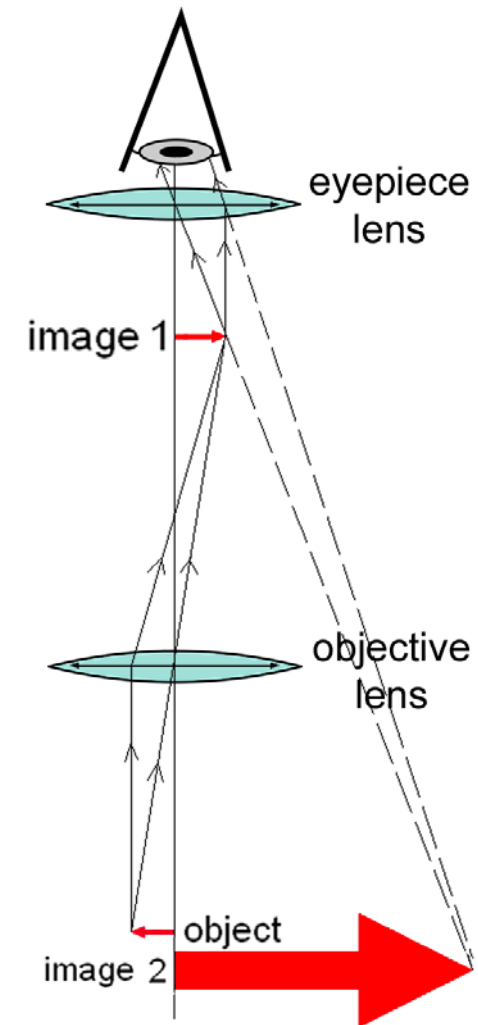
Увеличение, создаваемое одной линзой, составляет приблизительно $25/f$, где f - фокусное расстояние объектива в сантиметрах. Для повышения увеличения, фокусное расстояние должно быть уменьшено, что на практике требует, чтобы линза имела больший радиус кривизны. Лупа $\times 10$ уже представляет собой луковичный кусок стекла и дает значительные дефекты формирования изображения.



Обычная микроскопия

Комбинированный микроскоп использует два линзы. Линза рядом с объектом называется объективом. Она собирает свет, который фокусирует реальное изображение объекта внутри микроскопа (image 1).

Вторая линза или группа линз (называемая окуляром), дает наблюдателю увеличенное перевернутое виртуальное изображение объекта (image 2), затем увеличивает это изображение. Использование комбинированной системы «объектив-окуляр» позволяет значительно увеличить изображение. Обычные комбинированные микроскопы часто имеют сменные объективы, позволяющие пользователю быстро регулировать увеличение. Комбинированный микроскоп также обеспечивает более качественные настройки освещения, такие как фазовый контраст.

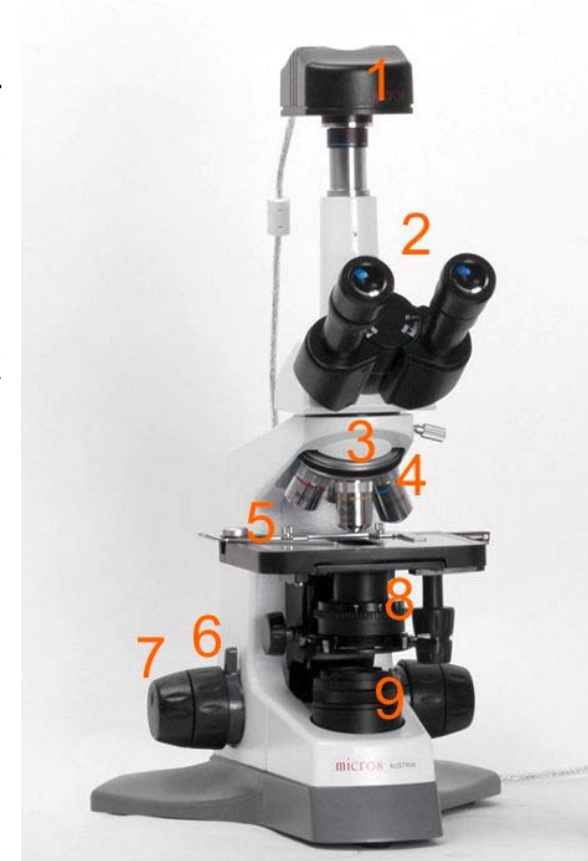


Тринокулярный микроскоп

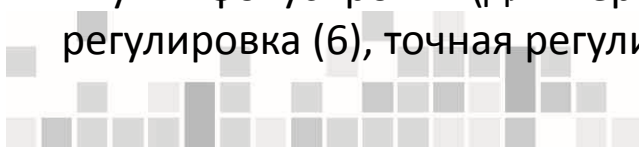
Некоторые из современных микроскопов выполняют в тринокулярном исполнении. Тринокулярный микроскоп имеет два окуляра, например, бинокулярный микроскоп и дополнительную третью глазную трубку для подключения камеры микроскопа. Таким образом, они представляют собой бинокль с подвижным призматическим узлом, в котором свет направлен либо на бинокулярный узел микроскопа, либо на камеру. Лучшие модели этого микроскопа будут иметь по крайней мере три положения, позволяя 100% света бинокулярному, 80% к камере и 20% к биноклю или просто 100% к камере.

Основные компоненты современного оптического микроскопа:

- Камера (1)
- Окуляр (окулярная линза) (2)
- Объективная башня, револьвер или вращающаяся носовая часть (для крепления нескольких объективов) (3)
- Объективные линзы (4)
- Стадия (удерживать образец) (5)
- Ручки фокусировки (для перемещения сцены): грубая регулировка (6), точная регулировка (7)



- Диафрагма и конденсатор (8)
- Источник света (свет или зеркало) (9).



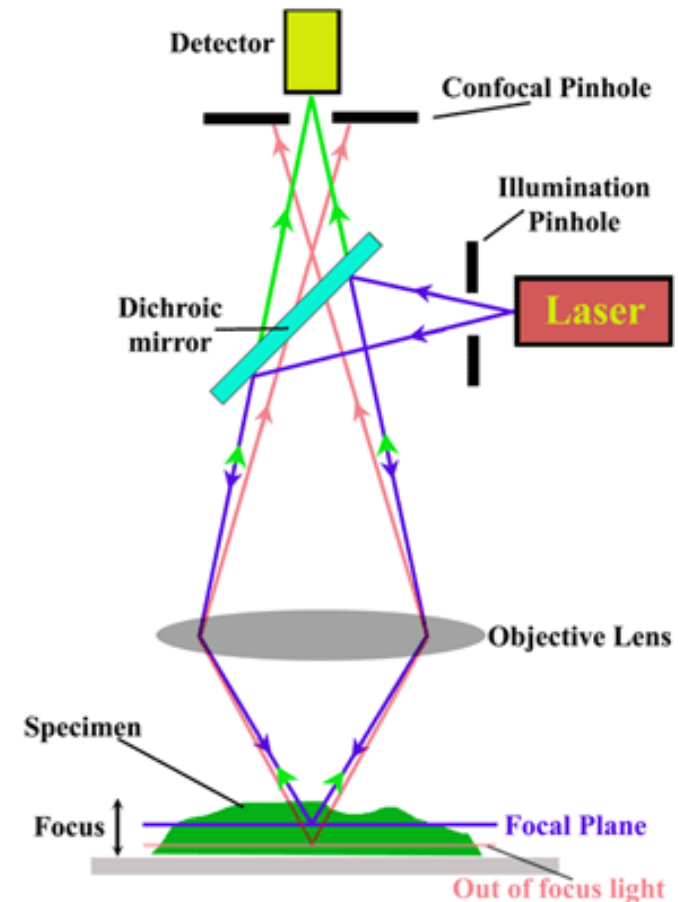
Конфокальный микроскоп

В традиционной микроскопии разрешение, которое может быть получено, ограничено дифракцией света. Уравнение:

$$D = \frac{\lambda}{2NA}$$

где D - дифракционный предел, λ - длина волны света, NA - числовая апертура или показатель преломления среды, умноженный на синус угла падения.

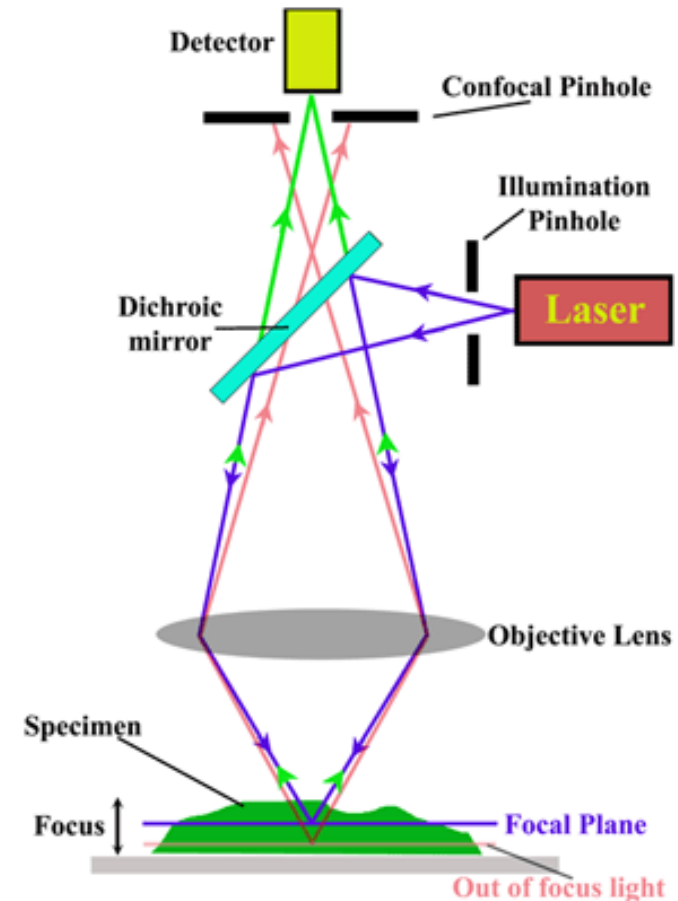
Важным шагом в эволюции современной оптической визуализации стало введение конфокальной оптики и конфокального лазерно-сканирующего микроскопа. В этом методе пятно возбуждения, ограниченное дифракцией в образце, отображается на конфокальную апертуру, которая расположена перед точечным детектором.



Конфокальный микроскоп

Другой проблемой обычной световой микроскопии является нецензурное размытие изображения, замаскировав важные структуры, представляющие интерес, особенно в толстых образцах. В обычной микроскопии освещена не только плоскость фокуса, но большая часть образца выше и ниже этой точки также освещена, что приводит к размытию фокуса из этих областей. Этот свет вне фокуса приводит к уменьшению контрастности изображения и уменьшению разрешения.

В конфокальном микроскопе все структуры вне фокуса подавляются при формировании изображения. Это достигается путем расположения диафрагм, которые при оптически сопряженных точках пути лучей действуют как точечный источник и как точечный детектор соответственно. Обоняние детектирования не позволяет пропускать через него лучи света из точек вне фокуса. Длина волны света, числовая апертура объектива и диаметр диафрагмы влияют на глубину фокальной плоскости.

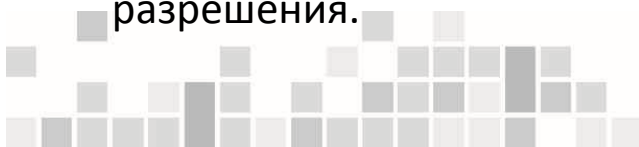


Конфокальный микроскоп

Чтобы получить полное изображение, точка света перемещается по образцу с помощью сканирующих зеркал. Испускаемый/отраженный свет, проходящий через отверстие детектора, преобразуется в электрические сигналы с помощью фотоумножителя и отображается на мониторе компьютера.

Основные улучшения, предлагаемые конфокальным микроскопом по сравнению с обычным микроскопом, можно резюмировать следующим образом:

- Световые лучи вне фокальной плоскости не записываются.
- Дефокусировка не создает размытие, но постепенно вырезает части объекта при их удалении от фокальной плоскости. Практическое следствие состоит в том, что эти части становятся темнее и в конечном итоге исчезают. Эта функция называется оптическим разделением.
- Можно записать трехмерные наборы данных.
- Сканирование объекта в направлении x - y , а также в направлении z (вдоль оптической оси) позволяет просматривать объект со всех сторон.
- Из-за малого размера освещающего светового пятна в фокальной плоскости минимизируется рассеяние света.
- При обработке изображений многие нарезки могут быть наложены друг на друга, давая расширенное фокусное изображение. Это может быть достигнуто только в обычной микроскопии за счет уменьшения апертуры и, таким образом, ухудшения разрешения.



Конфокальный микроскоп

Четыре типа конфокальных микроскопов являются коммерчески доступными:

Конфокальные лазерные сканирующие микроскопы используют несколько зеркал (обычно 2 или 3 сканирования линейно вдоль оси x и y) для сканирования лазера по образцу и «удаления» изображения через фиксированный пробой и детектор.

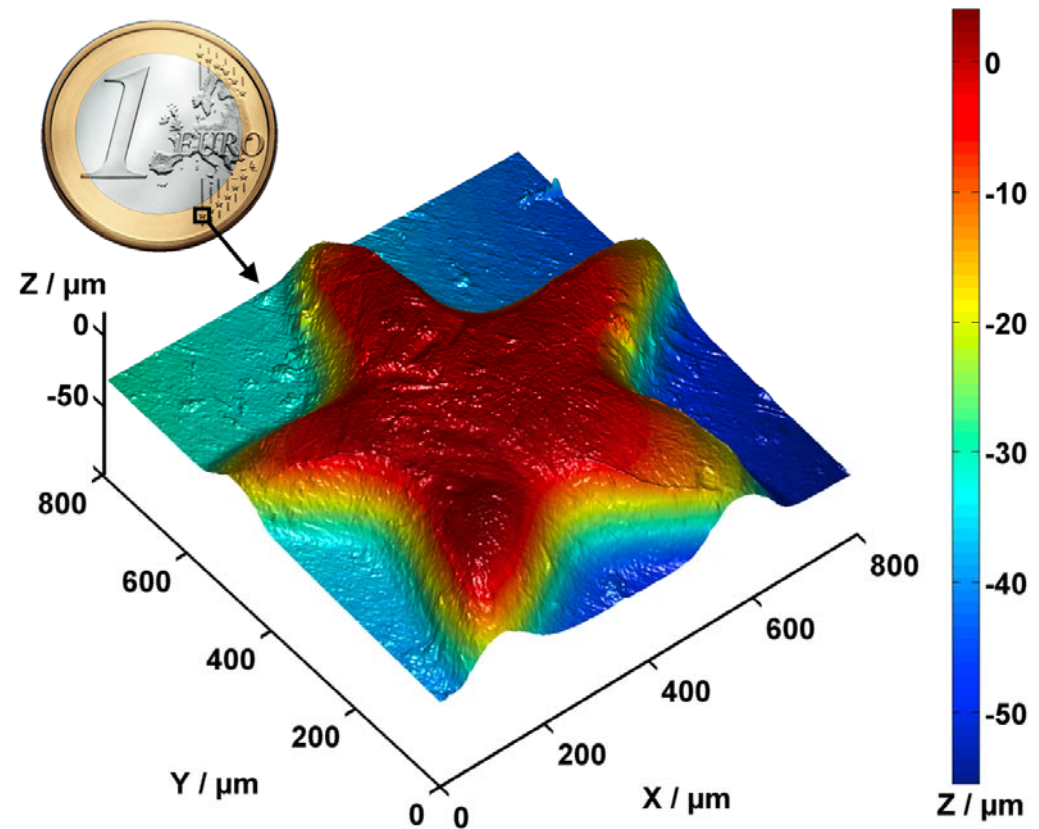
Дисковые конфокальные микроскопы Spinning-disk (Nipkow) используют серию движущихся отверстий на диске для сканирования пятен света. Так как серия отверстий сканирует область параллельно, каждому отверстию разрешено навешиваться на определенную область в течение более длительного времени, тем самым уменьшая энергию возбуждения, необходимую для освещения образца.

Конфокальные микроскопы с микролинзами или двойным спиннинг-дисксом работают по тем же принципам, что и конфокальные микроскопы с прядильным диском, за исключением того, что второй вращающийся диск, содержащий микролинзы, помещают перед вращающимся диском, содержащим отверстия. У каждого отверстия есть связанная микролинза.

Программируемые массивные микроскопы (PAM) используют электронно управляемый пространственный световой модулятор (SLM), который создает набор движущихся отверстий. SLM содержит микроэлектромеханические зеркала или жидкокристаллические компоненты. Изображение обычно приобретается камерой с зарядовой связью (CCD).

Конфокальный микроскоп

Частичный профиль поверхности монеты 1 евро, измеренный с помощью конфокального микроскопа на диске Nirxow. Трехмерное представление детали поверхности монеты 1 евро: показана одна из звезд, выбитых на одной стороне монеты. 3D-профиль был измерен конфокальным микроскопом белого света. Боковой диапазон измерения составляет 800 мкм на 800 мкм (0,8 мм на 0,8 мм), вертикальный диапазон составляет около 60 мкм (0,06 мм). Цвета поверхности показывают высоту по шкале в правой части изображения.



https://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_microscopy



STED / Флюоресцентная микроскопия

Спектроскопические методы, применяемые в современных конфокальных микроскопах, включают в себя, в частности, спектроскопию с временным разрешением (FLIM, визуализацию времени флуоресценции), измерения фотоизлучения и поляризационной анизотропии и корреляцию флуоресценции.

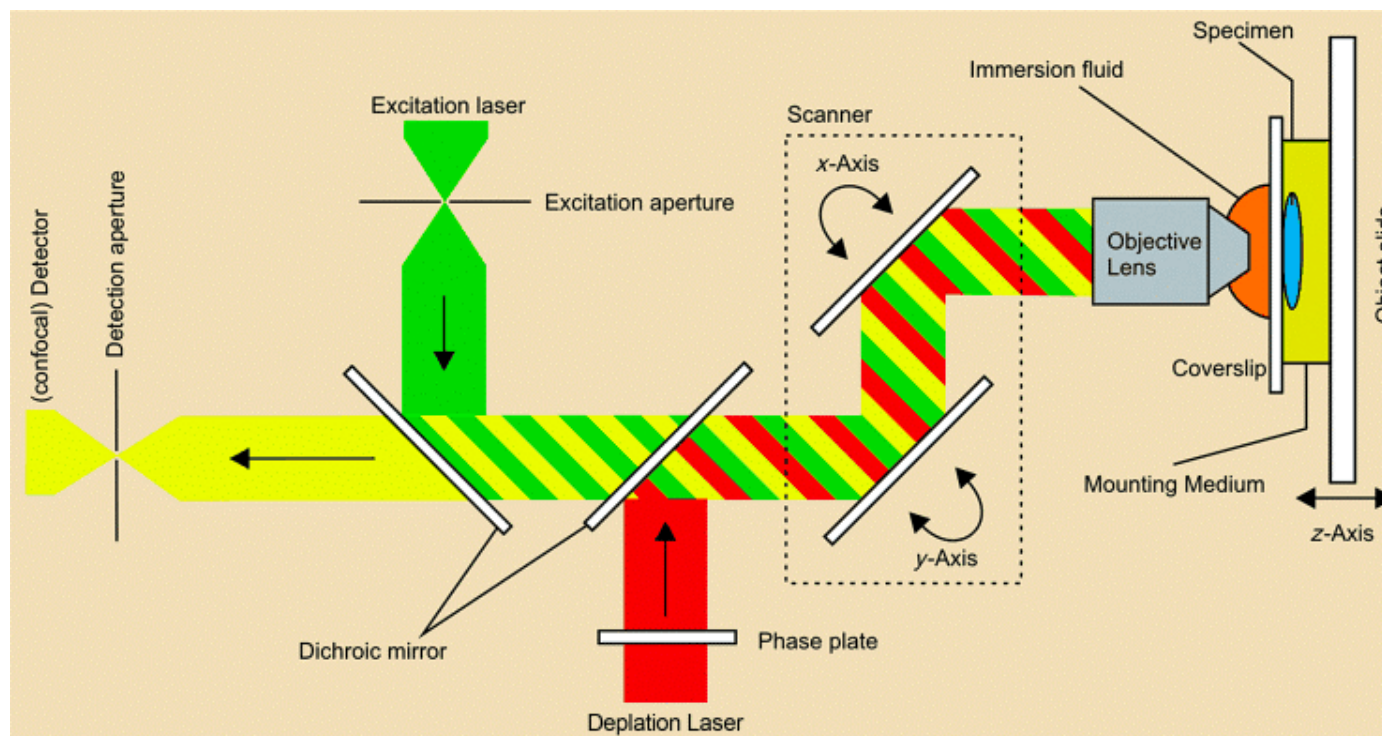
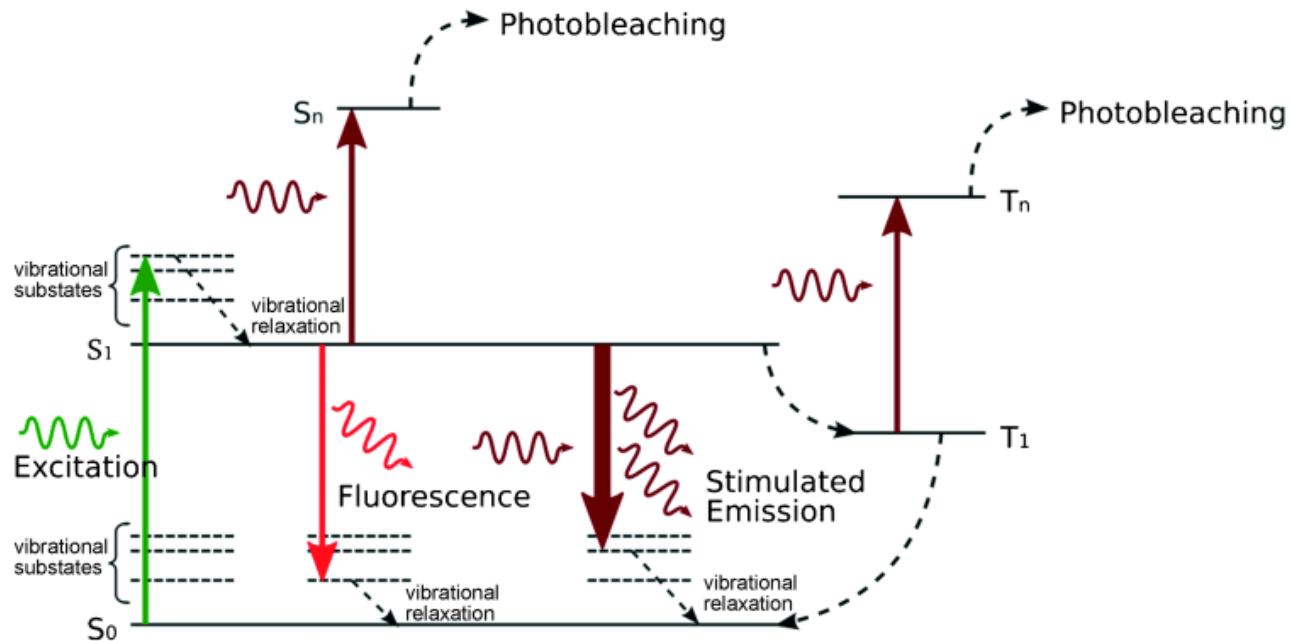


Рис. Оптический путь и расположение образца в обычном лазерном сканирующем микроскопе. Сначала лазерный луч сканирует образец в направлении x-y. Фокальную плоскость можно регулировать путем изменения расстояния между образцом и объективом (осевое, вдоль оси z). С применением лазера для девозбуждения конфигурация соответствует STED-микроскопу.

STED / Флюоресцентная микроскопия

Основной идеей STED-микроскопии является пространственно-селективная дезактивация флуорофоров, предотвращающая их участие в формировании изображения:



После начального возбуждения из состояния S_0 в состояние S_1 и колебательной релаксации флуорофоры могут излучать флуоресцентные фотоны. В качестве альтернативы, флуоресценцию можно остановить, стимулируя вынужденный переход излучения в более высокую вибрационную подложку электронного основного состояния S_0 . При обнаружении спектрально отделяется излучаемый красный свет вынужденного излучения.

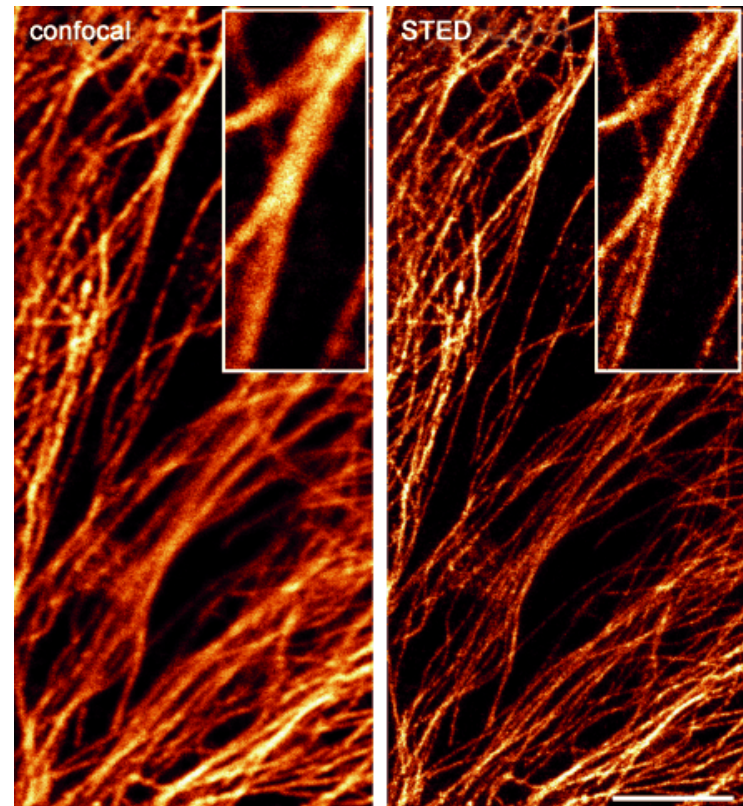


STED / Флюоресцентная микроскопия

Структурный анализ методом STED-микроскопии

STED-микроскопия открыла область применения флуоресцентной микроскопии, которая ранее была исключительной областью электронной микроскопии: анализ структуры и распределения белка на уровне суборганических групп. В исследованиях, основанных на принципе доказательства, цитоскелетные филаменты чаще всего используются в качестве стандарта для демонстрации сверхразрешения. Нейрофиламенты, актин и, чаще всего, тубулин обычно используются для сравнения разрешающей способности конфокальной и STED-микроскопии.

Микротрубки клетки Caco-2, окрашенные Atto647N. Сравнение изображений, полученных в конфокальном (левого) и STED (справа) микроскопе при линейном разрешении около 80 нм. Некоторые крупные, неверно определенные структуры из конфокальной записи возникают как пучки многократных нитей после включения деэксцитирующего лазера. Размерность шкалы: 5 мкм.



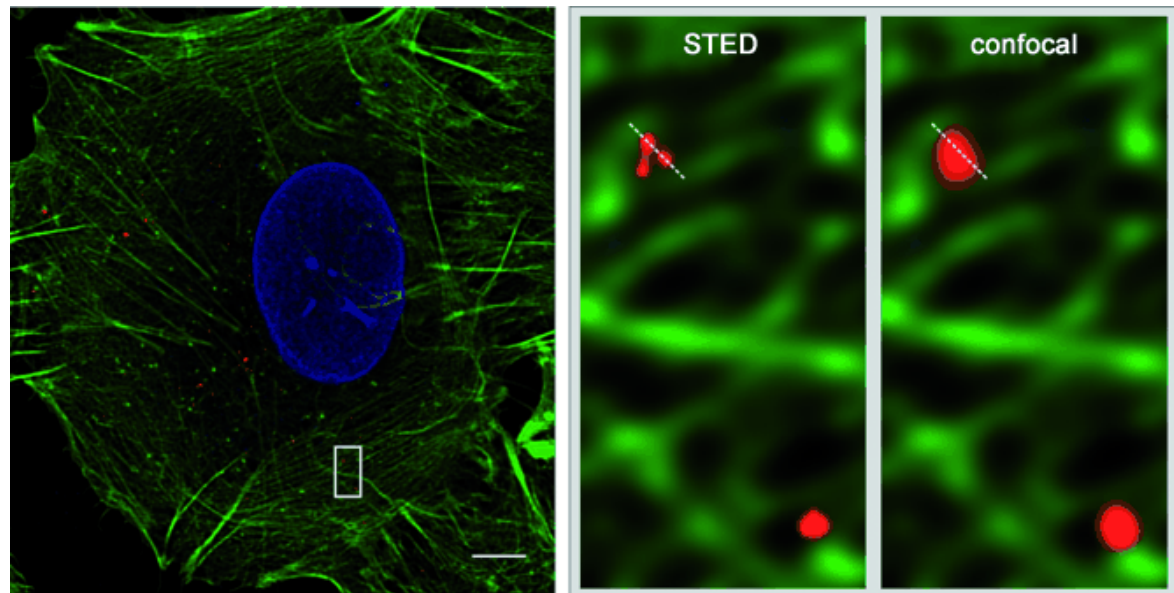
STED / Флюоресцентная микроскопия

STED-микроскопия живых клеток

Сочетание STED-микроскопии с флуоресцентной корреляционной спектроскопией (FCS) позволяет достичь нанометрового разрешения.

Флуоресцентные белки, которые могут специфичным склеиваться с целевыми белками, обеспечивают универсальность для визуализации практически любого распределения органелл или белков в живой клетке. Эта особенность была реализована для STED-микроскопии. Метод показал работоспособность при 50 нм поперечном разрешении.

A549 после 48 часов воздействия 80 нм частицами диоксида кремния. Частицы были введены и начали мигрировать к ядру. Расстояние Две из трех кластерных частиц находятся на расстоянии 180 нм, что больше предела разрешения конфокальной микроскопии, при этом различимо при STED-микроскопии.



Зеленый: актин, окрашенный с помощью Alexa 488, синий: lamin B, окрашенный Alexa 546 (оба конфокальные), красный: 80 нм частицы кремнезема, полностью помеченные Atto647N (STED).
Размерность шкалы: 5 мкм.

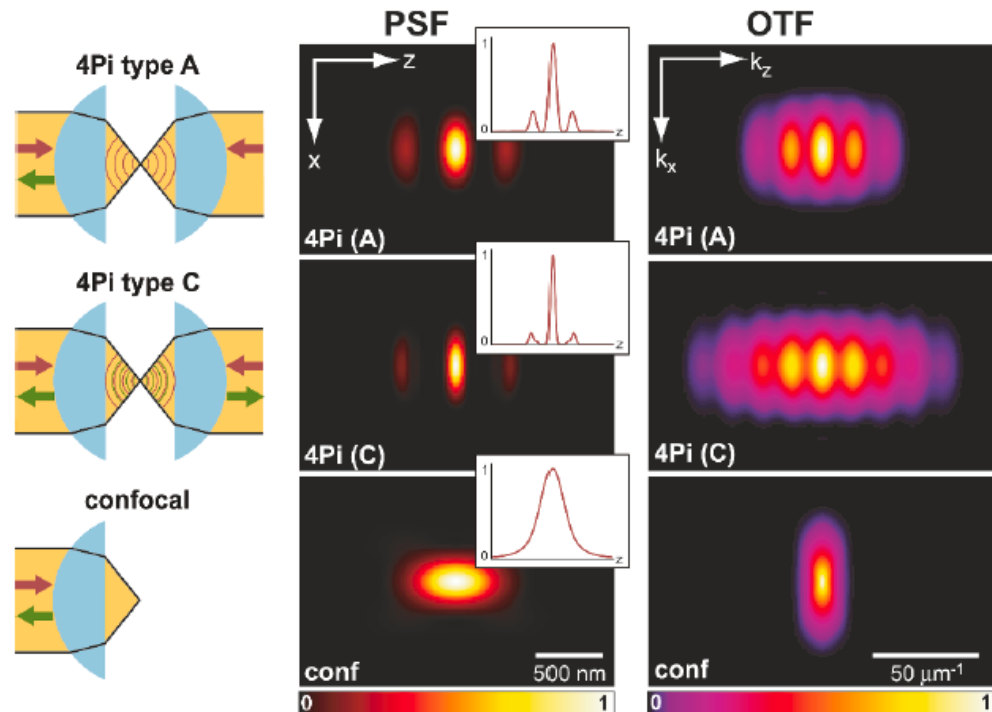


STED / Флюоресцентная микроскопия

4Pi-микроскопия

4Pi-микроскоп представляет собой лазерный сканирующий флуоресцентный микроскоп с улучшенным осевым разрешением. Типичное значение 500-700 нм может быть улучшено до 100-150 нм, что соответствует почти сферическому фокальному пятну с 5-7 раз меньшим объемом, чем стандартная конфокальная микроскопия.

В 4Pi-микроскопии типа А образец, помещенный между двумя покровными стеклами, когерентно освещен двумя противоположными объективами, фокусирующими импульсный инфракрасный лазерный луч в одно и то же пятно. Флуоресценция 2PE собирается с одной стороны и фокусируется на (переменный) конфокальный просвет. В 4Pi-микроскопии типа С флуоресценция собирается обоими линзами и когерентно комбинируется на детекторе. Из-за комбинации помех при возбуждении и детектировании режим типа С имеет более низкие боковые лепестки и на ~ 30% увеличенное осевое разрешение по сравнению с типом А.



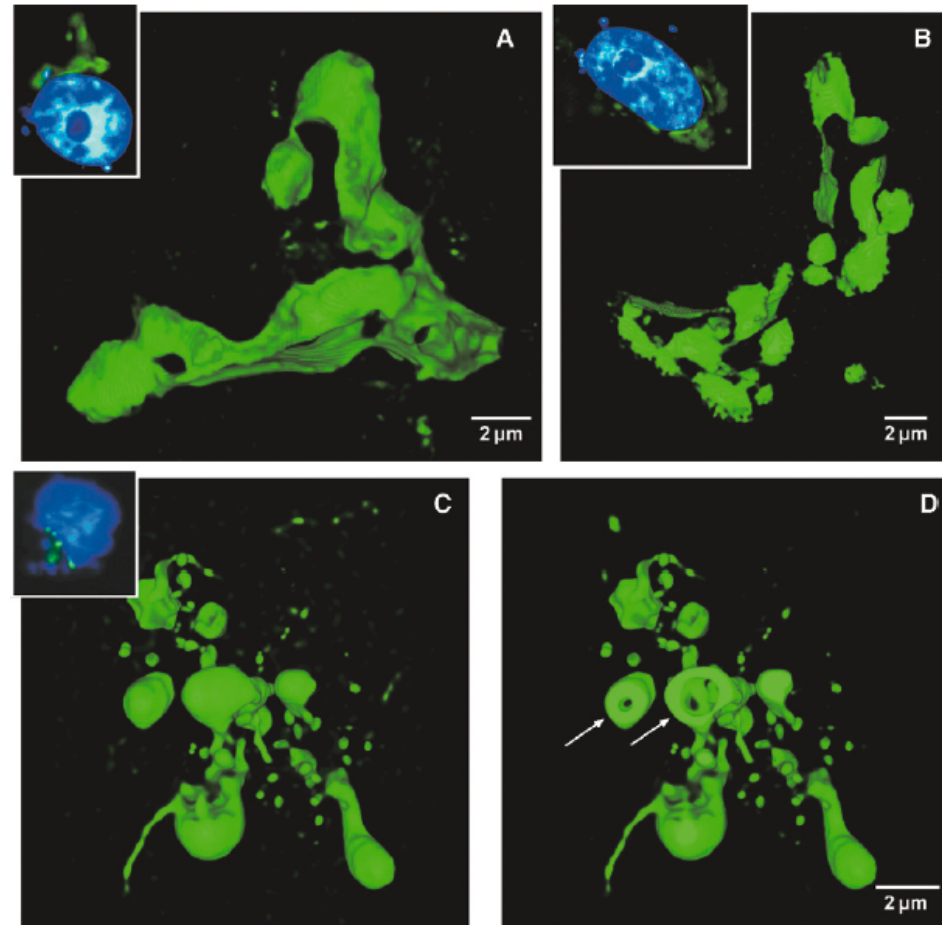
PSF - point spread function (отклик системы на точечный источник, OTF – optical transfer function (функция передачи света)

STED / Флюоресцентная микроскопия

4Pi-микроскопия

Изображение Аппарата Гольджи, полученного с помощью 4Pi-микроскопии GalP-EGFP (A) и 2-OSTEGFP (B) в живых клетках Vero при осевом разрешении ~ 100 нм. Трехмерное изображение четко показывает ленты, фракционные блоки, а также более мелкие трубчатые и везикулярные подблоки.

На вкладке в верхнем левом углу рисунка показано обычное x-y изображение маркированного GalTEGFP Аппарата Гольджи, расположенного близко к ядру и окрашенного флуорофором Hoechst.



Данные указывают на способность 4Pi-микроскопа разрешать небольшие структуры, такие как полости, которые становятся очевидными при удалении верхних крышек подобных баллонам структур (D).





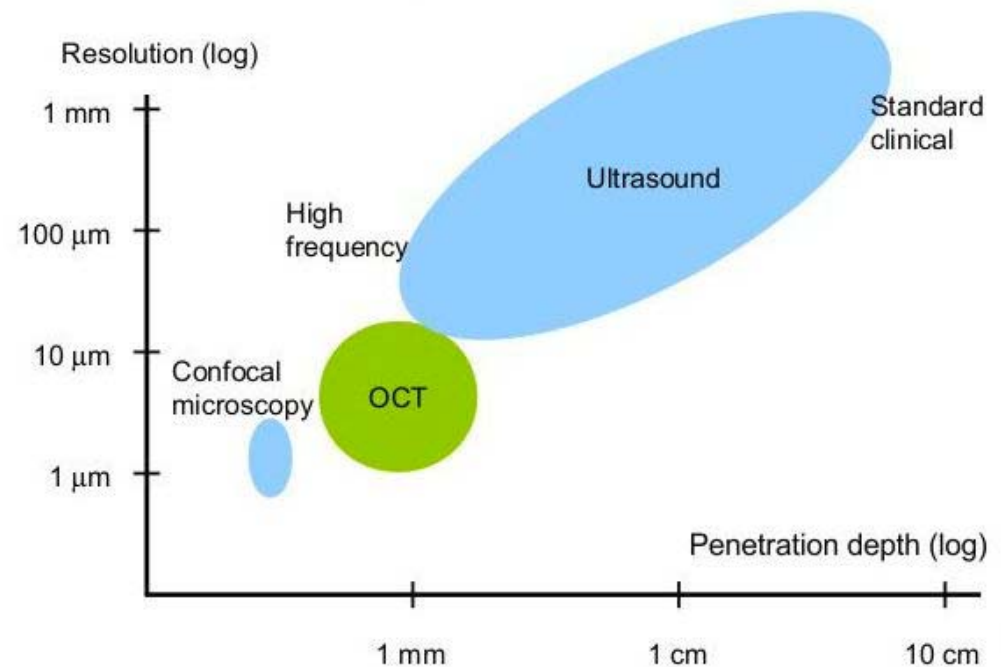
Лекция 7. Часть 2. Оптическая томография

Губарев Ф.А.

Оптическая когерентная томография (ОКТ)

Достоинства:

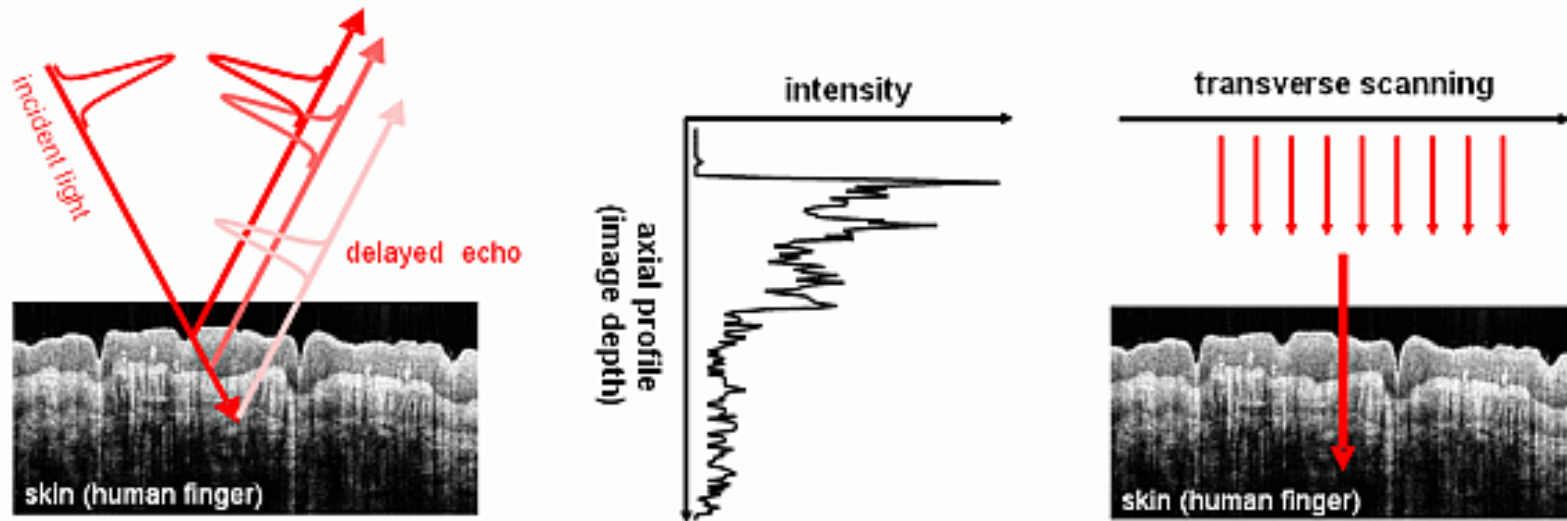
- разрешение изображения от 1 до 15 мкм может быть достигнуто - на один-два порядка выше, чем у ультразвука.
- изображения могут быть получены *in situ* и неинвазивно. Высокоскоростная визуализация в режиме реального времени возможна с частотой несколько кадров в секунду.
- ОКТ позволяет выполнять «оптическую биопсию», изображение структуры ткани или патологии по разрешению, близкому к гистопатологии, с визуализацией *in situ* и в реальном времени, без необходимости вырезать образцы и обрабатывать их, как при стандартной биопсии и гистопатологии.
- Технология ОКТ может быть реализована на основе волоконно-оптических технологий и использовать компоненты, разработанные для телекоммуникационной отрасли.



- Изображение генерируется в электронном виде, что позволяет осуществлять цифровую обработку, передачу и хранение.
- Системы ОКТ могут быть спроектированы компактными и недорогими, подходящими для применения в исследованиях, производстве или в клинике.

Принцип действия ОКТ

ОКТ выполняет визуализацию путем измерения задержки времени эха и величины отраженного назад или обратно рассеянного света. Изображения в поперечном сечении создаются путем проведения осевых измерений времени задержки эха и величины обратного рассеянного или обратно отражённого света в разных поперечных сечениях. Это приводит к двумерному набору данных, который отображает обратное рассеяние в плоскости поперечного сечения материала или ткани.



В ОКТ измерения расстояния и микроструктуры выполняются путем направления светового луча на материал или ткань и измерения светоотражающего и обратного рассеяния света из внутренних микроструктурных признаков, как показано на рис. ниже. В концептуальных целях можно представить работу ОКТ, считая световой пучок, состоящий из коротких оптических импульсов. Хотя ОКТ может быть выполнена с использованием короткого импульсного света, большинство систем ОКТ работают с использованием непрерывного света с короткой длиной когерентности.

Разрешение и чувствительность ОКТ

В отличие от обычной микроскопии, в ОКТ механизмы, которые регулируют разрешение осевого и поперечного изображений, развязаны. Длина когерентности источника света определяет осевое разрешение при визуализации ОКТ, и высокое осевое разрешение может быть достигнуто независимо от условий фокусировки пучка.

Для источника с гауссовским спектральным распределением осевое разрешение Δz определяется как

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \approx 0.44 \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda}$$

где Δz и $\Delta \lambda$ - полная ширина на половине максимума автокорреляционной функции и спектра мощности, соответственно; λ - длина волны центральной линии. Для достижения высокого осевого разрешения требуются источники с широкой полосой.

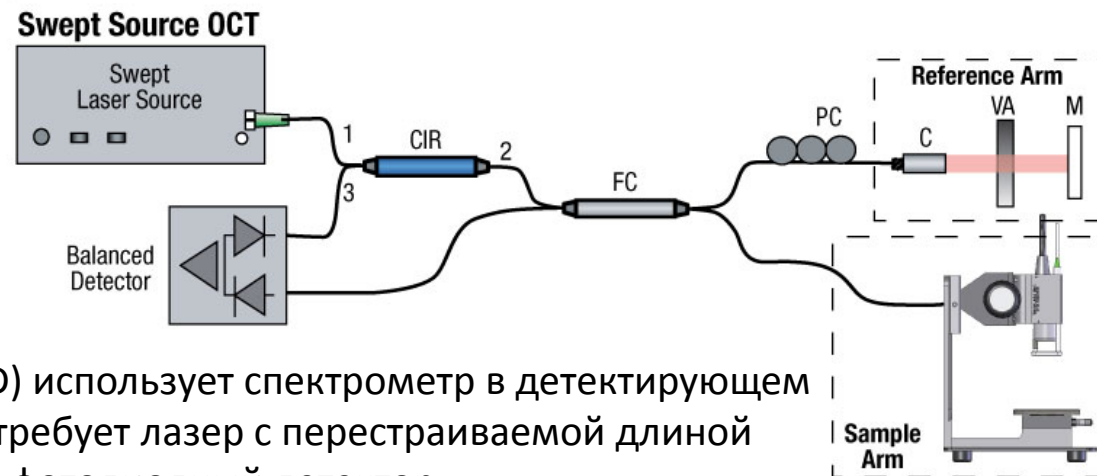
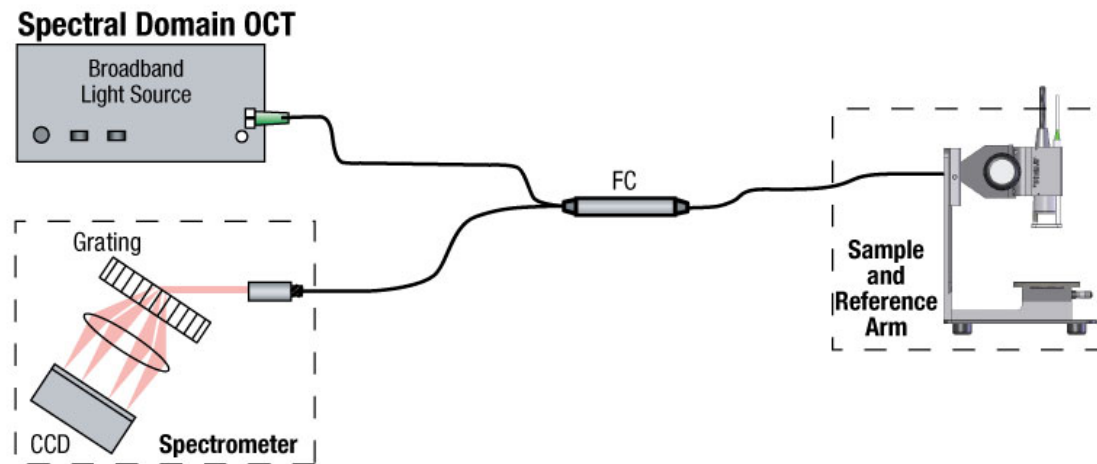
Поперечное разрешение при ОКТ такое же, как для обычной оптической микроскопии, и определяется фокусирующими свойствами оптического пучка. Минимальный размер пятна, на который может фокусироваться оптический луч, обратно пропорционален числовой апертуре или углу фокусировки луча. Поперечное разрешение дается как:

$$\Delta x = \frac{4 \lambda}{\pi} \cdot \frac{f}{d}$$

где d - размер пятна на объективе, а f - его фокусное расстояние. Высокое поперечное разрешение можно получить, используя большую числовую апертуру и фокусируя луч на пятно небольшого размера.

Технология ОКТ

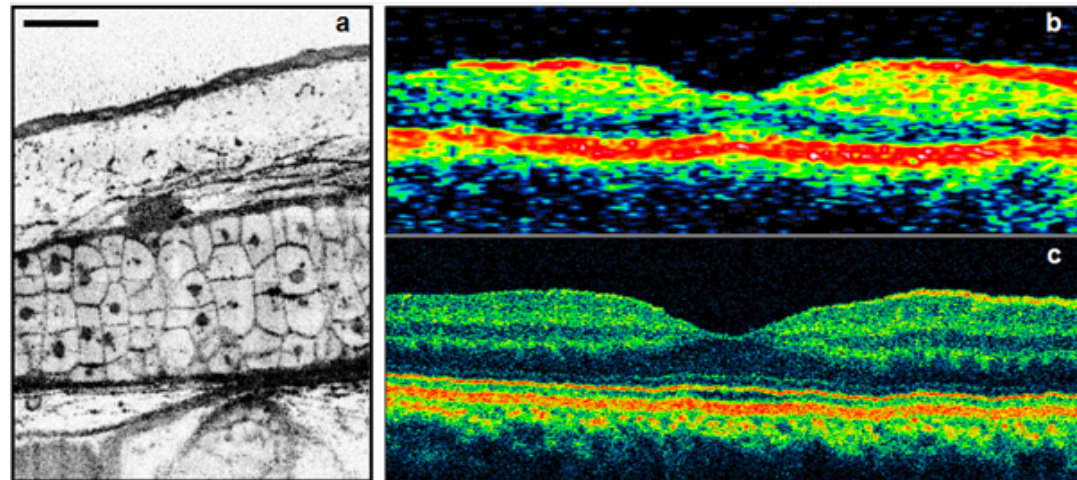
Оптическая когерентная томография имеет преимущество, что она может быть реализована с использованием компактных волоконно-оптических компонентов и интегрирована с широким спектром медицинских инструментов. Схемы ОКТ используют волоконно-оптический принцип интерферометра Майкельсона.



Спектральная ОКТ (SD) использует спектрометр в детектирующем плече, тогда как ОСТ требует лазер с перестраиваемой длиной волны и стандартный фотодиодный детектор.

Применение ОКТ

- Оптическая когерентная томография в офтальмологии.
- Оптическая биопсия - *in situ*, визуализация морфологии тканей в режиме реального времени, визуализация, где эксцизионная биопсия опасна или невозможна.
- Обнаружение ранних неопластических изменений;
- Руководимое хирургическое вмешательство.

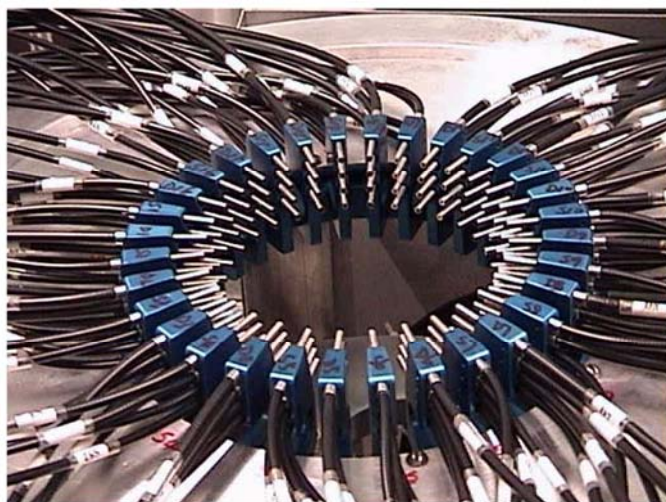


Оптическая когерентная томография для диагностики сетчатки.



Диффузионная оптическая томография

Диффузная оптическая томография (DOT) и визуализация (DOI) - это неинвазивные методы, которые используют свет в ближней инфракрасной области спектра для измерения оптических свойств физиологической ткани. Метод ориентирован на исследуемый объект, по меньшей мере, частично светопропускающий или полупрозрачный, поэтому он лучше всего работает на мягких тканях, таких как ткань груди и головного мозга. Наблюдая за пространственно-временными изменениями светопоглощающих и рассеивающих свойств ткани, можно визуализировать локальные вариации концентрации окси- и дезоксигемоглобина, а также клеточного рассеяния.



Прототип оптического томографа:

<http://www.nature.com/nphoton/journal/v8/n6/full/nphoton.2014.107.html>

Применения:

- обнаружение рака молочной железы
- исследование мозга
- оценка потребления кислорода мышцами
- диагностика артрита
- диагностика атеросклероз
- измерение пульса и ЧСС
- тест на билирубин для новорожденных.

Диффузионная оптическая томография

Оптимальные длины волн

Поглощение ткани линейно зависит от концентрации тканевых хромофоров):

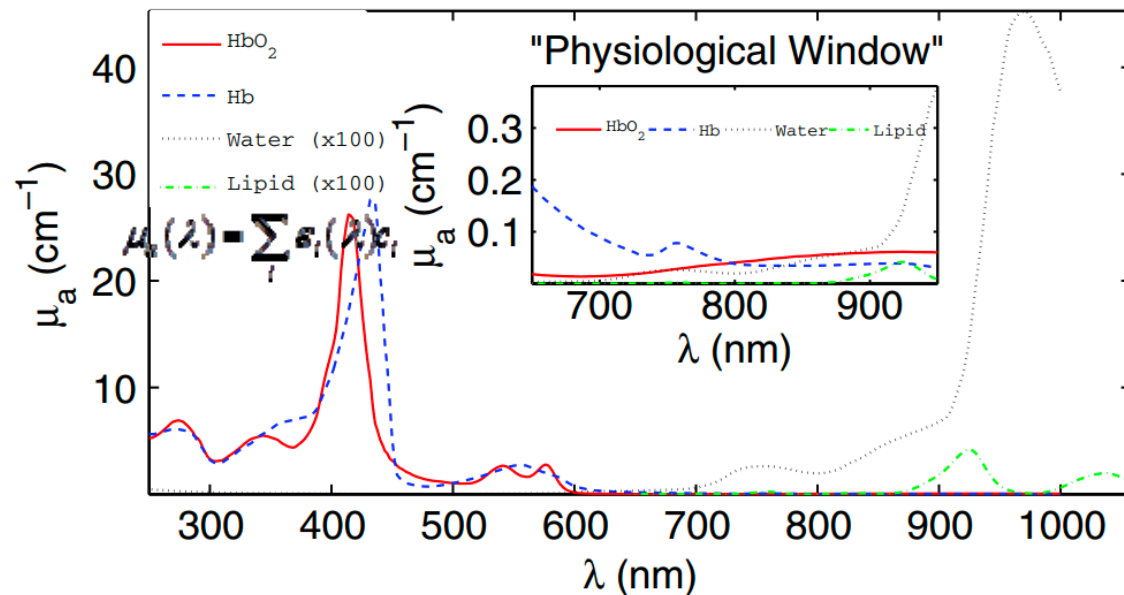
$$\mu_a(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) c_i$$

где $\varepsilon_i(\lambda)$ коэффициент экстинкции от длины волны излучения, и c_i - концентрация i -го хромофора.

Обычно используются два варианта:

- пара при 660-760 нм
- и 830 нм - 780 и 830 нм.

Определение концентраций хромофора в тканях требует разделения поглощения ткани от тканевого рассеяния на более чем одной оптической длине волны.

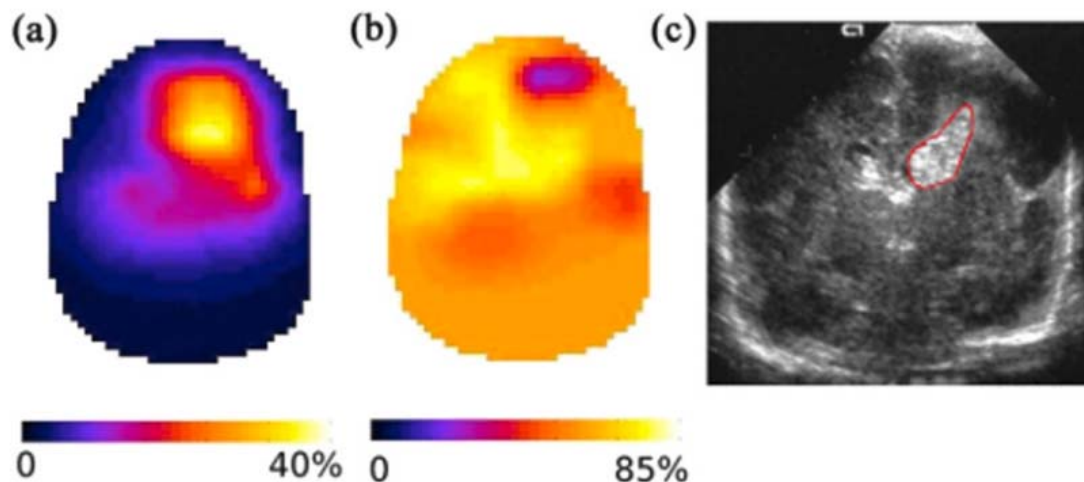
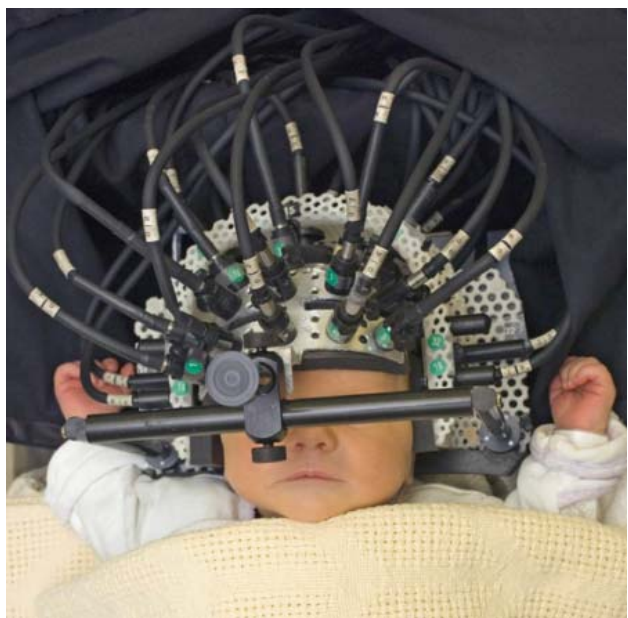


Абсорбционные (μ_a) спектры основных тканевых хромофоров в широком диапазоне длин волн. На вставке показано так называемое «физиологическое окно» в ближней инфракрасной области, где поглощение воды и гемоглобина относительно невелико. В этой части спектра свет может проникать в несколько сантиметров в ткани.



Диффузионная оптическая томография

Трехмерная томография головы новорожденных

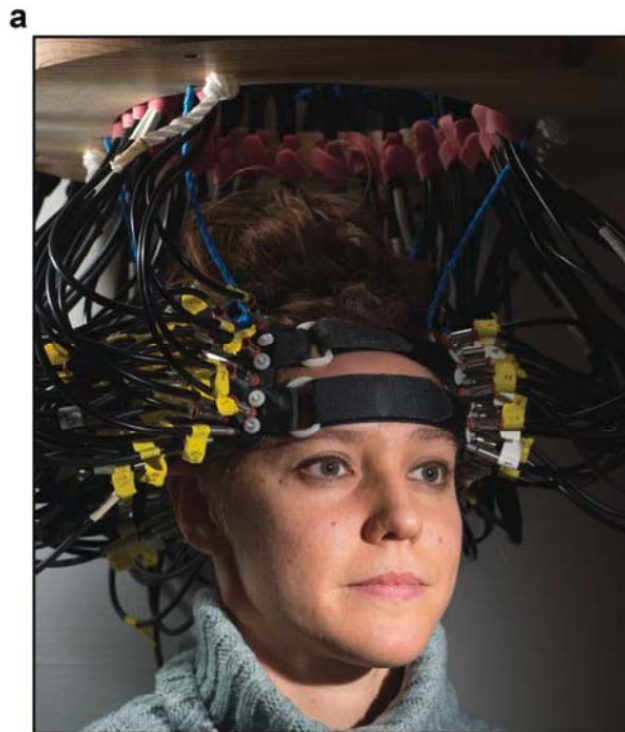


Размещение зондов у младенца. (Нижний) Корональные сечения, показывающие (а) объем крови, (б) насыщение кислородом крови и (в) соответствующее ультразвуковое изображение. [Hebden J.C., Austin T. Optical tomography of the neonatal brain // European Journal of Radiology 17(11) 2926 (2007)].

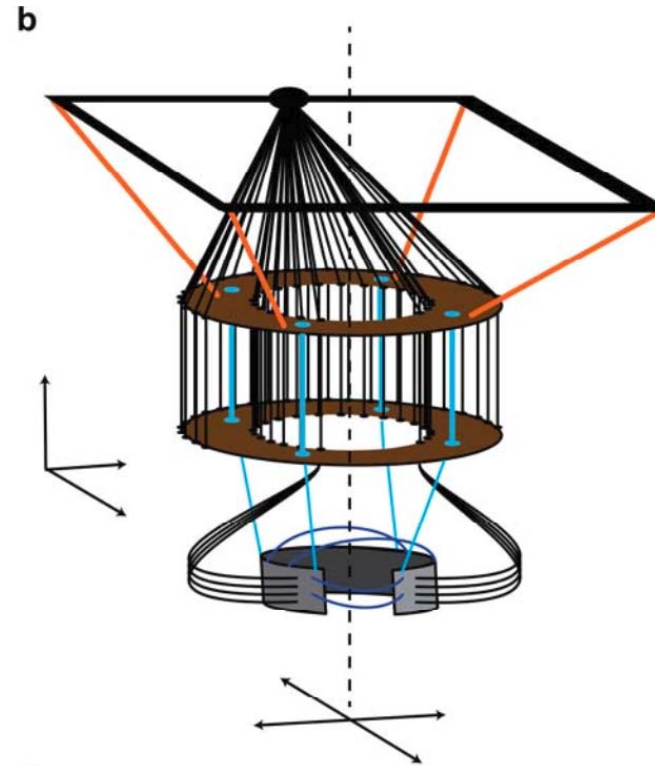


Диффузионная оптическая томография

ДОТ высокого разрешения



Конструкция
шлема для ДОТ

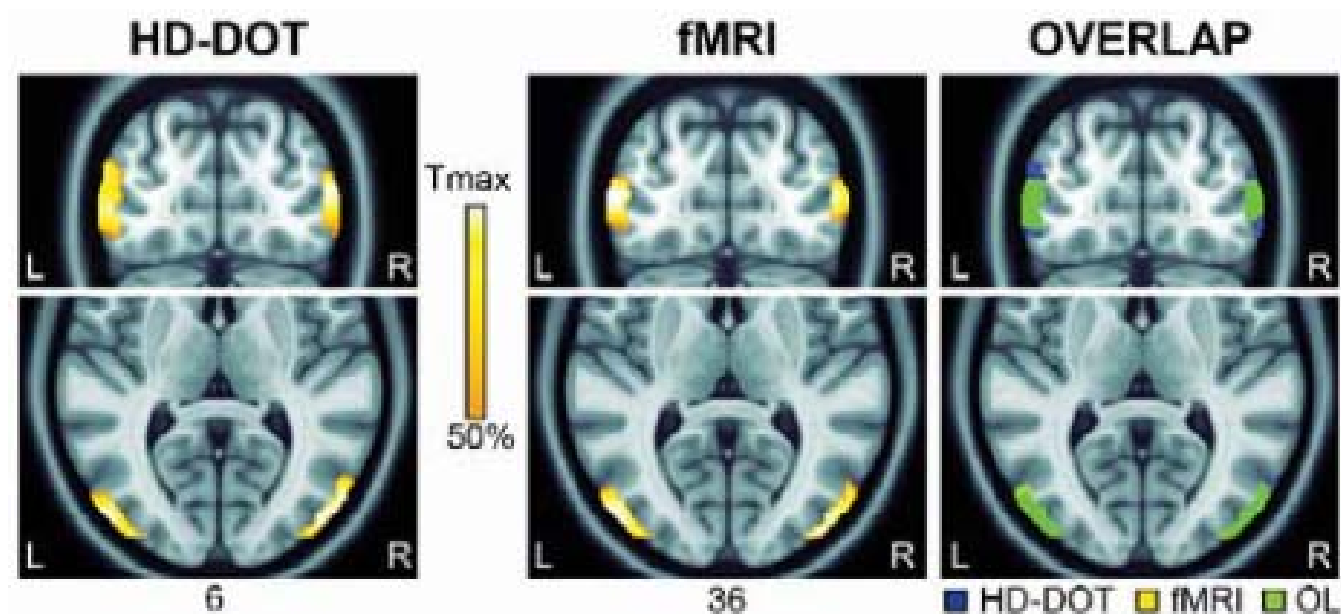


Adam T. Eggebrecht, Silvina L. Ferradal, Amy Robichaux-Viehoever, Mahlega S. Hassanpour, Hamid Dehghani, Abraham Z. Snyder, Tamara Hershey, Joseph P. Culver Mapping distributed brain function and networks with diffuse optical tomography // Nature Photonics. 2014. Vol. 8. P. 448-454.



Диффузионная оптическая томография

ДОТ высокого разрешения



Продемонстрирован ряд успехов в функциональной нейровизуализации с использованием ДОТ высокого разрешения:

- отображение иерархически организованных ответов на один стимул,
- отображение множественных покоящихся состояний высокого порядка,
- функциональная нейровизуализация пациентов, для которых МРТ исключена.

Спасибо за внимание!

