

ОСНОВЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ И формирования изображения

ПО МАТЕРИАЛАМ ЖУРНАЛА

**Imaging
& Microscopy**
RESEARCH • DEVELOPMENT • PRODUCTION

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

40 Years **GIT VERLAG**
A Passion
For Communication
Since 1969
A Wiley Company
www.gitverlag.com



ВАШИ ГЛАЗА СКОРО ПРИВЫКНУТ К ВЫСОКОМУ РАЗРЕШЕНИЮ! OLYMPUS SZX2.

Техническая революция всегда влечет за собой перемены: новые стереомикроскопы серии SZX2 фирмы Olympus обладают высочайшим разрешением, не имеющим аналогов. Ваш взгляд на препараты изменится навсегда – недавно разработанная система линз позволит Вам рассмотреть значительно больше деталей. Разнообразные свойства нашего микроскопа обеспечат Вам меньше стресса и больший успех в работе. В числе особенностей – самый большой, скорректированный на бесконечность диапазон увеличения; плоский LED-штатив для проходящего света, обеспечивающий постоянную температуру цвета; окуляры Olympus ComfortView, снимающие зрительное напряжение. Все вышеперечисленные черты делают микроскопы Olympus серии SZX2 идеальным инструментом для качественного и количественного анализа препаратов со 100-процентной точностью. Привыкайте к тому, что отныне Вы сможете увидеть значительно больше – Вы будете приятно удивлены тому, как это просто с Olympus SZX2.



Введение

В брошюре представлен теоретический и практический материал, связанный с основами современной световой микроскопии. Рассмотрены основные методы исследования и контрастирования. Базовый материал был напечатан в специальном выпуске журнала «Imaging & Microscopy». Данная брошюра предназначена для научных сотрудников, аспирантов и студентов, занимающихся микроскопическими методами исследования как в медицине и биологии, так и других областях науки и техники.

В научно-практическом обзоре эксперты по микроскопии фирмы Olympus (Япония) д-р Рейнер Вегерхофф (Dr. Rainer Wegerhoff), д-р Олаф Вайдлих (Dr. Olaf Weidlich) и д-р Манфред Касенс (Dr. Manfred Kässens) использовали свои обширные знания и многолетний опыт, чтобы предоставить специалистам-микроскопистам существующую на сегодняшний день редкую и важную информацию о технологиях, используемых в области микроскопии и средствах визуализации. Данная публикация, в которой рассматриваются обе эти области, помогает выделить ключевые моменты исследуемых технологий. Обзор охватывает весь процесс микроскопического исследования от создания первоначального изображения, учитывающего мельчайшие детали образцов, до получения конечного изображения и его обработки, подкрепляя общие сведения необходимыми разъяснениями, примерами, а также практическими советами и подсказками. Чтобы упростить процесс изучения этого комплексного обзора, он был четко разделен на несколько глав. Таким образом, читателю предоставляется возможность сначала ознакомиться с физической природой света, цветом и разрешением, и далее в деталях рассмотреть методы флуоресценции и контрастирования. Обзор завершают сведения о получении объемного 3D изображения. Главные моменты сведены в специально выделенные информационные блоки. Там также содержатся необходимые разъяснения по современной микроскопии и советы экспертов, касающиеся настроек микроскопа.

Содержание

Обращение к читателю	2–3
Доверься цвету	4
Разрешающая способность	12
Контраст и микроскопия	22
Сверкающая флуоресценция	34
Трехмерные изображения	42
Список авторов и выражение благодарности	52

Обращение к читателю

«Огромное количество методов в относительно кратком изложении»



Тони Вильсон (Tony Wilson),
кандидат технических наук,
профессор Оксфордского университета,
Великобритания

Микроскопы становятся все более простыми и удобными приборами для использования в различных областях науки и техники. Однако, по-прежнему остается важным понимание принципов функционирования, которые определяют разрешение и контраст изображения, наблюдаемого через микроскоп. Целью этой серии статей, написанных специалистами Olympus, является обзор физических свойств, заложенных в создание микроскопического изображения, а также рассмотрение наиболее распространенных в настоящее время оптических механизмов контрастирования. Даны ценные советы по их практическому применению. Безусловно, ни один из всех этих многочисленных аспектов невозможно охватить полностью. Тем не менее, такой подход, включающий рассмотрение возможностей применения и предоставление практических советов по многим аспектам современной микроскопии, без сомнения, окажется интересным для многих читателей.

Авторы начинают обзор с информации о факторах, определяющих разрешающую способность обычных микроскопов. Этим они подготавливают читателя к восприятию таких важных понятий, как числовая апертура, дифракционный круг, функция рассеяния точки, разница между глубиной фокуса и глубиной поля, а также понятие парфокальности. Далее рассматриваются обычные механизмы контрастирования, такие, как темное поле и фазовый контраст, а затем описываются дифференциально-интерференционный контраст и поляризационное контрастное изображение. На протяжении всего материала особо подчеркивается важность цифровой обработки изображений, которая рассматривается на таких простых примерах, как выравнивание гистограммы и использование различных фильтров.

В основе механизма контрастирования, упомянутого выше, лежит тот факт, что и амплитуда, и фаза света меняются при его прохождении через образец. Изменение амплитуды в пространстве (аттенюация) и/или фазе используются для получения контрастного изображения. Другой исключительно важный источник контрастирования изображения – это флуоресценция, как естественная, так и полученная в результате использования специальных флуоресцирующих маркеров, введенных в образец. Здесь рассматриваются элементы флуоресцентной микроскопии и методы спектрального смешивания, вкратце описываются более совершенные методы, в которых для получения контрастного изображения также используются пространственные изменения, например, изменения продолжительности флуоресценции. Наконец, авторы рассказывают о способах получения трехмерных изображений объекта, например, с помощью стереомикроскопов, вместе с очень кратким описанием конфокального микроскопа. Авторы предприняли попытку выполнить сложнейшую задачу и рассмотреть огромное количество методик в относительно кратком изложении. Я надеюсь, что данный материал будет для Вас интересным и полезным.

«Уникальное представление технических аспектов обработки изображения»



Доктор Мартин Фридрих (Dr. Martin Friedrich),
Глава издательства «GIT»,
«Imaging & Microscopy»,
компания «Wiley», Германия

С марта 2003г. по ноябрь 2005г. в журнале «Imaging & Microscopy» с тематическим названием «Основы световой микроскопии и формирования изображения» мы поместили серию из одиннадцати статей под тем же названием и с той же основной темой.

В сотрудничестве с авторами, сотрудниками компании Olympus – доктором Манфредом Кэссенсом (Dr. Manfred Kässens), доктором Райнером Вегерхоффом (Dr. Rainer Wegerhoff) и доктором Олафом Вайдлихом (Dr. Olaf Weidlich), была создана серия публикаций о «базовых принципах» микроскопии, где описываются различные термины и методы современной микроскопии и применяемые способы обработки и анализа изображения. Представление технических аспектов обработки и анализа изображений и возможные области их использования в то время были уникальны и стали отдельным стимулом и целью для авторов.

Положительные отзывы от читателей об отдельных публикациях подтвердили высокое качество серии. Это, во многом, стало побуждающим мотивом для сведения всех одиннадцати статей в один всеобъемлющий сборник в специальном издании. С этой целью в тексты и цифры еще раз были внесены исправления и дополнения, и статьи были сверстаны заново. Результат нашей работы, который сейчас находится перед Вами, является полезным руководством как для новичка, так и для опытного пользователя. Он может служить как справочным материалом, так и вводным курсом по основам микроскопии.

Всего было напечатано 20 000 копий журнала «Основы световой микроскопии и формирования изображения», что более чем в два раза превышает обычный тираж издания «Imaging & Microscopy». Этим мы хотели бы подчеркнуть, что для нас так же важна публикация основополагающей информации, как и сообщение о новых методах, технологиях и возможностях

Желаю Вам приятно провести время за чтением этого специального издания.

«Вы можете получить ключевые слова и возможность расширить свои знания»



Альберто Диаспро (Alberto Diaspro),
кандидат технических наук,
профессор прикладной физики
Университета Генуи, Италия

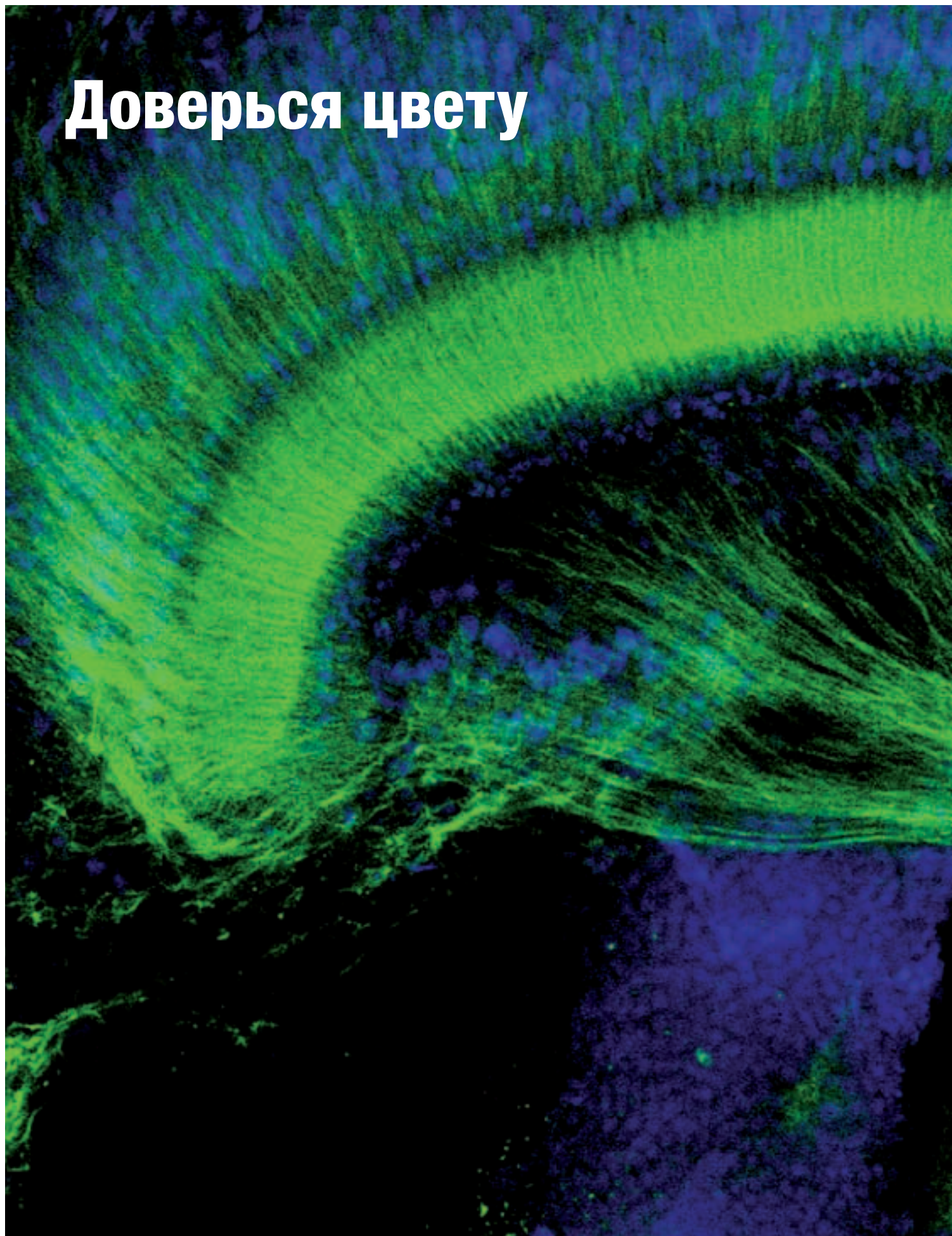
Публикация издания «Основы оптической микроскопии и формирования изображения: от цвета до разрешения, от флуоресценции до объемного изображения 3D» – это большая заслуга его издателей. Ведь очень важно определить, разъяснить и представить опорные элементы для понимания и успешной эксплуатации принципов оптики, применимых в технологии микроскопов и средств формирования изображения. Эту нишу все еще занимает оптическая микроскопия, где действует принцип «одержимости» разрешением, играющим основную роль, главным образом, из-за уникальной способности взаимодействия света и материю получать временные трехмерные изображения образцов. Это имеет решающее значение, поскольку понимание сложных и тонких отношений между структурой и функцией более успешно реализуется в четырехмерном пространстве 4D (x-y-z-t). На протяжении последних лет несколько новшеств вывели оптическую микроскопию на новый уровень: от конфокальных систем [1-6] до мультифотонных структур, от увеличения разрешения в 7-8 раз до отслеживания отдельных молекул, а в технологии формирования изображения появился новый термин: «оптическая наноскопия» [7]. Успехи биологической классификации, обусловленные использованием видимых флуоресцентных белков [8-12] и огромным количеством методик, таких, как методы «F» (FRAP—восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания, FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции, FCS – флуоресцентная спектроскопия, FLIM – микроскопия на основе продолжительности флуоресценции [4,3-15] ставят оптическую микроскопию на доминирующую позицию по сравнению с другими технологиями в микроскопии. Таким образом, она становится обязательной для начинающих, а также все более необходимой для ученых, занятых поиском ответов на вопросы в биологии, которые могут быть разрешены с помощью оптических микроскопов. Знания о разных видах микроскопии нужны для того, чтобы иметь надежную отправную точку при выборе оптимальной технологии и при этом понимать, что в данном случае можно сделать, а что – нельзя. Представленный объемный комментарий к «Основам» может послужить хорошей отправной точкой. Он знакомит читателя с различными понятиями и методами микроскопии. Читатель получает ключи к знаниям. Здесь рассматриваются несколько важных понятий, например, понятие «разрешения» и связанная с ним сложность выбора образцов, понятие «разделения спектра» и «счета фотонов», которые вводятся для дальнейшего изучения. В настоящей статье содержится несколько интересных примеров и хорошо прослеживается связь между разными методами контрастирования, от ДИК и фазового контраста вплоть до методов флуоресценции. Данное произведение не является строгим научным материалом, и представляет интерес и будет достаточно понятен широкому кругу читателей. Я прочел эту работу с большим интересом, несмотря на то, что обычно обращаюсь к более библиографическим материалам для углубления своих знаний.

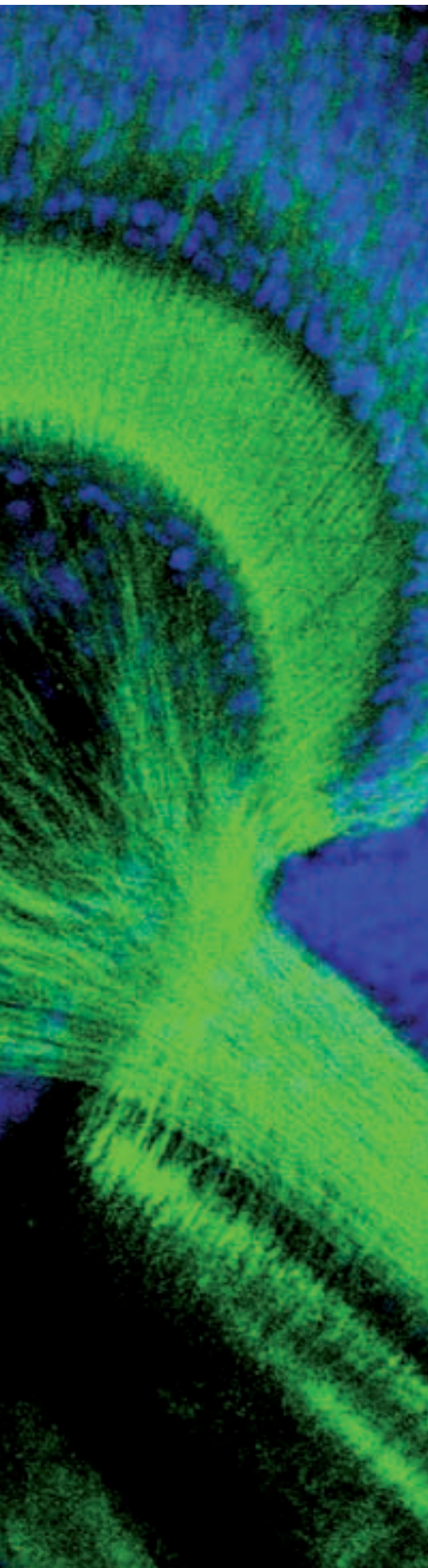
Библиография

- [1] Amos B. (2000): Lessons from the history of light microscopy. Nat Cell Biol. 2(8), E151-2.
- [2] Wilson T., Sheppard C. (1984): Theory and practice of scanning optical microscopy. Academic Press, London.
- [3] Diaspro A. (2001): Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances. Wiley-Liss, New York.
- [4] Pawley JB. (2006): Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd edition, Plenum-Springer, New York.
- [5] Hawkes P.W., Spence JCH. (2006): Science of Microscopy, Springer, New York.
- [6] Masters BR. (2006): Confocal Microscopy And Multiphoton Excitation Microscopy: The Genesis of Live Cell Imaging, SPIE Press Monograph Vol. PM161, USA.
- [7] Hell SW. (2003): Toward fluorescence nanoscopy. Nat Biotechnol. 21, 1347.
- [8] Jares-Erijman EA., Jovin TM. (2003): Nat Biotechnol. 21(11), 1387.
- [9] Tsien RY. (2006): Breeding molecules to spy on cells. Harvey Lect. 2003-2004, 99, 77.
- [10] Tsien RY. (1998): The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem. 67, 509.
- [11] Pozzan T. (1997): Protein-protein interactions. Calcium turns turquoise into gold. Nature. 388, 834
- [12] Diaspro A. (2006): Shine on ... proteins. Microsc Res Tech. 69(3),149
- [13] Periasamy A. (2000): Methods in Cellular Imaging, Oxford University Press, New York.
- [14] Becker W. (2005): Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques, Springer, Berlin.
- [15] Periasamy A., Day RN. (2006): Molecular Imaging : FRET Microscopy and Spectroscopy, An American Physiological Society Book, USA.

<p>Выходные данные исходного материала</p> <p>Издано GIT VERLAG GmbH & Co. KG</p> <p>Администратор сектора Анна Сейдингер (Anna Seidinger) a.seidinger@gitverlag.com</p> <p>Администратор журнала Д-р Мартин Фридрих (Dr. Martin Friedrich) m.friedrich@gitverlag.com</p> <p>Авторы Д-р Рейнер Вегерхофф (Dr. Rainer Wegerhoff) rainer.wegerhoff@olympus-europa.com Д-р Олаф Вайдлих (Dr. Olaf Weidlich) olaf.weidlich@olympus-sis.com Д-р Манфред Кассенс Кэссенс (Dr. Manfred Kässens) manfred.kaessens@olympus-sis.com</p> <p>Редакционная поддержка Лана Фильдман (Lana Feldmann) l.feldmann@gitverlag.com</p> <p>Руководитель Дитмар Этофер (Dietmar Edhofer) d.edhofer@gitverlag.com</p>	<p>Верстка исходного варианта Рут Херманн (Ruth Herrmann) r.herrmann@gitverlag.com</p> <p>Офсетная печать и дизайн обложки Эльке Пальцер (Elke Palzer) palzer@gitverlag.com</p> <p>GIT VERLAG GmbH & Co. KG Россельштрассе, 90 64293 Дармштадт Германия Тел.: +49 6151 8090 0 Факс: 49 6151 8090 133 www.gitverlag.com</p> <p>В сотрудничестве с Olympus Life and Material Science Europa GmbH Венденштрассе 14–18 D-200097, Гамбург, Германия Тел.: +49 40 23772-0 Факс: +49 40 23 77 36 47 www.olympus-europa.com</p> <p>Печать Frotscher Druck Ридштрассе 8, 64295 Дармштадт, Германия</p>	<p>Тираж 20,000 экземпляров</p> <p>Издательский дом GIT VERLAG GmbH & Co.KG наделен эксклюзивным правом относительно размера времени и содержания на использование работы/комментариев редакторов в изначальной или отредактированной форме в любых целях любое количество раз самостоятельно, или передавать права на использование другими организациями, с которыми он находится в партнерских отношениях, а также третьим сторонам. Право на использование подразумевает право на печать, а также использование в электронных СМИ, в том числе сети Интернет и носителях данных/баз данных любого рода.</p> <p>Все имена, обозначения или знаки в настоящем издании, на которые ссылаются или которые приведены в тексте, могут быть торговыми названиями соответствующего владельца.</p> <p>GIT VERLAG A Wiley Company</p>
---	--	---

Доверься цвету





Свет

Как бы мы описали свет, который мы видим? Наверное, мы бы назвали два ключевых слова: яркость и цвет. Давайте сравним эти описания с тем, как свет характеризуется в естественных науках, где он рассматривается как электромагнитная волна с характерной амплитудой и четко определенной длиной. И повседневное, и научное видение, по сути, означают одно и то же. Амплитуда волны придает свету яркость, в то время как длина волны определяет его цвет. На Рис. 1 показана взаимосвязь цвета и длины волны света.

Цвет

Цвет всегда возникает благодаря свету. Другого источника не существует. Человеческий глаз может воспринимать цвета в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм. Однако, вместо одного определенного цвета, свет обычно состоит из многочисленных фракций с разными цветами. Это то, что называют спектром света. Для примера взгляните на спектр нашего источника жизни, Солнца, который излучает свет, состоящий из всех возможных цветов (Рис. 2).

Белый свет

Все цвета в источнике света накладываются друг на друга. Следовательно, его цвет зависит от цветовой гаммы доминирующей длины волны. Например, свеча выглядит желтоватой, поскольку свет в основном состоит из длин волн в диапазоне 560-600 нм. Свет, излучаемый источником с примерно одинаковым количеством всех частей спектра, кажется белым.

Зеленая трава

Что позволяет нам видеть объекты, которые сами не являются источниками света? При взаимодействии света с физической материей происходят различные процессы, называемые отражением, преломлением, дифракцией и поглощением. Все они происходят одновременно, однако один из процессов всегда доминирует. Посмотрите, например, на траву или другие объекты с высокой плотностью материи. То, что мы видим, глядя на траву – это, главным образом, отраженный свет. Но почему трава кажется зеленой? Причина в том, что трава поглощает красную и голубую части белого света, отражая только его часть. Таким образом, остается отраженный зеленый цвет, который мы и наблюдаем.

Цветовые модели

Многое из того, что мы знаем о цвете, можно описать математически, используя различные цветовые модели, т.е. в разных цветовых пространствах. Для этих моделей используются обозначения HSI, RGB и CYMK. Все они создают разную перспективу цвета и используются в разных областях в зависимости от того, какая перспектива наиболее подходит для решения определенных задач. При этом каждая из моделей описывает одну и ту же физическую реальность.

Модель HSI

Давайте снова обратимся к нашему примеру и представим себе свежую весеннюю траву. Как бы мы описали ее в повседневной жизни? Мы бы охарактеризовали ее как зеленую – не синюю или оранжевую. Это основной оттенок цвета. Мы, возможно, дали бы дополнительную характеристику цвета как «полного» или «глубокого», а не бледного. Это называется насыщенностью цвета. Затем кто-то бы назвал цвет ярким, а не темным. Отсюда – яркость, или интенсивность цвета. Оттенок (Hue), Насыщенность (Saturation) и Интенсивность (Intensity) и образуют цветную модель HSI. Система цветов Манселла (Munsell) в виде дерева (Рис. 3) представляет цвет в трех геометрических измерениях. Здесь значение

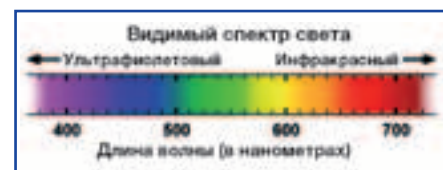


Рис. 1: Видимый спектр света.

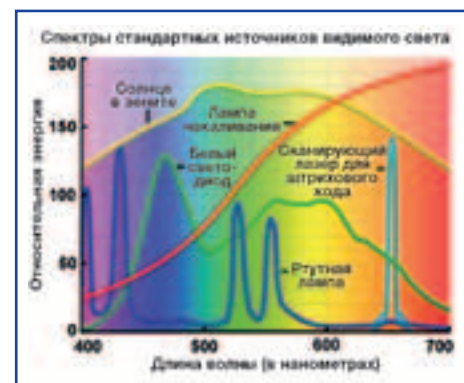


Рис. 2: Спектр солнечного света и спектры стандартных источников видимого света.

оттенка представлено углом, насыщенность – радиусом, проведенным от центральной оси, а интенсивность, или яркость – вертикальной позицией цилиндра.

Модель RGB

Модель HSI может использоваться для описания и распознавания цвета. Однако существует другая цветовая модель, которая более точно отражает механизм восприятия цвета человеческим глазом. Глаз использует три типа фоторецепторов – колбочек сетчатки, обладающих чувствительностью к свету, соответственно, красной длины волны (R), зеленой длины волны (G) и синей длины волны (B) видимого диапазона спектра. Эти цвета называются первичными цветами. Дело в том, что все другие существующие цвета могут быть созданы путем разных комбинаций этих первичных цветов. Например, человеческий глаз воспринимает равное количество всех трех цветов как белый цвет. Добавление равного количества красного и синего цветов дает пур-



пурный цвет, синего и зеленого – бирюзовый, а зеленого и красного – желтый. Все остальные цвета производятся стимуляцией в разной степени всех трех типов колбочек сетчатки. Практическое применение модели RGB многообразно. Например, помимо механизма восприятия света глазом, добавлением трех первичных цветов можно описать принцип

действия цифровых камер, мониторов, а также форматов файлов изображения.

Модель СУМ

Перекрытие трех первичных добавочных цветов: красного, зеленого и синего дает голубой (С), желтый (Y) и пурпурный (M) цвета. Они называются дополнительными или первич-

ными субтрактивными цветами, поскольку образуются путем вычитания красного, зеленого или синего цвета из белого. Например, желтый цвет наблюдается при вычитании синего света из белого. А все остальные цвета образуются путем вычитания различных количеств голубого, желтого и пурпурного цветов из белого света. Удаление всех трех цветов в равной степени интенсивности дает черный цвет, т.е. отсутствие света. Белый цвет с помощью комплиментарных цветов не производится (Рис. 4). Модель СУМ и ее более технологичный вариант, модель СУМК, применяются в производстве оптических компонентов, например, светофильтров, а также для принтеров.

Смещение цвета

А сейчас давайте рассмотрим феномен цвета, который постоянно дает нам повод для удивления в повседневной жизни – смещение цвета. Это также позволит нам сделать первый шаг в изучении световой микроскопии и взглянуть поближе на характерные для нее источники света: галогенную лампу, ксеноновую газоразрядную лампу и ртутную дуговую лампу.

Обычным делом является покупка пары черных брюк, которые дома оказываются темно-синими. Этот феномен смещения цвета, доставляющий столько неудобств, не ограничивается синими брюками. Так называемый «белый свет», генерируемый галогенной лампой в микроскопе, значительно отличается от света ксеноновой лампы. На первый взгляд, главное отличие заключается в интенсивности света, но даже если снизить интенсивность излучения ксеноновой лампы, свет галогенной при проекции на белую поверхность все равно даст более желтоватый оттенок. Более того, приглушение света галогенной лампы может даже изменить цвет на более красноватый. Это явление можно без труда наблюдать в микроскопе, если сфокусироваться на белой части образца и медленно увеличивать мощность света. Наблюдаемое изображение изменит цвет с желтовато-красного на голубоватый и очень яркий. Это означает, что с увеличением мощности изменилась интенсивность, или количественное присутствие волн разной длины (цветов). Здесь также надо учитывать дополнительный фактор последовательного восприятия и интерпретации цвета. В результате этих двух процессов, выполняемых в глазу и сознании человека, формируется конечное распознавание цвета.

Однако вернемся к генерации цвета. Весь спектр источника света при определенной настройке мощности определяется термином «цветовая температура». С помощью этого термина спектр источников света можно описать как нагретый черный кусок идеального металла. При достижении температуры 3500К, этот металл приобретает желтоватый цвет, который изменяется на голубовато-белый при 6000К.

Для вольфрамово-галогенной лампы 12 В / 100 Вт при +9 В цветовая температура составляет приблизительно 3200К (Рис. 5а), в то время как для ксеноновой лампы в 75 Вт –

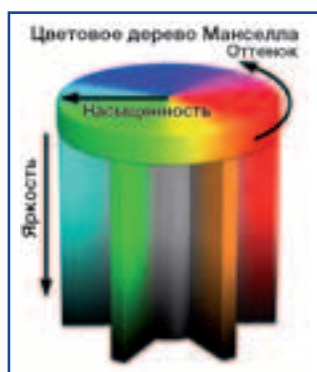


Рис. 3: Цветовое дерево Манселла.



Рис. 4: Первичные цвета.

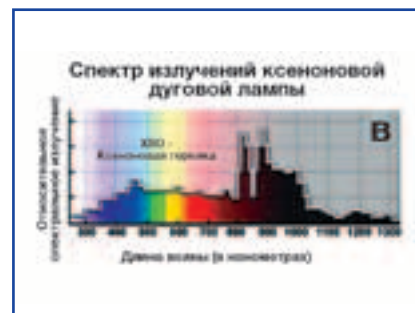
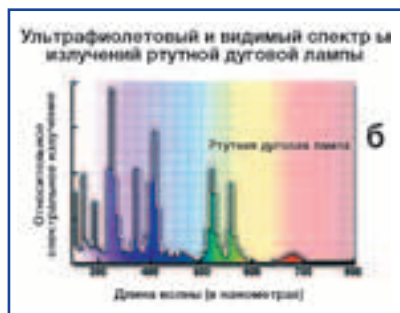
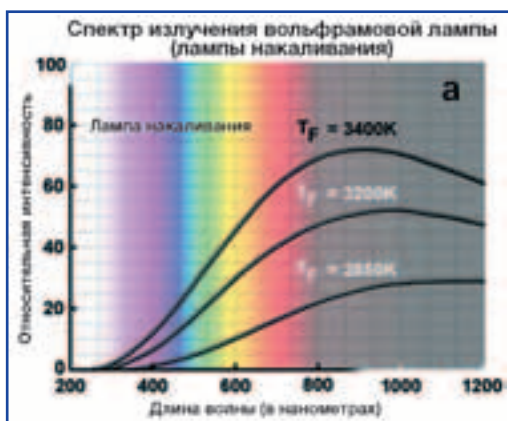


Рис. 5а-в, на котором показан спектр излучения трех наиболее используемых источников света в микроскопе: (а) вольфрамово-галогенной лампы, где T_F = цветовая температура при разных настройках мощности; (б) ртутной лампы; (в) ксеноновой лампы.

6000К. Таким образом, цветовая температура указывает на общее смещение цвета, хотя и не дает представления об отдельных показателях интенсивности на разной длине волн. Тем не менее, знать эту информацию очень важно при использовании источника света, например, во флуоресцентной микроскопии. В этом случае источник должен производить свет достаточной интенсивности в диапазоне волн, которые соответствуют диапазону возбуждения наблюдаемого флуорохрома.

Источники света в микроскопах

Вольфрамово-галогенные лампы

Практически все оптические микроскопы оснащены галогенной лампой (10Вт–100Вт), которая используется как для общего освещения, так и в качестве дополнительного источника света. Этот тип источника освещения позволяет выбирать из множества способов создания оптического контраста и охватывает все волны в видимом диапазоне, но с повышением интенсивности от голубого к красному цвету. Кроме того, спектральная кривая изменяется по мере использования энергии (Рис. 5а). Для разделения близких цветов в наиболее распространенных на сегодняшний день микроскопах светлого поля, настройки необходимо удерживать на одном уровне, например, 9В ($T_F = 3200K$; при цветовой температуре цвета +9В). Данный уровень интенсивности света обычно отмечен на раме микроскопа.

Однако, здесь возникает следующая проблема: если интенсивность света в оптическом микроскопе должна оставаться фиксированной, яркость освещения может быть слишком большой, что создаст неудобства при наблюдении. В повседневной жизни от слишком яркого солнечного света спасают темные очки — однако, кроме снижения интенсивности освещения, они изменяют краски, в которых мы видим мир. В оптической микроскопии существуют световые фильтры, которые просто снижают интенсивность освещения, не искажая цвета. Это нейтральные светофильтры (ND), или нейтрально-серые светофильтры, свойства которых определяются по количеству пропускаемого света. Так, светофильтр

ND50 пропускает половину всей интенсивности света, в то время как ND25 сокращает интенсивность до 25%, не искажая при этом

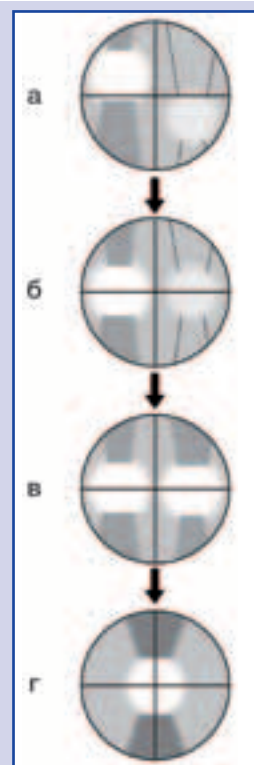
цвета. Для смены спектра нам потребуются цветные светофильтры. Их огромное множество, но здесь мы рассмотрим только так

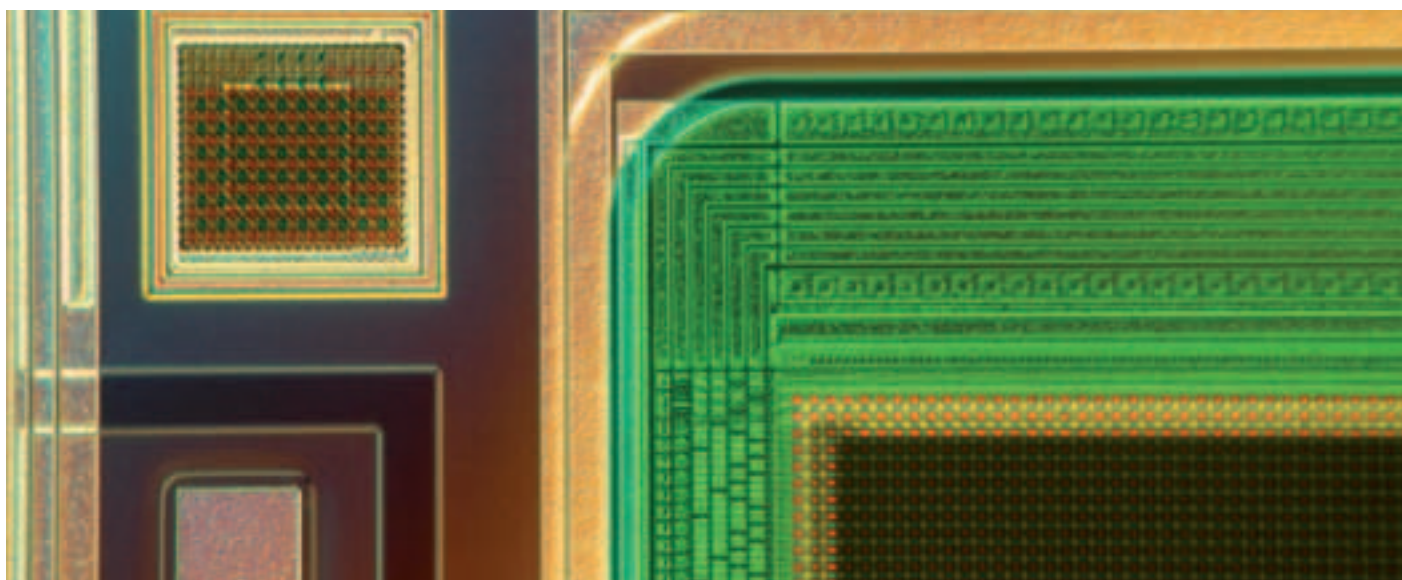
Блок 1: Центрирование ртутной лампы

В зависимости от типа микроскопа (инвертированного или прямого) и производителя, настройки могут иметь свои особенности, однако общая стратегия остается неизменной.

Ознакомьтесь с настройкой освещения ртутной лампы люминесцентного микроскопа фирмы Olympus.

1. Включите блок поджига ртутной лампы, используйте экран для защиты от УФ-излучения, и проследите, чтобы блок флуоресцентных фильтров находился на пути световых лучей.
2. Поместите белую бумажную карточку на предметный столик микроскопа и откройте затвор. Если свет слишком яркий, вставьте дополнительные светофильтры для создания нейтральной плотности (например, светофильтр ND25 пропускает только 25 % интенсивности света).
3. Установите фокусирующий механизм грубой фокусировки в самую низкую позицию.
4. Установите в ход лучей гнездо револьверного устройства без объектива или объектив 20x (на прямом микроскопе).
5. Откройте апертурную диафрагму, и закройте полевую диафрагму (если она есть в наличии).
6. Произведите оптимальную настройку яркости с помощью винтов центровки лампы (обычно располагаемых со стороны гнезда крепления лампы).
7. На карточке будет наблюдаться изображение светящегося тела, расположенного между двумя электродами, и зеркальное его изображение. Чтобы увидеть их в фокусе, воспользуйтесь фокусирующим механизмом.
8. Если выводится только одно пятно или если зеркальное изображение пятна неодинакового размера и интенсивности, (Рис. б), то требуется повторная центровка. В большинстве узлов крепления ламп сзади имеются специальные центровочные винты. Поворачивайте их, пока размеры и интенсивность изображений не сравняются, как показано на рисунке в.
9. Расположите оба изображения параллельно друг другу и перекройте их, используя центровочные винты на узле крепления лампы (Рис. г).
10. Выведите изображения из фокуса, поворачивая рукоятку фокусирующего механизма, и откройте полевую диафрагму.
11. Удалите белую карточку и введите в ход лучей однородный флуоресцентный образец (например, попробуйте поместить карри на покровном стекле).
12. Точная настройка равномерного освещения может быть выполнена только при наблюдении: при необходимости, повторно сфокусируйте коллектор так, чтобы все поле наблюдения было равномерно освещено.
13. Если при наблюдении основное внимание уделяется цифровому захвату изображения, точную настройку также можно выполнять на мониторе, чтобы оптимизировать освещенность в соответствии с размерами CCD.





называемый балансирующий светофильтр дневного света (LBD).

Этот светофильтр используется с галогенным источником света и компенсирует излишек распределенных длинных (красных) волн. Это позволяет нам, например, изучать патологические образцы на нейтральном белом фоне используя световую микроскопию. (Рис. 11).

Ртутная дуговая лампа

Ртутная лампа характеризуется пиками интенсивности при 313, 334, 365, 406, 435, 546 и 578 нм и более низкой интенсивностью при других длинах волн (см. Рис. 5б). Это свойство делает ртутную лампу самым используемым источником света во флуоресцентной микроскопии. Каждый раз, когда пиковые излучения осветителя совпадают с условиями для возбуждения флуорохрома, возможно получение хорошего (в зависимости от образца)

сигнала. Тем не менее, эти преимущества не могут компенсировать относительно короткого срока службы лампы, который составляет до 300 часов, а также изменение спектра излучения, обусловленное отложениями катода на внутренней стеклянной поверхности лампы в течение всего времени эксплуатации.

Ксеноновая газоразрядная лампа (ХВО)

Ксеноновые лампы наиболее предпочтительны в случаях, когда нужен очень яркий свет в микроскопии отраженного света, например, при создании дифференциально-интерференционного контраста на темных объектах, или в количественном анализе флуоресцентных сигналов при таких операциях, как измерение коэффициента ионов. Этот вид осветителей дает одинаковую интенсивность по всему спектру, более яркую, чем в галогеновой лампе, однако пики не достигают интен-

сивности света, свойственной ртутным лампам. Спектр излучения ксенонового осветителя позволяет проводить прямой анализ интенсивности при разных длинах волн возбуждения и эмиссии. Срок эксплуатации составляет примерно 500–3000 часов, в зависимости от режима использования (частое включение-выключение сокращает срок службы) и типа лампы (75 или 150Вт). При оптимизации освещения, особенно в ртутных и ксеноновых лампах, важную роль играют центрирование и равномерность.

Говоря по существу

Способность источника света излучать нужный спектр – это один аспект изучения цвета; способность линз используемого при этом объектива справиться с эффективностью излучения – это совсем другой аспект той же проблемы. При прохождении «белого света» через систему линз объектива происходит его преломление. По законам физики света, синие (более короткие) волны преломляются в большей степени, чем красные (более длинные). Это позволяет нам любоваться голубым небом, однако мешает надлежащему воспроизведению цвета в микроскопе. Если объективы не в состоянии компенсировать эту аберрацию света, то, как показано на Рис. 6, на оптических осях появятся фокальные точки для каждого цвета. Это является причиной появления цветной интерференционной полосы вокруг изображения.

Для устранения этого эффекта еще с XVIII века стали применяться комбинации ахроматических линз. Линзы данного типа совмещают синие и красные волны в одной фокусной точке. Дальнейшая коррекция цвета в видимом свете достигается путем добавления разных видов систем стекла для создания так называемых флуоритных объективов (название происходит от добавляемого в стекло компонента – флуорита). Их также называют полунейтральными. Чтобы скорректировать весь диапазон от ближнего инфракрасного спектра (ИК) до ультрафиолета (УФ), был раз-

Таблица 1: Сравнение разных источников света с изменением их цветовой температуры

Источник света	Цветовая температура
Вакуумная лампа (220Вт/220В)	2790 К
Лампа «Нитрафот» В (вольфрамовая лампа накаливания) (500Вт / 220В)	3000 К
Фото- и кинолампы, а также лампа контроля цвета (лампа Фишера)	3200 К
Фото- и кинолампы (например, лампы типа «Нитрафот» S (вольфрамовая лампа накаливания)	3400 К
Лампа-вспышка, желтая	3400 К
Лампа-вспышка, прозрачная	3800 К
Лунный свет	4120 К
Лампа Бека	5000 К
Дуговая лампа белого света, а также синяя лампа-вспышка	5500 К
Устройство электронной вспышки	5500-6500 К
Солнечный свет (утренний и вечерний)	5200-5400 К
Солнечный свет (полуденный)	5600 К
Солнечный свет при безоблачном небе	6000 К
Пасмурное небо	6700 К
Туман, мгла	7500-8500 К
Синее северное небо с вертикальным углом 45°	11000 К
Международный стандарт средней яркости солнечного света	5500 К



Рис. 6: Схематическое изображение осевой хроматической aberrации.



Рис. 7. Принцип действия цифровых камер ПЗС.

работан самый точный класс объективов – апохроматы. Кроме коррекции цвета, здесь первостепенную важность приобретает также мощность передачи энергии объективом. Это имеет особое значение, если требуется высокая мощность в УФ-диапазоне при длине волны, например, 340 нм (возбуждение реагирующего на кальций красителя «Fuga-2»), или, если требуется ИК для ИК-ДИК 900 нм.

Вид цвета

Давайте сделаем еще один шаг и посмотрим, как происходит детектирование света со всеми его цветами – после прохождения через микроскоп – в современных цифровых камерах. В этом отношении цифровые фотоаппараты уже стали стандартом создания цвета, или монохроматных изображений, в микроскопии. Но как же они работают и как можно гарантировать точность цветов в получаемых изображениях? Цвет имеет решающее значение, поскольку это первичная предпосылка для всех видов операций, таких, как

документирование, архивация или анализ изображений.

Детектирование света

Детектирование света происходит одинаково как в цветных, так и монохромных цифровых камерах. На Рис. 7 показано, как работают цифровые фотоаппараты ПЗС (Приборы с зарядовой связью – CCD). В цветных цифровых камерах мозаичные светофильтры устанавливаются на элементы ПЗС (Рис. 8). Эти светофильтры пропускают только зеленый, красный или синий цвет, который вступает в контакт со светочувствительной частью отдельных сенсоров, или пикселями (элементов картинки). Стандартная пропорция – это два зеленых пикселя к одному красному и одному синему. Цветное изображение, собственно, изначально создается компьютером путем выполнения сложнейших алгоритмов. Этот процесс включает анализ и обработку отдельных сигналов зеленых, красных и синих пикселей, соответственно. Например, один

пиксель с глубиной цвета 8 бит становится цветным пикселем с глубиной цвета 24 бит. (Рис. 9).

В зависимости от метода получения изображения, отраженный или проходящий свет объекта фокусируется на светочувствительном ПЗС-сенсоре. Так что же такое ПЗС-элементы (Приборы с зарядовой связью)? Это полупроводниковая структура, предназначенная для считывания электрических сигналов из определенных участков, где они хранятся (Рис. 7, 10). Благодаря специальному способу считывания, светочувствительная область пикселя ограничена всего 20% действительной поверхности пикселя. Именно поэтому специальные линзы, расположенные над сенсором, фокусируют весь входящий свет на светочувствительной области поверхности пикселя. Свет генерирует электронно-дырочные пары через фотоэлектрический эффект. Эти электрические заряды собираются, объединяются в зарядовые пакеты и последовательно передаются через весь ПЗС-сенсор. Заряд сначала преобразовывается в

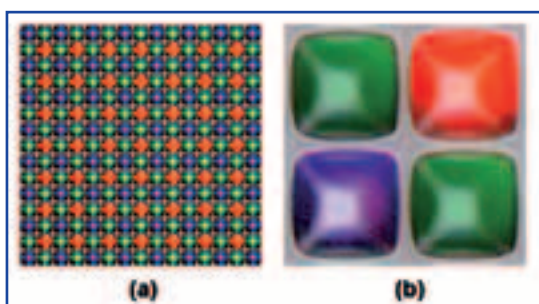


Рис. 8: Цветная мозаика фильтров Байера и исходные фотодиоды.

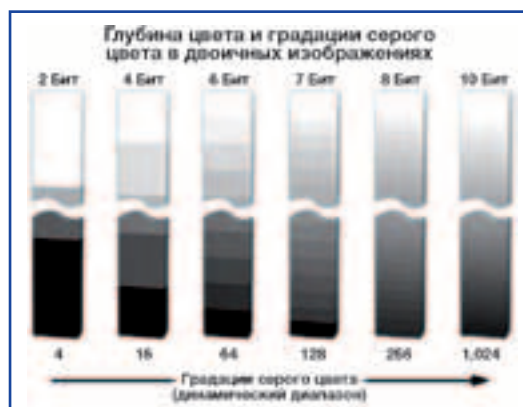


Рис. 9: Глубина цвета и уровень серого цвета в цифровых изображениях.

напряжение, поскольку проведение напряжения значительно легче проведения тока. Этот вывод аналогового сигнала затем усиливается сначала на самом чипе, а затем за пределами чипа. Аналоговый/цифровой преобразователь переводит напряжение (сигнал) в двоичный формат.

Существует множество значений глубины цвета, однако стандартом является 8 бит. Это означает 256 градаций интенсивности для каждого пикселя. (Рис. 9, 10). Сейчас на рынке появляются цифровые камеры со значением глубины цвета 12 бит (4096 уровней интенсивности). Некоторые цифровые камеры даже обеспечивают глубину цвета до 16 бит (65536 уровней интенсивности). Количество пикселей в цифровых камерах зависит от используемого ПЗС-чипа и технологии создания изображения. В настоящее время цифровые камеры предлагают разрешение до 12.5 миллионов пикселей.

Цветовая температура и баланс белого

Давайте вернемся к рассмотрению темы цветовой температуры источников света в микроскопах и изучим ее воздействие на цвета при создании цифрового изображения. Как мы знаем, свет является основным условием работы как микроскопов, так и цифровых камер. Существует множество разных видов света, о которых мы уже говорили в разделе, описывающем источники света в микроскопах. Как Солнце может создавать различные цвета в зависимости от времени суток, также и микроскоп использует разные варианты настроек в зависимости от используемого источника, а также от среды получения света. Причина этого заключается в явлении, которое называют цветовой температурой. Как мы видели, этот термин описывает особый физический феномен: спектральные композиции из разных источников света неодинаковы и, более того, определяются температурой (см. Табл. 1). Это значит, что цветовая температура имеет огромное значение для цифрового захвата и воспроизведения изображения, поскольку оказывает определяющее

влияние, как на восприятие цвета, так и на его воспроизведение. Человеческий глаз автоматически корректирует этот эффект, подсознательно адаптируясь к меняющимся условиям освещения. Это значит, что человек видит предметы, о которых известно, что они белые, именно белыми.

К сожалению, цифровые и видео камеры не обладают таким уровнем интеллекта, чтобы самим замечать меняющиеся условия освещения и корректировать свои настройки в соответствии с изменениями цвета в этих новых условиях. Именно по этой причине эти виды цифровых камер часто выдают изображение с искаженными цветами. Корректирование таких искаженных цветов в соответствии с реальными цветами изображения называется балансом белого (см. Рис. 11). Во многих цифровых камерах имеется функция адаптации цветов изображения при захвате, однако это несоответствие цвета можно скорректировать и после захвата. Для этого пользователь должен знать, в какой области изображения нет цвета. Эта специфическая область должна быть черной, белой или серой.

Автоматические настройки баланса белого цвета

Большинство программ обработки изображения включают алгоритмы корректировки цветных искажений. Для этого пользователь должен в процессе наблюдения указать участок в области изображения, где пиксели должны быть черными, белыми или серыми (хотя в данный момент они искажены). Во-первых, на основе пикселей в пределах участка вычисляются три фактора коррекции цвета – один для каждого из трех цветных компонентов: Красного (R), Зеленого (G) и Синего (B). Эти факторы коррекции определяются таким образом, чтобы пиксели в пределах участка в среднем были бы серыми, т.е. участок совсем не имел бы цвета. Затем при помощи факторов коррекции автоматически исправляется все изображение целиком (Рис. 11в, г).

Рассмотрим происходящие при этом процессы более детально. Средняя интенсивность I_n для каждого пикселя (n) рассчитывается как:

$I_n = (R+G+B)/3$. Фактор цвета (F) для каждого компонента цвета, каждого пикселя в секции будет определен на основе этого расчета, например, для фактора красного цвета: $F_n(R) = (I_n/R)$.

Обратите внимание на следующий пример. Пиксель имеет следующие составляющие цвета: $(R,G,B) = (100,245,255)$ – таким образом, средняя интенсивность $I_n = 200$ и фактор красного цвета $F_n(R) = (200/100) = 2.0$. Три фактора цвета будут сведены к общему значению для всех пикселей в пределах круга, что означает, что факторы коррекции $\langle F(R) \rangle$, $\langle F(G) \rangle$ и $\langle F(B) \rangle$ будут определены для каждого компонента цвета. И теперь, компоненты цвета всех пикселей изображения умножаются на соответствующий фактор или факторы коррекции.

Почему цвета не совпадают?

Было бы идеальным решением взять любой цифровой фотоаппарат, монитор и принтер и получить в результате на экране и в распечатанном виде цвета, наиболее близкие к оригиналу. Но, к сожалению, добиться соответствия цветов очень трудно.

Начнем с того, что цвет – понятие субъективное. Это означает, что цвет – неотъемлемая характеристика объекта и что цвета совершенно индивидуально воспринимаются визуальной системой и мозгом. Другой важный аспект заключается в том, что освещение оказывает существенное влияние на цвет. По этой причине напечатанное изображение будет меняться в зависимости от освещения. Оно будет выглядеть по-разному при свете от лампы накаливания, или от флуоресцентного осветителя, или при дневном свете. Более того, цвета оказывают влияние на восприятие других цветов. Это означает, что ваше восприятие цвета будет меняться в зависимости от того, какие цвета его окружают. В дополнение к этому следует помнить, что мониторы в состоянии воспроизводить те цвета, которые не могут напечатать принтеры. В свою очередь, принтеры печатают цвета, которые не могут воспроизвести мониторы. Цифровые камеры могут фиксировать цвета, которые не могут воспроизвести ни принтеры, ни мониторы. Цветовая модель – это, как минимум, просто способ представления цветов матема-

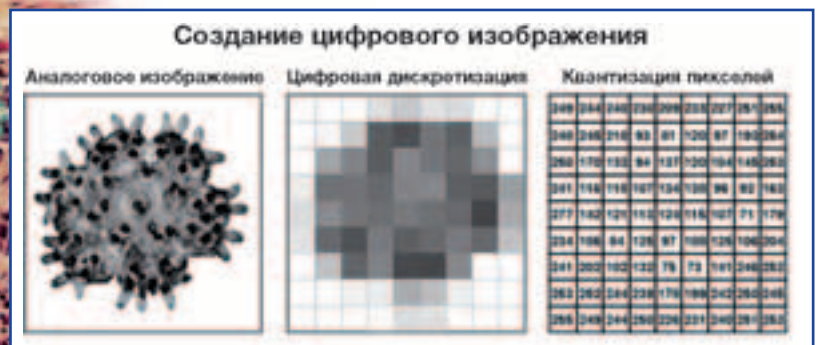
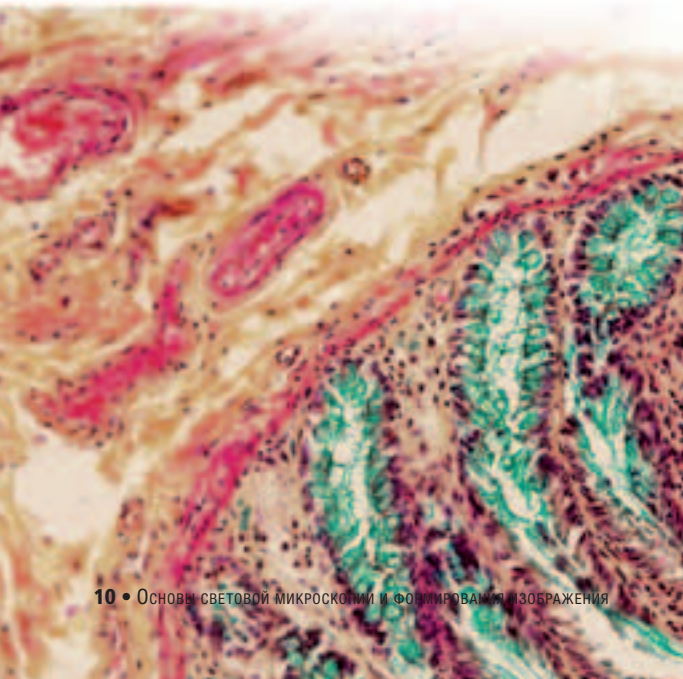


Рис. 10: Создание цифрового изображения.

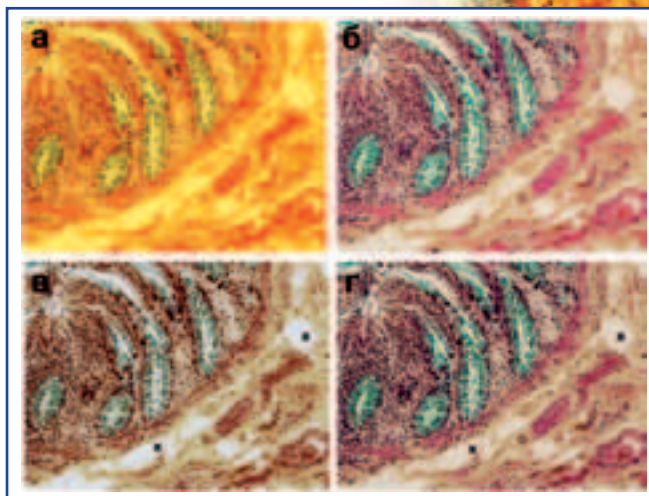


Рис. 11: Регулировка баланса белого цвета изображения гистологического образца с использованием микроскопа и программного обеспечения.
а: изображение с неправильной настройкой микроскопа (низкая мощность 3В, без светофильтра LBD), обратите внимание, что неокрашенные области (фон) имеют желтоватый оттенок.
б: изображение с использованием оптимизированной настройки микроскопа (9В + светофильтр LBD + светофильтр нейтральной плотности ND6), обратите внимание на то, что фон становится белым.
в: изображение после цифровой балансировки белого цвета (а), обратите внимание на то, что с помощью балансировки белого цвета на желтоватом изображении (а) цвета могут быть в некоторой степени пересчитаны до получения хорошо сбалансированного изображения (сравните б, в и г).
г: изображение после цифровой балансировки белого цвета (б), обратите внимание, что качество уже сбалансированного по уровню белого изображения (б) все еще может быть улучшено. Области, используемые для определения (нейтральный фон) области интереса (ОИ), отмечены знаком (х).

тическими средствами. Поскольку разные приборы используют разные цветовые модели, они должны преобразовывать цвета из одной модели в другую. Это часто приводит к ошибкам. Принимая во внимание все ограничения, возникающие при попытке обеспечить совпадение цветов, важно понимать разницу между корректируемыми и некорректируемыми ошибками цвета. Корректируемые ошибки можно каким-то образом исправить, используя программное обеспечение. К ним относятся ошибки в системе управления цветом или баланса белого. Некорректируемые ошибки – это те, с которыми уже ничего не сделаешь, потому что информации, нужной для исправления, просто не существует. Более качественные линзы, оптическое покрытие и более совершенные ПЗС-матрицы – все это помогает свести к минимуму некорректируемые ошибки. Корректируемые ошибки, тем не менее, требуют управления цветом средствами программного обеспечения.

Если бы все программы использовали единый подход к управлению цветом и каждый принтер, монитор, сканер и цифровая камера были бы предназначены для работы с определенной схемой управления, этот процесс, безусловно, выполнялся бы с легкостью. Если бы аппаратные устройства, например, использовали одну и ту же стандартную цветовую модель, или применяли режим перевода информации о цвете на нужный стандарт, информацию о цвете можно было бы переме-

щать из программы в программу, со сканированного изображения на принтер без риска допущения ошибок.

Заключение

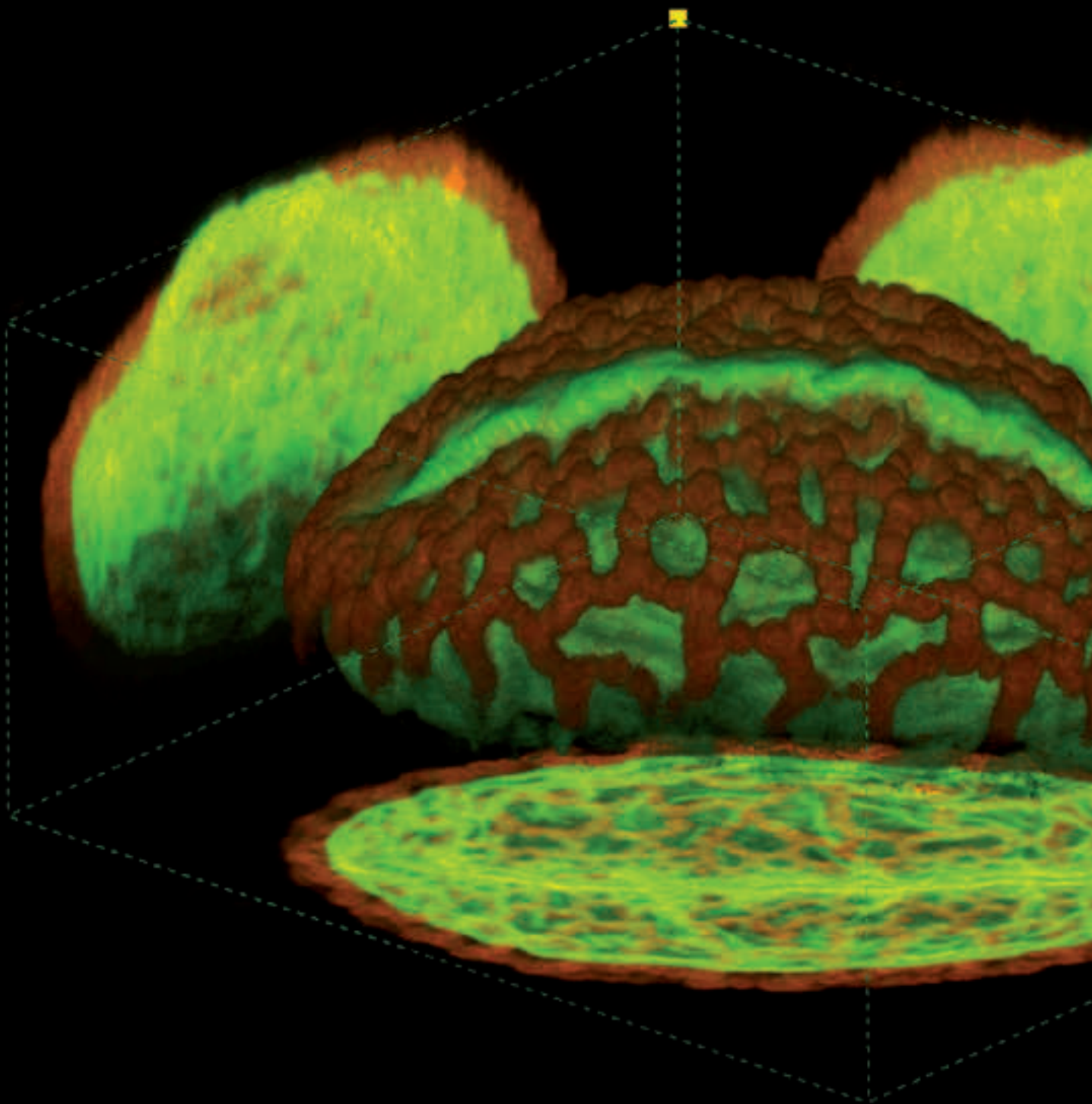
Свет, который видят наши глаза, состоит из множества различных цветов, и разные источники света по-разному их комбинируют. Различные объекты поглощают и отражают свет на разной длине волн – это основа создания их цвета.

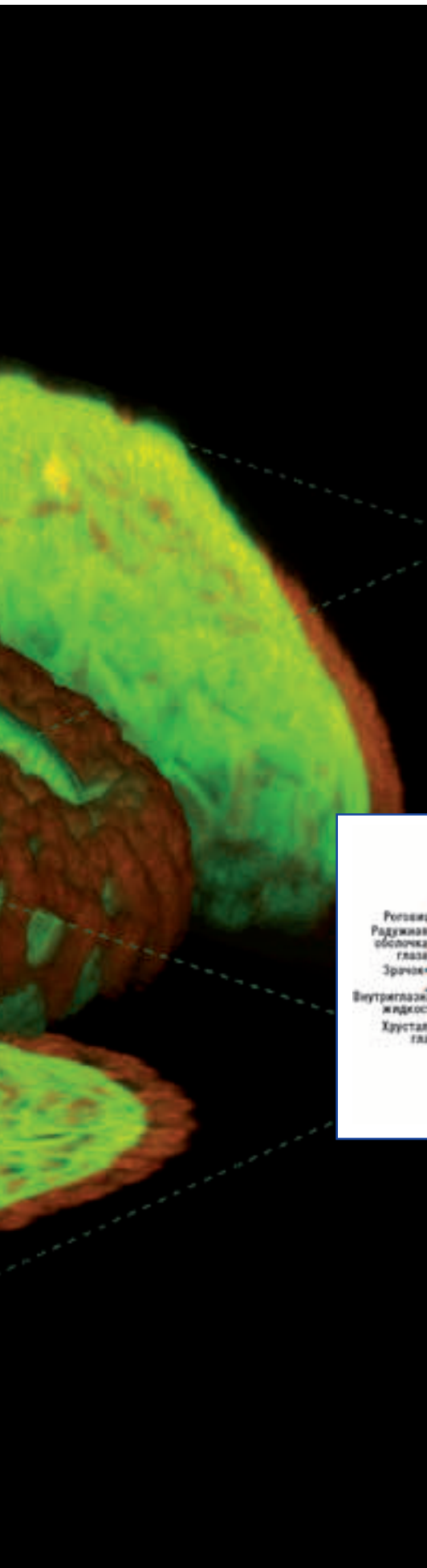
Для отображения этого многомерного мира существует множество цветовых моделей: каждая из них описывает одну и ту же физическую реальность, но имеет особую сферу применения. Наша зрительная система в состоянии отобразить всего лишь часть этой реальности.

Для эффективной работы с изображениями пользователь микроскопа должен быть осведомлен о всей многомерности мира света. Существует множество источников освещения, объективов и светофильтров, которые позволяют создать системы со специфическими свойствами для конкретного применения. Фотограф работает с системой изображения, которая берет частичную информацию и обрабатывает ее для достижения цветового баланса. Принтеры и мониторы, в свою очередь, повторяют этот процесс – и еще дальше уведут конечное изображение от первичного.

Несколько сот лет развития оптики смогли скрыть от обычного пользователя некоторые сложности создания изображения. Однако, микроскопия намного сложнее, чем может показаться. Знание реальных процессов, которые происходят в наших глазах, нашем мозге, в оптике, в ПЗС и на экране, позволяет нам оценить, насколько великолепно это достижение – конечное изображение, и сколько вложено труда для обеспечения наилучших результатов.

Разрешающая способность





Зрение человека

Для большинства из нас способность видеть – это обычное явление, и мы привыкли оценивать вещи взглядом. Однако, при этом используется множество разных сложнейших структур, которые позволяют нам не просто воспринимать изображения, но и в то же самое время обрабатывать и интерпретировать их. Каждое изображение, которое проецируется на сетчатку глаза, преобразовывается в нервные импульсы, создающие реакцию и влияющие на нее: это то, что мы называем зрением. Следовательно, то, что мы видим, не всегда совпадает с тем, что видит другой человек.

Если сравнить это с процессами, происходящими в нашем мозге, первый этап зрительного действия кажется намного проще. Чтобы создать проекцию на слой сетчатки, где располагаются миллионы светочувствительных сенсорных клеток, свет проходит через зрительную систему, состоящую из роговицы, внутриглазной жидкости, радужки, зрачка, фокусного хрусталика и стекловидного тела, см. Рис. 12. Все эти элементы вместе создают то, что растровая структура сенсорных клеток может перевести в меру своих возможностей в нейронную активность.

Орлы и мыши

Эти две системы – зрительная и сенсорная – ограничивают возможности зрения человека на самом первом этапе. Подробности можно узнать на сайте www.mic-d.com/curriculum/

вать расхождения и переводить их в узнаваемое изображение.

К сожалению, мы можем приблизиться к объекту только на определенное расстояние, за которым гибкая зрительная система больше не может четко проецировать изображение на сетчатку. Если слова напечатаны очень мелким шрифтом, как этот текст: [«Вы не разберете его без помощи оптических средств»] ... наш предел разрешения достигнут.

Длина волны, которая передает информацию об изображении, также оказывает влияние на нашу разрешающую способность. Короткие синие волны передают более мелкие детали объекта, чем длинные волны. С помощью микроскопа и цифровой камеры было бы легче читать текст и документировать его. Однако эти инструменты также ограничены разрешающей способностью своих оптических систем и количеством и чувствительностью сенсоров-пикселей.

Что такое разрешение?

Разрешение, или разрешающую способность микроскопа можно определить как самое близкое расстояние между двумя отдельными точками образца, позволяющее визуально их различить. В микроскопах проходящего света, XY-разрешение R определяется, главным образом, тремя параметрами: длиной волны λ излучаемого света, числовыми апертурами (NA) объектива (NA^{ob}) и конденсора (NA^{cond}).

$$R = 1,22 * \lambda / (NA^{ob} + NA^{cond}) \quad (1)$$

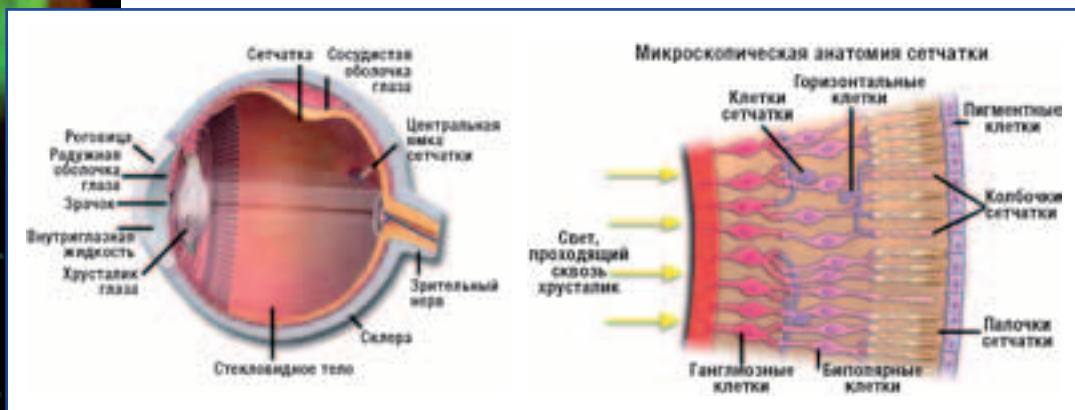


Рис. 12: Анатомия человеческого глаза и вид сетчатки в разрезе.

lightandcolor/humanvision.html. Даже имея оптические системы, повторяющие систему зрения орла, мы не сможем увидеть мышшь издали. Чтобы зафиксировать маленький объект (мышшь) на крупном фоне, нужны специальные физические характеристики оптики, а также это требует определенной степени чувствительности и ряда сенсоров, способных преобразовывать информацию.

Если буквы в этом тексте становятся слишком маленькими, вам нужно поднести текст поближе ... Это означает, что ваши глаза теперь воспринимают свет, отражаемый от маленьких букв, под более широким углом, чем раньше. Сейчас Ваше зрение фокусируется на меньшей площади, распределенной по всему количеству сенсорных клеток. Индивидуальные сенсоры могут улавли-

При регулировке апертуры конденсора в соответствии с апертурой объектива, т.е. когда апертура конденсора практически аналогична апертуре объектива, уравнение (1) упрощается:

$$R = 0,61 * \lambda / NA^{ob} \quad (2)$$

Это уравнение используется как для микроскопии проходящего света, так и для микроскопии отраженного света. Обратите внимание, что разрешение не находится в прямой зависимости от увеличения. Более того, полезное увеличение не должно превышать 1000 раз NA объектива, в противном случае с повышением увеличения разрешение в изображении повышаться не будет. Это явление называют пустым увеличением.

Что такое числовая апертура объектива?

Числовая апертура объектива микроскопа – это мера его способности собирать свет и таким образом разрешать мелкие детали образца на фиксированном расстоянии объектива. Числовая апертура объектива вычисляется по следующей формуле:

$$NA = n \cdot \sin(\mu) \quad (3)$$

n – это коэффициент преломления среды между передней линзой объектива и покровным стеклом образца. Он составляет $n = 1,00$ для воздуха и $n = 1,51$ для масла. μ – это половина угловой апертуры, как показано на Рис. 13. Чем больше μ , тем выше значение числовой апертуры. При работе в воздушной среде теоретическое максимальное значение числовой апертуры составляет $NA = 1$ ($\mu = 90^\circ$). Практический предел этого значения – $NA = 0,95$.

Числовая апертура на практике

В описаниях всех объективов микроскопов, разрешающая способность связывается с цифровым значением числовой апертуры, указываемым после цифрового значения увеличения (Рис. 14), например, объектив «UplanFLN 60x/0,9» обеспечивает увеличение 60x с числовой апертурой 0,9. Числовая апертура строго различается в зависимости от типа объектива или конденсора, т.е. типа оптической коррекции. В Таблице 2 перечислены некоторые типичные значения числовой апертуры для разных значений увеличения и типа оптической коррекции объектива.

Чтобы добиться числовой апертуры выше значения 0,95, между передней линзой объектива и образцом должна быть иммерсионная среда. С этой целью чаще всего используется

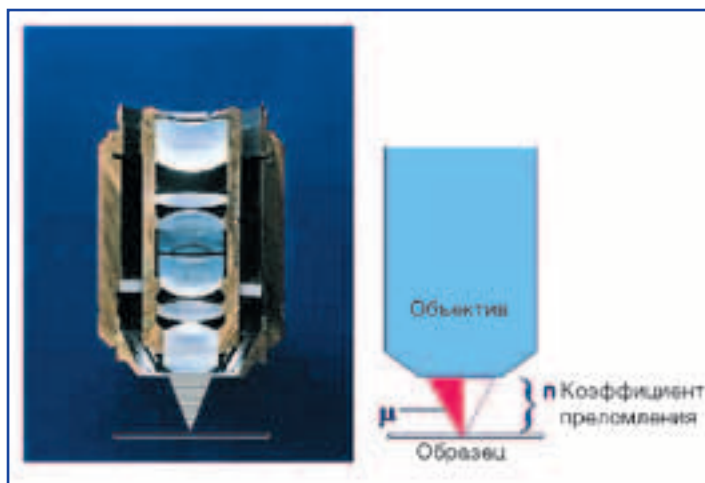


Рис. 13: Угловая апертура объектива

Таблица 2: Значения числовой апертуры (NA) для разных типов объективов и увеличения.

Увеличение	План Ахромат	План Флюорит	План Апохромат
4x	0,1	0,13	0,16
10x	0,25	0,3	0,4
20x	0,4	0,5	0,75
40x	0,65	0,75	0,9
60x	0,8 (сухой)	0,9 (сухой)	1,42 (масло)
100x	1,25 (масло)	1,3 (масло)	1,4 (масло)

масло или вода. Так как объективы должны быть специально разработаны для работы с той или иной иммерсионной средой, то это всегда указывается на корпусе объектива, например, как для объектива «UplanFLN 60x/1,25 Oil Iris». Для работы микроскопа с этим объективом в качестве иммерсионной среды требуется масло, без которого он не способен обеспечить хорошее качество изображения.

Для специальных технологий, как, например, флуоресцентная микроскопия полного

внутреннего отражения (TIRFM), объективы выпускаются с очень высокими числовыми апертурами NA, и ведущим в этой области является объектив Olympus AP0100X OHR с числовой апертурой NA 1,65. Достижимое при этом разрешение, особенно в микроскопии проходящего света, зависит от правильной установки света в микроскопе. Для обеспечения равномерного распределения проходящего света в плоскости предмета и достижения максимального разрешения микроскопа, рекомендуется освещение по Келеру (см. Блок 2).

Какое разрешение возможно в световых микроскопах?

Чтобы приблизить тему разговора к практике, приведем некоторые цифры, относящиеся к разрешению. С помощью волн среднего диапазона 550 нм, объектив «План Ахромат» 4x обеспечивает разрешение приблизительно в 3,3 мкм, в то время как «План Апохромат» достигает разрешение около 2,1 мкм. «План Ахромат» 40x обеспечивает разрешение 0,51 мкм, а «План Апохромат» – 0,37 мкм. Реальный предел разрешения, достигается при использовании объектива «План Апохромат» 100x и часто не превышает $R = 0,24$ мкм.

Чтобы провести сравнение с другими микроскопами, которые не работают в видимом диапазоне света, разрешение, достигаемое сейчас в сканирующих электронных микроскопах, составляет около $R = 2,3$ нм. В электронном микроскопе проходящего света, разрешение позволяет наблюдать структуры размером до 0,2 нм. Микроскопы со сканирующим зондом могут разрешать структуры размерами с атом и даже менее ангстрема и позволяют детектировать отдельные атомы.

Блок 2: Как установить освещение по Келеру

Чтобы настроить микроскоп, в котором меняется расстояние между конденсором и образцом, по принципу Келера Вам необходимо:

1. Получить четкое изображение образца с помощью объектива 10x или большего увеличения, так, чтобы Вы могли видеть хотя бы какой-нибудь участок образца в фокусе (если у конденсора имеется откидная фронтальная линза, установите ее в ход лучей при использовании объективов с увеличением более 10x).
2. Закройте полевую диафрагму на выходе светового пучка.
3. Перемещайте конденсор вверх-вниз, пока в плоскости образца не появится изображение закрытой полевой диафрагмы. Теперь освещена только центральная часть вашего поля видения.
4. Если освещаемая часть находится не в центре, конденсор необходимо отцентрировать, перемещая его в направлении XY.
5. Наконец, отрегулируйте высоту конденсора так, чтобы края полевой диафрагмы были четко видны и дифракционный цвет на краю полевой диафрагмы был сине-зеленым, обращенный за край диафрагмы (не в поле видения!).
6. Откройте полевую диафрагму настолько, чтобы все поле видения было освещено (может потребоваться повторная центровка в направлении XY).
7. Чтобы получить наилучший контраст при наблюдении поля с высокой освещенностью, откройте апертурную диафрагму конденсора на 80% от числовой апертуры объектива.

На практике, Вы можете медленно закрывать апертурную диафрагму конденсора, не прекращая наблюдать образец. В момент появления первого изменения контраста, числовая апертура NA конденсора начинает уменьшаться по отношению к числовой апертуре NA объектива, что можно использовать. При документировании числовая апертура конденсора NA должна соответствовать числовой апертуре NA объектива. Чтобы осуществлять прямую визуализацию апертурной диафрагмы, можно вынуть из окулярной трубки один из окуляров.

Что такое кружок Эйри?

Каждая деталь образца, которая освещается в микроскопе, создает так называемый дифракционный кружок, или модель кружка Эйри. Это распределение яркого центрального пятна (кружок Эйри или главный максимум) и так называемых вторичных максимумов, разделенных темными областями (минимумы или кольца кружка Эйри, см. Рис. 15, 16), созданное интерференцией (более подробную информацию можно найти на сайте: www.mic-d.com/curriculum/lightandcolor/diffraction.html). Если две детали в образце находятся близко друг от друга, мы можем их увидеть по отдельности, только если два центральных максимума расположены не слишком близко друг к другу и если сами кружки Эйри не перекрывают друг друга. Это явление называется критерием разрешения Рэля. Хорошее распознавание возможно, даже если один кружок Эйри попадает в главный минимум второго. (Рис. 15).

Чем меньше кружки Эйри (т.е. чем меньше дифракционная точка, через которую проходит свет и образуется дифракционная картина с максимумом и системой колец), тем выше разрешение изображения. Объективы с более высокой числовой апертурой воспроизводят меньшие по размеру кружки Эйри (имеется в виду диаметр дифракционной точки) (Рис. 16), чем объективы с низким значением числовой апертуры NA. Однако, чем лучше разрешение в направлении XY, тем меньше просматриваемый слой образца, находящийся в фокусе (глубина резкости в плоскости предмета), поскольку разрешение также становится лучше в направлении z. Как и более высокое увеличение, более высокое разрешение всегда создает меньшую глубину резкости в плоскости предмета. Также в большинстве случаев увеличение значения числовой апертуры NA означает, что объектив находится ближе к образцу (рабочее расстояние уменьшается) по сравнению с объективом с более низким значением числовой апертуры NA, но с тем же увеличением. Следовательно, выбор наиболее оптимального объектива для конкретного применения может зависеть не только от разрешающей способности.

Разрешение в цифровых камерах – важно ли это?

Следующим шагом является переход от оптического изображения к цифровому. Что же при этом происходит? Преобразование оптического изображения в цифровое в «реальном» мире осуществляется через светочувствительные элементы ПЗС-чипов, например, в цифровых камерах. Или, сенсор видеокamеры может выдавать сигналы напряжения, которые считываются и преобразовываются в цифровой вид специальными картами захвата. Однако, гораздо больший интерес здесь представляет принцип, лежащий в основе практической реализации оцифровывания. Оптическое изображение характеризуется непрерывным спектром тонов, т.е. непрерывно меняющимися зонами теней и оттенков. Изображение должно быть оцифровано и квантифицировано: в противном случае

Таблица 3: Оптическое разрешение и количество требуемых пикселей. Количество пикселей на чипе в 1/2 дюйма должно соответствовать критерию Найквиста (2 пикселя на элемент изображения) и оптимальному разрешению (3 пикселя на элемент изображения). Количество пар линий/мм дано для проекции изображения на ПЗС.

Объектив	Увеличение	Числовая апертура NA	Разрешение (мкм)	Пар линий/мм (на ПЗС)	Разрешение ПЗС 1/2 Предел по Найквисту 2 пикселя/пара линий	Разрешение ПЗС 1/2 Необходимое разрешение 3 пикселя/пара линий
«PlanApoN»	2x	0,08	4,19	119	1526 x 1145	2289 x 1717
«UPlanSApo»	4x	0,16	2,10	119	1526 x 1145	2289 x 1717
«UPlanSApo»	10x	0,4	0,84	119	1526 x 1145	2289 x 1717
«UPlanSApo»	20x	0,75	0,45	111	1420 x 1065	2131 x 1598
«UPlanSApo»	40x	0,9	0,37	67	858 x 644	1288 x 966
«UPlanSApo»	100x	1,4	0,24	42	534 x 401	801 x 601

компьютер не сможет его обработать. Для этого исходное изображение сначала делится на небольшие отдельные блоки, обычно квадратной формы, которые называют пикселями. Далее, каждому пикселю присваивается скрытое значение яркости. Первый этап называется цифровой дискретизацией, второй – квантизацией пикселей. Они оба преобразовывают оптическое изображение с непрерывным спектром тонов в двухмерную матрицу пикселей: цифровое изображение.

Цифровое разрешение – для чего оно нужно?

Квантизация пикселей интенсивности изображения зависит от битовой глубины, или динамического диапазона преобразующей системы. Битовая глубина определяет количество уровней серого цвета, или диапазон значений цвета для пикселя, и, таким образом, обуславливает разрешение по яркости, или цветовое разрешение. В то же время пространственное разрешение цифрового изображения определяется цифровой дискретизацией. Как пространственное, так и разрешение по яркости обеспечивают способность изображения воспроизводить мельчайшие детали, присутствующие в

исходном варианте. Пространственное разрешение зависит от количества пикселей в цифровом изображении. На первый взгляд, здесь должно действовать следующее правило: чем больше количество пикселей в пределах одних и тех же физических размерностей, тем выше становится пространственное разрешение. Влияние разного количества пикселей на действительную структуру образца можно увидеть на Рис. 17. Первое изображение (175 x 175) предоставляет ожидаемую информацию об изображении, в то время как детали образца будут потеряны из-за недостаточного количества пикселей (44 x 44). При еще большем уменьшении количества пикселей элементы образца скрываются и становятся невидимыми. Это называется блокированием пикселей.

Существует ли оптимальное цифровое разрешение?

Таким образом, количество пикселей на оптическую область изображения не должно быть слишком маленьким. Но каков точный предел? В



Рис. 14: Что есть что на объективе? Olympus: производитель PlanApo: плоское поле, Apo: апохромат

60X: 1,42 Oil: линейное увеличение числовая апертура (необходима масляная иммерсия)

∞: оптика скорректированная на бесконечность (не путать с оптикой длиной 160мм)

0.17: корректировка на покровное стекло. Толщина покровного стекла должна быть 0.17мм

Примечание: Этот параметр требует особого внимания. При отсутствии покровного стекла на корпусе маркируется значение «0», для предметного стекла толщиной 1 мм «1» или промежуток значений. Неправильное использование объективов приводит к созданию «дымчатых» изображений (малоконтрастных изображений со сферической аберрацией).

FN 26,5: Линейное поле 26,5 (При использовании окуляра и тубуса, которые обеспечивают линейное поле FN 26,5 мм, можно разделить этот номер на значение увеличения и получить диаметр поля, наблюдаемого на предмете в мм (26,5/60 = 0,44 мм).

Блок 3: Создание панорамного изображения

Создание сшитого изображения – это программный метод комбинирования нескольких изображений в одну панораму с сохранением высокого разрешения.

Здесь контроль над микроскопом, камерой, механизмом предметного столика и т.д. осуществляет программное обеспечение. Все параметры изображения передаются в систему управления через дистанционный интерфейс. С помощью этих данных все настройки микроскопа и камеры могут контролироваться и калиброваться программными средствами. После определения желаемого размера и разрешения изображения, пользователь может выполнить следующие функции автоматически, путем простого нажатия кнопки мышки:

1. Вычисление нужного количества областей изображения и их соответственного расположения.

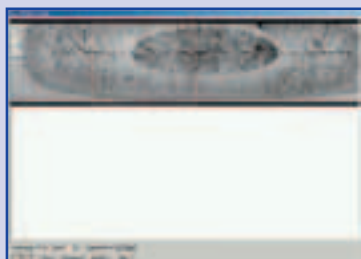


2. Покадровый захват изображения, включая управление столиком, захват изображений и вычисление их оптимального взаимного наложения.

3. Бесшовное «сшивание» покадровых изображений с точностью до долей пикселя с запрограммированным распознаванием образца в пределах областей взаимного наложения.



4. Автоматическое регулирование разницы интенсивности в областях взаимного наложения.



5. Визуализация полного изображения.



процессе преобразования оптического изображения в цифровое нельзя допускать потери информации. Чтобы предотвратить это, цифровое пространственное разрешение должно равняться оптическому, т.е. разрешающей способности микроскопа, или превышать ее. Это требование сформулировано в теореме Найквиста: интервал дискретизации (т.е. количество пикселей) должен быть равен двойному значению пространственной частоты оптического изображения. Иными словами, чтобы захватить мельчайшую долю детали изображения, на каждый элемент берутся два пикселя. Для изображений высокого разрешения критерий Найквиста расширяется до 3 пикселей на элемент.

Чтобы понять значение критерия Найквиста, рассмотрим представленные изображения на Рис. 18 и 19. Самым критическим элементом при воспроизведении является идеальный периодический рисунок пары черной и белой линий (нижние рисунки). С интервалом дискретизации два пикселя (Рис. 18) цифровое изображение (верхний рисунок) может разрешить рисунок линий, а может и не разрешить, что зависит от геометрического построения образца и цифровой камеры. Однако, интервал дискретизации в 3 пикселя (Рис. 19) разрешает рисунок линий с любым геометрическим построением образца. Цифровое изображение (верхний рисунок) всегда в состоянии отобразить рисунок двух линий.

При работе с настоящими образцами, 2 пикселя на элемент вполне достаточно для разрешения большинства деталей изображения. Так что теперь мы можем ответить на некоторые поставленные ранее вопросы. Да, оптимальное пространственное разрешение действительно существует и составляет два или три пикселя на элемент образца. Разрешение ни в коем случае не должно быть ниже этих значений, в противном случае информация об изображении будет утеряна.

Практический Пример

Практический пример покажет, какое цифровое разрешение предпочтительнее в тех или иных обстоятельствах. Следующая формула выражает критерий Найквиста:

$$R * M = 2 * \text{размер пикселя} \quad (4)$$

R – это оптическое разрешение объектива; M – полученное увеличение в сенсоре цифровой камеры. Оно рассчитывается путем умножения значения увеличения объектива на значение увеличения адаптера камеры.

Предположим, что мы работаем с микроскопом и объективом «План Апохромат» 10x, числовая апертура которого составляет (NA) = 0,4. Основная длина волны в освещении составляет $\lambda = 550$ нм. Значит, $R = 0,61 * \lambda / NA = 0,839$ мкм. Предположим также, что увеличение адаптера камеры составляет 1x, так, что $M = 10x$. Теперь умножаем значение увеличения объектива на коэффициент 10 и получаем разрешение цифровой камеры:

$R * M = 0,839 \text{ мкм} * 10 = 8,39 \text{ мкм}$. Таким образом, при указанных вводных данных, мы получили минимальное расстояние 8,39 мкм, при котором ряд линий может быть разрешен. Это количество составляет $1/8,39 = 119$ линий на миллиметр.

Размер пикселя – это размер ПЗС-чипа, разделенный на количество пикселей.

Размер полудюймового чипа составляет 6,4 мм * 4,8 мм. Таким образом, количество пикселей, необходимых для того, чтобы такой чип соответствовал критерию Найквиста, определяющему норму как 2 пикселя на элемент, составляет $1/(R * M) * \text{размер чипа} * 2 = 119 \text{ линий/мм} * 6,4 \text{ мм} * 2 = 1526$ пикселей в горизонтальном направлении. Если же Вы хотите получить 3 пикселя на одну пару линий, в результате будет 2289 пикселей. Этот способ вычисления может применяться для разных видов объективов. В качестве примера под-

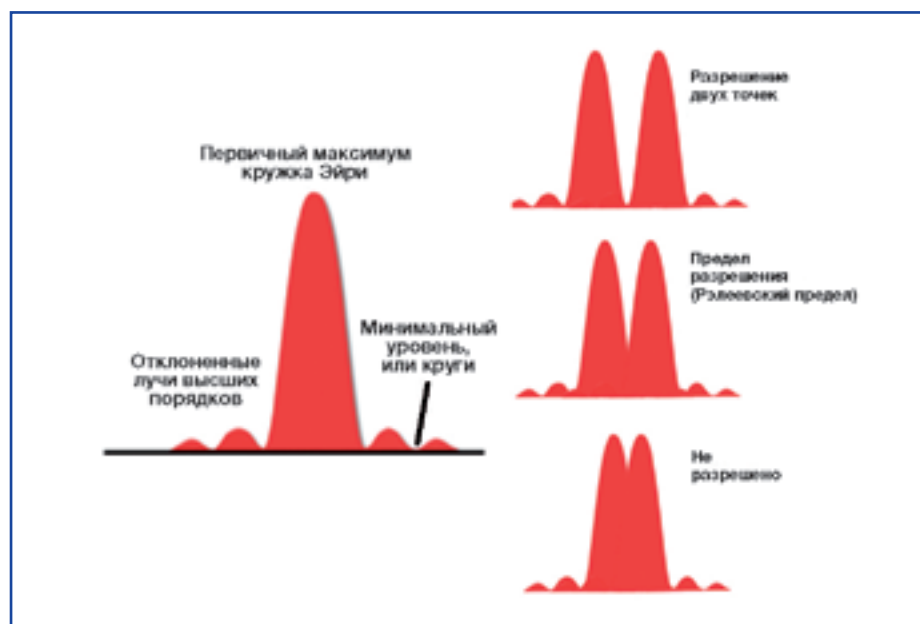


Рис. 15: Профили интенсивности моделей кружков Эйри в одной детали образца и двух деталей на разном расстоянии.

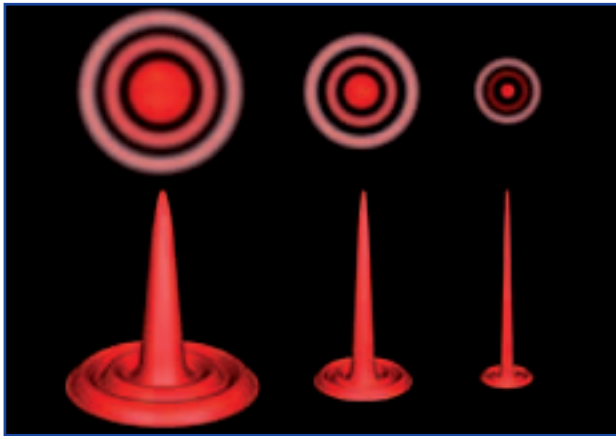


Рис. 16: Модели кружков Эйри разных размеров, как пример разрешающей способности объективов с малой числовой апертурой NA (слева) и большой NA (справа).

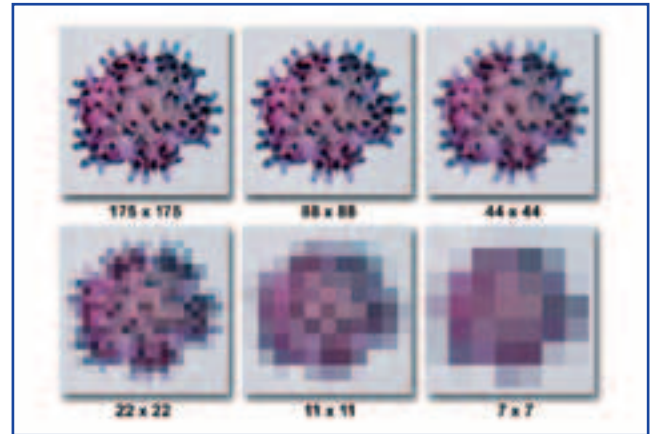


Рис. 17: Шесть вариантов одного и того же изображения с разным количеством использованных пикселей. Под каждым изображением указано количество пикселей.

считано количество пикселей для полудюймового чипа в таблице 3.

Вызывает удивление тот факт, что, чем выше увеличение, тем меньше чипу цифровой камеры ПЗС требуется пикселей! При работе с объективом «План Апохромат» 100x в сочетании с полудюймовым чипом, нам нужно всего лишь 800 x 600 пикселей для цифрового разрешения даже самой мелкой оптически различимой структуры. Более высокое количество пикселей, от 2300 x 1700, требуется только при малых значениях увеличения, до 10x.

Какую цифровую камеру купить?

Разрешение – это несомненно, один из важнейших критериев, принимаемых во внимание при выборе ПЗС-камеры. Разрешение должно быть оптимально отрегулировано в соответствии с основным объективом. Оптимальное разрешение зависит от значения увеличения объектива и микроскопа, с которым Вы обычно работаете. Она должна обладать достаточным количеством пикселей, необходимым для сохранения всего оптически достигнутого разрешения, согласно изложенному выше. Однако количество пикселей также не должно быть очень высоким, поскольку количество пикселей прямо связано со временем захвата изображения. Выигрыш в разрешении компенсируется медленным процессом захвата. Самая высокая скорость передачи изображений высокого разрешения может достигать до 100 миллисекунд или даже достигать второго диапазона, что в ежедневном использовании может стать помехой. Кроме этого, для ненужных пикселей требуется такая же память, что и для нужных. Например, изображение в подлинном цвете в 24 бит, состоящее из 2289 x 1717 пикселей, обладает размером файла почти 12 Мб, если к нему не применяется метод компрессии. Медленная скорость передачи изображений и размер файла – это только два аспекта, которые показывают, что работа с изображениями с высоким разрешением со временем все более усложняется.

Высокое разрешение или широкое поле обзора

Желательное высокое XY-разрешение – это один из аспектов, составляющих «высокое

качество» изображений. Другой, частично противоречащий этому определению аспект – это то, что мы обычно хотим видеть самый большой фрагмент образца, а лучше – весь наблюдаемый образец. Здесь становится важным поле наблюдения в микроскопе. Информация о поле наблюдения заключается в номере FN так называемом линейном поле. Например, если микроскоп оснащен окулярами и насадкой поддерживающими FN 22, при применении объектива с увеличением 10x, диаметр линейного поля зрения будет $22/10 = 2,2$ мм. Использование объективов с меньшим увеличением позволяет создать большее поле наблюдения, а использование тубусов и окуляров с большим числом поля

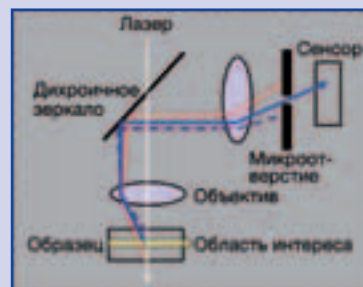
(FN) может увеличить размер линейного поля до 26,5 мм (FN 26,5). Например, линейное поле окуляра 26,5 мм и объектив 4x обеспечивают диаметр поля на предмете $26,5/4 = 6,625$ мм. Но, к сожалению, объектив с малым увеличением не может обеспечить такого же максимального значения числовой апертуры NA, как объективы с большим увеличением. Даже когда мы используем объектив «Апохромат» 4x с лучшим для этого увеличения значением числовой апертуры (0.16) – его разрешение все равно ниже, чем наименьшее разрешение объектива «Ахромат» с увеличением 20x и малой для данного увеличения числовой апертурой NA 0.35. Меньшее значение NA дает более низкое разрешение. В некоторых случаях

Блок 4: Использование технических средств для улучшения качества разрешения во флуоресцентной микроскопии

Некоторые приставки к микроскопу позволяют получение изображения, не позволяя ему «расплываться» (расфокусироваться) под действием внефокусного цвета из других слоев образца. Например, растровая проекция, конфокальное детектирование и флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRFM).

Поскольку фрагменты образца, находящиеся вне фокуса, создают не четкие изображения, применяется достаточно простой способ устранения этого рассеянного света в изображении. В большинстве конфокальных микроскопов предусмотрено микроотверстие, расположенное перед системой регистрации, которое пропускает только световые лучи, исходящие из зоны фокуса, остальные лучи при этом просто поглощаются. Полученное точечное изображение содержит только информацию из зоны фокуса. Для создания изображения более чем из одной точки фокуса, требуется проведение сканирования.

Сканирование можно проводить с помощью вращающихся дисков для обычной флуоресцентной микроскопии, или с использованием лазерного луча в установке конфокального лазерного сканирующего микроскопа (с LSM). Разные системы обеспечивают разный уровень улучшения качества разрешения. Тем не менее, все они используют профессиональную систему цифровых сенсоров для отображения изображений.



TIRFM (флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения) использует совершенно другой подход. При этом способе для создания изображения используется очень тонкий слой образца (около 200 нм). Поэтому метод TIRFM идеален для анализа, например, взаимодействия отдельных молекул или мембранных процессов. При выполнении этой задачи луч света направляется под критическим углом на покровное стекло.

Из-за более высокого коэффициента преломления покровного стекла по сравнению с образцом возникает общее внутреннее преломление. Это означает, что прямой свет практически не попадает в образец – однако, благодаря физической природе света в направлении образца излучается так называемая затухающая волна. Эта волна способна возбуждать флуорохромы в толщине образца только в пределах первых нескольких сот нанометров от покровного стекла. Флуоресцентное изображение ограничивается этой небольшой глубиной и не подвержено «размытости» из-за внефокусного цвета (ввиду отсутствия такового) из более глубоких слоев образца. (Более подробную информацию о методе TIRFM можно найти на сайте www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfhome/html).

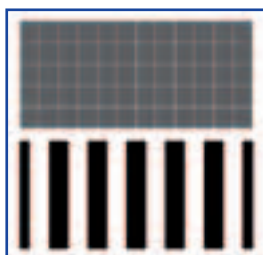


Рис. 18: Рисунок двух линий, полученный с разрешением 2 пикселя на две линии. Описание особенностей разрешения находится в тексте.

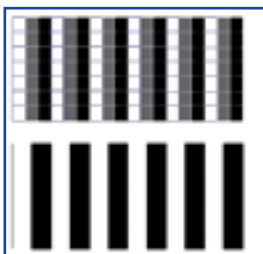


Рис. 19: Рисунок двух линий с разрешением 3 пикселя на две линии. Описание особенностей разрешения находится в тексте.

практического использования микроскопа требуется одновременное создание поля наблюдения диаметром в несколько миллиметров, а разрешение по микрометровой или нанометровой шкале. (Рис. 20). Как же нам преодолеть эту проблему, особенно если нам известно, что ПЗС-сенсор камеры еще более сокращает поле наблюдения (изображение на мониторе)? Некоторые способы обработки изображений предлагают альтернативное решение. На первом этапе обработки эти системы осуществляют автоматический кадровой захват изображений при предварительно установленном высоком разрешении.

На следующем этапе программное обеспечение выполняет «умное» распознавание рисунка вместе с проверкой достоверности взаимно наложенных частей отдельных кадров изображения, чтобы выстроить их в одно изображение с высокой степенью точности (выше, чем в пикселях). В результате получается одно комбинированное изображение с сохранением исходного уровня разрешения. Так, вы получаете изображение, обладающее как высоким разрешением, так и большим полем наблюдения (Рис. 21). Ознакомьтесь с Блоком 3, где содержится описание процедуры обработки изображения. В дополнение к этому, в Блоке 7

описывается более сложный и детализированный вариант, который называется «Цифровая Виртуальная Микроскопия».

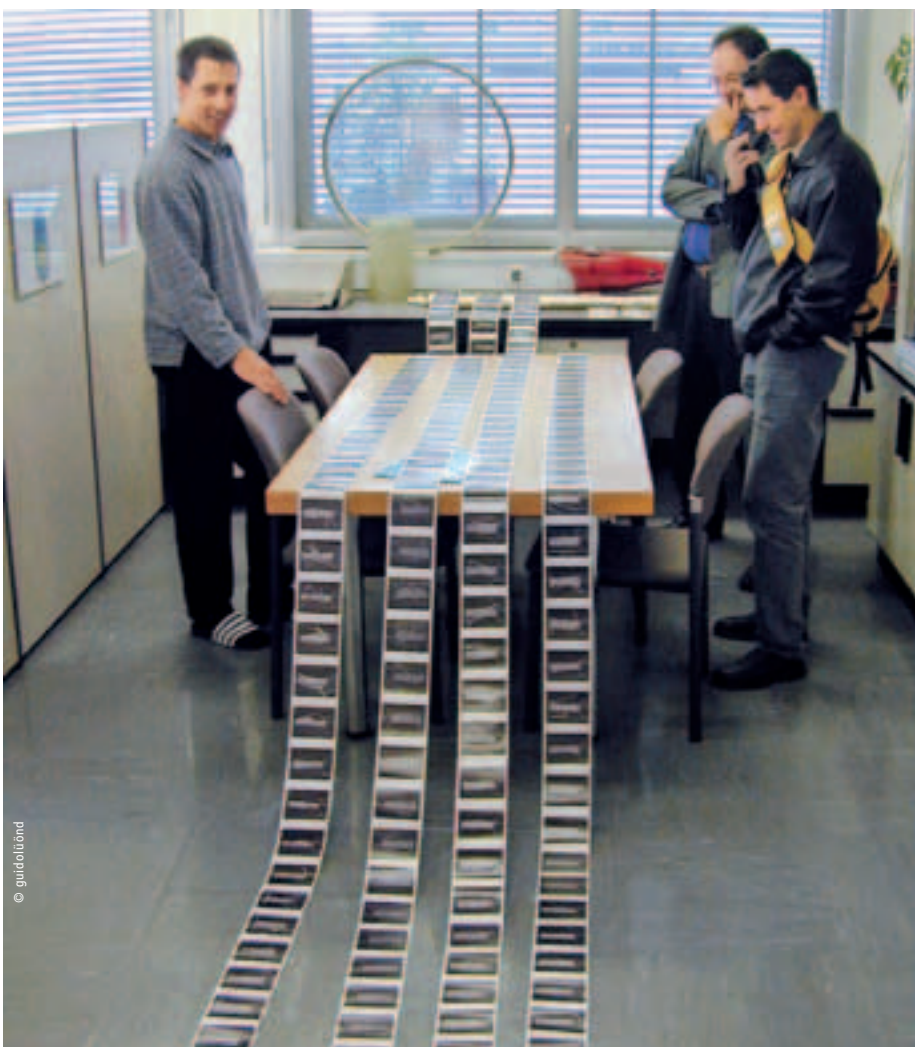
Физические пределы и способы их преодоления

Как описывалось ранее, разрешение объектива микроскопа определяется как наименьшее расстояние между двумя точками образца, на котором они распознаются как две отдельные единицы. Однако на разрешение оказывают влияние несколько ограничений. Далее мы рассмотрим влияние «размытости» изображения и характеристики глубины разрешения.

Конволюционный и деконволюционный анализ

Рассеянный свет из областей, находящихся вне зоны фокуса, ниже или выше фокальной плоскости (например, во флуоресцентной микроскопии) становится причиной появления блеска, искажения и нерезкости при получении изображений (Рис. 22а). Эти артефакты изображения известны в науке как конволюция. Они ограничивают возможность быстрого и более подробного анализа изображения. В микроскопии применяются несколько, порой очень сложных технических способов, позволяющих снизить, а иногда и полностью предотвратить внефокусное изображение. Подробно они описаны в Блоке 4. Деконволюция – это совсем иной подход – признанный математический метод устранения артефактов после захвата изображения. Если известна функция рассеяния точки (ФРТ), становится возможным выполнение

Рис. 20: Гвидо Луонд, «Rietter AG», Отделение «Werkstoff-Technik DTTAM», Винтертур, Швейцария, работает с волокнами, используя микроскоп. В целях исследования им приходится часто склеивать отдельные снимки в общее изображение. Ранее это представляло существенную задачу. Теперь этой работой занимается часть программного обеспечения.



деконволюции изображения. Это означает что конволюция математически перевернута, что позволяет выполнить восстановление исходного изображения. Полученное в результате изображение характеризуется гораздо большей резкостью, меньшим шумом и более высоким разрешением. (Рис. 22б).

Что же такое функция рассеяния точки?

Функция рассеяния точки – это изображение точечного источника освещения из образца, проецируемое объективом микроскопа в промежуточную плоскость изображения, т.е. функция рассеяния точки представлена моделью кружков Эйри (Рис. 15, 16). С математической точки зрения, функция рассеяния точки – это Фурье-преобразование оптической передаточной функции (ОПФ), которая является, по сути, способом измерения способности микроскопа передавать контрастность из образца в промежуточную плоскость изображения при определенном разрешении. ФРТ (или ОПФ) отдельного объектива или системы линз зависит от числовой апертуры, конструкции объектива, длины волны освещения, и метода контрастирования (например, светлое поле, фазовый контраст, ДИК).

Трехмерная функция рассеяния точки

Система изображения в микроскопе передает изображение точечного источника освещения из образца не только в двух измерениях. Точка может расширяться также и в трехмерном пространстве. Так, в общих словах, ФРТ системы – это трехмерная модель преломления, созданная идеальным точечным источником освещения. Трехмерные формы ФРТ создают так называемую расфокусировку изображения, которая снижает разрешение и контраст в изображениях, например, во флуоресцентной микроскопии. Эта расфокусировка, или дымчатость (вуаль), исходит из фрагментов образца, находящихся вне



Рис. 21: Анализ неметаллических включений согласно DIN, ASTM и JIS требует обработки образца площадью до 1000 мм², в то время как сульфидные и оксидные включения, подлежащие анализу, сами не шире микрометра. Цифровой камеры с таким большим ПЗС-сенсором не существует. Проблема обработки изображения решается методом сшивания отдельных перекрывающихся друг друга изображений и получения одного изображения с высоким разрешением.

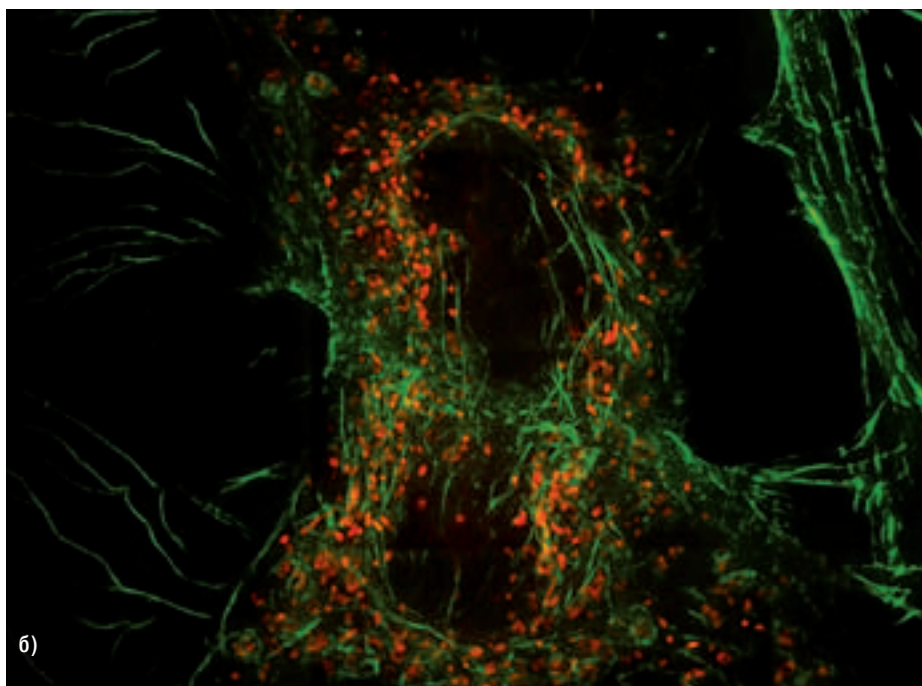
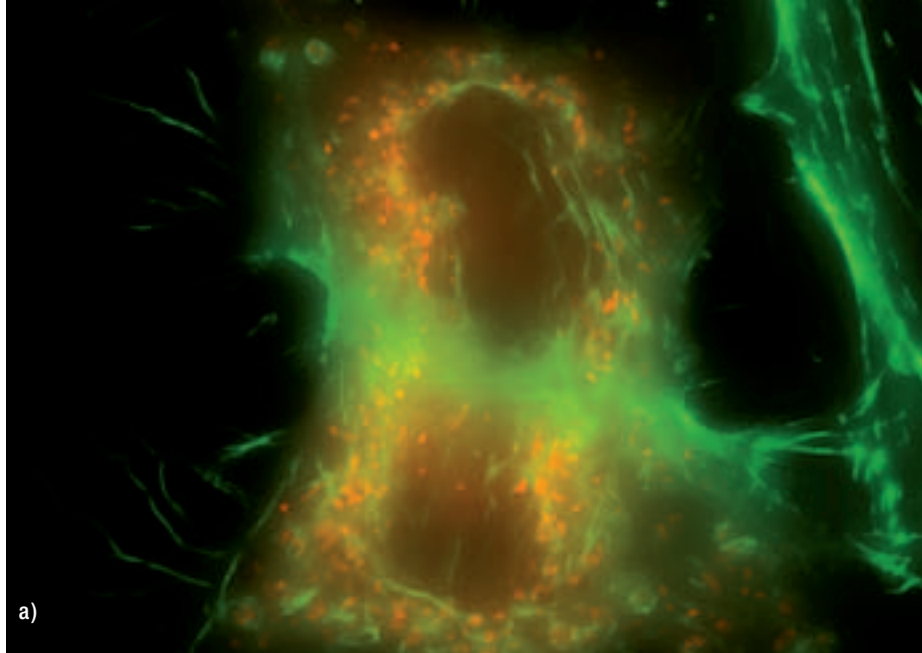


Рис. 22: С помощью деконволюции артефакты могут быть вычтены из флуоресцентных изображений. а) Причиной артефактов является рассеянный свет из областей вне зоны фокуса выше и ниже уровня фокуса. Это явление, называемое сверткой, приводит к появлению блеска, искажения и расфокусировки. б) Деконволюция – это признанная математическая процедура устранения этих артефактов. Полученное в результате изображение, показанное на рисунке, характеризуется большей резкостью, меньшим шумом и, следовательно, более высоким разрешением. Оно также гораздо больше подходит для более подробного анализа.

фокальной плоскости рассматриваемого изображения. Так, изображение из любой фокальной плоскости образца содержит рассеянный свет из точек, расположенных в этой плоскости, который смешивается с рассеянным светом из точек в других фокальных плоскостях (Рис. 23).

Для чего используется деконволюция?

По известной ФРТ можно устранить размытость изображения. Это осуществляется в ходе так называемой деконволюции – способе обработки изображений, применяемого для удаления размытости в изображениях образца, находящихся вне фокуса. Алгоритм деконволюции работает с набором изображений, представляющих собой оптические срезы, сделанные по всему образцу по оси Z. Алгоритм вычисляет трехмерную ФРТ системы и

возвращает в исходное положение расфокусированные фрагменты, присутствующие в изображении. В этом отношении деконволюция производит попытку восстановления изображения образца из расфокусированного изображения (Рис. 23).

Глубина резкого видения в плоскости изображения против глубины резкого видения в плоскости предмета

Два определения – глубина резкого видения в плоскости изображения и глубина резкого видения в плоскости предмета – часто используются для описания одной и той же оптической характеристики – количества глубинных структур образца, которые можно увидеть одновременно. Однако, для описания этой характеристики следует использовать только

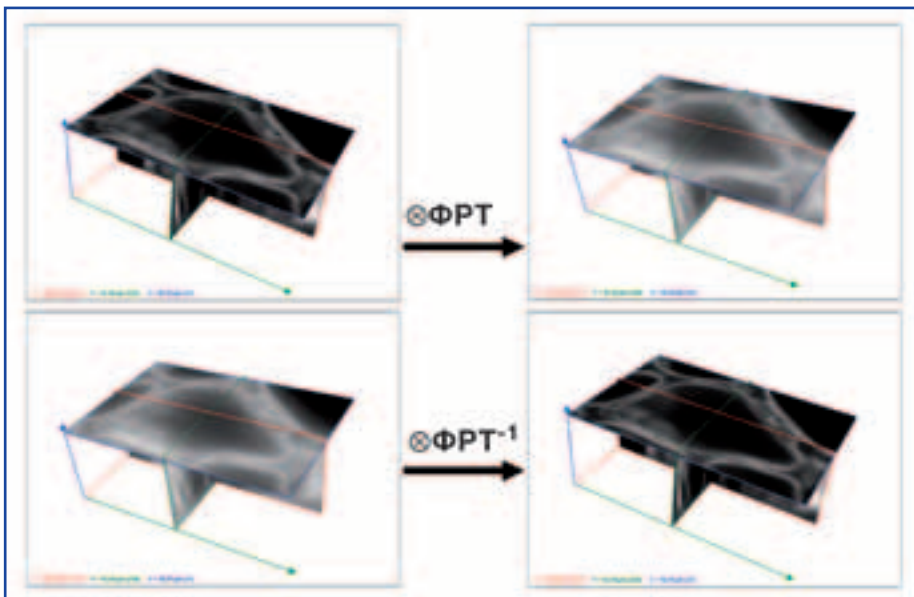


Рис. 23: Рассеянный свет из областей выше и ниже фокальной плоскости приводит к появлению блеска, искажения и расфокусировки (конволюция), особенно во флуоресцентной микроскопии и гистологии. Деконволюция представляет собой признанный математический метод для коррекции этих артефактов. Степень искажения изображения описывается функцией рассеяния точки (ФРТ). Если она известна, появляется возможность выполнить «деконволюцию» изображения. Это означает, что свертка изображения математически обратима, что позволяет производить восстановление исходных форм образца. Чем выше точность данных о степени искажения – т.е. ФРТ – тем лучше результат. Что же получается в результате? Более резкий вариант изображения с меньшим шумом, с большим разрешением и с улучшенным качеством изображения.

определение «глубина резкого видения в плоскости предмета». Как мы заметим далее, определение «Глубина резкого видения в плоскости изображения» требуется для описания совсем другого оптического свойства.

Такая оптическая система, как глаз, фокусирующая свет, обычно производит четкое изображение на определенном расстоянии от оптических компонентов. Для цифровой камеры идеальной является ситуация, когда четкое изображение формируется на чипе, а для глаза – когда оно возникает на сетчатке. В глазах это происходит при совпадении длины глаза с его оптической силой, и при условии,

что объект, находящийся на расстоянии, сохраняется в фокусе при расслабленных мышцах глаз. Если в такой ситуации возникает различие между силой и длиной глаза, то изображение, полученное на сетчатке, будет немного не в фокусе. Тем не менее, такое расхождение может быть настолько малым, что останется незамеченным, и поэтому небольшой коэффициент «ухудшения» в системе с подобным диапазоном фокуса считается приемлемым. Этот диапазон определяется как «глубина фокуса» глаза. Если взглянуть на это с другой стороны, глаз имеет точный фокус на определенном расстоянии – например, за

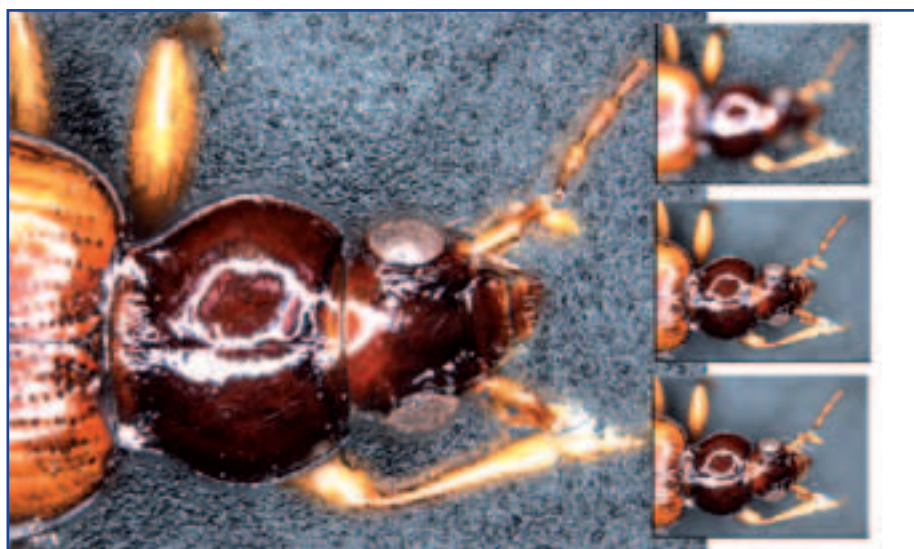


Рис. 24: Программное обеспечение «извлекает» область резкого видения находящегося в фокусе изображения из серии изображений и составляет их в единый бесконечно резкий снимок. На примере, приведенном здесь, представлено окончательное изображение, произведенное автоматически с использованием 25 изображений образца *Bembidion tetracolum*.

метр от объекта. При этом, благодаря коэффициенту ухудшения системы (аккомодации), другие объекты, находящиеся за 90 и 110 см от объекта, тоже четко видны. Спереди и сзади расстояния точного фокуса имеется диапазон четкого видения, и он определяется как «глубина поля».

Теперь давайте взглянем на физическое понимание «глубины фокуса» в микроскопии и «глубины поля», соответственно. Глубина поля (глубина резкости в плоскости предмета) Δf_i в микроскопе – это область спереди и сзади образца, находящаяся в допустимом фокусе. Она определяется расстоянием от самой близкой до самой дальней плоскостей объекта, одновременно находящихся в фокусе. Это значение описывает диапазон расстояния по оптической оси, в котором образец можно передвигать без риска потерять резкость. Математически Δf_i прямо пропорционально

$$\Delta f_i \sim \lambda/2 \cdot NA^2 \quad (5)$$

Δf_i = глубина поля

λ = длина волны освещения (излучение)

NA = числовая апертура

Δf_i , несомненно, зависит от разрешения микроскопа. Объективы с малым фокусным расстоянием и большим увеличением обладают очень малой глубиной резкого видения в плоскости предмета. Объективы с большим фокусным расстоянием и небольшим увеличением подходят гораздо больше. Глубина резкого видения в плоскости изображения Δf_o в микроскопе – это расстояние выше и ниже плоскости изображения, на котором изображение резкое и в фокусе. Это протяженная область вокруг плоскости изображения, в которой изображение кажется резким. Δf_i прямо пропорционально

$$\Delta f_o \sim M^2/NA \quad (6)$$

Δf_o = глубина фокуса

M = увеличение

NA = числовая апертура

Δf_o относится к размеру изображения и в большой степени зависит от увеличения M , однако она зависит также и от числовой апертуры NA .

В качестве совета – высокое разрешение создает относительно малую глубину резкости в плоскости предмета, большое увеличение создает большую глубину резкости в плоскости изображения – в том числе и по этой причине процедура парфокального выравнивания будет эффективна.

Парфокальность

В обычной световой микроскопии широко известна проблема ограниченной глубины резкого видения: если вы фокусируетесь одним объективом, например, 4x. Изображение может быть нерезким при замене объектива, например, на увеличение 40x. Определение «парфокальность» описывает ситуацию, когда объект остается резким. Парфокальность – это характеристика объективов. Прочтите Блок 5, где объясняется, почему парфокальность является характеристикой высококлассных объективов.

Блок 6: Расширенное фокальное изображение (EFI)

Недостаток глубины резкости в микроскопе – это старая и известная проблема. Собственная глубина резкости микроскопа одновременно способна обеспечить резкость изображения только ограниченного диапазона высоты. Оставшиеся части изображения затем расплываются.

В моторизованном микроскопе, оснащённом моторизованным столиком, весь этот процесс может быть автоматизирован. Контроль над управлением микроскопом, камерой, механизмом перемещения предметного столика и т. д. осуществляется с помощью программного обеспечения. Все параметры передаются в систему изображения через дистанционный интерфейс. С помощью этих данных все настройки микроскопа и камеры могут контролироваться и калиброваться программными средствами. После того, как пользователь определит общее количество изображений, а также максимальную и минимальную позицию столика, он может приступить к выполнению следующих шагов, которые автоматически будут производить настройку микроскопа простым нажатием на кнопку мышки:

1. В первую очередь, пользователь определяет количество изображений в серии фокусов. Используя микроскоп с моторизованным столиком, он должен определить максимальное и минимальное положение предметного столика микроскопа, а также общее количество отдельных изображений, которые он планирует получить.
2. Производится захват определенной серии изображений при разных уровнях фокуса.
3. Далее из этих изображений будет создано составное изображение с точностью до пикселя. Это выполняется посредством извлечения фрагментов изображения в соответствующем фокусе каждого отдельного изображения и соединения их в составное изображение. Большинство этих решений учитывают типичное (обусловленное конструкцией) смещение оптической оси, возникающее при фокусировке, например, стереомикроскопов.
4. «Расширенное фокальное изображение» с практически неограниченной глубиной резкости получено.
5. Теперь пользователь способен создать карту высоты, позволяющую ему восстанавливать трехмерные изображения, например, с целью измерения различий высоты.

Автоматическое получение четких изображений

Давайте вернемся к обсуждению препятствий, связанных с ограничением глубины резкости в плоскости предмета. Чем лучше разрешение, тем меньше будет глубина резко-



Рис. 25: На этом рисунке показано, что можно сделать с изображением монеты. Деталь сингапурской монеты была снята цифровым ПЗС-фотоаппаратом «ColorView» и обработана с помощью выравнивания, расширенного фокуса и программных модулей трехмерных измерений. Снимите и автоматически выровняйте многочисленные компоненты изображения в единое изображение с высоким разрешением, используя модуль MIA. Извлеките самые резкие детали в компонентах изображения и соберите их в единое изображение с бесконечной глубиной фокуса, используя модуль EFI. Наконец, создайте невероятно реалистичные виды, используя информацию о высоте и фактуре, полученную с помощью функций перспективы модуля 3D.

сти в плоскости предмета. Проблема, прежде всего, имеет физическую природу, и ее нельзя обойти никакими настройками оптической системы. Современные стандарты световой микроскопии позволяют наблюдать объекты с максимальным увеличением примерно до 1000x. Глубина резкости в плоскости предмета при этом снижается приблизительно до 1 мкм. Только в этой области образец отображается идеально. Такое физическое ограничение влияет на равномерность глубины резкости в плоскости предмета по всему полю – знакомая проблема при получении изображения в микроскопах. В металлообрабатывающей промышленности при анализе или оценке двухмерных металлографических объектов, таких как, например, образец профиля проката, обычно используется пресс для получения точного прямоугольника, выровненного по оптической оси микроскопа. В этом случае при едином захвате изображение образца для анализа может быть получено резким по всему полю.

Тем не менее, для объектов с отчетливой трехмерной структурой, или при обследовании, например трехмерного износа, при большем увеличении невозможно получить удовлетворительное обзорное изображение средствами стереомикроскопа или микроскопа отраженного света. С помощью микроскопа можно сфокусироваться только на ограниченные области объекта. Ограниченная глубина резкости в плоскости предмета делает захват с сохранением резкости по всему полю изображения невозможным. Эти физические ограничения могут быть преодолены только с помощью цифрового анализа изображения. Неумолимые в обычных ситуациях законы физики здесь можно обойти стороной.

При этом происходит следующее: серия изображений захватывается на различных уровнях фокуса. Затем специальные про-

Блок 7: Виртуальная микроскопия



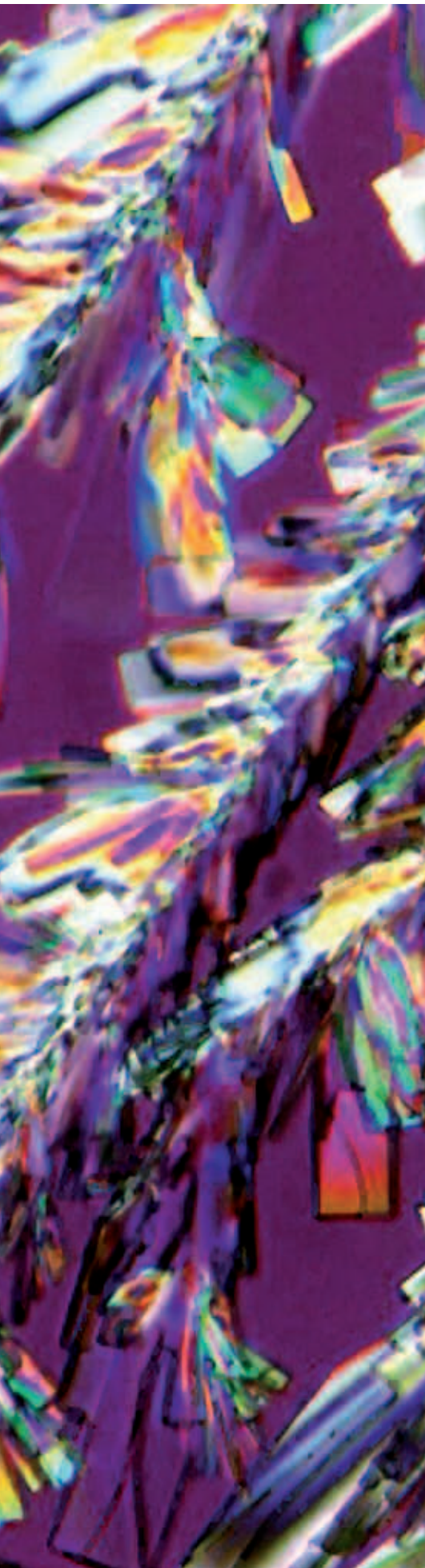
Световая микроскопия является одной из классических технологий создания изображения, используемых в медицинском образовании и для повседневных процедур в патологии, гистологии, физиологии и эмбриологии. Патология использует микроскопы для диагностического исследования образцов ткани с целью определения патологических изменений. Процесс оцифровки позволил достигнуть существенного прогресса в области микроскопии. Тем не менее, цифровая технология до сих пор имеет некоторые ограничения. Одна из проблем заключается в том, что поле обзора всех камер ограничено при любом увеличении. Как правило, невозможно получить полную картинку образца ткани с разрешением, позволяющим проведение дальнейшего анализа. Цифровая виртуальная микроскопия преодолевает этот барьер.

Виртуальная микроскопия является цифровым эквивалентом обычной микроскопии. Вместо наблюдения образца через окуляр микроскопа и его анализа, на монитор передается виртуальное изображение всего препарата («виртуальный слайд») с совершенным качеством изображения. Отдельные компоненты системы (микроскоп, моторизованный предметный столик, ПК, программное обеспечение) оптимально скоординированы между собой и обеспечивают скорость, точность и надежность в использовании. Система Olympus сканирует весь слайд целиком при требуемом разрешении. Режимы работы в интегрированном фокусе гарантируют, что изображение всегда четкое. Получаемые отдельные снимки автоматически сшиваются в большой фотомонтажный снимок («виртуальный слайд»). Весь «виртуальный слайд» может отображаться на мониторе. Детальные сегменты изображения могут выбираться и приближаться или удаляться, также как и при работе с фактическим стеклянным препаратом под микроскопом и с той же эффективностью. При подсоединении к сети Интернет эту процедуру можно выполнять из любой точки мира. Кроме того, пользователи получают в свое распоряжение все преимущества обработки цифровых изображений, включая структурированное веб-архивирование изображений, анализ и документацию результатов.

граммные алгоритмы применяются ко всем изображениям серии и в каждом снимке выделяют сегменты изображения с фокусом и вне фокуса. Сегменты с четким изображением затем собираются заново в единое сфокусированное (резкое по полю и глубине) изображение всего образца (Рис. 24). Кроме того, становится возможным измерение разницы в высоте и производство трехмерных изображений (Рис. 25). Более подробную информацию смотрите в Блоке 6.

Контраст и микроскопия





В темноте все кошки серые

Почему в темноте все кошки серые? Здесь в игру вступает термин «контраст». Контраст относится к разнице интенсивности или цветов в пределах изображения. Детали, находящиеся в границах изображения, требуют разницы в интенсивности или цвете, чтобы их можно было отличить от окружения и общего фона. Давайте сначала ограничим наш обзор изображением на уровне шкалы серых тонов, как на Рис. 26. Глядя на изображение, попробуйте оценить количество серых тонов, которые можно различить – и запомните это количество.

Теперь давайте сравним это количество с другим примером – вы идете в магазин, чтобы купить палитру образцов серых тонов. Все образцы случайно падают на пол и перемешиваются между собой. Сейчас вам придется заново собрать их в правильном порядке возрастания серого цвета – много ли тонов вы можете различить сейчас?

Удивительно, но мы способны дифференцировать приблизительно 50–60 уровней серого цвета – это означает, что уже 8-битное изображение на Вашем мониторе со шкалой из 256 серых тонов предлагает большую возможную дифференциацию, чем способно распознать наше зрение. Образцы серого цвета разных тонов должны иметь разницу в уровне контраста приблизительно 2%, чтобы мы могли их различить. Однако если взглянуть на количество фрагментов изображения (пикселей), представляющих дискретную интенсивность (интенсивность уровня серого или пикселей) в границах распределения интенсивности изображения, мы можем воспринимать и оперировать вариациями контраста и яркости с большей легкостью. Отображения распределения интенсивности или уровня серого цвета называют гистограммами, их подробное описание можно найти в Блоке 8. Такие гистограммы позволяют оптимизировать настройки цифровой камеры и микроскопа так, чтобы воспроизвести все возможные значения интенсивности, имеющиеся в данном образце (Рис. 27). Если доступные значения интенсивности в начальной стадии не изучаются пользователем, они архивируются и уже не могут визуализироваться на дополнительных этапах обработки изображения.

Знакомая картина – контраст в светлом поле

В микроскопии проходящего света в светлом поле контраст образца, главным образом, создается вследствие разных уровней поглощения света – благодаря окрашиванию или пигментам, свойственным образцу (амплитудным объектам). С гистологическими образцами, например, процедура окрашивания сама по себе может изменять уровень контраста в пределах, доступных для создания изображения (Рис. 27). Несмотря на это, выбор подходящего оптического оборудования и установка правильного освещения важны для получения наилучшего контраста.



Рис. 26: Кристаллы Витамина С, наблюдаемые в поляризованном свете.

Когда мы рассматривали выравненное освещение в плоскости предмета, реализованное с помощью принципа Келера (см. Блок 2), мы говорили о том, что в конце этой процедуры апертурная диафрагма должна быть открыта, так, чтобы оставалось примерно 80% числовой апертуры (NA) объектива. Это позволяет обеспечить наиболее оптимальную настройку контраста для зрения. Дальнейшее снижение апертурной диафрагмы приведет к возникновению искусственности снимка и низкого разрешения изображения.

Тем не менее, для целей документирования, апертурная диафрагма может быть установлена на таком же уровне, что и числовая апертура NA объектива – потому что сенсоры используемого фотоаппарата способны оперировать большим количеством уровней контраста, чем человеческое зрение. Для образ-

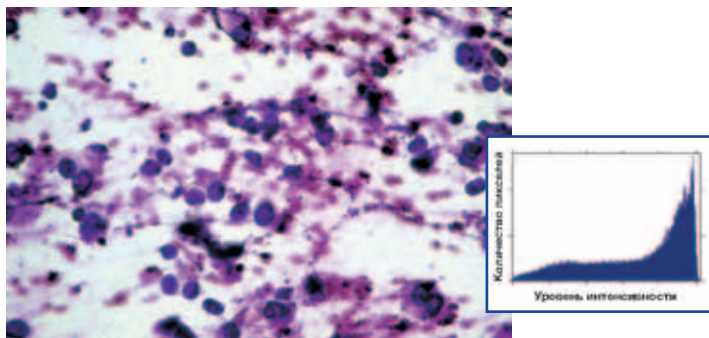
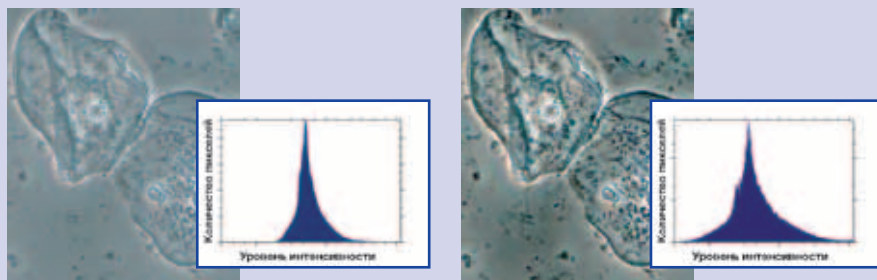


Рис. 27: Гистологическое окрашивание. Клетки, полученные в результате применения трансбронхиальной иглы. Как показывают изображение и гистограмма, общая интенсивность и контраст были оптимизированы.

Блок 8: Оптимизация гистограммы во время съемки

Гистограмма интенсивности отражает распределение интенсивности пикселей в изображении. Значения интенсивности наносятся по оси X и варьируются в пределах от 0 до 255 в сером изображении 8 бит, или 24 бит (3x8 бит) в цветном изображении. Количество пикселей на величину интенсивности показано по оси Y.

Гистограмма интенсивности обеспечивает средства для мониторинга общих характеристик цифрового изображения, таких как его общая интенсивность, контраст, используемый динамический диапазон, возможную насыщенность, фазы образцов и т.д. В этом отношении гистограмма предоставляет более объективный критерий для оценки качества изображения, чем просто его наблюдение (являющееся в некоторой степени субъективным). При воспроизведении в «живом» режиме, гистограмма позволяет оптимизировать и подрегулировать режимы захвата и параметры микроскопа и камеры. Сюда входят регулировка микроскопа, метод контраста, настройки микроскопа, а также требуемое время экспозиции камеры. Таким образом, гистограмма способствует получению изображения более высокого качества и содержащее больше информации.



Показаны: клетки эпителия, наблюдаемые методом фазового контраста: левая сторона, настроенная на низкий контраст, и правая сторона с оптимизированным контрастом микроскопа и фотоаппарата.

Левый рисунок, без сомнения, освещен правильно, однако имеет слабый контраст. Это отображено на соответствующей гистограмме: пик расположен приблизительно в середине диапазона интенсивности (оси X), так что время экспозиции фотоаппарата установлено верно. Однако все пиксели сжаты в среднем диапазоне между 75 и 200, следовательно, используется только половина динамического диапазона фотоаппарата. Регулирование микроскопа (например, яркость освещения) и адаптация времени экспозиции фотоаппарата увеличивают контраст изображения (правый рисунок), а также распределяют интенсивность по всему динамическому диапазону, не уменьшая информацию перенасыщением (смотри соответствующую гистограмму). Здесь становятся заметнее более детальные структуры изображения.

Общее правило

Для получения наилучшего контраста необходимо, чтобы гистограмма интенсивности охватывала весь динамический диапазон системы; однако следует избегать переполнения или перенасыщения на правой стороне гистограммы, т.е. на белых пикселях.

Также можно использовать гистограмму для улучшения качества контраста изображения впоследствии. Однако, в таком случае невозможно увеличить информацию об объекте в изображении, а можно только улучшить его.

цов с недостатком естественной разницы во внутреннем поглощении света, таких как живые клетки (фазовые объекты, Рис. 28), или для образцов, используемых в микроскопии отраженного света, без существенной трехмерной рельефной структуры, полученное изображение обладает слабым контрастом. Чтобы улучшить визуализацию существую-

щих свойств изображения (Рис. 28, исходное изображение), можно применить процедуры по последовательной цифровой оптимизации контраста (Рис. 28, исправленное изображение). Но для того, чтобы визуализировать больше деталей в этих образцах, должны использоваться методы оптического контраста.

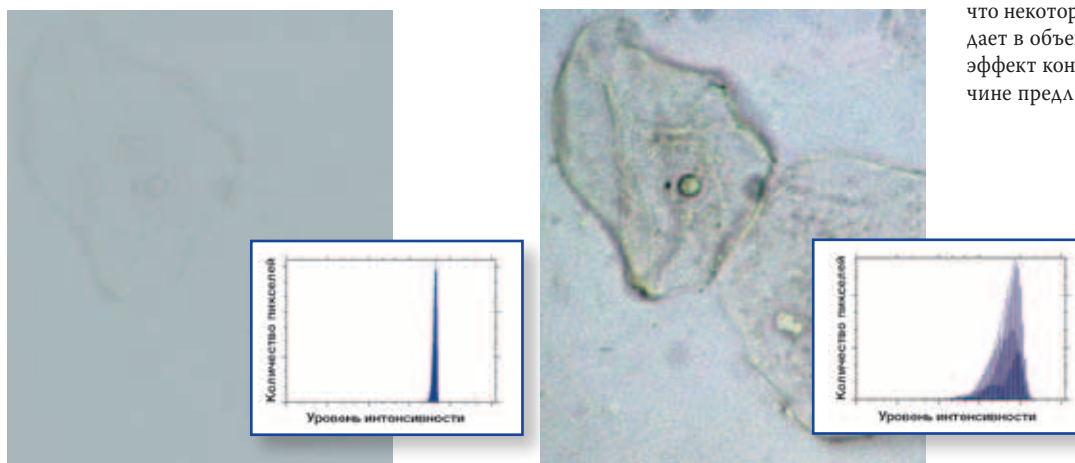


Рис. 28: Изображение в светлом поле живых эпителиальных клеток, взятых из ротовой полости, до и после цифровой оптимизации контраста полученного изображения и соответствующей гистограммы. Для получения более подробной информации смотрите раздел «Улучшаем изображение».

Как звезды на небе – контраст в темном поле

Пыль в воздухе легко разглядеть в луче света, проникающем в затемненную комнату. Это происходит только потому, что частицы пыли преломляют и/или отражают свет, и этот свет перемещается во всех направлениях.

По этой причине мы можем наблюдать свет, исходящий из частицы на темном фоне, даже если сама частица слишком маленькая для разрешения и не показывает соответствующего контраста в условиях дневного света. Этот феномен также используется в микроскопии темного поля (или темного фона). Освещение направляется на образец так, чтобы прямой свет не попадал в объектив. При отсутствии рассеивающей свет частицы, изображение остается темным, а если есть что-то, преломляющее или отражающее свет, эти рассеивающие лучи могут попадать в объектив и проявляться как белые структуры на черном фоне (Рис. 29).

(Смотрите также: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfieldindex.html>)

Темное поле в проходящем свете

В микроскопии проходящего света, включая стереомикроскопию, этот метод создания контраста особенно часто используется для визуализации рассеивающих объектов, таких, как малые живые водные микроорганизмы, или диатомеи и волокна. (Рис. 30). Почти все прямые микроскопы легко оснащаются для освещения в темном поле.

Самый легкий путь создания простого темного поля – это вставка центральной световой заслонки в конденсор. Для установки более яркого освещения или даже темного поля с высоким разрешением требуются специальные конденсоры темного поля (Рис. 29).

Для того, чтобы прямой свет не попадал в объектив, числовая апертура NA конденсора должна быть приблизительно на 15% больше, чем числовая апертура NA объектива. Это противоречит всем остальным методам создания контраста, где числовая апертура NA объектива равна или больше числовой апертуры NA конденсора. Следует помнить, что числовая апертура NA – это число, которое описывает угол, создаваемый конусом света конденсора или объектива. Объектив с высокой числовой апертурой NA, как, например, апохромат, характеризуется большим углом светового конуса и поэтому есть вероятность, что некоторая часть прямого освещения попадает в объектив. Это сразу же уничтожило бы эффект контраста темного поля. По этой причине предлагаются объективы с высокой чис-

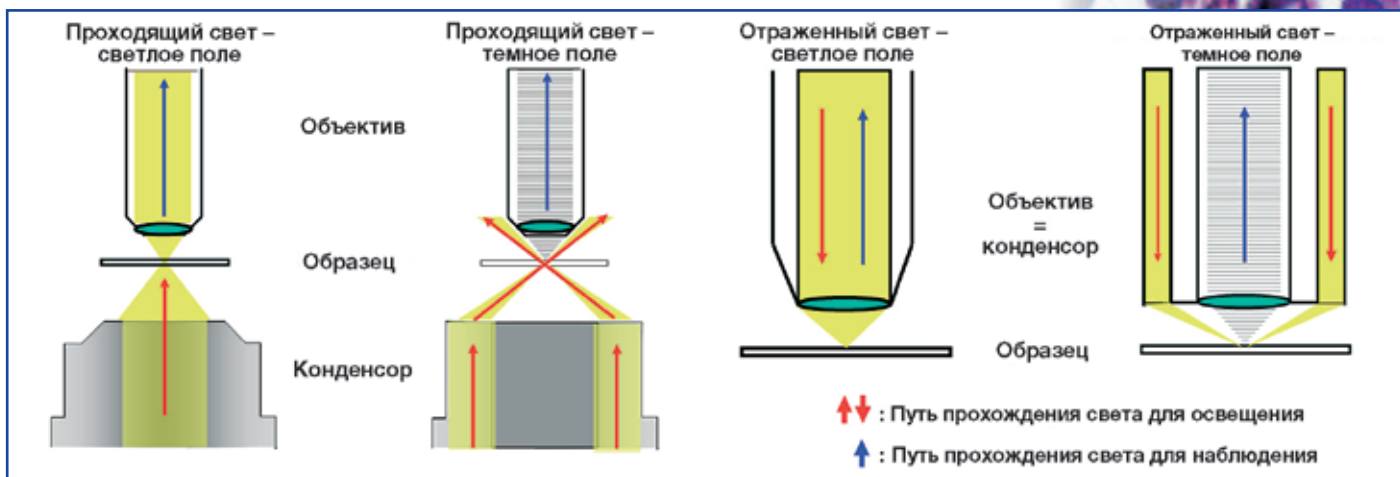


Рис. 29: Путь прохождения света для темного поля в сравнении с установкой светлого поля в проходящем и отраженном освещении.

ловой апертурой NA, имеющие внутреннюю ирисовую диафрагму, которая уменьшает числовую апертуру NA до величины, достаточной для наблюдения в темном поле.

Темное поле отраженного света

В микроскопии отраженного света освещение в темном поле – весьма распространенный метод создания контраста. Он делает видимыми мельчайшие царапины и изменения роста благодаря непрямому, косому, освещению (Рис. 31). Создание отраженного темного поля требует более сложной настройки микроскопа. Центральная световая кольцевая диафрагма, располагающаяся в светоделительном кубе для отраженного света и специальный объектив светлого/темного поля направляют свет через внешнее кольцо на

образец. Через центральную часть объектива проходит только рассеянный свет от образца как формирующее изображение световые лучи (Рис. 29). Такие объективы также могут использоваться для обычного наблюдения в светлом поле или других технологиях, как, например, дифференциально-интерференционный контраст (ДИК) и/или поляризация.

Создание разрушающей интерференции – фазовый контраст

Свет, идущий через ту часть образца, в которой он не поглощается амплитудными объективами, не может создать четкое видимое изображение. Интенсивность света остается той же, однако фаза света изменяется по сравнению с той фазой, где свет просто проходит через окружающие области (среду). Это смещение фазы для культивированных клеток составляет приблизительно четверть длины волны и практически не заметно для глаз. Поэтому для преобразования этой разницы в изменение интенсивности требуются дополнительные оптические элементы. Они соз-

дают контраст, в котором отклоненный и неотклоненный свет составляют половину длины волны фазы, что приводит к разрушающей интерференции. Это означает, что детали клетки кажутся темными на более светлом фоне в положительном фазовом контрасте (см. рисунки к Блоку 8). (смотрите также: www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phaseindex.html).

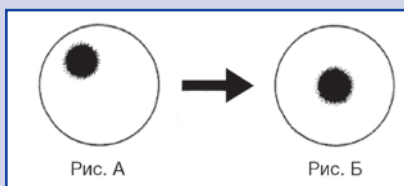
Для микроскопии фазового контраста необходимы два элемента. Один – место в конденсоре для вставки фазового кольца, другой – специальные объективы, которые содержат фазовые пластины. Объективы для фазового контраста имеют зеленую маркировку на корпусе объектива – буквенные обозначения и индикацию размера фазового кольца, например, Ph1, Ph2, Ph3 или PhC, PhL, PhP. В соответствии с этими фазовыми кольцами объективов должны использоваться соответствующие вставки в конденсоре.

Оба элемента расположены в так называемых задних фокальных плоскостях. Они становятся видны при вынудом окуляре и могут быть отцентрированы в процессе оптического

Блок 9: Настройка конденсора

темного поля в проходящем свете

1. Установите в ход лучей объектив 10x и получите резкое изображение образца.
2. Наблюдая в окуляры и используя рукоятку настройки высоты конденсора, аккуратно установить такую высоту конденсора, при которой появится темное круглое пятно (Рис. А).
3. Регулировкой центрировочными винтами конденсора добиться того, чтобы темное пятно переместилось в центр поля видения (Рис. Б). Это завершит настройку.



4. Выберите нужный объектив. Используя рукоятку настройки высоты конденсора, перемещением конденсора добиться отсутствия темного пятна и получения хорошего качества изображения в темном поле.

Блок 10: Настройка фазового контраста

1. Конденсор микроскопа должен находиться в положении, соответствующем принципу Келера
2. Выньте один из окуляров и посмотрите в пустую окулярную трубку визуальной насадки. Установите вместо окуляра центрирующий телескоп (настоятельно рекомендуется применение подобного дополнительного оборудования; в некоторых инвертированных микроскопах уже есть такая функция – например, в модели «Olympus U-B190C» – в бинокулярную насадку встроена дополнительная оптическая система), сфокусироваться на светлое кольцо (цель в виде кольца в конденсоре) и темное кольцо (фазовая пластина объектива), вращая кольцо настройки линзы.
3. С помощью центрировочных винтов для вставки конденсора отцентрируйте световое кольцо конденсора, так, чтобы оно наложилось на темное фазовое кольцо объектива (см. рисунок).
4. Повторите эти шаги для каждого объектива.
5. Снимите центрирующий телескоп и замените его окуляром.
6. Открывайте полевою ирисовую диафрагму по полю видения.



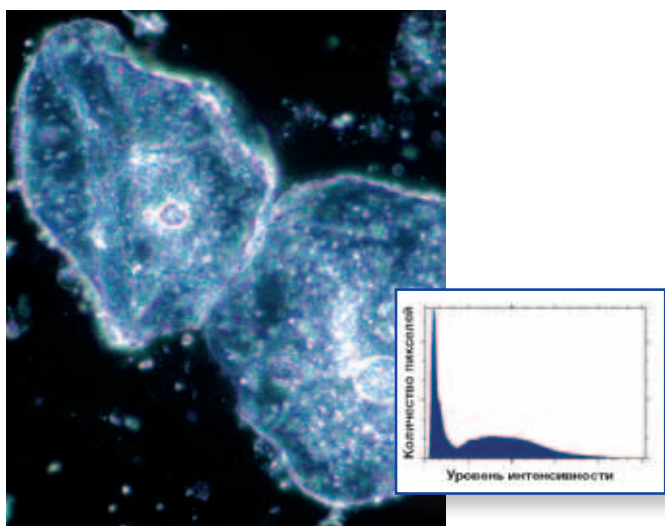


Рис. 30: Эпителиальные клетки с контрастом проходящего темного поля.

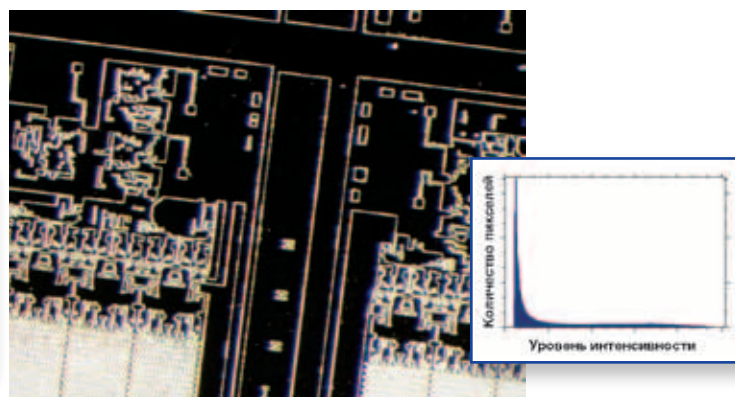


Рис. 31: Пластина с контрастом отраженного темного поля.

контроля (для более качественного наблюдения должен использоваться центрирующий телескоп).

Благодаря оптическим принципам фазового контраста он обеспечивает хороший контраст в проходящем свете при наблюдении неокрашенных тонких образцов. Толщина образца не должна превышать 10 мкм. Для таких образцов фазовый контраст вполне применим, однако более толстые детали и налагающиеся друг на друга структуры создают яркое кольцевое свечение, окаймляющее образец. Этот эффект (гало-эффект) может проявляться с такой силой и иметь столько налагающихся друг на друга сигналов, что в таких ситуациях просто необходимо проведение четкого анализа морфологии образца. Тем не менее, для эксперта может быть достаточно наличие искусственного изображения более толстых структур, чтобы определить, сколько клеток в клеточной культуре подвергаются митозу или риску гибели. На рис. 32 видны яркий окайм-

ляющий гало-эффект, который можно наблюдать вокруг относительно толстых клеточных тел атроцитов, в то время как более тонкие слои хорошо видны в темном фазовом контрасте.

При наблюдении клеток в камере, например, клеток в 24-луночной планшете, клетки, наиболее подходящие для исследования, могут находиться на границе лунки. Эти клетки видимы, но, поскольку из-за границы лунки и эффекта притяжения среды путь прохождения света меняется, то настройки фазового контраста сильно смещаются. Можно повторно отрегулировать фазовые кольца для этого конкретного положения, как описывалось ранее, но потом придется их регулировать снова при смене позиции столика. Поэтому использование специальных вставок «Olympus PHS» вместо РН1 способствует созданию более качественного контраста для много-луночных планшетов, где проблемы с менисками становятся очевидными.

Улучшаем изображение – только для зрительного восприятия

Очень важно выбрать способ создания оптического контраста, соответствующий исследуемому образцу и зависящий от характеристик, которые должны стать видимыми. Все, что мы можем сделать – это лишь выстроить изображение на основе уже существующих свойств образца.

Выбрав наиболее оптимальный способ получения контраста, можно попытаться улучшить изображение. Как правило, эффективен цифровой метод регулировки контраста изображения. Здесь Вы можете поднять как общий уровень контрастности, так и усилить контраст конкретных структур. Что бы Вы ни хотели сделать, Вам необходимо снова прибегнуть к помощи гистограммы, чтобы точно определить порядок действий для улучшения качества изображения.

На Рис. 28 приведен довольно тяжелый для решения пример (слева). Оптический кон-

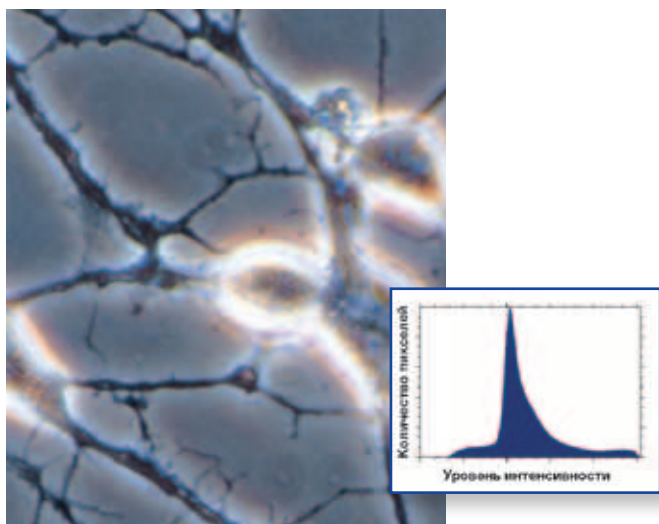


Рис. 32: Астроглициты в фазовом контрасте, обратите внимание: тела клеток окружены светлой каймой (гало-эффект).

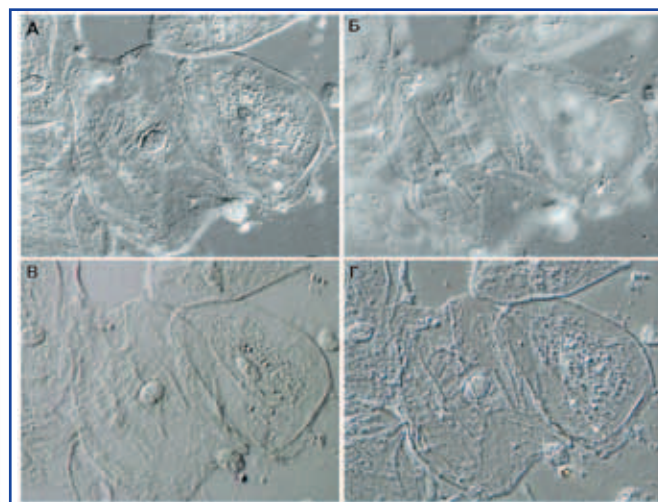


Рис. 33: Эпителиальные клетки, взятые ложечкой с языка и помещенные на предметное стекло. А,Б: ДИК освещение в разных фокусных плоскостях; В: контраст косого освещения; Г: рельефный контраст Olympus PHS в изображении с низкой числовой апертурой.

траст такой слабый, что рельеф клеток почти не заметен. Как показывает соответствующая гистограмма, пиксели группируются в центре гистограммы, указывая на то, что используются только небольшая часть динамического диапазона камеры (значения интенсивности 165–186 из 256). Изображение имеет только 21 разное значение интенсивности. Присутствующие свойства можно визуализировать, распространив гистограмму на весь динамический диапазон с 0 до 255. Эта операция не меняет содержания изображения, однако позволяет, наконец, увидеть, что же там находится (справа).

Распределение доходит до предела, как только в изображении появляется отдельный черный или белый пиксель. В таком случае умеренное сокращение до 3% с левой стороны (темные пиксели) и с правой стороны (светлые пиксели) не приведет к большой потере информации, однако повысит контраст основных характеристик изображения в центральной части диапазона интенсивности. Чтобы выборочно акцентировать свойство особого диапазона интенсивности (так называемой фазы), должна быть определена отдельная функция передачи, которая повышает контраст фазы по отношению к фону и другим фазам. Операции по интенсивности и контрасту изображения обычно выполняются после захвата изображения. Часто контроль камеры с помощью программного обеспечения для анализа изображения позволяет вычислить изображение с распределенным контрастом и отобразить его в режиме реального времени. В качестве альтернативы, контраст может быть установлен вручную на гистограмме в реальном времени, в то время как непосредственные результаты этой настройки будут контролироваться по живому изображению. При любом способе использования гистограммы она представляет собой мощный инструмент сохранения достоверности изображения, а также создания четкой картины физических характеристик образца.

Одного света недостаточно – дифференциально-интерференционный контраст (ДИК)

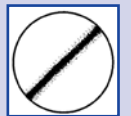
Тот, кому доводилось кататься на лыжах в пасмурный день, знает, что рассеянный свет сильно снижает способность различать перепады уровня снега – и это может вызвать большие проблемы. Источник равномерно распределенного света не создаёт чётких теней, и это приводит к снижению видимости трёхмерных структур. Человеческое зрение приспособлено для различения трёх измерений и достаточно натреновано для восприятия объектов, которые освещены практически из одной точки. Образующиеся при этом области тени и света на поверхности объекта позволяют легко различать и опознавать их. Информацию о высоте и расстоянии человек получает из своего опыта. Таким образом, метод контраста, который отражает различия в структуре в виде определённой комбинации света и тени, кажется очень знакомым и лёгким для восприятия. Структуры в составе объекта могут быть распознаны, даже если они отображаются только в двухмерном режиме, выглядят они трёхмерными.

Блок 11: Как подготовить к работе микроскоп с дифференциально-интерференционным контрастом проходящего света (например, Olympus)

- Настроить освещение в микроскопе по принципу Келера, получив резкое изображение образца (лучше использовать объектив 10x).
- Установить поляризатор (со стороны конденсора) и анализатор (со стороны объектива) на пути светового потока.
- Убрать образец из светового потока.
- Вращать поляризатор до тех пор, пока наблюдаемое поле не станет максимально тёмным (положение скрещенных призм Николя).
- Вставить призму ДИК в конденсор в соответствии с используемым типом объектива, при этом изображение сразу станет ярким.
- Вставить слайдер ДИК со стороны объектива. Величина контраста по методу ДИК регулируется вращением рукоятки точной настройки, расположенной в этом слайдере.
- Оптимальный уровень контраста достигнут тогда, когда фон окрашивается в серый цвет, а образец принимает чёткий псевдотрёхмерный вид.

Другой способ этой настройки:

- Настроить освещение в микроскопе по принципу Келера, получив резкое изображение образца (лучше использовать объектив 10x).
- Установить поляризатор (со стороны конденсора) и анализатор (со стороны объектива), а также призму слайдера на пути светового потока.
- Убрать образец из светового потока.
- Вынуть один окуляр и, наблюдая через центрирующий телескоп, если таковой имеется, вращать рукоятку настройки слайдера, пока не появится черная полоска интерференции (Блок 11 – рисунок).
- Вращать поляризатор, пока черная полоска не станет максимально темного цвета.
- Вставить призму ДИК в конденсор и окуляр для ведения обычного наблюдения.
- Можно произвести точную настройку ДИК-слайдера, чтобы установить значение интерференционного контраста.



Реальные трёхмерные изображения можно наблюдать только в стереомикроскопе, когда два световых пучка двух объединённых микроскопов передают глазу изображение под слегка отличающимися углами. Но это – отдельная тема для обсуждения.

Просто с одной стороны

Использование наклонного освещения является самым простым способом достижения метода контраста, позволяющего получить рельефное изображение: однако, теория наклонного освещения более сложная. Подробные сведения можно найти на странице

www.olympusmicro.com/primer/techniques/oblique/obliquehome.html. Для удобства применения этой методики прямые микроскопы оснащены специальными конденсорами. Наклонное освещение также часто используется в стереомикроскопах для усиления контраста трёхмерной поверхности просто путём освещения объекта с одной стороны. В микроскопах отражённого света это достигается с помощью гибких волокон холодного света или кольцевых светодиодных систем, обеспечивающих воспроизводимое освещение отдельных элементов, которые можно вращать.

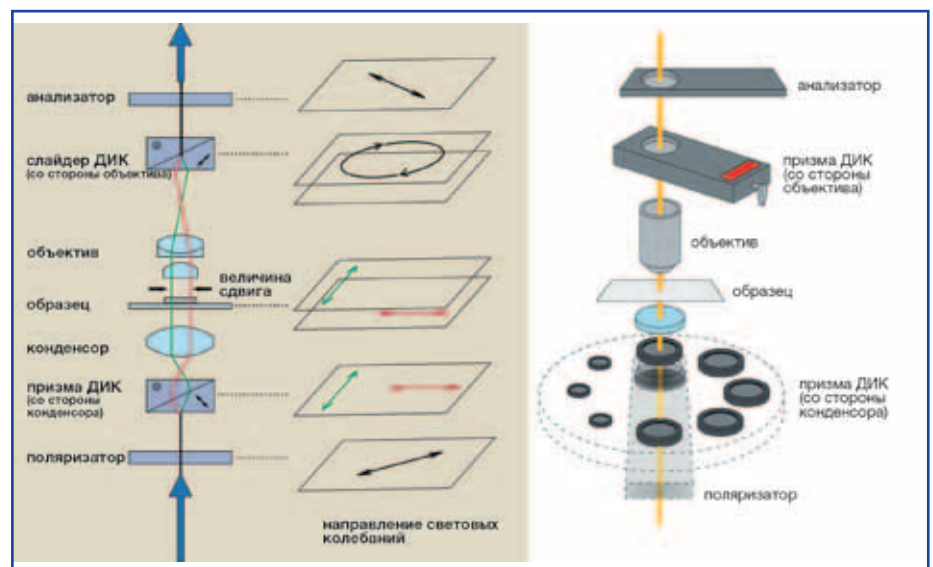


Рис. 34. Простой принцип дифференциально-интерференционной микроскопии (метод Номарского).

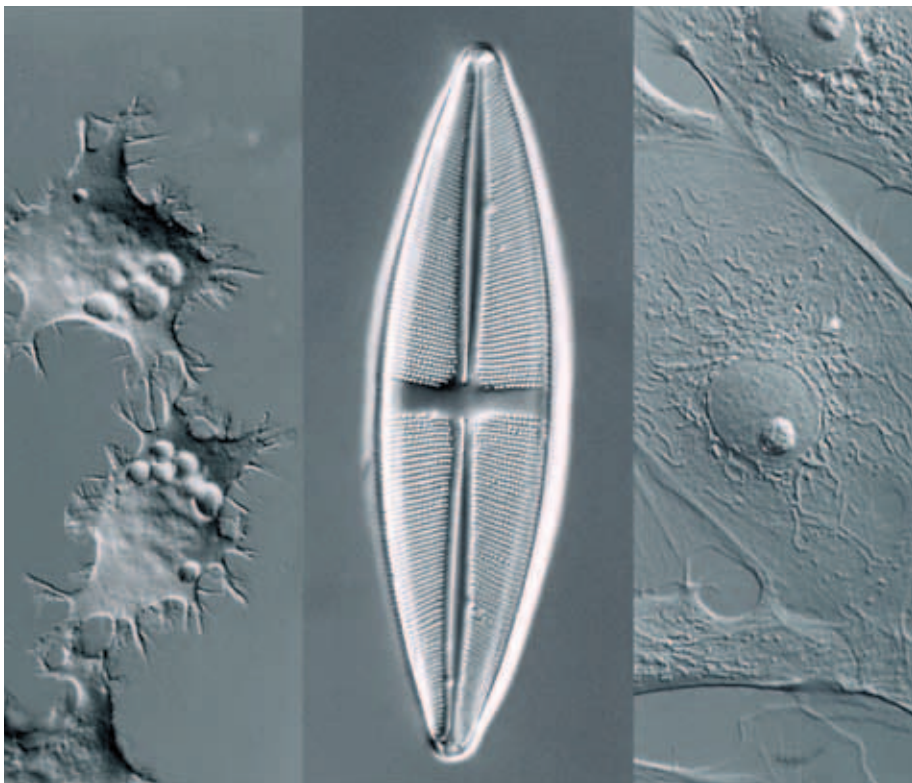


Рис. 35. Изображения образцов с разными значениями сдвига. Слева показаны тонкие клетки NG108, изображение которых получено с помощью комплекта высококонтрастных призм, посередине показано изображение толстого среза диатомеи, полученное с помощью комплекта призм высокого разрешения, а справа представлено изображение клеток PK2, полученное с помощью обычных призм.

Конденсор наклонного освещения в микроскопах проходящего света (например, конденсор наклонного освещения микроскопа Olympus WI-OBCD) оснащен регулируемой щелью, которую можно вращать. После настройки микроскопа по Келеру на пути светового потока устанавливается эта щель, дающая освещение с одной стороны. При этом создается контраст объектов, отличающихся по толщине и плотности. Вращение щели позволяет осветить структуры с любой стороны. Сам контраст достигается за счет полной толщины объекта, а разрешение изображения ограничено вследствие наклона луча (Рис. 33 В).

Чтобы устранить ограничения контраста наклонного освещения, обычно для получения изображений высокого разрешения применяют метод дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) по Номарскому. Преимуществом данного метода является то, что контраст рельефа так же как и изображения создается только в фокальном участке (глубина резкости). Пользователь может оптически разрезать образец большой толщины, изменяя фокус.

На Рис. 33 показаны слои клеток в фокусе, контраст которых может быть ограничен, например, слоем соматических клеток (Рис. 33 А) или поверхностной частью слоя этих клеток (Рис. 33 Б). Кроме того, при использовании инфракрасного излучения (в основном в диапазоне около 700 нм или 900 нм) вместо белого света данная технология позволяет проникнуть очень глубоко в толстые срезы – более чем на 100 мкм. Это часто используется в нейробиологических исследованиях. Метод

ДИК по Номарскому обеспечивает усиление контраста вследствие сдвига фаз при прохождении света через материалы с разными показателями преломления. Подробную информацию о теории использовании метода ДИК можно получить на странице www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dichome.html. В данной работе акцент будет



Рис. 37. Поляризационная микроскопия проходящего света; изменение вида расплавленных химических веществ при просмотре через скрещенные поляризаторы. Снимки любезно предоставил Норберт Юнкер, Olympus Europa GmbH, г. Гамбург, Германия.

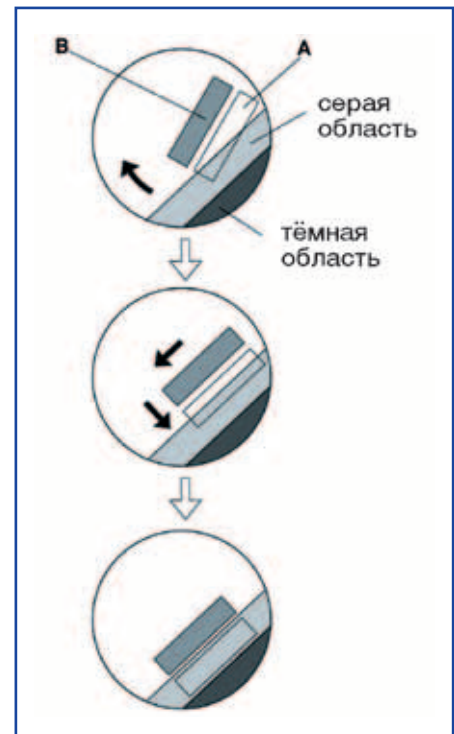


Рис. 36: Настройка конденсора рельефного контраста фирмы Olympus или модуляционного контраста Хоффмана; серая и тёмная области размещаются в объективе, а области А и В помещаются в качестве вставки в конденсор и соответствующим образом юстируются.

сделан на основополагающие вводные положения и практическом применении.

Чтобы получить ДИК изображения проходящего света по Номарскому, необходимы четыре оптических элемента: поляризатор, две призмы и анализатор. Для настройки микроскопа по методу ДИК в отраженном свете требуется только одна призма ДИК (слайдер).

Перейдём к более детальному изучению дифференциально-интерференционного контраста проходящего света. Поляризатор, расположенный между источником света и конденсором, унифицирует направление световых колебаний (Рис. 34). Находящаяся в конденсоре специальная вставка, призма Волластона (соответствующая кратности объектива), расщепляет каждый световой луч на два, которые называются обыкновенным и необыкновенным лучами и располагаются под углом 90 градусов друг к другу. Затем оба световых луча проходят небольшое расстояние отдельно, так называемое расстояние сдвига. По достижении образца скорость луча, проходящего, например, через клетку снижается по сравнению с лучом, проходящим через окружающую среду. В результате образуется фазовый сдвиг между двумя лучами, рекомбинация которых (т.е. расположение лучей в новом порядке) происходит с помощью второй призмы, помещаемой у револьвера объектива. Только эти объединённые с фазовым сдвигом лучи интерферируют таким образом, что создаются колебания в плоскостях, проходящих через анализатор. Чтобы создать псевдотрёхмерное изображение, можно двигать призму, вдвигая или выдвигая ее, тем самым увеличивая фазовый сдвиг (расстояние) между обыкновенным и необыкновенным лучами. В среднем положении фон должен быть темным, а образцы кажутся освещенными одновременно из разных направлений, соответствующих северо-западу и юго-западу. При дальнейшем повороте слайдера в одном направлении появляется типичное трёхмерное изображение образца, при этом освещение будет направлено с северо-запада или с юго-запада. Это наблюдается только в случае, если на пути светового потока не находится какой-либо деполярирующий материал (например, пластик). Следовательно, метод ДИК высокого разрешения неприменим с пластиковыми чашками Петри или многорукочными планшетками. В этих случаях обычно используются другие методы, такие как метод модуляционного контраста Хоффмана или аналогичный метод рельефного контраста фирмы Olympus.

Для метода ДИК не требуются специальные объективы, но призма должна соответствовать применяемому объективу. Для большинства флуоритовых и апохроматических объективов имеются подходящие призмы. Можно подобрать контраст ДИК с оптимальным для каждого случая значением сдвига: высококонтрастная настройка оптимальна для очень тонких препаратов (большое расстояние сдвига, Рис. 35 слева), слайдер со стандартной призмой общего назначения (Рис. 35 справа) и слайдер с высоким разрешением для толстых образцов (небольшое расстояние сдвига, Рис. 35 посередине), таких как зародыши нематоды или полосатой перцины.

Разные имена, один принцип: метод модуляционного контраста Хоффмана – метод рельефного контраста фирмы Olympus

Когда все же требуется высокое разрешение при использовании пластиковых чашек, распространенными методами, применяемыми в инвертированных микроскопах проходящего света, являются метод модуляционного кон-

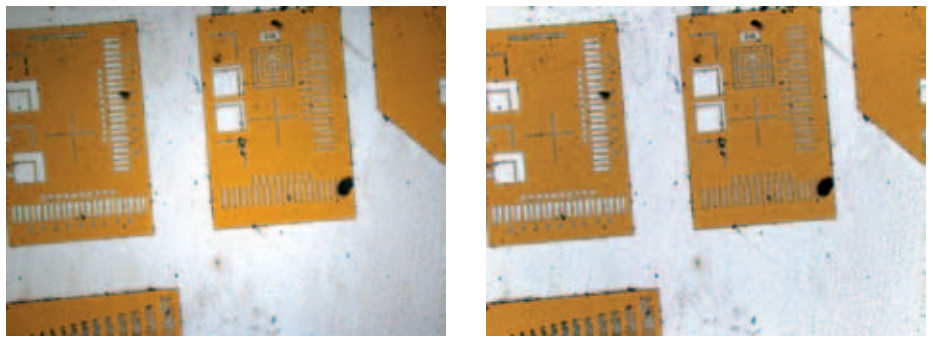
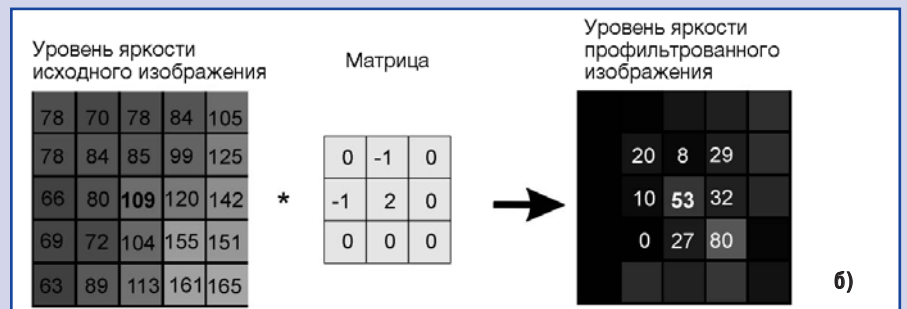
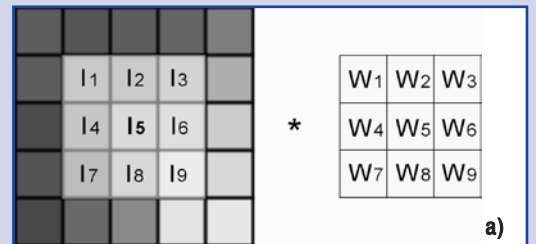


Рис. 38: Светлопольное изображение платы. Слева: ясно различается неравномерность освещения фона. Справа: то же изображение с применением выравнивания фона изображения в реальном времени.

Блок 12: Математическое описание операций обработки изображений

С точки зрения математики, функция обработки изображений является функцией преобразования, применяемой к каждому пикселю исходного изображения в отдельности и создающей новое значение пикселя (яркость/цвет) в результирующем изображении. Функции преобразования можно грубо разделить на точечные, локальные и глобальные операции.

- Точечные операции: результирующий пиксель зависит только от яркости и цвета исходного пикселя и не зависит от координат (x/y) этого пикселя, а также от яркости/цвета соседних пикселей. Контролировать, задавать и выполнять точечные функции можно посредством гистограммы. Все операции с яркостью и контрастом являются точечными. Точнее говоря, точечные операции не являются фильтрами в более узком смысле этого слова.
- Локальные операции: в этих операциях для вычисления нового значения пикселя (яркость/цвет) в расчёт берётся не только сам пиксель, но и соседние пиксели. Например, конволюционные фильтры являются локальными операциями. Многие общеизвестные фильтры шумоподавления, увеличения резкости и усиления контуров являются конволюционными. Для них функцию



преобразования фильтра можно определить как матрицу, включающую целые положительные или отрицательные числа, так называемые весовые коэффициенты. Исходный пиксель находится в центре матрицы. Матрица применяется к исходному пикселю и соседним с ним пикселям для расчёта яркости результирующего пикселя. В качестве иллюстрации смотрите блок 12, рисунок 1 а). Матрица 3x3 содержит девять весовых коэффициентов W1 – W9. Каждый весовой коэффициент перемножается с соответствующим значением яркости I1 – I9 исходного изображения для расчёта яркости центрального пикселя I5 после фильтрации. Конкретный численный пример смотрите в блоке 12, на рисунке 1 б). В дополнение к этому расчёту, поделив полученное в результате значение яркости на нормировочный множитель и сложив его с величиной коррекции, можно убедиться в том, что функция фильтрации не изменяет средней яркости изображения. Весовые коэффициенты матрицы определяют функцию и силу фильтра. Например, матрица 3x3, где все весовые коэффициенты равны единице, создаёт простой средний фильтр, используемый для подавления шума. Фильтры увеличения резкости состоят из матриц с положительным центральным весовым коэффициентом в окружении отрицательных. Ассиметричная матрица на Рис. 43 б) создаёт псевдотопографический контраст в результирующем изображении.

- Глобальные операции: при расчёте яркости результирующего пикселя используются все пиксели исходного изображения с учётом их яркости/цвета и координат (x/y). Примерами являются фильтр нижних частот и полосовой фильтр шумоподавления. Вообще, все фильтры преобразования Фурье являются глобальными операциями.

траста Хоффмана или метод рельефного контраста фирмы Olympus, например, в исследованиях *in vitro* (Рис. 33 г).

По сути, в методе используется наклонное освещение образца, при этом для увеличения контраста учитываются различия показателей преломления в разных частях образца. Это позволяет анализировать полупрозрачные структуры образцов в случаях, когда это сложно сделать с применением методов светопольной микроскопии (смотрите также www.olympusmicro.com/primer/techniques/hoffmanindex.html).

Для данного метода контраста требуется специальный конденсор и объектив. В усовершенствованных системах конденсор оснащён поляризатором и щелевой пластиной (в соответствии с используемым объективом: Рис. 36 области А и Б). В ахроматическом или флуоритовом объективе в задней фокальной плоскости имеется вставка модулятора (Рис. 36, темная и серая область). Щелевая пластина в конденсоре должна быть приведена в соответствие с модулятором в объективе (Рис. 36). Эта операция выполняется путем визуализации данных элементов через сфокусированный центрирующий телескоп (один окуляр вынимается и вставляется телескоп). Получаемый контраст можно регулировать поворотом поляризатора в конденсоре.

Интерпретация изображений, полученных методом ДИК или рельефного контраста, не является интуитивной. Сопоставляя с помощью этих методов разные показатели преломления на образце, создается псевдотрёхмерное изображение. Это означает, что элементы образца, которые выглядят как впадины или возвышения на поверхности структуры (смотрите Рис. 35, левая и правая стороны), могут быть просто участками с различными показателями преломления, и не обязательно отличаются по высоте.

Выше всяких ожиданий: поляризация

С помощью ДИК-приставки в микроскопе исследователям становится доступен совершенно другой метод микроскопии – простая поляризация. В этом случае призмы не используются и требуются только первые операции по установке поляризатора и анализатора в скрещенном положении (смотрите блок 11). Такая установка формирует темное изображение, поскольку направление колебания света, проходящего через образец, точно совпадает с направлением колебания, полностью блокируемого анализатором. Однако, если образец содержит материал, отклоняющий свет, эта часть светового потока может пройти через анализатор и обнаружится как яркое пятно на темном фоне. Примерами таких анизотропных материалов являются кристаллический витамин С, масляные эмульсии, скелетные мышцы, кристаллы уратов (обследование на подагру), амилоид, камни и минералы, а также металлические поверхности или сама призма ДИК. Список очень длинный, и часто сочетание простой поляризационной микроскопии и ДИК может обеспечить более детальный анализ образца только за счет использования уже имеющихся узлов в микроскопе. Помимо всех аналитиче-

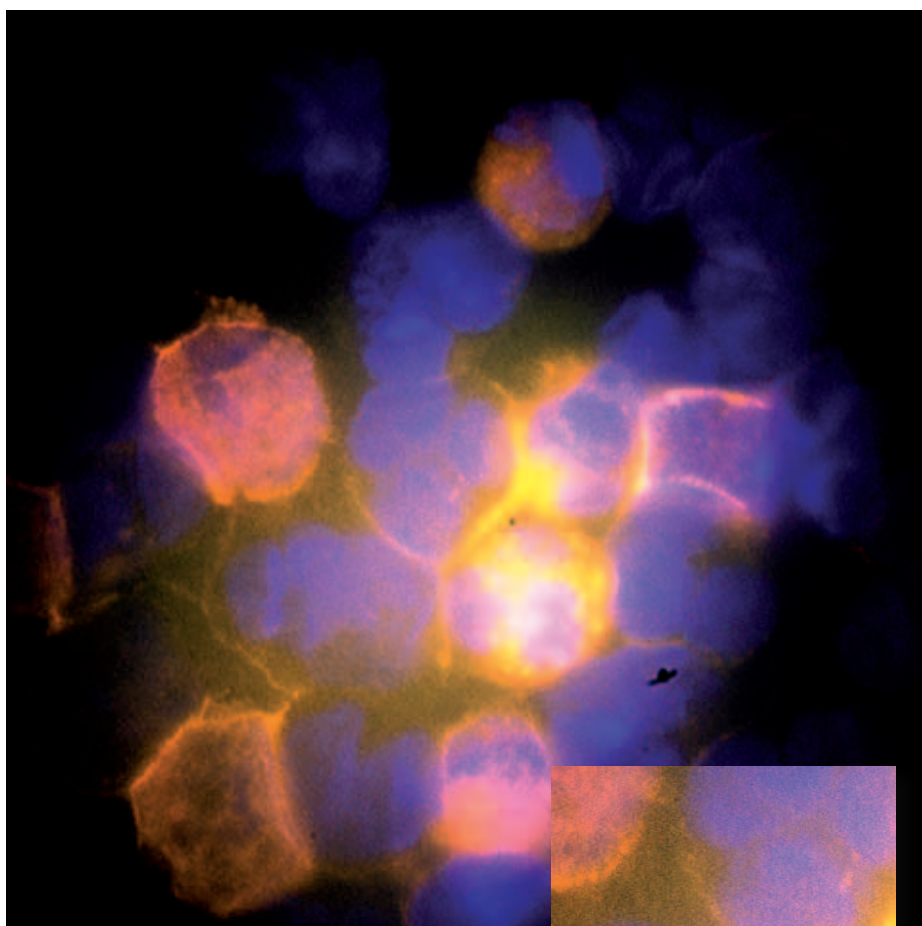
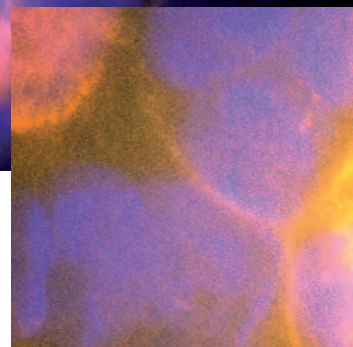


Рис. 39: Флуоресцирующее изображение стволовых клеток. Уровень шума лучше проявляется на детализированном изображении.



ских преимуществ, поляризационная микроскопия также дает высокое «чистое» качество изображений (Рис. 37).

Выявление структур с помощью методов фильтрации изображений

Наконец, выбран подходящий метод контраста для микроскопа и произведены оптимальные настройки камеры. На этом подготовительная работа заканчивается, и можно приступить к использованию методов цифрового фильтра и обработки изображений. Далее приводятся более подробные разъяснения по этому поводу.

Тонкая грань

С помощью обработки изображения на фотографии обычному лицу можно придать невероятную красоту или создать образы, которым нет аналогов в реальном мире. Учитывая это, цифровую обработку изображений часто сравнивают с манипуляцией результатами. Возможно, многие микроскописты действительно наслаждаются изумительной красотой невидимой природы, отраженной в получаемых ими изображениях, но в повседневной

работе упор делается на фактическую информацию в изображении. Однако, на эту информацию могут накладываться дефекты, создаваемые при подготовке образца, условиями освещения, установочными параметрами камеры или параметрами отображения. И здесь вступают в свои права методы фильтрации. В зависимости от причины обработки изображения, для выявления новой информации или для усиления четкости изображения наблюдаемых деталей может применяться широкое разнообразие операций обработки. Какого рода дефекты могут встречаться на цифровом изображении? Дефектные цифровые изображения могут выглядеть слабоконтрастными, неравномерно освещенными, неправильно окрашенными, расплывчатыми, смазанными, искаженными, «грязными» и т.д. Эти искажения могут придать изображениям непрофессиональный вид. Но, помимо этого, они могут осложнить, а иногда даже сделать невозможным применение любой программы автоматических измерений, основанной на пороговых значениях или распознавании контуров.

Многие из этих дефектов могут быть устранены использованием соответствующего метода цифровой фильтрации. Часто для

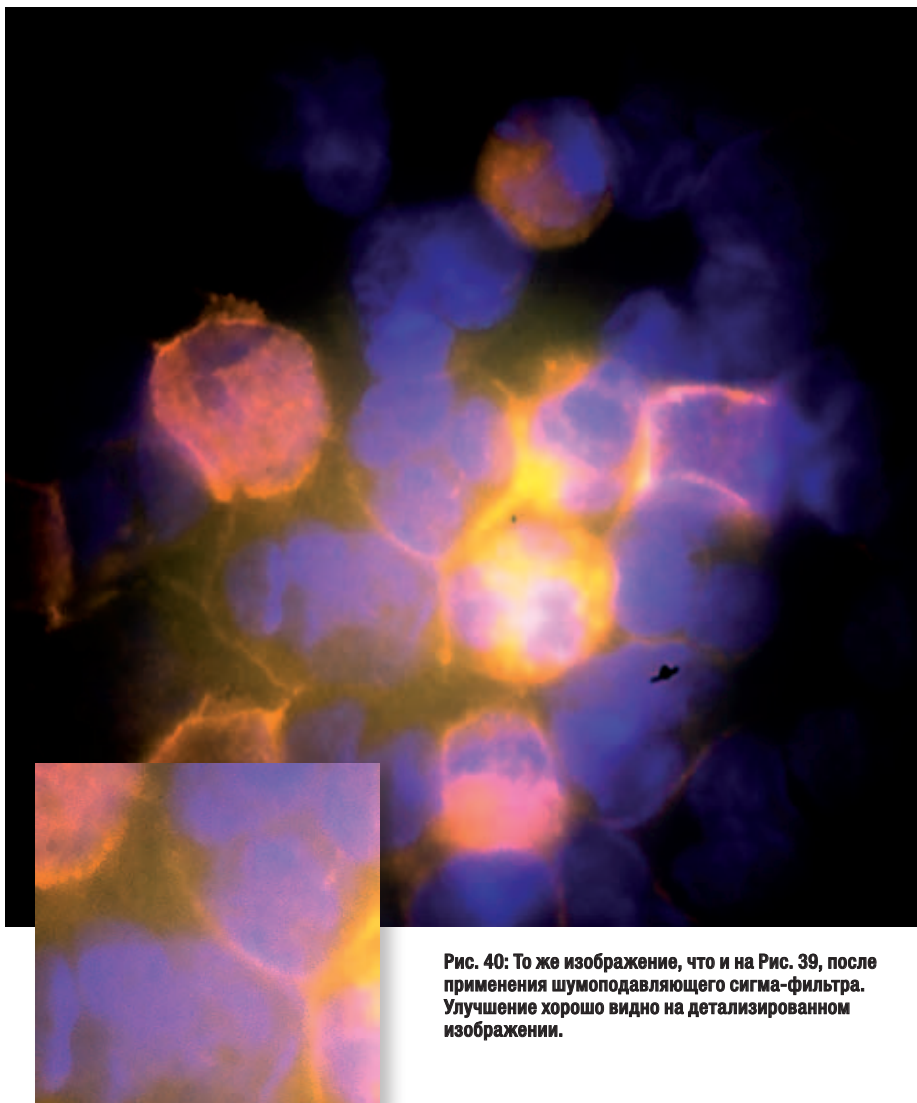


Рис. 40: То же изображение, что и на Рис. 39, после применения шумоподавляющего сигма-фильтра. Улучшение хорошо видно на детализированном изображении.

исправления качества изображения подходит несколько различных фильтров. Не всегда просто выбрать лучший метод и значения параметров, чтобы убрать дефекты изображения, не разрушая информации «истинного» изображения. Это тот высочайший стандарт, которому должен соответствовать оптимальный фильтр: устранять дефекты изображения, сохраняя на нем структуры образца. Эта цель не всегда достижима. Часто при обработке изображений тонкая грань отделяет то, что необходимо сделать, и то, что хорошо было бы сделать. К тому же, тонкая грань пролегает между научным совершенством и творческим созиданием!

Сейчас или позже – оба варианта возможны

Обычно цифровая обработка изображения применяется после получения и сохранения изображения. Но в новейших системах обработки изображений поддерживается функция «прямой цифровой обработки изображений». Это означает, что многочисленные функции могут выполняться в реальном времени на этапе получения изображения. К ним относится гистограмма он-лайн для контроля

яркости и контрастности изображения. Кроме того, сама функция гистограммы может использоваться для автоматического улучшения контрастности изображения или оперативной установки его вручную (смотрите блок 8 о пользовании гистограммой и улучшении контрастности изображения). Другой функцией, применяемой в режиме реального времени, является функция баланса белого, которая позволяет скорректировать цветовые сдвиги в момент получения изображения. Неравномерность освещения образца также может быть исправлена непосредственно при получении изображении с помощью функции выравнивания фона он-лайн. Описание приводится далее. Функции улучшения контрастности, баланса белого и выравнивания фона можно применять как во время получения изображения, так и после этого. Это, выражаясь математически, точечные функции (смотрите блок 12). Поэтому они подходят для устранения дефектов изображения без нарушения самой сути изображения.

Где свет, там и тень

Одним из важных источников искажения изображения в световых микроскопах является

колебание яркости в связи с условиями освещенности на краях поля изображения или неоптимальной настройкой микроскопа. Дефекты неравномерного освещения могут также проявляться в условиях обычного наблюдения при использовании объектива с малым увеличением и/или в сочетании с малым увеличением фотоадаптеров. При этом затемняющие дефекты проявляются в виде кольцеобразной тени, которая ближе к краям изображения становится еще темнее (Рис. 38, слева). Незначительное затемнение фона необходимо устранить. Применяемая для этого функция называется коррекцией фона, плоскостной коррекцией или функцией выравнивания фона (простое описание коррекции фона можно загрузить с сайта www.mic-d.com).

Лучшим способом является запись фоновое и темное изображений в дополнение к «сырому» изображению образца. В фоновом изображении имитируется профиль фонового освещения, в то время как темное изображение создает эффект уровня шума камеры. Преимущество этого способа состоит в том, что данные изображения получают независимо от изображения образца. Фоновое изображение обычно получают, отодвинув, например образец с гистологическим препаратом и покровным стеклом, оставив в ходе лучей пустое место.

Если это невозможно, тот же результат можно получить, оставив образец на месте и расфокусировав микроскоп. Важно, чтобы в фоновом изображении не присутствовало никакого мусора. Темное изображение получают, делая снимок с закрытым затвором камеры. Необходимо установить то же время экспозиции, что и для снимка образца.

С помощью алгоритма выравнивания фона сначала из изображения образца (d), а также из фоновое изображение (s) вычитается темное изображение (b). Затем скорректированное фоновое изображение делится на скорректированное изображение образца: $(s-d)/(b-d)$. Имеется также возможность автоматического выполнения этой процедуры на этапе получения изображения. При этом для каждого объектива микроскопа необходимо только один раз получить фоновое и темное изображения, используя стандартный образец и стандартные параметры съёмки. Изображение на Рис. 38 (справа) было получено таким образом.

Если фоновое и темное изображения отсутствуют, выравнивание фона возможно также на самом изображении образца. Например, благодаря очень сильному сглаживающему фильтру, происходит усреднение всех структур и выявление фона. В качестве альтернативы можно применить многомерную поверхностную функцию для соответствия параметрам освещения фона.

Слишком много шума

Случайный шум может оказаться досадной помехой, которая возникает, когда уровень сигнала образца низок и/или был применён высокий коэффициент усиления. На Рис. 39 представлен пример из флуоресцентной микроскопии. В стандартных изображениях оптической светлопольной микроскопии слу-

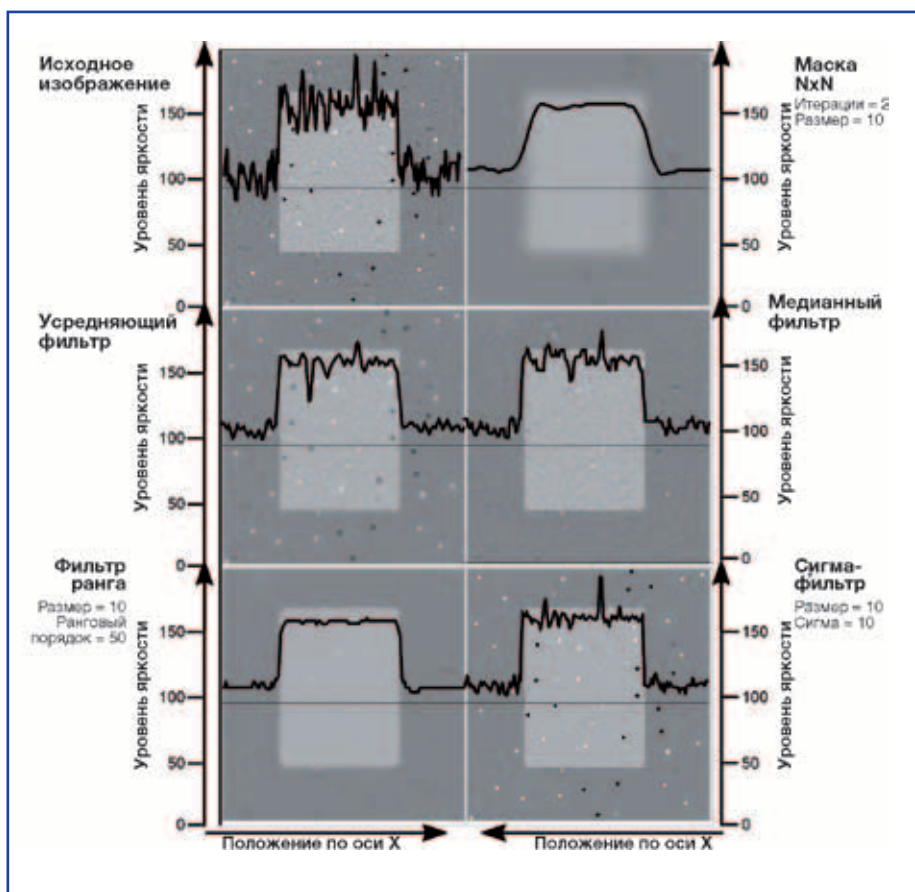


Рис. 41: Разные сглаживающие фильтры в сопоставлении. Дальнейшие объяснения смотрите в тексте.

чайный шум обычно незаметен. Но он часто обнаруживает себя при применении к изображению фильтра, увеличивающего резкость. В качестве примера рассмотрим Рис. 42, первый и второй снимки. Существуют разные сглаживающие фильтры для устранения шума. Сглаживающие фильтры применяются еще и для подавления дефектов изображения, которые являются следствием мелких помех, таких как грязь, пыль, мусор или царапины. Задача состоит в том, чтобы найти такой фильтр, который устранил шум и дефекты изображения, не слишком сильно сглаживая контуры объекта.

На Рис. 41 показано искусственно созданное изображение только с одной реальной структурой: простой прямоугольник света на темном фоне. На эту структуру были наложены два различных вида искажения: с одной стороны, сильный статистический шум, с другой – так называемые горячие пиксели, или дробовой шум. Дробовой шум представляет собой отдельные яркие и темные пиксели и может возникать по причине дефекта фотокамеры. Эти пиксели также являются отражением дефектов вследствие присутствия частиц пыли, грязи, мусора или мелких царапин.

Шумоподавляющие фильтры изображения являются локальными, или соседними операциями, т.е. для расчета нового значения пикселя в результирующем изображении принимаются во внимание соседние пиксели (смотрите также блок 12). Усредняющий фильтр и

фильтр с маской $N \times N$ просто сглаживают все и таким образом также расширяют структуру прямоугольника (Рис. 41). Чем более сильный сглаживающий эффект производится, тем более заметна морфология объекта на корректируемом изображении. Дробовой шум не устраняется. В то время как в среднем фильтре применяются фиксированные установочные параметры, степень усреднения фильтра $N \times N$ зависит от заданных параметров.

Сигма-фильтр, или фильтр «размывка по Гауссу» является специальным усредняющим фильтром, который не оказывает воздействия ни на какие пиксели, сильно отличающиеся от окружающего их участка (Рис. 41). При этом «реальные» структуры и контуры, такие как прямоугольник, не затрагиваются, а случайный шум исчезает. Сигма-фильтр предпочтителен для избирательного устранения статистического шума без значительного расширения структуры образца (смотрите также пример на Рис. 40).

Медианный и ранговый фильтры в значительной мере устраняют дробовой шум (Рис. 41). Они особенно подходят для подавления пыли и грязи, и, в целом, всех мелких структур, выделяющихся на фоне. Сравнивая результаты воздействия разных сглаживающих фильтров на искусственное изображение образца (Рис. 41), можно отметить, что лучшим способом устранения двух разных видов искажений изображения является последовательное применение двух фильтров: сначала применяется сигма-фильтр в отношении ста-

тистического шума, а затем ранговый фильтр в отношении дробового шума. Отсюда следует отчасти философское правило, гласящее, что не следует пытаться решить сразу всё, лучше разбить задачу на части и искать соответствующее средство для решения каждой части в отдельности.

В фильтре с маской $N \times N$, сигма-фильтре и ранговом фильтре имеются задаваемые пользователем параметры управления, которые позволяют оптимальным образом регулировать эффект сглаживания изображения. Альтернативным способом устранения статистического шума, обычно с фиксированными параметрами, дающим действительно хорошие результаты, является фильтр низких частот. Этот фильтр является глобальной функцией (смотрите блок 12), отсеивающей искажения высоких частот и периодические искажения. При этом, однако, происходит некоторое расширение контуров. Но еще эффективнее действует полосовой фильтр, который устраняет шум, сохраняя при этом крутизну контуров.

Выявление деталей

Другим классом фильтров с прикладной точки зрения являются фильтры повышения резкости. Фильтры повышения резкости усиливают мелкие детали изображения. После обработки таким фильтром изображение становится более резким. Но необходимо весьма осторожно использовать фильтры повышения резкости, поскольку при чрезмерном применении они сами могут создавать дефекты. Установленные фильтры повышения резкости являются локальными, или соседними операциями, как и сверточные фильтры (смотрите блок 12). В современных фильтрах используются так называемые алгоритмы нерезкой маски (смотрите Рис. 42). Повышение резкости первого, исходного изображения, дает второе изображение. К сожалению, усиление происходит не только в отношении элементов образца, но и шума в исходном изображении. Таким образом, операция повышения резкости делает заметным шум. Кроме того, параметры фильтра были заданы слишком высокими, так что «слоистые» структуры диатомеи выглядят искусственно. При использовании фильтра повышения резкости необходимо иметь в виду следующее: часто, прежде чем применять к изображению фильтр повышения резкости, необходимо использовать шумоподавляющий фильтр. Следует осторожно применять любой фильтр повышения резкости с устанавливаемыми пользователем параметрами. В них часто «меньше» значит «больше». На третьем снимке Рис. 42 показан результат устранения шума посредством использования сигма-фильтра и последующего умеренного повышения резкости.

Фильтр УДК – это специальный фильтр повышения резкости и входит в состав программных решений обработки изображений фирмы Olympus. УДК значит усиление дифференциального контраста. Фильтр УДК усиливает слабые различия по контрастности. Он усиливает избирательно взятые из соседних пикселей меньшие модуляции яркости, оставляя неизменными модуляции большей ярко-

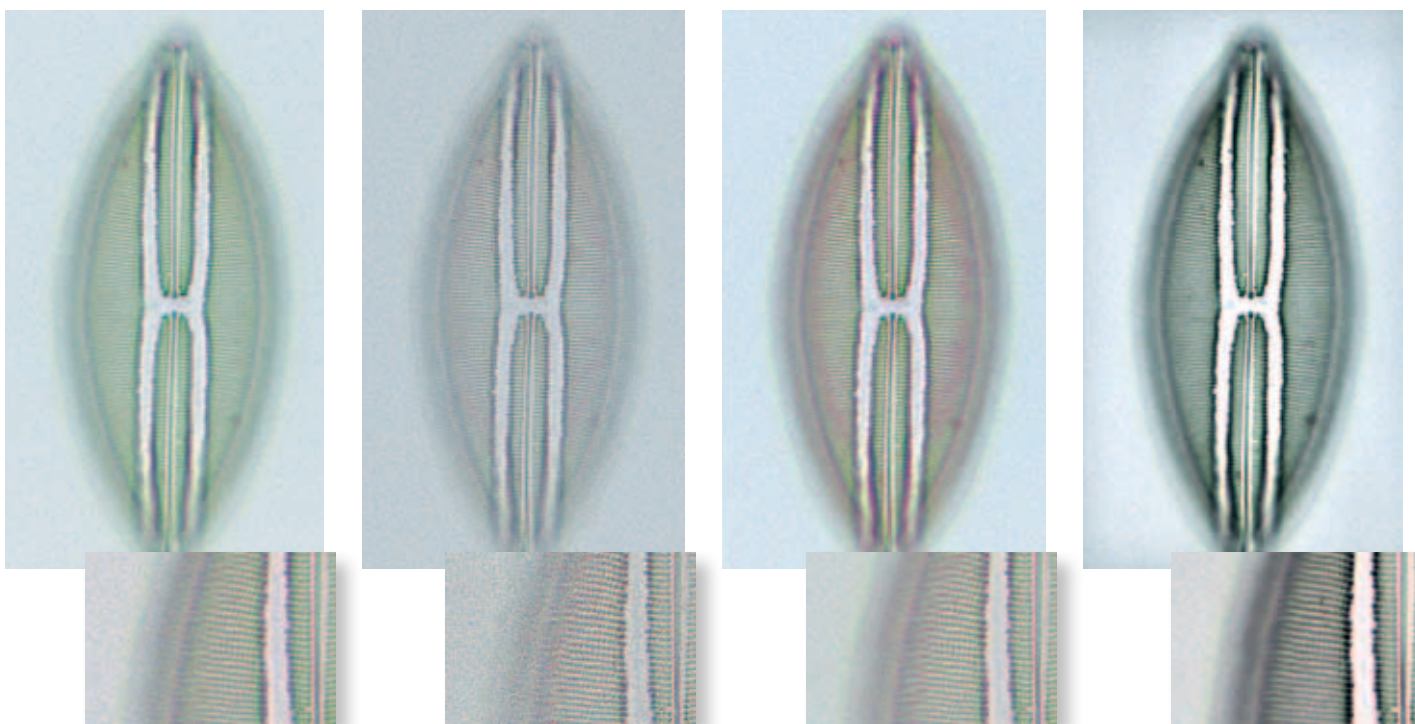


Рис. 42: Светлопольное изображение диатомей: (а) исходное изображение; (б) после применения фильтра сильного повышения резкости, вызвавшего увеличение шума; (в) после применения шумоподавляющего сигма-фильтра и фильтра умеренного повышения резкости; (г) после применения шумоподавляющего сигма-фильтра и фильтра повышения резкости УДК.

сти. Таким образом, фильтр УДК делает видимыми слабо различимые детали исходного изображения. Фильтр работает тем лучше, чем больше в изображении мелких деталей. Результирующие изображения более подробные и выглядят более сфокусированными. Смотрите в качестве примеров Рис. 42, последнее изображение, и оба изображения на Рис. 43.

Подведем итоги

Суммируя сказанное ранее, некоторые функции обработки изображений имеет смысл или даже необходимо применять к изображениям либо в реальном времени, либо после получения изображения. Эти функции устраняют искажения и готовят изображение к выполнению автоматических измерений или просто

улучшают изображение. Нижеследующие этапы представляют возможную стратегию цифровой обработки изображения после его получения (смотрите также: www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/imageprocessingsteps.html)

1. Выравнивание фона для коррекции неравномерного освещения фона.
2. Улучшение контрастности для оптимизации яркости и контраста.
3. Баланс белого для коррекции цветовых сдвигов.
4. Сглаживание для устранения случайного шума и подавления дробового шума и мелких дефектов, таких как пыль и грязь.
5. Повышение резкости для усиления мелких деталей контура.

Здесь указаны немногие из широкого спектра возможных операций фильтрации. Есть многие другие, выходящие за рамки научного применения и превращающие простое изображение видимой реальности в создание оригинальных, забавных, интеллектуальных и красивых композиций.

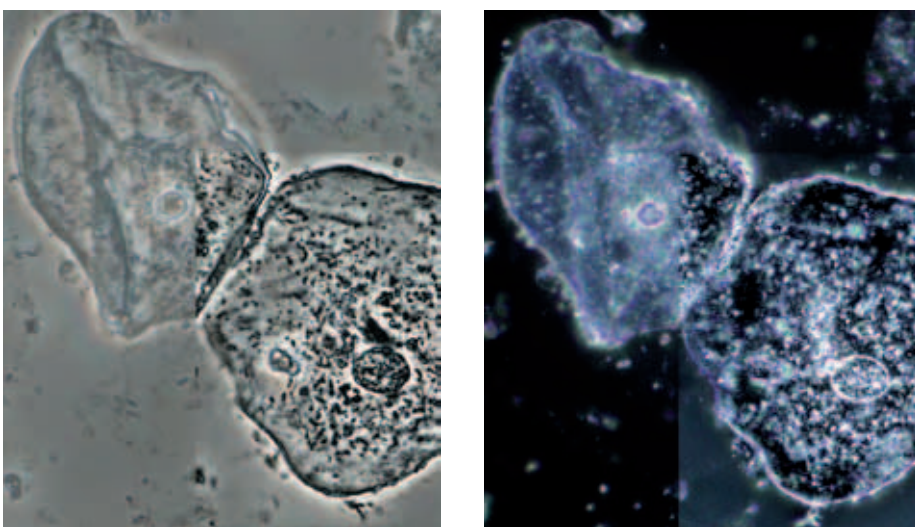
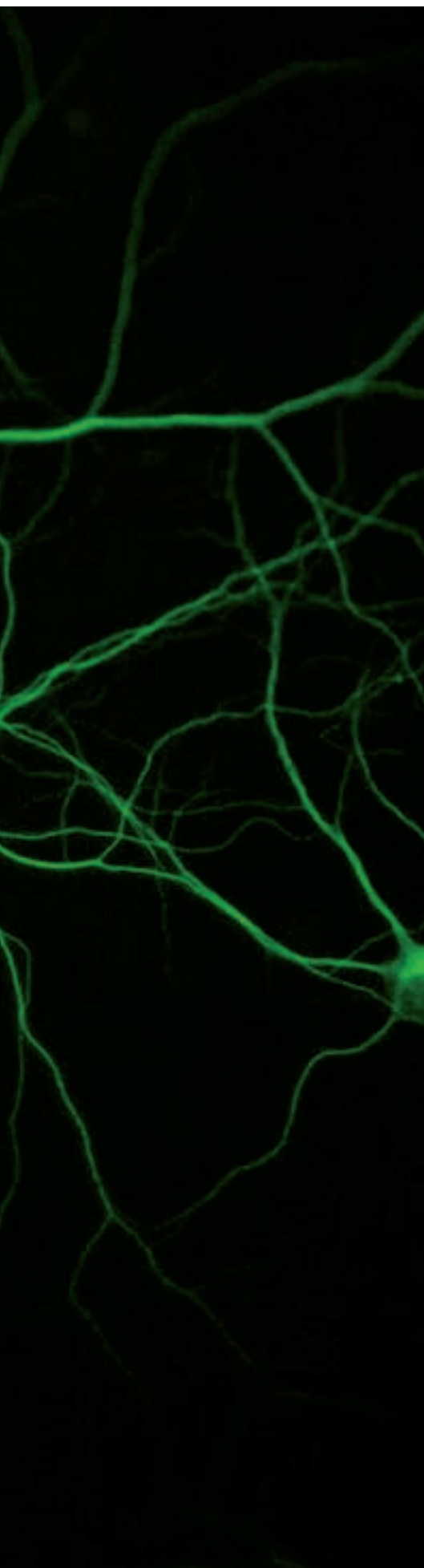


Рис. 43: Изображение эпителиальных клеток с использованием фазового контраста (слева) и контраста темного поля проходящего света (справа). Исходные изображения, ранее уже показанные в блоке 8 и на Рис. 30, получены с применением оптимизированных установочных параметров микроскопа. Нижние правые части каждого из изображений были обработаны фильтром УДК.

Сверкающая Флуоресценция





Первое знакомство

В большинстве недавно разработанных методов микроскопии применяется флуоресценция. Флуоресцентная микроскопия – это нечто большее, чем «просто создание цветных изображений в одном, двух, трёх или даже более цветах». Это чрезвычайно мощный инструмент для проведения исследований в области биологии. Флуоресцентные методы дают многочисленные преимущества ученым, желающим использовать верхние границы чувствительности и разрешения в микроскопии. Помимо научных преимуществ, просто изучение флуоресцентных изображений может иногда дать новое понимание реальности, обычно скрытой от взгляда человека.

Основные положения: паразитическое и продолжающееся развитие

В течение нескольких последних десятилетий многочисленны новые методики, такие как конфокальная микроскопия, деконволюция, визуализация относительной флуоресценции, микроскопия полного внутреннего отражения, и применение флуоресцентных белков (например, зелёный флуоресцентный белок – GFP) положили начало настоящему возрождению в области микроскопии. Во всех этих методах используется явление флуоресценции, которое в 1852 г. впервые наблюдал сэр Джордж Габриэль Стокс, и которому в 1935 г. Александр Яблонский дал физическое определение (смотрите блок 13). В 1990 г., в отличие

подобные вопросы. Они помогают ответить на специальные вопросы, касающиеся образцов из области бионауки или материаловедения, и предоставить результат в определённом цвете. Например, чтобы выявить распределение конкретного белка в ткани, можно использовать флуорохром, помечающий белок с помощью антитела (иммуногистохимия).

У методов гистологического окрашивания в оптической микроскопии проходящего света длинная предыстория. Одним важным преимуществом флуоресцентной микроскопии является само наличие флуоресцирующих молекул. Даже если структура слишком мала для разрешения оптического микроскопа, излучаемый свет остаётся видимым.

Флуоресцирующие молекулы выступают в качестве источников света, расположенных в определённых участках образца и обозначающих их местоположение свечением определённого цвета. Чтобы испускать свет, этим индикаторам требуется энергия, и флуорохром получает её через фотовозбуждение от источника света микроскопа. Для возбуждения свечения конкретного флуорохрома необходим определённый диапазон длин волн. Например, свечение флуорохрома FITC возбуждается голубым светом с длиной волны около 480 нм. Это предполагает использование двух различных световых лучей и необходимость их разделения. С одной стороны, надо направлять свет от источника света на образец, с другой необходимо наблюдать свет, исходящий из флуорохромов. Такое разделение возможно благодаря «сдвигу Стокса», свидетельствующему о том, что длина волны

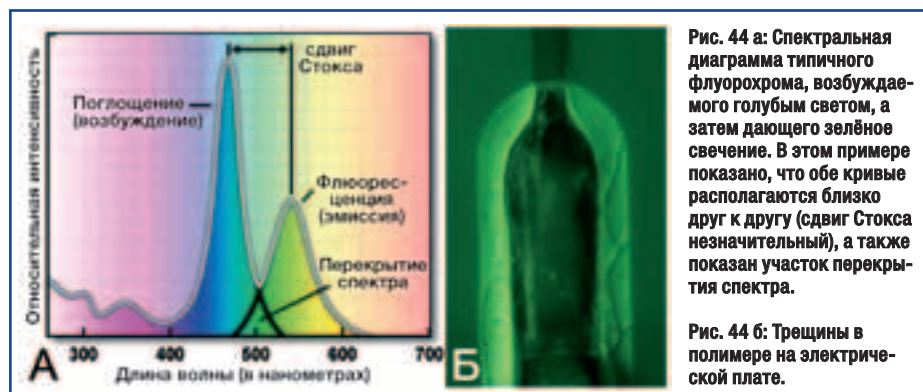


Рис. 44 а: Спектральная диаграмма типичного флуорохрома, возбуждаемого голубым светом, а затем дающего зелёное свечение. В этом примере показано, что обе кривые располагаются близко друг к другу (сдвиг Стокса незначительный), а также показан участок перекрытия спектра.

Рис. 44 б: Трещины в полимере на электрической плате.

от нашего времени, в широком применении было лишь небольшое количество флуорохромов. Например, сейчас во флуоресцентной микроскопии широко используется набор светофильтров флуорохрома FITC, который также может использоваться для большого количества различных флуорохромов с зелёным спектром излучения.

Для чего используется флуоресценция?

Использование флуоресценции можно сравнить с ситуацией, когда учитель спрашивает, выполнили ли ученики домашнее задание. Быстрая смена красок на лицах «провинившихся» даёт убедительные «свидетельства». Однако, методы флуоресценции в действительности предназначены не для ответа на

флуоресценции (излучения) всегда длиннее, чем длина волны света возбуждения. Таким образом, при использовании для возбуждения голубого света будет получено зелёное излучение флуорохрома FITC. У каждого флуорохрома свой собственный спектр возбуждения и излучения. Оснащение микроскопа должно быть идеальным, чтобы полноценно отображать флуоресценцию.

Флуоресцирующие молекулы

Есть два варианта использования флуоресцентной микроскопии в зависимости от предмета исследования: либо сам образец уже содержит флуоресцирующие молекулы, либо в образец необходимо добавить специальные флуорохромы. Автофлуоресценция широко встречается среди таких материалов, как

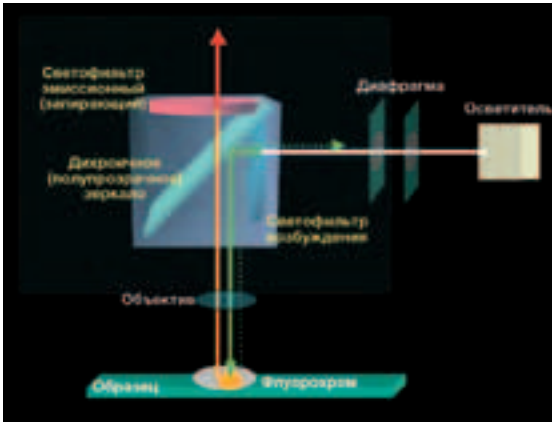


Рис. 45: Световой путь в микроскопе для флуоресцентных исследований

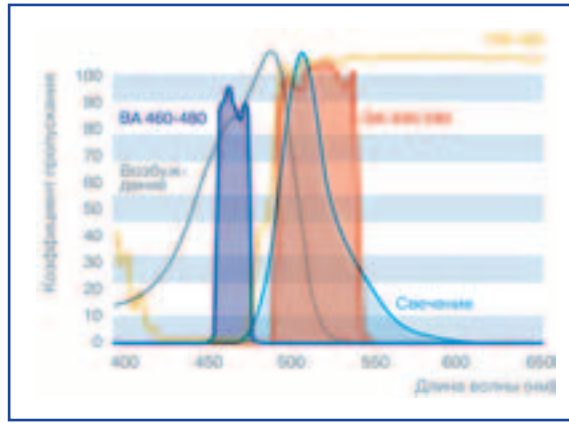


Рис. 46: Характеристики комплекта высококачественных светофильтров фирмы Olympus, оптимизированных для работы с белком GFP. Применяя метод осаждения ионов до 100 слоев с использованием новых субстратов и покрывающих материалов, можно создать светофильтры с высокой пропускной способностью и с исключительно резким отрезанием спектра (допуски < 2 нм). Автофлуоресценция значительно снижена, и светофильтры способны подавлять шум рассеянного света для повышения соотношения сигнал-шум.

срезы растений или электрические схемы. Полимер на схемах флуоресцирует, и его можно легко исследовать под действием голубого возбуждающего света (Рис. 44 б). Зелёное свечение полимера позволяет обнаружить малейшие трещинки, которые могут повлиять на качество материала.

Сами флуорохромы можно подразделить, по крайней мере, на три группы. В первую входят флуорохромы, которым для связи с конкретной целью, требуются другие молекулы, такие как антитела или лектины. Эта быстро растущая группа включает такие издавна применяемые флуорохромы, как FITC и TRITC (тетраметиладамин). Большинство из этих флуорохромов продаются в комплекте со специальной молекулой наведения (например, кози противомышьиные антитела IgG, помеченные с помощью Cy5). Квантовые точки также частично входят в состав этой группы,

но имеют отличия в структуре и в теории. Они представляют собой кристаллы очищенных полупроводников размером, исчисляемым в нанометрах, и проявляют долговременную фотостабильность, а также дают яркое свечение. Их главной отличительной особенностью является способность возбуждаться под действием света с длиной волны до диапазона голубого и светиться различными цветами в зависимости от размера. Благодаря своим гибким возможностям они также могут применяться при прямом окрашивании клеток (например, при изучении жизнеспособности клеток).

Вторая группа включает флуорохромы, обладающие собственными связывающими способностями, такие как краситель нуклеиновой кислоты DAPI или антероградный нейрональный маркер DiI. В эту группу также входят флуорохромы, флуоресцентные свой-

ства которых меняются в зависимости от количества молекул, таких как кальций, с которыми они вступают в связь (например, Fura-2). Это означает, что такие флуорохромы используются напрямую и не всегда нуждаются в транспортном средстве в виде антитела.

К третьей группе относятся флуоресцентные белки, например, GFP, которые вырабатываются внутри организмов. Это позволяет проводить эксперименты совершенно иным образом. Чаще всего такие белки применяются для получения изображений живой клетки или в экспериментальных исследованиях и молекулярной биологии. Все флуорохромы имеют индивидуальные спектральные свойства (Рис. 44 а), и часто их используют в сочетании для многоцветного анализа образца.

Требования к системе флуоресцентной микроскопии

Источник света

Для возбуждения свечения флуорохрома требуется источник интенсивного света с длиной волны, необходимой для возбуждения конкретного флуорохрома. В первой главе были описаны наиболее распространённые источники света в световой микроскопии и их настройка. Правильно настроенный осветитель играет важную роль в создании хороших флуоресцентных изображений. Если осветитель настроен неправильно, сигнал от возбуждённого флуорохрома может оказаться слишком слабым, освещение поля обзора будет неравномерным или отношение сигнала к шуму окажется низким. Так как с применением флуоресцентного метода исследуются самые разнообразные образцы, единой стратегии на все случаи не существует. Все флуорохромы подвержены фотообесцвечиванию, то есть химической деструкции в процессе возбуждения. Живые клетки также могут разрушаться под действием интенсивного света, поэтому крайне важно ограничить яркость и длительность воздействия света возбуждения точно требуемым количеством. Количество света может быть эффективно скорректировано с использованием светофильтров нейтральной плотности или моторизированного аттенуатора. Когда свет не требуется для воз-

Блок 13. Что такое флуоресценция?

Проявление флуоресценции можно схематически проиллюстрировать с помощью уже известной диаграммы Яблонского, где во флуорохроме поглощаемая световая энергия переводит возбуждённые электроны на более высокий энергетический уровень. Они теряют часть своей энергии за счёт колебания и вращения, а затем при возврате в исходное состояние спустя всего около 10 нс выделяют остальное количество в виде флуоресценции.



буждения, затвор закрыт. Эти функции могут быть предварительно настроены в моторизированных микроскопах и способствуют оптимизации экспериментов.

Набор светофильтров

Кроме специального источника, другим обязательным элементом флуоресцентного микроскопа (Рис. 45) является наличие светофильтра, который пропускает волны возбуждающего света только в необходимом диапазоне. Это достигается за счёт использования светофильтра возбуждения с характеристиками так называемого полосового фильтра (блок 14). После выделения конкретной длины волны, требуемой для возбуждения флуорохрома, свет от дихроичного (полупрозрачного) зеркала направляется на образец (Рис. 45).

Дихроичное зеркало, как следует из его названия, отражает разные цвета по-разному. Оно отражает свет с длиной волны ниже заданной и способно пропускать световые волны большей длины. Возбуждающий свет попадает через объектив на образец, выступая в качестве конденсора. При этом возникает явление флуоресценции. Возбуждённые под действием света флуорохромы излучают свет с длиной волны флуоресценции большей, чем свет возбуждения. Свет воспринимается объективом и проходит через дихроичное зеркало, которое теперь пропускает световые волны большей длины. Последний этап фильтрации проходит в эмиссионном светофильтре (именуемый также запирающим светофильтром, смотрите Рис. 46). Этот светофильтр ограничивает пропускаемый спектр, и пропускает только тот цвет, который соответствует свечению флуорохрома и предмету исследования. Он обеспечивает устранение нежелательных длин волн из сферы наблюдения и анализа. Эмиссионный светофильтр может быть выполнен как узкополосный светофильтр (с точным ограничением по одному спектру) или как широкополосный пропускающий светофильтр (в сущности, дающий больше яркости, но не обеспечивающий оптимального результата вследствие отсутствия ограниченного диапазона частот). Имеется целый ряд веб-страниц (например, www.olympusmicro.com/primer/java/fluorescence/matchingfilters/index.html), облегчающих подбор наилучшего сочетания фильтров для используемых флуорохромов и выполнения планируемого анализа. Простой пример (ниже) показывает, как в зависимости от обстоятельств могут отличаться наборы светофильтров.

Пример правильного подбора светофильтров

Если требуется выполнить прижизненное исследование клеточной культуры, для окрашивания живых клеток можно выбрать диатемат флуоресцина (FDA). Этот флуорохром возбуждается под действием голубого света и даёт зелёное свечение. Живыми будут клетки, окрашенные в зелёный цвет. Таким образом, светофильтры могут быть подобраны следующим образом: возбуждающий светофильтр узкополосный типа BP460-490, дихроичное зеркало с характеристиками DM505 и эмиссионный (запирающий) широкополосный свето-

фильтр типа LP510. При этом получается ярко-зелёное изображение всех молекул, флуоресцирующих зелёным цветом. На данном этапе результат удовлетворительный, живые клетки окрашены. Чтобы убедиться в том, что неокрашенные клетки действительно неживые, можно применить окрашивание йодистым пропидием (PI). Мембраны неповреждённых клеток этот краситель не пропускают. Только ДНК мёртвых клеток будет помечена красным цветом. Это означает, что они могут применяться в сочетании с FDA. Однако при этом возбуждение FDA с помощью указанного светофильтра вызовет некоторые проблемы. Краситель PI также будет возбуждён голубым светом, и будет наблюдаться его красное свечение. Это происходит благодаря эмиссионному (запирающему) светофильтру, поскольку его характеристики позволяют пропускать все волны длиной свыше 510 нм. Таким образом, оба красителя возбуждены и становятся видимыми. Чёткое разделение обоих сигналов невозможно и, как будет показано далее, это может вызвать проблемы при получении изображения.

Чтобы получить оба сигнала отдельно из клеточной структуры, необходимо в качестве эмиссионного светофильтра для красителя FDA применить узкополосный светофильтр (например, BP510-550). Такой светофильтр пропустит только зелёное свечение FDA и задержит излучение красителя PI. Затем можно использовать второй светофильтр,

Блок 14. Характеристики

светофильтров

Характеристики светофильтров во флуоресцентной микроскопии представляются с помощью букв и чисел: например, BA 460-480. В этом случае BA означает узкополосный светофильтр, а числа представляют 50% нижней части среза и 50% верхней части среза (Рис. 46, смотрите также рисунок в блоке ниже). Для широкополосного пропускающего светофильтра указывается только число для 50% нижней части среза. В некоторых компаниях используются другие обозначения предельных параметров того же самого светофильтра (например, 470/20), где 470 означает центральную длину волны, а 20 – диапазон полной ширины на полувысоте максимума (FWHM). Правильные характеристики пропускания светофильтра можно обеспечить, только пользуясь графиком соотношения пропускания и длины волны (смотрите рисунок в блоке ниже).

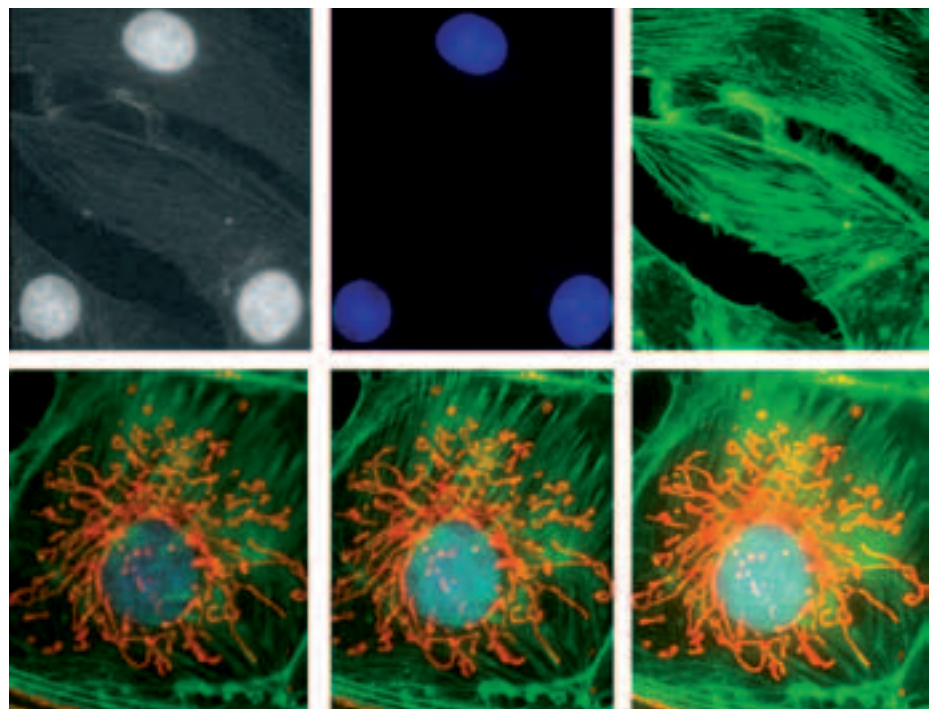
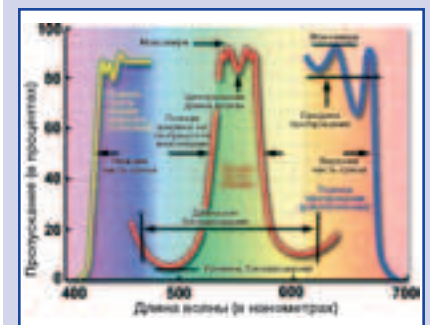


Рис. 47: Верхний ряд: изображения образца с двойной меткой (краситель DAPI для окраски ДНК и антитело с меткой Alexa 488 для окраски F-актина). На первом снимке показано свечение, обнаруженное с помощью набора светофильтров, включающего соответствующий светофильтр возбуждения для DAPI и широкополосный пропускающий эмиссионный светофильтр. При исследовании с монохромной камерой видны также со структурами синего и зелёного цвета представлен тот же образец, где оптимизированный эмиссионный светофильтр позволяет получить каждый сигнал в отдельности.

В нижнем ряду показан пример участка изображения, анализ которого выполнен с использованием ахроматического (слева), флуоритового (в центре) и ахроматического объектива (справа) с одной и той же кратностью увеличения.

Необходимо отметить, что показатели интенсивности сигнала и цветопередачи улучшаются от ахроматического к ахроматическому изображению благодаря увеличению числовой апертуры и качества объективов, в то время как яркость фона в левом верхнем углу остаётся неизменной.

Блок 15. Способ измерения резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET)

Измерение соотношения

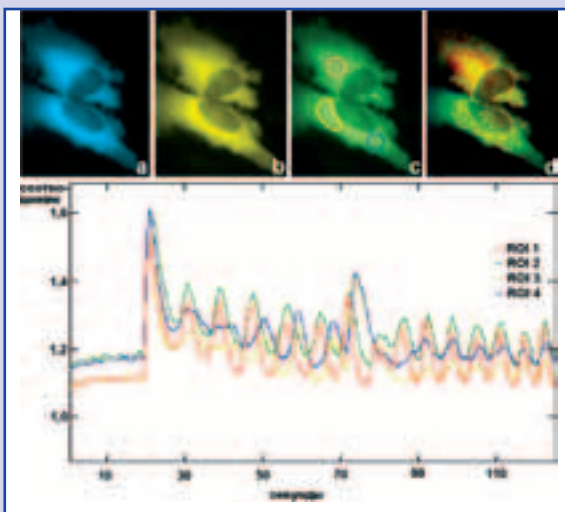
Требуется эпифлуоресцентный микроскоп, оснащённый набором узкоспециальных флуоресцентных светофильтров, цифровой фотокамерой и программными средствами анализа изображений. Рассчитывается соотношение между интенсивностью излучения сенсibilизированного акцептора (= сигнал FRET – резонансного переноса энергии флуоресценции) и интенсивностью излучения донора (смотрите рисунок). Результаты необходимо скорректировать с учётом спектральных перекрёстных помех, применив программу спектрального разделения.

Фотовыцветание акцептора

Данный эффект возникает, когда акцептор подвергается необратимому разрушению под экстенсивным действием возбуждающего света. После обесцвечивания флуорофора акцептора явление FRET прекращается. Возбуждение донора приведёт к его флуоресцентному свечению. После фотовыцветания акцептора свечение донора становится более интенсивным.

Обесцвечивание донора

На образец действует возбуждающее излучение донора с конкретной длиной волны. Изображения донора получают в непрерывном режиме, и подсчитывают снижение интенсивности. Явление FRET уменьшает среднее время жизни донора и защищает его от фотоповреждения. Поэтому при использовании FRET степень фотовыцветания ниже, а в отсутствие FRET – выше.



чтобы эффективно проанализировать сигнал метки PI (например, светофильтр возбуждения BP530-550 и эмиссионный светофильтр LP575, дихроичное зеркало DM570). Этот принцип также применим к другим процедурам многоцветного окрашивания. Лучшие результаты достигаются, когда эмиссионный светофильтр для обнаружения флуорохрома с более короткой длиной волны является узкополосным (Рис. 47, верхний ряд).

Объективы

Способность объектива собирать световые лучи играет во флуоресцентной микроскопии важную роль. Для получения сигнала оптимальной силы требуется высокая числовая апертура (NA) и применимое наименьшее увеличение. Например, использование объектива с числовой апертурой 1,4 вместо 1,3 при той же кратности увеличения даёт увеличение яркости на 35% при прочих равных условиях. Кроме того, необходим тип стекла, который хорошо пропускает волны нужной длины, поэтому применяются флуоритовые и апохроматические объективы. Дальнейшего улучшения показателей можно добиться, выбирая объективы с предельно низкой автофлуоресценцией стекла (объективы UIS2 фирмы Olympus). Если предусмотрены все эти условия – высокая числовая апертура, хорошее пропускание и низкий уровень автофлуоресценции, то идеальное соотношение сигнал-шум обеспечено (т.е. сильный сигнал со слабым фоновым шумом (Рис. 47, нижний ряд)). Фоновый шум может вносить сам образец вследствие его фиксации, автофлуоресценции или вследствие неоптимизированных процедур окрашивания.

Тип камеры

Цифровая камера является одним из самых важных компонентов анализа во флуоресцентной микроскопии. Это связано с тем, что от типа используемой камеры зависит уровень обнаружения флуоресценции образца, разрешение значимых структур и/или динамика процессов получения и сохранения изображений. Для эффективного применения во флуоресцентной микроскопии камера должна обладать рядом характеристик. Сюда входят: высокое разрешение, высокая светочувствительность, охлаждение, регулируемое время экспозиции и функция внешнего запуска. Как правило, ни одна камера не отвечает сразу

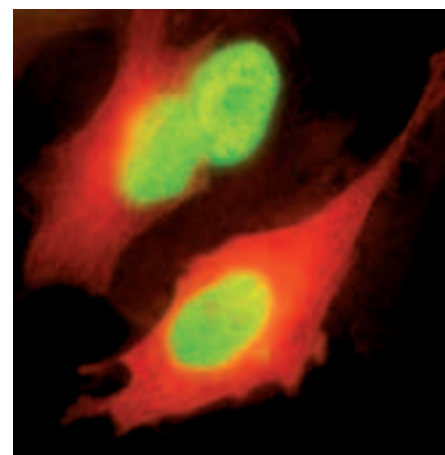
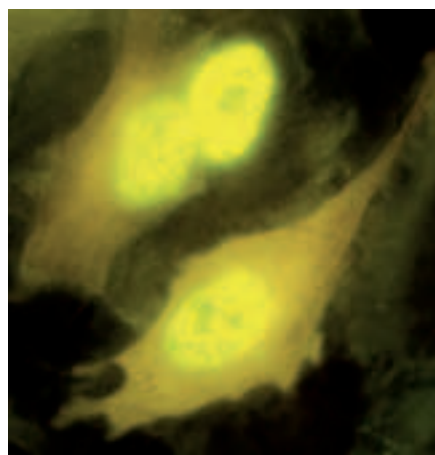


Рис. 48: Многоцветное изображение образца с введённой двойной меткой GFP/YFP до (слева) и после спектрального разделения (справа). В данном образце метка GFP была введена в гистон H2B, а YFP – в тубулин. Видимым результатом является чётко выраженное цветовое разрешение обеих структур, которые теперь отображаются зелёным и красным цветами. Ясно различим тубулин за пределами ярко-зелёных ядер.

всем этим требованиям. Следовательно, микроскопистам часто приходится идти на компромисс. Тем не менее, применяемые камеры должны, как минимум, обладать высокой чувствительностью к сигналу, низким шумом и функцией измерения распределения интенсивности.

Чувствительность цветных камер ниже, чем у чёрно-белых за счёт дополнительного разделения луча и частотно-селективных компонентов. Таким образом, чёрно-белые камеры предпочтительнее. Они дают изображение интенсивности флуоресценции каждого флуорохрома в отдельности и могут впоследствии с помощью соответствующего программного средства преобразовать необходимые изображения в конкретном цветовом пространстве. Полученные многоцветные изображения можно просмотреть, распечатать и проанализировать или выполнить их дальнейшую обработку. Каждый цветовой канал представляет один флуорохром. Такой результат возможен только в том случае, если были правильно подобраны флуоресцентные светофильтры. Вернёмся к примеру о двойной метке с помощью красителей FDA и PI. Используя широкополосный пропускающий эмиссионный светофильтр, получим сигнал FDA, при этом красное свечение PI также присутствует на полученном цифровом изображении. Чёрно-белая камера не различает красный и зелёный цвета, как показано на Рис. 47 (первый снимок), она просто покажет яркость в градациях серого. Таким образом, на изображении будет представлено результирующее распределение обоих флуорохромов, окрашенное одним цветом. Как указано выше, в этом случае может оказаться полезным использование узкополосного эмиссионного (запирающего) светофильтра.

Программные средства: спектральное разделение

Ещё одна проблема может возникнуть при использовании на одном образце разных флуорохромов с перекрывающимися спектрами. Примером значительного наложения спектров возбуждающего и эмиссионного света

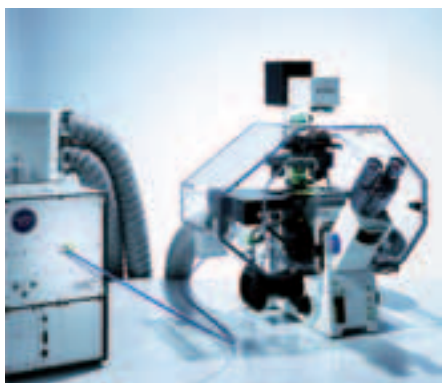


Рис. 49: Климатическая камера реализует такие функции, как регулирование температуры, влажности и содержания CO₂ в воздухе.

различных флуорохромов служат спектры улучшенного зелёного флуоресцентного белка (eGFP) и улучшенного жёлтого флуоресцентного белка (eYFP) – двух широко применяемых модификаций зелёного флуоресцентного белка (Рис. 48, слева). Даже при условии применения высококачественных оптических светофильтров не представляется возможным удовлетворительным образом разделить спектральную информацию. Это означает, что структуры, меченные YFP, будут видны при установленном светофильтре GFP и наоборот, при этом качество результирующего изображения значительно ухудшается. Это явление, так называемое «проступание», сильно снижает цветовое разрешение и затрудняет возможность правильных выводов. Решением, направленным на преодоление данного явления, является спектральная фильтрация изображений и линейное разделение.

Спектральная фильтрация изображений и линейное разделение – это метод из области получения изображений с помощью искусственных спутников, адаптированный для широкопольной флуоресцентной микроскопии. Используя этот высокоэффективный метод, можно определить удельную эмиссию разных флуорохромов по отношению к общему сигналу и восстановить чёткость сигнала для каждого цветового канала, независимо от излучения другого флуорохрома. Это достигается путём перераспределения яркости (Рис. 48, справа). Важно заметить, что во время линейного разделения не происходит ни потери исходных данных, ни внесения какой-либо дополнительной информации в изображение. Всё, что используется в этой процедуре, – это информация исходного изображения. При этом сохраняется общая яркость пикселей. Таким образом, с помощью этого метода не создаются искусственно приукрашенные изображения. После разделения, проведение количественного анализа становится не только возможным, но и приобретает большую точность.

Применение света в качестве инструмента

Выяснив первоосновы и требования микроскопии, можно теперь углубиться в изучение различных современных качественных и

количественных методов флуоресцентной микроскопии. Эти методы требуют применения усовершенствованных приборов для микроскопических исследований и получения изображений, которые могут варьироваться в зависимости от обстоятельств. Поэтому здесь можно привести только общие положения об используемых аппаратных и программных средствах, а также дать описание применениям и методам.

Жизнь под микроскопом

Везде, где есть жизнь, происходят динамические процессы: наблюдение живых клеток и организмов – это потрясающая возможность микроскопии. Существуют различные методы, позволяющие выявить динамические процессы и движение живых клеток. С помощью флуоресцентных белков и живых флуоресцентных красителей производится высокоизбирательная маркировка разных органелл или молекул в живой клетке. Интенсивность возбуждённого света этих меток используется для получения изображений клеток. Кроме протокола применения и метода получения флуоресцентных изображений, есть и дополнительные общие сведения, с которыми необходимо ознакомиться.

Во-первых, необходимо определить потребность в создании специфических внешних условий и их контроле при работе с образцом. Например, если имеется линия клеток, для которой требуется провести исследования процессов во времени, то для этих клеток понадобится создать соответствующие условия окружающей среды. Динамические процессы в отдельных клетках могут происходить в миллисекундном диапазоне – как, например, изменения концентрации ионов, или в течение минут – как, например, при активном или пассивном транспорте белков или везикул. Микроскопы могут быть оснащены нагревательными столиками, микрокамерами или камерами полного цикла культивирования, которые позволяют выращивать живые клетки с заданием всех необходимых параметров микроскопа при проведении наблюдений в течение нескольких часов или дней (Рис. 49).

Куда деваются все ионы?

Такие флуоресцентные красители, как «FURA», «INDO» или «Fluo» проявляют спектральную чувствительность после связывания ионов Ca²⁺ и являются завоевавшим репутацию инструментом в исследовании изменений внутриклеточной концентрации Ca²⁺. В клетку вводится краситель в форме конъюгата с солью или декстраном – например, путём микроинъекции, электропорации или АТФ-индуцированной проницаемости. Кроме того, в среду может быть добавлен краситель ацетоксиметилэфир для пассивного введения в клетки и ферментативного расщепления для образования непроницаемых для клеток соединений.

Для анализа типичного эксперимента двухканальной окраски с помощью «FURA» требуется переключение длины волны возбуждения между 340 нм и 380 нм. При наблюдении

клеток с введённым красителем «FURA» в отсутствие стимулирующего воздействия ионы Ca²⁺ находятся в компартментах клеток в связанном состоянии. При возбуждении в длине волны 380 нм молекулы красителя «FURA» дают сильное свечение с длиной волны 510 нм и слабое свечение при возбуждении длиной волны 340 нм. По мере высвобождения клеткой ионов Ca²⁺ из накопительных компартментов вследствие реакции на стимулирующее воздействие, молекулы «FURA» образуют комплексы с этими высвобождающимися ионами Ca²⁺. При возбуждении в длине волны 340 нм в канале излучения флуоресцентный сигнал длиной волны 510 нм усиливается, и ослабевает с длиной волны 380 нм. Соотношение между сигналами из двух каналов возбуждения применяется для определения количественного изменения интенсивности.

Для чего необходимо соотношение? Колебания свечения ламп или прочие изменения интенсивности света искусственного происхождения могут вызвать появление ложного сигнала, который можно ошибочно истолковать как изменение концентрации ионов при проведении измерений интенсивности света только в одном канале. Вторым недостатком одноканального анализа является то, что он отражает только количество флуоресценции. Поэтому, части большей толщины могут выглядеть ярче, чем более мелкие части клетки, хотя в них просто содержится больше флуорохромов вследствие их большего объёма. Физиологически важные изменения концентрации ионов на небольших участках, таких как конус роста нейрона, могут остаться незамеченными по прошествии времени, потому что их флуоресценция слишком слаба по сравнению с ярким центром клетки. После вычитания фона с помощью расчёта соотношения каналов производится коррекция результата с учётом суммарных искусственных флуоресценций и толщины образца. После выполнения процедуры калибровки получают количественные результаты. В продаже имеются флуорохромы с различными спектральными свойствами для множества разных ионов. Системы для микроскопических

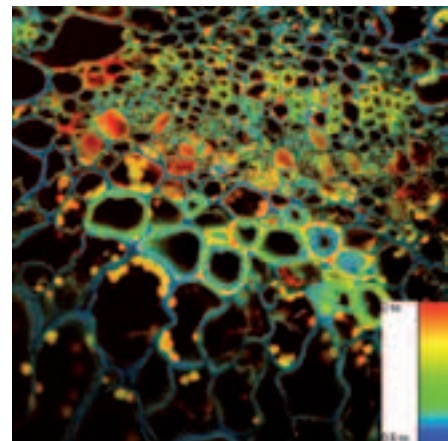


Рис. 50: Автофлуоресценция кусочка яблока (Llefer). Снимок получен с помощью конфокальной системы модели «FluoView FV1000» фирмы Olympus и в режиме TCSPC фирмы PicoQuant. Цветная полоска в правом нижнем углу является ключом к распределению времени жизни в пределах изображения.

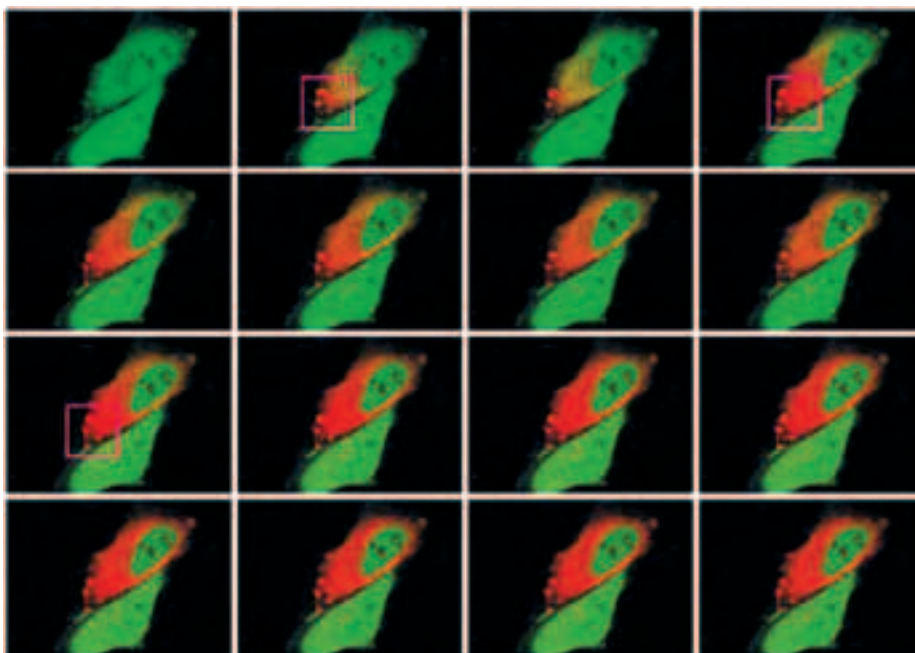


Рис. 51: Фотоконверсия: в лаборатории Мияваки (Miyawaki's lab), Андо и др. [1] удалось клонировать ген, в котором закодировано свечение белка кораллового полипа «Kaede». Зелёное свечение может быть преобразовано в красное под действием УФ облучения. Применяя возбуждающий свет в спектральном диапазоне длин волн голубого и зелёного света, можно наблюдать перемещение и распределение белка в живой клетке. На рисунке показана диффузия Kaede-экспрессирующего белка в клетках HeLa. Воздействие лазером 405 нм на исследуемый участок превращает зелёное свечение белка группы «Kaede» в красное. Конфокальные изображения, демонстрирующие распределение белка «Kaede» в клетках HeLa, были получены с интервалом три секунды под воздействием излучения лазера с длиной волны 488/543 нм. С помощью двух синхронизированных сканеров (один для фотоконверсии, другой для получения изображения) становится возможным наблюдение изменений флуоресценции во время стимуляции. Данные любезно предоставили: Р. Андо, д-р А. Мияваки, Лаборатория динамики функционирования клеток при Институте исследований мозга RIKEN.

исследований с быстрой сменой светофильтров и управлением в реальном времени позволяют проводить исследования даже в миллисекундном диапазоне.

Свет как линейка

Многие процессы в клетке протекают под управлением сил внешнего и внутреннего взаимодействия молекул: например, взаимодействия «рецептор–лиганд», реакции «фермент–субстрат», свертка/разворачивание молекул. Взаимодействие «рецептор–лиганд», например, происходит – в условиях очень сильного сближения двух белков в ангстремном диапазоне. Исследования близкорасположенных объектов не обнаруживают взаимодействия молекул в ангстремном диапазоне, потому что пространственная разрешающая способность оптического микроскопа ограничена значением 200 нм. Как же при помощи оптического микроскопа доказать близость двух молекул в ангстремном диапазоне, который лежит за пределами физических возможностей световой микроскопии? Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) помогает найти ответ на этот вопрос. FRET – это безизлучательный перенос энергии между двумя различными флуорофорами. Первый флуорофор (донор) возбуждается под действием света. Донор безизлучательно, то есть без излучения фотонов, передаёт свою энергию второму флуорофору (акцептору). В результате под действием донора акцептор возбуждается,

и появляется свечение («сенситализированное излучение»). Происходит гашение донора, и свечение прекращается. Безизлучательный перенос энергии происходит в очень ограниченном диапазоне расстояния между донором и акцептором: 1–10 нм. Положительный сигнал FRET несёт информацию о расстоянии между партнёрами переноса FRET и в количественном отношении представляет эффективность FRET. Сигнал FRET может отсутствовать по многим причинам: например, из-за слишком большого расстояния между партнёрами переноса FRET, неудовлетворительной пространственной или дипольной ориентации, недостаточного перекрытия эмиссионного спектра донора и спектра возбуждения акцептора (смотрите блок 15).

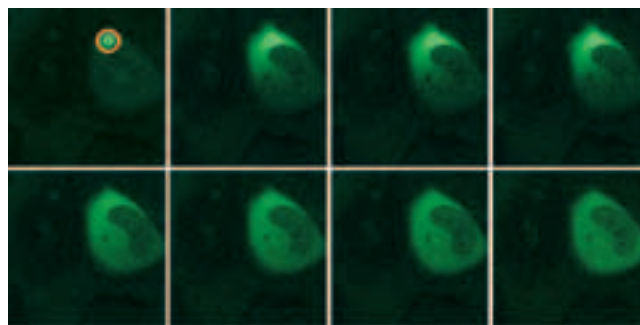


Рис. 52: Фотоактивация белка типа PA-GFP, экспрессирующего клетки HeLa. Белок PA-GFP активирован с помощью диодного лазера с длиной волны 405 нм (область интереса), а изображения распределения PA-GFP в клетке получены с интервалом в 1 секунду с помощью лазера с длиной волны 488 нм. Данные любезно предоставили: А. Мияваки, Т. Нагаи, Т. Мияучи, Лаборатория динамики функционирования клеток при Институте исследований мозга RIKEN.

Сколько живёт флуорохром? – Сосчитайте фотоны!

При возбуждении флуорохром переходит на более высокий энергетический уровень. Время жизни флуорофора – это среднее время (в диапазоне, измеряемом наносекундами/пикосекундами), в течение которого он остаётся на более высоком энергетическом уровне до возврата в основное состояние. Время жизни флуорохрома представляет собой индивидуальный параметр этого конкретного флуорохрома. Он сильно зависит от изменений внешних условий (например, pH, концентрации ионов и т.д.), от скорости переноса энергии (FRET) или взаимодействия флуорохрома с гасителями. Спектральные свойства флуорохромов часто сходны или совпадают, поэтому анализ времени жизни флуорохрома является решающим при различении местоположения этих флуорохромов в клетке (Рис. 50). В таких случаях используются экспериментальные системы типа FLIM – микроскопия изображений на основе продолжительности флуоресценции.

Микроскопия изображений на основе продолжительности флуоресценции (FLIM)

Существуют различные методы микроскопии изображений на основе продолжительности флуоресценции, предлагаемые для целей как широкопольной, так и конфокальной микроскопии. В данной главе рассматривается режим счёта одиночных фотонов с корреляцией во времени (TCSPC). Флуорохром переходит в возбуждённое состояние под действием лазерного импульса, излучаемого импульсным лазерным диодом или фемтосекундным лазером «Ti:Sa». Фотоумножитель для счёта фотонов или лавинный диод для счёта одиночных фотонов регистрирует фотоны, которые излучает флуорофор. Измеряется временной интервал между лазерным импульсом и моментом регистрации фотона. Данные о фотонах в связи с относительным временем между лазерным импульсом и регистрацией сигнала суммируются в гистограмме. Каждый пиксель изображения FLIM включает информацию о полной кривой затухания флуоресценции. Если изображение состоит из трёх флуорохромов с разным временем жизни, распределение всех красителей передаётся тремя различными цветами (Рис. 50).

Микроскопия FRET с временным разрешением (FRET-FLIM)

При использовании метода FRET время жизни донора зависит от наличия или отсутствия безызлучательного переноса энергии (смотри выше). Таким образом, микроскопия FRET с временным разрешением – это технический подход к количественным измерениям эффективности FRET.

Методы FRAP, FLIP и FLAP

FRAP, FLIP и FLAP – всё это методы, основанные на фотообесцвечивании. С помощью лазерного сканера в конфокальном микроскопе можно обесцветить (разрушить) флуорохромы (например, связанные с определённым белком) на определённом участке окрашенной клетки, в результате чего свечение флуорохрома прекращается. Другие помеченные белки, которые не подвергались действию фотообесцвечивания, теперь становятся видимыми при их перемещении в предварительно обесцвеченное поле. Это перемещение является следствием таких динамических процессов, как активный транспорт или пассивная диффузия в живой клетке, поэтому интенсивность флуорохрома в обесцвеченном поле клетки восстанавливается.

FRAP = метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания

Через некоторое время после обесцвечивания флуорохрома в избранном участке клетки делается серия снимков этой клетки. В избранный участок в ходе диффузии или переноса попадают новые, необесцвеченные флуорохромы. В результате, можно наблюдать и измерять восстановленный сигнал флуоресценции. После внесения поправки на общее обесцвечивание в процессе получения изображения получается график восстановления флуоресценции.

FLIP = метод затухания флуоресценции при фотообесцвечивании

На небольшом участке клетки флуорофор постоянно подвергается обесцвечиванию. Вследствие перемещения необесцвеченных флуорофоров из участков за пределами избранного поля в обесцвечиваемое поле, концентрация флуорофора в других частях клетки снижается. По результатам измерений падения интенсивности на участках за пределами избранного поля строится кривая затухания. Для применения данной технологии особенно удобен конфокальный микроскоп с лазерным сканированием, объединяющий два сканера, один для наблюдения, а другой – для стимуляции светом. Система одновременного сканирования позволяет получать изображения в условиях непрерывного обесцвечивания.

FLAP = метод локализации флуоресценции после фотообесцвечивания

Исследуемый белок помечается двумя разными флуорохромами. Один подвергается процессу обесцвечивания, другой остаётся неповреждённым и выступает в роли контрольной метки. Совокупность обесцвеченных флуорохромов определяется вычитанием

изображения обесцвеченного красителя из изображения необесцвеченного красителя.

FAUD = Fluorescence Application Under Development – новые методы применения флуоресценции!

Мы ждём авторов новых методов флуоресценции – свяжитесь с нами!

Из чёрного в зелёный, из зелёного в красный ...

В результате слишком длительного пребывания на солнце белая кожа становится красной, это явление называется солнечным ожогом. Если воздействовать излучением УФ

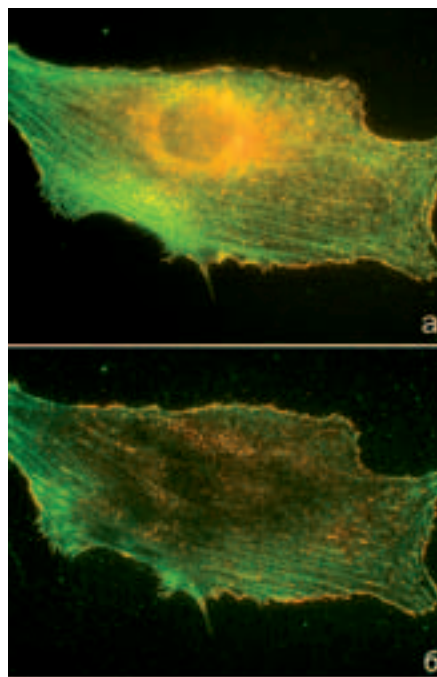


Рис. 53: Изображения на границах предела разрешения:
(а) широкопольное изображение,
(б) изображения на основе технологии TIRF, полученные с использованием лазера с длиной волны 488 нм.

Зелёный цвет: FITC-актин
Красный цвет: DyeMer 605-EPS8.

Данные любезно предоставил М. Фаретта, Европейский Институт онкологии, отделение экспериментальной онкологии, проточной цитометрии и оптических изображений, г. Милан, Италия.

лазера на клетку, содержащую белок «Kaede», зелёный цвет этого белка изменится на красный, и это явление называется фотоконверсией (Рис. 51). Для стимуляции флуорохромов в избранных областях клетки может быть использован конфокальный микроскоп. Модель «FluoView FV1000» фирмы Olympus как раз позволяет производить стимуляцию одного участка с помощью первого лазера, одновременно наблюдая за результатом по другому каналу с помощью второго лазера. Недавно разработанный фотоактивируемый мутант GFP, PA-GFP, активируется с помощью излучения диодного лазера с длиной волны 405 нм (Рис. 52). Интенсивное излучение повышает интенсивность сигнала флуоресценции

белка PA-GFP в сто раз. PA-GFP является мощным инструментом наблюдения за динамикой белка в живой клетке (Рис. 52).

Получение изображений на верхнем пределе разрешения

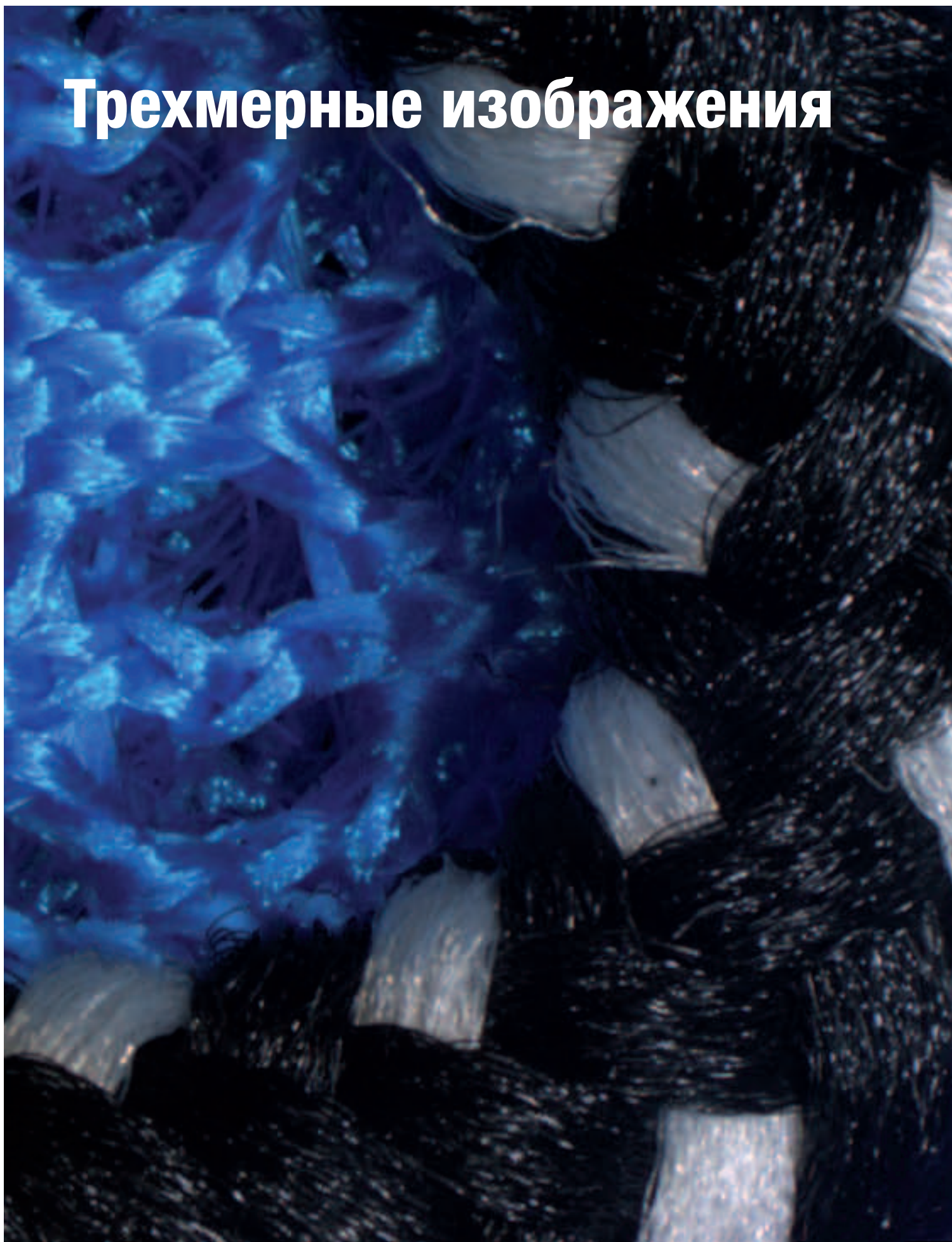
Описанные ранее методы обесцвечивания и фотоактивации легко реализованы с помощью соответствующего конфокального микроскопа с лазерным сканированием. Лазер является гораздо более мощным источником света, чем люминесцентная лампа на основе ртути, ксенона или галоидов металлов. Сканеры с гальваническим зеркалом, в сочетании с акусто-оптически настраиваемыми фильтрами (АОТФ), позволяют сконцентрировать лазерное излучение на одном или нескольких выбранных участках клетки, при этом остальные участки клетки не подвергаются действию возбуждающего света. Именно это делает незаменимым лазерный сканирующий микроскоп при использовании методов, где в качестве инструмента выступает свет. Кроме того, принцип конфокальности позволяет устранить нерезкость изображения, что создаёт оптический срез конкретно в данной фокальной плоскости. Это означает, что может быть получено изображение с высоким разрешением по осям X, Y и Z. Конфокальный микроскоп является идеальным системным решением для исследователей, которые ставят перед собой задачу использовать свет не только для получения изображений, но и в качестве средства манипуляции флуорохромами.

Чтобы получить ещё более тонкий оптический срез (только отдельный тонкий срез, а не трёхмерный стек), предпочтительной технологией может оказаться флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRFM). Более подробно о технологии TIRFM смотрите в Блоке 4 или на странице www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirf-home.html. Переменное поле затухающих колебаний, применяемое в данной технологии, возбуждает только флуорохромы, находящиеся близко к покровному стеклу (приблизительно 100–200 нм). Флуорохромы, находящиеся в более глубоких слоях клетки, не переходят в состояние возбуждения (Рис. 53). Это означает, что могут быть получены изображения помеченных структур мембраны, слияния помеченных везикул с плазматической мембраной или взаимодействия отдельных молекул с высоким разрешением по оси Z (200 нм или менее, в зависимости от переменного поля затухающих колебаний).

Список литературы

- [1] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki, PNAS Vol. 99, No. 20, 12651–12656 (2002)
- [2] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, Science, Vol 297, Issue 5588, 1873–1877 (2002)

Трехмерные изображения





Реальность многомерна

Что видит человек, изучая образец под световым микроскопом? Какую информацию он получает? Большинство световых микроскопов даёт двухмерное изображение физической реальности. То изображение, которое обычно наблюдается в широкопольном микроскопе, представляет собой двухмерную проекцию трёхмерной физической структуры. Это означает потерю одного измерения, что существенно ограничивает восприятие наблюдаемой физической реальности.

Когда человек смотрит на двухмерные изображения, он часто выполняет обратный процесс и, основываясь на опыте, более или менее бессознательно достраивает двухмерный вид до трёхмерного. Но как можно быть уверенным в том, что эта интерпретация верна? Глядя в ночное небо, мы не можем сказать, близки ли две звезды друг к другу или в действительности между ними в космосе пролегают сотни световых лет. Изобразительные методы, однако, дают множество примеров того, как можно создать чёткое впечатление присутствия третьего измерения, используя разную степень контраста света и тени, а также удачное расположение объектов со знакомыми пропорциями. Привычка человека воспринимать разную освещённость структуры как свойство трёхмерности также помогает изображать рельеф – как в методах контраста, используемых в микроскопии (например, дифференциально-интерференционный контраст – ДИК).

СтереоиЗОБРАЖЕНИЕ

Глаза человека всегда смотрят на объекты под небольшим углом, который зависит от расстояния между глазами и между человеком и объектом. В сочетании с интерпретацией, которую даёт мозг, на основе этих двух источников восприятия создаётся трёхмерное изображение. Чтобы увидеть объекты под микроскопом аналогичным образом, каждый из двух глаз должен иметь отдельный световой путь, вследствие этого становится возможным наблюдать образец под углом, подобным тому, под которым глаза человека смотрят в естественных условиях. В этом как раз и заключается принцип стереомикроскопии. Микроскопы такого типа создают изображение, в котором образец выглядит естественно, включая большую глубину резкости и рабочее расстояние. При угле стереоскопичности в 10–12° левый и правый глаз наблюдают изображения одного и того же объекта под слегка отличающимся ракурсом (Рис. 54).

Для исследования поверхностей стереомикроскоп даёт достоверное трёхмерное восприятие объекта. Наблюдатель получает представление о форме поверхности и о том, какие структуры выше или ниже. То, что в данном случае исследуется, представляет собой криволинейную двухмерную поверхность, развёрнутую в трёхмерное пространство. Есть, однако, одно общее ограничение – по глубине резкости, которое часто не позволяет получить совершенно чёткое изображение. Кроме того, увеличение и разрешающая способность в стереомикроскопе меньше по сравнению с

прямыми или инвертированными широкопольными микроскопами, что обусловлено их общей конструкцией. Более того, если стереомикроскоп используется для документирования изображений, то в большинстве случаев только одно из направлений будет использовано для съёмки камерой. Это означает, что полученный цифровой снимок окажется двухмерным – третье измерение на нём отсутствует.



Рис. 54: Световой путь в стереомикроскопе (с промежуточной системой Галилея) – два микроскопа в одном – обеспечивает изучение образцов под естественным углом схождения глаз человека. Это позволяет наблюдать трёхмерный рельеф поверхности. Однако, при получении изображения снимок всё же остаётся двухмерным.

Таким образом, когда требуется получить чёткое изображение рельефной структуры под световым микроскопом или стереомикроскопом, или вообще, когда есть желание узнать больше о трёхмерном внутреннем устройстве структур, необходимо получить несколько срезов или кусочков с разным положением по оси Z или на разной фокальной плоскости. Рассмотрим серию изображений (Рис. 55), в которую входит несколько срезов головы человека, полученных методом магнитно-резонансной визуализации (MRI).

Не слишком мало и не слишком много – как раз в меру

Оптические срезы с помощью светового микроскопа обычно получают с применением моторизированной фокусировки. Сначала определяют максимальную и минимальную высоту столика или револьверной головки микроскопа вдоль оси Z. Затем необходимо указать либо расстояние между двумя положениями по оси Z (т.е. изменение фокусного расстояния (Δz) или амплитуда по оси Z), либо задать общее количество срезов, которое необходимо получить. В зависимости от применения потребуется минимальное количество срезов с оптимальной амплитудой по оси Z (Δz).

Одним из применений в оптической микроскопии и стереомикроскопии является получение серии кадров по оси Z, которые позволяют преодолеть ограничения по глубине резкости отдельного кадра. При этом изменение фокусного расстояния (Δz) между двумя срезами должно быть таким же или

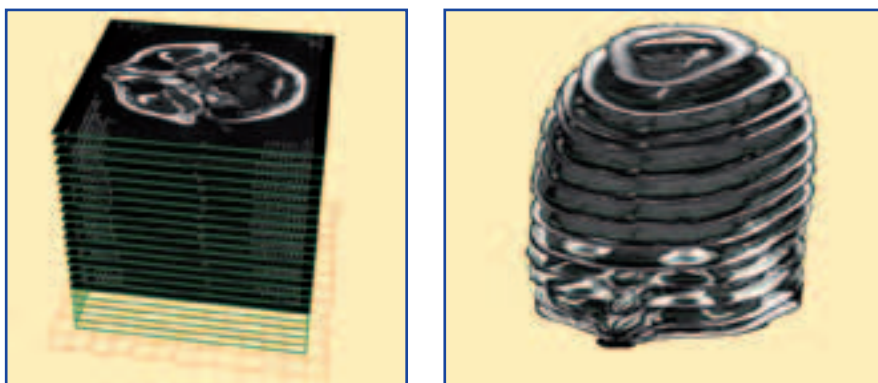


Рис. 55:
Слева: серия изображений, полученных методом MRI (магнитно-резонансная визуализация).
Справа: структуры головы, составленные из отдельных срезов изображения.

чуть меньше, чем глубина резкости. Как описано ранее, глубина резкости в основном зависит от числовой апертуры объектива. Фактически, применимое значение Δz можно легко вывести, медленно поднимая предметный столик. Одновременно ведётся наблюдение за тем, при каком изменении фокуса резко выраженная структура расфокусируется. Это значение необходимо применить ко всем срезам на полном диапазоне высоты образца (Рис. 56). При цифровом формировании изображений можно ввести параметры фокуса, после чего программа берёт на себя управление фокусом и формирует серию кадров по оси Z. Четкие участки отдельных срезов затем объединяются в изображение, глубина резкости которого, в принципе, не ограничена (Рис. 56). Указанный метод называется EFI – расширенное фокальное формирование изображений (смотрите также Блок 6). Кроме результирующего изображения (Рис. 56) с неограниченной глубиной резкости, можно сформировать карту высот (Рис. 57). В алгоритм программы заложена информация о том, из какого среза необходимо брать резкие пиксели для формирования результирующего изображения.

Эта информация используется для создания изображения, где каждая градация серого представляет конкретную высоту. В этой карте высот содержится столько уровней градации серого, сколько было получено срезов. Это означает, что чем меньше глубина резкости

объектива и чем больше срезов было фактически получено, тем более точной является информация о высоте. Это существенно, когда информация о высоте представлена в трёхмерном виде (Рис. 57). Если получено достаточное количество срезов, наблюдатель получит чёткое пространственное представление о поверхности. Чтобы сгладить карту высот, можно немного выровнять пики и ступеньки. Трёхмерный вид превращается в весьма реалистичное изображение действительной структуры объекта, когда чёткое составное изображение накладывается на поверхность как текстура (Рис. 57).

Правильное количество

В биологических науках и флуоресцентной микроскопии требуемое количество срезов для трёхмерного изображения можно вывести экспериментально. Общеизвестно, что размытость изображения, находящегося не в фокусе, может значительно снизить научную ценность, а также ухудшить резкость флуоресцентных изображений, полученных с помощью обычных широкопольных флуоресцентных микроскопов. Существуют два основных метода устранения нечёткости и восстановления информации изображений, находящихся вне фокуса: вычислительный метод деконволюции и конфокальная микроскопия. Один из этих подходов нужен для того, чтобы создать надлежащее трёхмерное представление флуоресценции.

Для деконволюции требуется трёхмерная серия изображений исследуемого образца с минимальным изменением фокусного расстояния (Δz) для максимального эффекта. Изменение фокусного расстояния (Δz) зависит от числовой апертуры объектива (NA), длины волны излучения (λ) флуорохрома в образце и показателя преломления (n) иммерсионной среды и вычисляется по следующей формуле:

$$\Delta z \sim (1,4 * \lambda * n) / NA^2 \quad (9)$$

Чтобы получить более чёткое представление о реальных цифрах, рассмотрим пример. Объектив «Plan Fluorite» с увеличением 40x имеет значение числовой апертуры NA 0,75. Показатель преломления воздуха равен 1. При длине волны излучения 540 нм это даёт минимальное требуемое значение изменения фокусного расстояния, т.е. амплитуды по оси Z (Δz), – около 1,3 мкм. Амплитуда по оси Z в основном зависит от числовой апертуры. При использовании высококачественного объектива «Plan Achromat» с числовой апертурой (NA) 0,9, требуется смещение по оси (Δz) около 0,9 мкм. При исследовании клеток требуется захват диапазона высот от 5 до 10 мкм в зависимости от типа клетки и препарата. Так, при использовании объектива «Plan Achromat» с увеличением 40x необходимо получить до 10 срезов или кадров. На Рис. 58 показан пример.

Имеющиеся на сегодняшний день программные решения обеспечивают задание либо числовой апертуры, либо показателя преломления. В полностью моторизованных системах программное обеспечение считывает значение числовой апертуры и показателя преломления объектива, находящегося в рабочем положении. После выбора флуорохрома производится автоматическое вычисление амплитуды Z, задаются максимальное и минимальное значения подъема предметного столика, и получается серия кадров по оси Z.

Деконволюция применяется непосредственно к серии изображений по оси Z. Самый мощный деконволюционный фильтр называется слепой деконволюцией. Он не подразумевает предварительных сведений о системе или образце. В нём используются сложные и занимающие много времени математические итеративные методы. В них входит метод оценки максимальной правдоподобности при ограниченной информации,

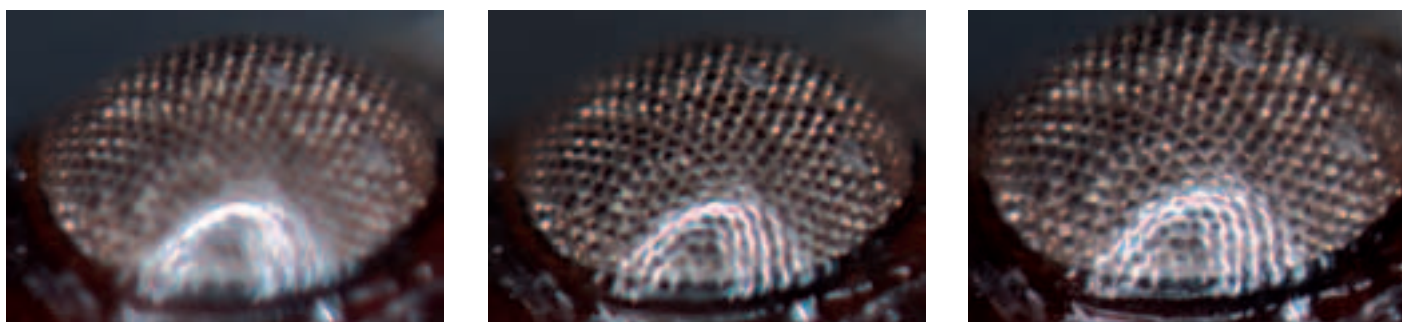


Рис. 56:
Слева и посередине: изображение глаза жука, полученное в двух разных фокальных плоскостях. Фокус (Δz) изменился так, что все структуры между данными фокальными плоскостями оказываются чётко в фокусе.
Справа: одно чёткое изображение с неограниченной глубиной резкости создано путём объединения семи оптических срезов, полученных на разных фокальных плоскостях.

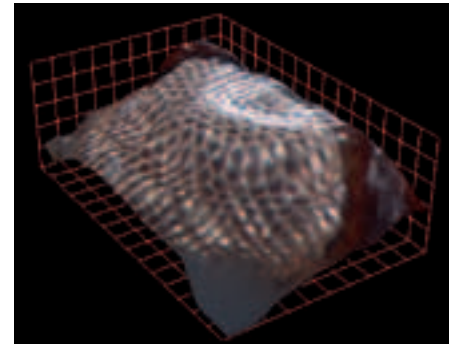
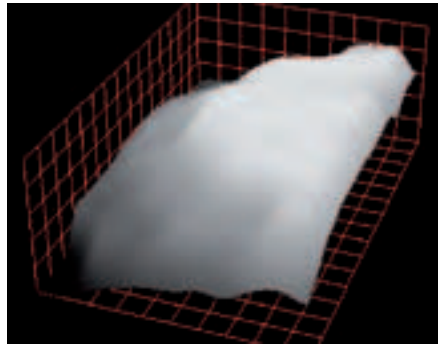
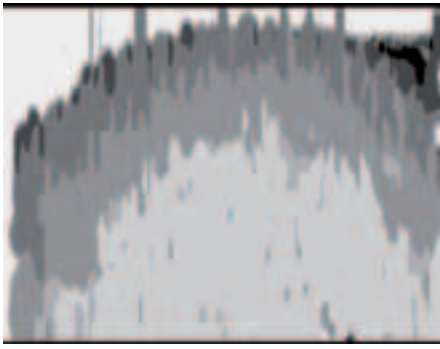


Рис. 57: Слева: карта высот. Посередине и справа: трёхмерное изображение поверхности. Форма поверхности текстурирована с помощью комбинированного изображения.

адаптированный для действующей трёхмерной функции рассеяния точки (PSF) системы (более подробное описание смотрите в пункте «Что такое функция рассеяния точки», глава «Разрешающая способность»). На основании трёхмерной PSF системы слепая деконволюция, по существу, восстанавливает трёхмерное изображение образца по серии размытых изображений по оси Z (Рис. 58, 60, 62). Деконволюционные алгоритмы применяются, в меньшей степени, к сериям изображений конфокальной микроскопии, а также к изображениям широкопольной микроскопии проходящего света.

Конфокальное изображение

Второй способ быстрого создания оптических срезов с высоким разрешением предоставляет конфокальная микроскопия. При этом световой луч, обычно лазерный, фокусируется на небольшом участке образца. Свет, исходящий из этого участка (свечение флуоресценции или отражённый свет непрозрачных материалов), улавливается чувствительным датчиком. В конфокальной оптике местоположение апертуры (обычно точечное отверстие) оптически сопряжено с фокусом. Такое сопряжённое расположение фокуса отражено в термине «конфокальный» (смотрите также Блок 4). Система устраняет свет от всех участков образца, кроме находящегося в фокальной плоскости, поэтому при сканировании вдоль осей X и Y получается оптический срез сфокусированного участка без применения программно-реализованных алгоритмов.

Один за всех

Современные программы обычно рассматривают серию изображений по оси Z как один объект. Все срезы и кадры хранятся в едином файле. Данные о разрешении и калибровке по осям X-Y, а также амплитуды по оси Z и другие параметры, такие как канал (флуорохром и длина волны), момент получения изображения, числовая апертура и показатель преломления для каждого кадра также хранятся в одном и том же файле. Отдельные слои можно просматривать раздельно. Способ быстро получить изображение всех значимых структур из полной серии срезов даёт метод проекции максимальной интенсивности, при котором в проецируемом изображении ото-

бражаются пиксели с максимальными значениями интенсивности в каждой координате X-Y по всем слоям (Рис. 58, 60, 62). Другими методами проекции являются метод проекции средней интенсивности и минимальной интенсивности.

Необходимо осторожно применять методы проекции, потому что отсутствие размытости ведёт к изображению всех деталей, находящихся на разных уровнях оси Z так, как если бы они все были на одной горизонтальной плоскости – что, разумеется, не соответствует действительности. Читатели, рассматривающие такие изображения в научном журнале, в действительности извлекут из удачного, казалось бы, цветного конфокального двумерного изображения меньше информации, чем из «нормального» широкопольного флуоресцентного изображения. Другим способом представления серии кадров является мультипликация – как при просмотре фильма. Объекты изображения действительно являются многомерными. Кроме третьей пространственной оси они могут включать разные цветовые каналы флуоресцентных образцов, помеченных несколькими метками – четвёртое измерение (Рис. 59, 60 и 62). Изображения могут также содержать пятое измерение – время: если снимки получены в разные моменты времени.

Это все объемное

Серии кадров по оси Z и многомерные изображения изображаются в виде трёхмерных объектов методом трёхмерной объёмной визуализации, или воксельной визуализации. Воксель означает минимальный объёмный элемент изображения трёхмерного пространства. На Рис. 61 показано соответствие между пикселем и вокселем. Воксель – это пиксель, имеющий дополнительно присвоенное ему значение высоты. Присвоенное значение высоты соответствует амплитуде кадров по оси Z. Так происходит восстановление вокселей из серии кадров.

Каждому вокселю трёхмерного объекта соответствует цвет. Существуют несколько общеизвестных методов объёмной визуализации, такие как методы проекции и отслеживания лучей. Согласно этим подходам трёхмерный объект проецируется на двумерную плоскость визуализации. Применение правильного метода формирования объёма гарантирует, что будет получено изображение не только внешней поверхности, но и то, что трёхмерный объект будет представлен не в виде массивного блока с нечёткими контурами. Визуализируются также внутренние структуры трёхмерного объекта, такие как сигналы флуоресценции. В методе

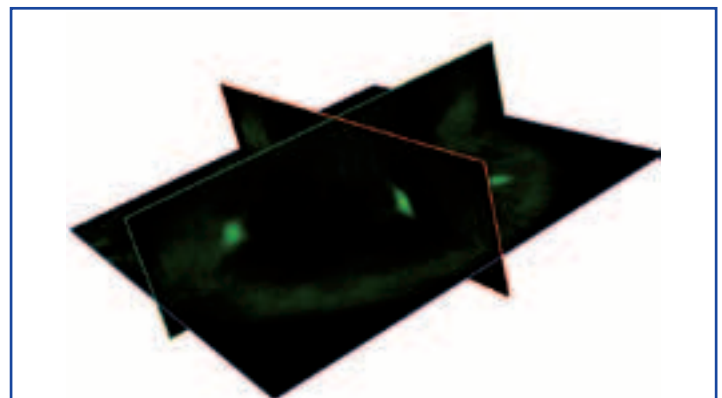
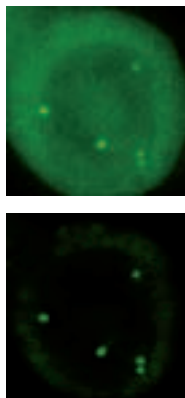


Рис. 58: Раковая ткань молочной железы, помеченная для выявления гена HER2 (краситель «Texas Red» – здесь не показан, смотрите Рис. 62) и хромосомы 17 (FITC). Вверху слева: проекция максимальной интенсивности из 25 кадров, $\lambda(\text{FITC}) = 518 \text{ нм}$, числовая апертура $NA = 1$, амплитуда по оси Z (Δz) = 0,18. Внизу слева: та же серия изображений по оси Z после применения алгоритма слепой деконволюции. Справа: изображение даёт хорошее представление о пропорциях среза в трёхмерном виде, который позволяет пространственно локализовать сигналы флуоресценции.

проекция максимальной интенсивности выбирается самый яркий воксель по линии проекции, и только этот воксель отображается в двумерном виде. На Рис. 62 показана проекция максимальной интенсивности двух цветовых каналов по 25 кадров каждый, наблюдаемых под двумя разными углами. Смена ракурса позволяет чётко локализовать в пространстве сигналы флуоресценции. Объёмная структура будет выглядеть более реалистично, когда визуализируемая в трёхмерном виде структура будет равномерно вращаться.

Сколько структур – одна или две?

Использование нескольких цветовых каналов (в каждом из которых множество слоёв по оси Z) для одного объекта изображения может вызвать ложное представление. Возникает вопрос, действительно ли две структуры, которые создают впечатление перекрывающихся, находясь пространственно в одном и том же месте, или на самом деле одна из них находится за другой. Дело в том, что два сигнала флуоресценции могут перекрываться – вследствие их близкого расположения друг к другу в пределах образца. Это явление называется колокализацией. Оно возникает, когда молекулы с несколькими метками связываются со структурами, которые находятся в очень близких или пространственно совпадающих позициях.

Объёмная визуализация даёт возможность визуально определить местоположение колокализованных структур в пространстве. В целях удобства представления и измерения колокализации объектов цифрового изображения различные сигналы флуоресценции сначала отделяются от фона. Для этого в каждом из цветовых каналов устанавливается порог. Новый объект изображения может быть создан только с использованием структур, которые были выделены посредством порогов. Колокализованные сигналы флуоресценции отображаются разными цветами. Визуализация этих объектов изображения чётко показывает колокализованные сигналы, не затрагивая фон. Чтобы получить количественные результаты, подсчитывается доля площади колокализованных сигналов в соотношении с общей площадью каждого из двух сигналов флуоресценции по всем срезам изображения (смотрите Таблицу 4).

Таблица 4:

Слой	Площадь [%] красного	Площадь [%] зелёного	Площадь [%] колокализации	Соотношение [%] колокализация/красный	Соотношение [%] колокализация/зелёный
1,00	0,11	0,20	0,04	39,60	21,22
2,00	0,15	0,26	0,07	47,76	27,92
3,00	0,20	0,36	0,10	49,93	28,08
4,00	0,26	0,53	0,13	51,84	25,32
5,00	0,35	1,34	0,20	57,39	14,87
6,00	0,43	2,07	0,26	61,00	12,81
7,00	0,38	1,96	0,24	61,66	12,07

Таблица колокализации: значение соотношения около 52% в колонке колокализация/красный для слоя 4 означает, что в данном случае 52% красных сигналов флуоресценции колокализовано с зелёными флуоресцентными структурами.

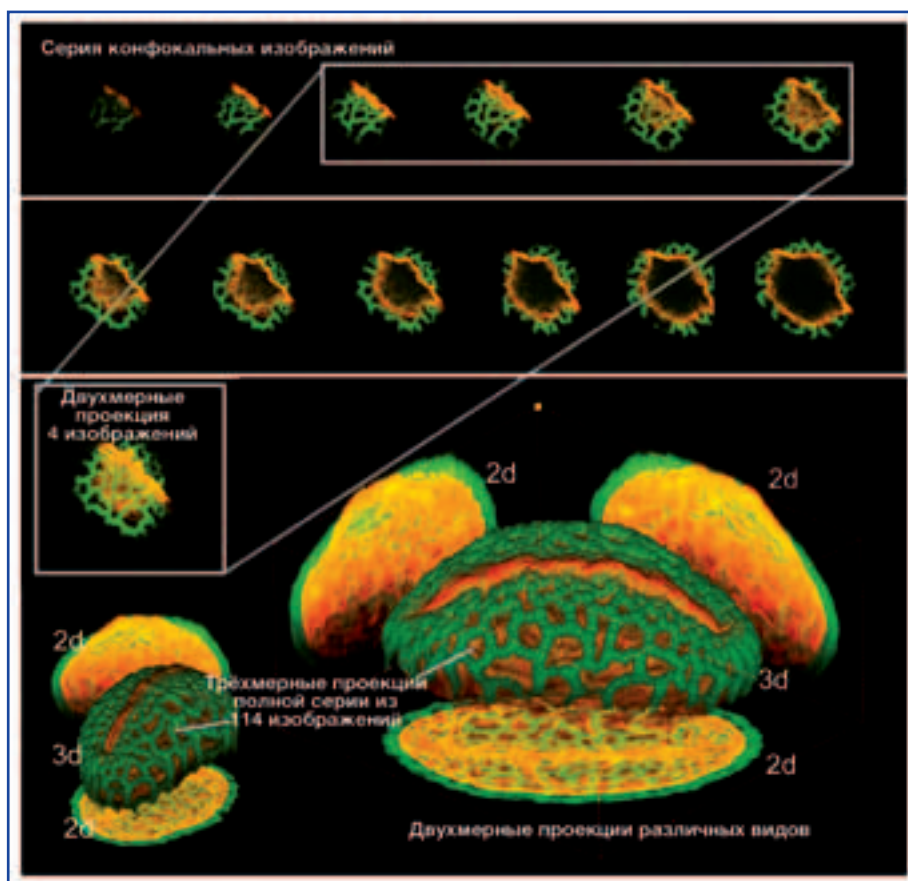


Рис. 59: Конфокальное изображение пыльцы. В верхних рядах показаны первые 12 из 114 изображений серии, которые могут быть использованы для создания либо двумерных проекций частей пыльцы, либо трёхмерного представления поверхностной структуры. Эта трёхмерная проекция показана здесь в сопровождении двумерных проекций, представляющих вид пыльцы как бы с двух различных ракурсов. Изображения были получены с помощью конфокальной системы Olympus FluoView 1000.

Трёхмерная реконструкция

Рассмотрим проблему шире и выйдем на минуту за рамки методов оптической микроскопии, позволяющих формировать изображение трёхмерных объектов. Вообще, выявление трёхмерных структур от макроуровня до атомного уровня является ключевым предметом внимания в современных биохимических исследованиях. В основных биологических процессах, таких как метаболизм ДНК, фотосинтез или синтез белка, требуются согласованные действия большого числа компонентов. Понимание трёхмерной организации этих компонентов, а также их детальной атомной

структуры имеет решающее значение для правильной трактовки их функций.

В области материаловедения устройства должны действительно «видеть», чтобы изменить объёмные параметры материалов независимо от того, каким методом это осуществляется: структурным, механическим, электрическим или функциональным. Однако, поскольку размерность структурно-значимых элементов теперь сместилась в диапазон ниже нескольких сотен нанометров, получение этих трёхмерных данных означает необходимость предварительной разработки новых методов, которые позволят отображать и изучать объёмные структуры. Среди таких методов свою пользу как в бионауках, так и в материаловедении доказали различные приёмы трёхмерной реконструкции. Они дают особо наглядные и информативные объёмные изображения. Поэтому теперь перейдём к более тщательному рассмотрению двух из этих методов трёхмерной реконструкции: в одном из них используется серия изображений образца, полученных с помощью светового микроскопа, во втором применяется электронная томография с помощью трансмиссионного электронного микроскопа.

Трёхмерная реконструкция с использованием серии изображений срезов образца

Одним из распространённых методов при трёхмерной реконструкции является метод получения серии ультратонких срезов иссле-

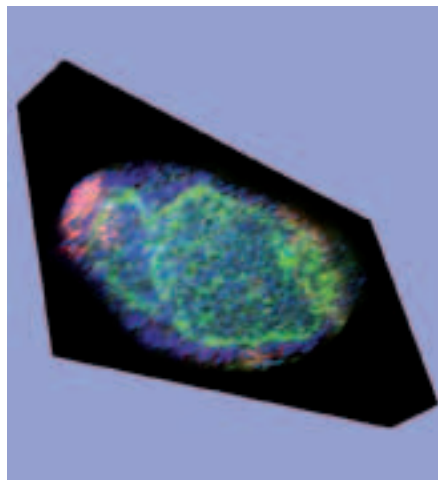
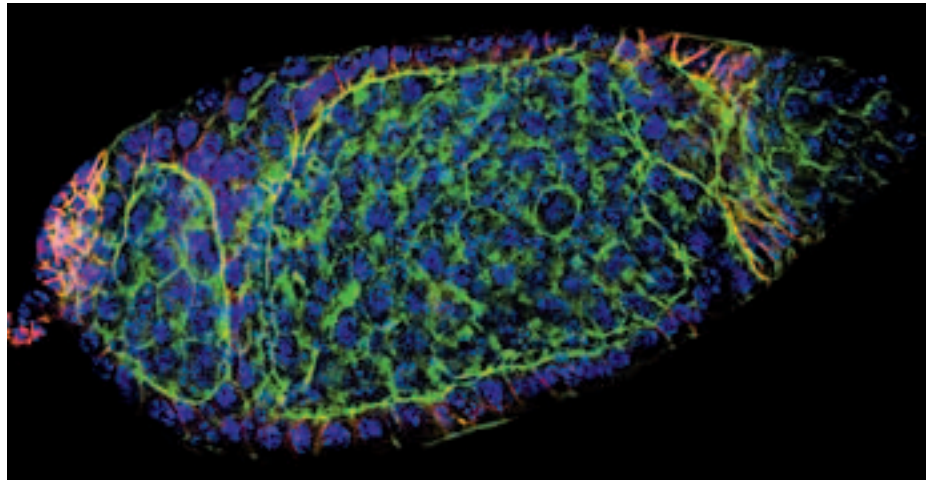
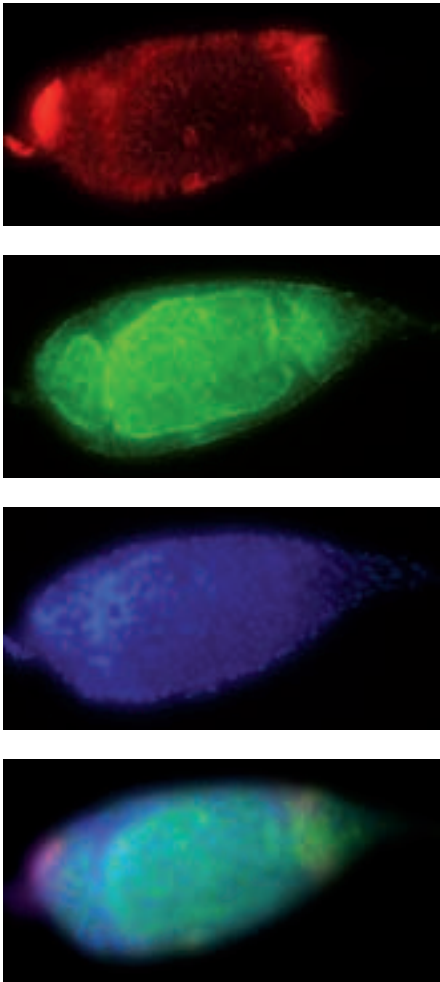


Рис. 60: Овариола *bgsn*-мутанта дрозофилы обыкновенной. Многоцветный канал и изображения из серии кадров по оси Z могут быть совмещены в одном объекте. Этот изображаемый объект имеет три цветовых канала, каждый из которых состоит из 41 кадра серии снимков по оси Z. Это изображение сформировано методом проекции максимальной интенсивности. Красным цветом: Fascin III, зелёным: F-актин, синим: ядра. Вверху справа: отдельный слой по оси Z после применения алгоритма слепой деконволюции ко всем трём каналам изображаемого объекта. Слева: трёхмерная структура, полученная методом объёмной визуализации. Снимки любезно предоставил: Д-р Ральф Рюбсам (Dr. Ralph Rübсам), Институт биологии, Эрланген-Нюрнбергский Университет, г. Эрланген, Германия.

дуюемого образца. Затем эти препараты окрашиваются. Окрашивание облегчает процесс распознавания структур и/или выделяет конкретные части. Препараты исследуют под микроскопом по отдельности и зарисовывают их. Эти рисунки затем увеличивают в масштабе. В прошлом трёхмерную модель реконструировали послойно из кусков картона, вырезанных в соответствии с изображениями. В качестве альтернативы для построения модели использовался воск или пластик. Сегодня процесс значительно упрощается с использованием компьютерной сборки виртуальной модели. Специальные программы трёхмерного моделирования рассчитывают модель на базе оцифрованных срезов изображения. Такая модель называется трёхмерной реконструкцией.

Современные мощные программы обеспечивают трёхмерную обработку, визуализацию и анализ данных трёхмерного изображения. Эргономические функции и гибкое управление проектированием дают пользователю возможность реконструировать даже самые сложные модели и позволяют легко проникать во внутренний вид таких структур. До сих пор формировать изображения такого внутреннего вида было крайне сложно. В Блоке 16 представлены необходимые операции трёхмерной реконструкции, которые, например, выполняются для визуализации процессов эмбрионального роста в трёх измерениях. Данный подход вызывает интерес также и при

исследованиях в других областях – таких как материаловедение.

Трёхмерная реконструкция с использованием наклона образца

Томография представляет собой другой способ трёхмерной (3D) реконструкции образца на основе серии двухмерных (2D) микроснимков. Некоторые возможности томографии образца применяются не только в электронной микроскопии (называемые электронной томографией), но и в компьютерной аксиальной томографии (КАТ) – известной многим по её медицинскому применению как компьютерная томография (КТ).

Компьютерная томография в течение долгого времени входила в стандартный набор для повседневного применения в медицине. Значение трансмиссионной электронной томографии возросло за последние несколько лет. Она сделала возможным то, что в биоло-

гии казалось невозможным: формирование трёхмерных изображений внутриклеточных структур, имеющих нанометрические размеры. Это стало реальностью благодаря соединению новых технологий – соответствующим образом оборудованных электронных микроскопов, высокочувствительных ПЗС-камер с высоким разрешением, увеличения производительности компьютерного процессора и усовершенствования программ.

Принцип действия электронной томографии в действительности очень прост (смотрите Блок 17). Держатель образца наклоняется вдоль хорошо отцентрированной оси (если это возможно), и в ходе этого процесса в широком диапазоне углов формируются изображения. Тем самым обеспечивается должное разрешение трёхмерной структуры по всем трём осям. Обычно образец наклоняется вдоль одной оси в диапазоне не менее чем от -60° до $+60^\circ$, при этом изображения (проек-

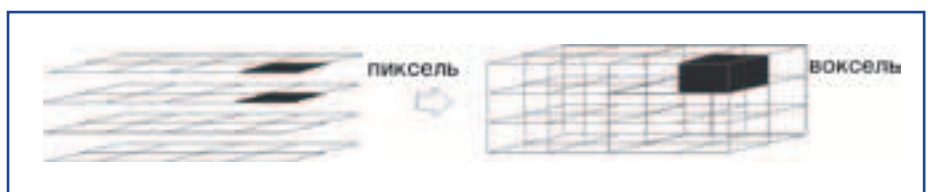


Рис. 61: Двухмерный пиксель (элемент двухмерного изображения) достраивается до трёхмерного вокселя (элемент объёмного изображения).

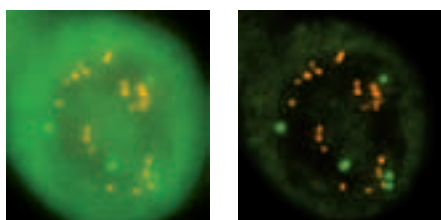
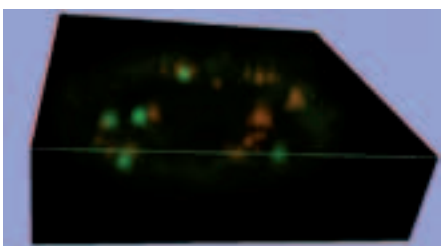
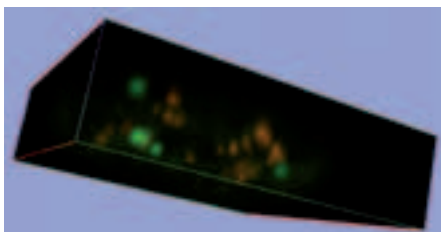


Рис. 62: Раковая ткань молочной железы, помеченная для выявления гена HER2 (краситель «Texas Red») и хромосомы 17 (FITC).

Вверху слева: проекция максимальной интенсивности из 25 кадров, $\lambda(\text{FITC}) = 518 \text{ нм}$, числовая апертура $NA = 1$, амплитуда по оси $Z (\Delta z) = 0,18$. Вверху справа: к обоим каналам применён метод слепой деконволюции. Слева: проекция максимальной интенсивности. Визуализация структуры в объёме под двумя разными углами позволяет рассмотреть пространственную композицию сигналов флуоресценции.



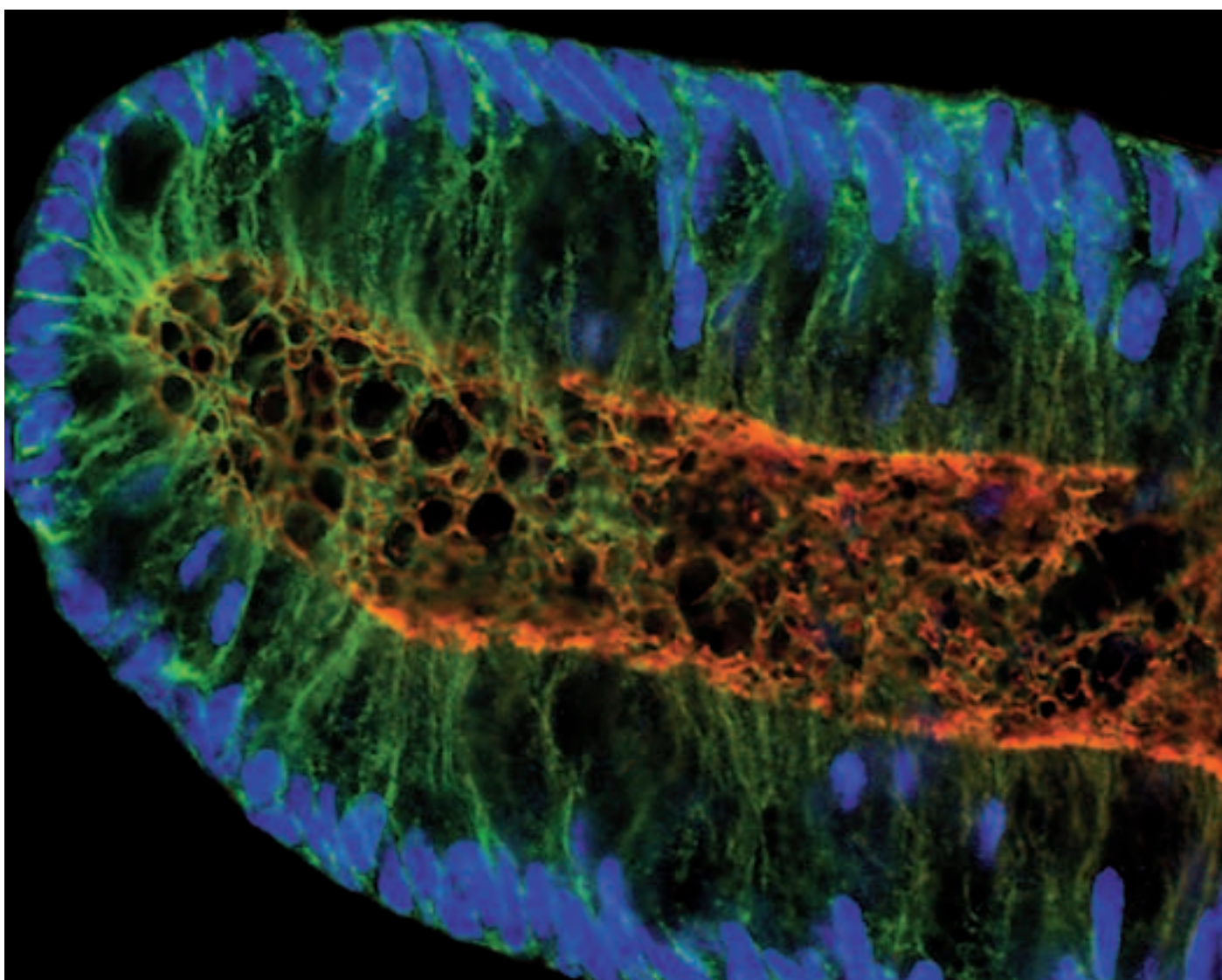
ции) регистрируются с равным шагом в 1° или 2° . Снимки делаются с использованием ПЗС-камеры и хранятся в виде массива наклонных изображений. Вследствие таких явлений, как смещение образца, отклонение положения оси или тепловое расширение, массив наклонных изображений необходимо выравнивать до начала последующей обработки. После выравнивания массив готов к реконструкции, для выполнения которой используются разные подходы. Имеются два метода, которые называются $|w|$ -фильтрация и (не)взвешенная обратная проекция с применением БПФ (быстрого преобразования Фурье). Получен-

ное реконструированное изображение сохраняется и воспроизводится в виде массива по оси Z . В Блоке 17 описаны необходимые этапы процедуры электронной томографии.

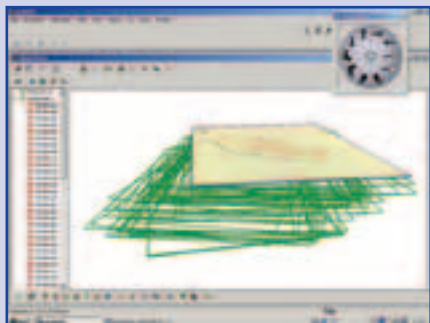
Чем больше измерений – тем больше можно увидеть

Многие методы анализа изображений, особенно двух- и трёхмерные подходы, получили общее признание и ежедневно применяются как в сфере производства, так и исследований. Появились новые технологии для применения в биологических науках, которые предполагают ещё больше измерений и которые, очевидно, в обозримом будущем также упрочат своё положение.

Как описано выше, длина волны рассматривается как четвёртое измерение в области флуоресцентной микроскопии. Возможность различать длины волн обеспечивает дополнительную структурную информацию. Существует много новых практических применений этой методики. Изменение образца во времени так же имеет решающее значение в биологических науках. Одной из причин этого, в частности, является возможная важ-



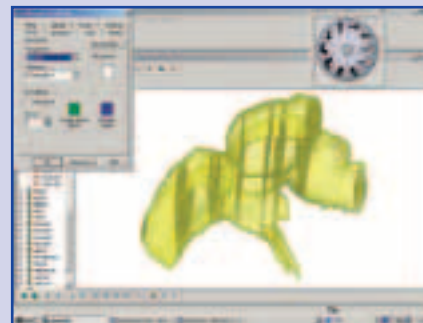
Блок 16. Этапы трёхмерной реконструкции, в которой используется серия изображений срезов образца



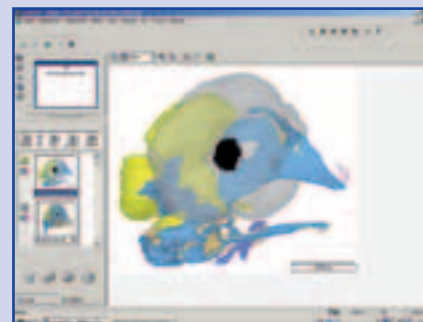
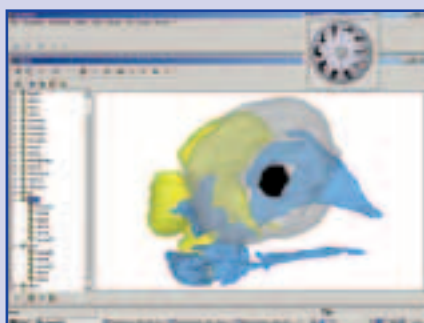
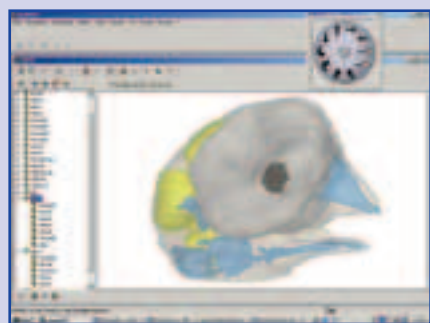
Раньше, чтобы построить трёхмерную модель, склеивали вместе вырезанные вручную куски картона. Сегодня эту задачу берёт на себя компьютер. Сначала с помощью программы получают цифровые микроскопические изображения серии снимков (или, как в данном случае, сканируются и заносятся в компьютер рисунки). Затем программа укладывает эти оцифрованные срезы один на другой. Любые сдвиги или отклонения от оси можно скорректировать в диалоговом или полуавтоматическом режиме.



Контуры структуры ткани очерчивают с помощью курсора или они автоматически распознаются прикосновением инструмента «волшебная палочка» (подход локального порога). Затем программа реконструирует контуры в виде многоугольников. Так обрабатывается сканированный рисунок в стереомикроскопе. В точности такую же процедуру выполняют при использовании цифровых микроскопических изображений.



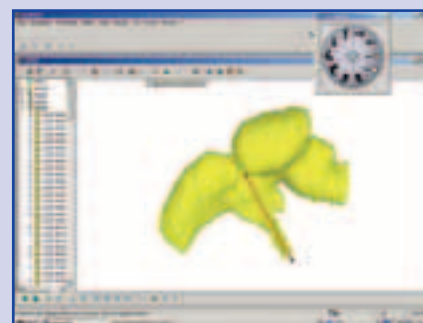
Программа объединяет двухмерные многоугольники отдельных слоев и формирует пространственные, трёхмерные структуры. Эта операция выполняется в автоматическом режиме. В случае необходимости можно внести коррективы вручную. С помощью навигационных инструментальных средств объект можно увеличить, уменьшить или пространственно повернуть в любом направлении.



Здесь представлена полная реконструкция черепа зародыша перепела. Чтобы исследовать и производить точные измерения, важно иметь возможность проникать внутрь модели. Для этого отдельные части необходимо сделать прозрачными или полностью удалить их из поля зрения.



Подготовка виртуального образца: реконструированное в цифровой форме изображение черепа зародыша перепела может быть в любое время разложено на составные части. Виртуальные срезы также могут быть сформированы в любых направлениях.



Всё можно определить непосредственно в трёхмерном представлении: расстояние, длину ломаной линии, площадь, объём и абсолютные координаты.

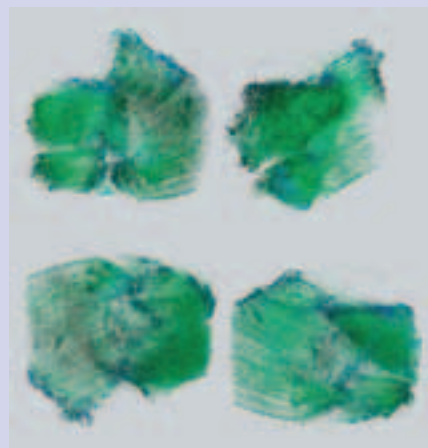
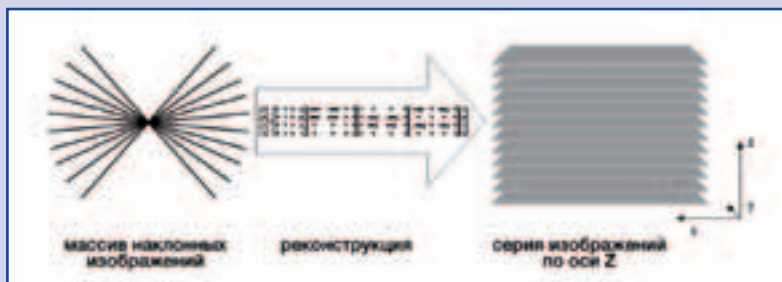
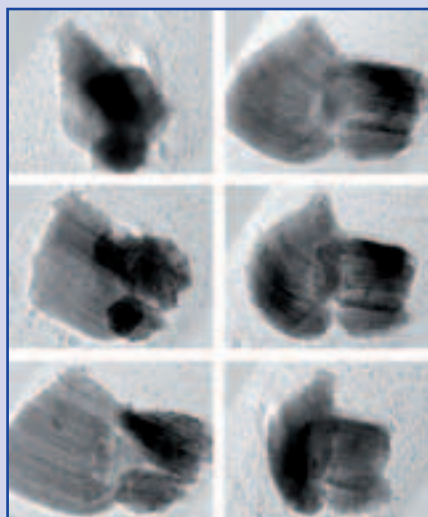
ность этой информации для оценки роста клеточных культур или поведения молекулы, помеченной флуоресцирующей меткой, на временном интервале (смотрите пункт «Микроскопия изображений на основе продолжительности флуоресценции» в главе «Детали яркого свечения»). Кроме того, существует информация, которая может быть эффективно использована в дополнение к информации о положении по осям X, Y. Одним

из примеров служит потеря энергии, которая играет ключевую роль в таких применениях флуоресценции, как метод FRET (смотрите пункт «Свет как линейка» в главе «Сверкающая флуоресценция»). Это явление также применяется в нескольких методах электронной микроскопии. Рассмотрим два таких метода: рентгеновский микроанализ и трансмиссионная электронная микроскопия с использованием энергетического фильтра (EFTEM).

Объединение морфологических и химических данных

Рентгеновские лучи можно представить как электромагнитное излучение с длиной волны в диапазоне от 10^{-9} до 10^{-11} м или как энергию в диапазоне 10 эВ–100 кэВ, соответственно. Рентгеновские лучи применяются для проведения элементного анализа в области биологии, а также при исследовании материалов. С

Блок 17. Этапы трёхмерной реконструкции с помощью электронной томографии (ТЕМ).



Сбор данных с помощью автоматизированной электронной томографии включает сложную настройку ТЕМ, ПЗС-камеры и систем сбора и обработки данных. Обычно для сбора данных требуется наклон в диапазоне $\pm 90^\circ$. Однако, диапазон вращения ограничен вследствие геометрической формы держателя образца или толщины самого образца. Это означает, что на практике регистрируются углы наклона в диапазоне от -70° до $+70^\circ$ с эквидистантными интервалами. На рисунке показано только 6 из не менее 144 полученных изображений, составляющих полный комплект (снимок любезно предоставлен Олегом Абросимовым, Новосибирский университет, Россия).

Основной функцией, предоставляемой автоматизированной электронной томографией, является автоматическое выравнивание серии наклонных изображений. Для этого используются различные алгоритмы. Жёсткая ось рассчитывается на базе таких данных, как увеличение, диапазон наклона и приращение. Затем изображения сохраняются в файл выровненных наклонных изображений.

Для создания массива изображений по оси Z на базе данных, хранящихся в файле наклонных изображений, применяются специальные программы реконструкции.

Трёхмерный внутренний вид образца можно представить с помощью специализированных средств визуализации. Есть возможность обработать последовательности изображений средствами мультимедиа и сохранить их в виде файлов в формате .AVI. На рисунке показаны 4 разных вида, выбранных из одного файла .avi.

помощью специальных детекторов регистрируется характеристическое рентгеновское излучение и радиационное торможение электронов внутри вещества. После внесения поправки на поглощающую способность, атомный вес и флуоресценцию каждый срез образца изображает характерный спектр. Сканируя образец и одновременно регистрируя сигналы рентгеновских лучей, получают и визуализируют изображение распределения элемента. Посредством анализа собранных изображений получают такую дополнительную информацию, которая ранее была недоступна. Такая методика (Рис. 63) широко используется и называется энергодисперсионным рентгеновским анализом (EDX).

Сочетание анализа цифровых изображений с рентгеновским микроанализом позволяет изучать и описывать свойства новых материалов, что предполагает исследование макроскопических свойств материала в соотношении с его микроструктурой. Одним из таких применений, где это необходимо, является рафинирование и разработка алюминиевых сплавов, производство и технологические процессы. Чтобы получить статистически надёжные и репрезентативные результаты анализа, требуется большое количество образцов. Для исследования частиц в диапа-

зоне 10–300 нм применяется пропускающий электронный микроскоп (ТЕМ) с интегрированным режимом сканирования, обеспечивающий необходимое локальное разрешение наряду с достаточной интенсивностью излучения электрона. Весь процесс получения и анализа данных, включая параллельный контроль ТЕМ и EDX, а также анализ полученных изображений, автоматизирован и управляется с помощью программного обеспечения. Полученные в рамках анализа морфологические данные сохраняются и отображаются в виде таблиц и графиков. Впоследствии производится автоматизированное построение спектра методом EDX – в центре исследуемых частиц. Эти данные также сохраняются и автоматически оцифровываются. Затем в сочетании с измерением толщины слоя определяется доля объёма экссудации. Эти результаты дают исследователям важную микроструктурную информацию (Рис. 64).

Объединение локальных данных с данными о потере энергии

Всё большее значение приобретает возможность анализа многомерных изображений, включая серии изображений электронной микроскопии с использованием энергетиче-

ского фильтра. В ЕФТЕМ (трансмиссионная электронная микроскопия с использованием энергетического фильтра) контраст изображения достигается, главным образом, благодаря рассеянию электронов в образце – как и в традиционной ТЕМ-микроскопии (Блок 18). В то время как в традиционной ТЕМ-микроскопии в основе контраста лежит отбор по углам рассеянных электронов, при использовании ЕФТЕМ электроны подвергаются дополнительному отбору по энергии – с помощью спектрометра. При этом отбираются только электроны определённого уровня потери энергии (по спектру пропускаемых электронов) – участки со сниженной контрастностью не видны. Это означает, что в процессе получения изображения участвуют только электроны с конкретными значениями потери энергии. Таким образом, в результате получают усиленный контраст для изображений всех типов. Поскольку этот метод не оказывает воздействия на локальное разрешение, он позволяет получать высококонтрастные изображения тонких и неконтрастных, а также замороженных образцов или образцов нестандартно большой толщины. Более того, этот подход даёт возможность также выбрать электроны с очень специфической характеристикой рассеяния, создавая таким образом струк-

Блок 18: Как создаётся элементная карта железа?

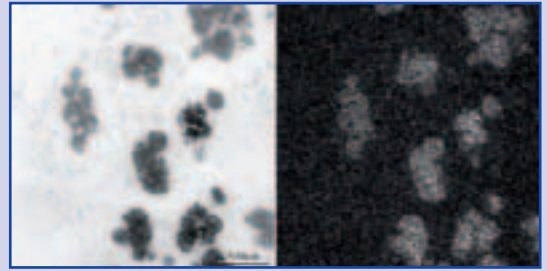
EFTEM означает «трансмиссионная электронная микроскопия с использованием энергетического фильтра». В методе EFTEM электронный пучок пропускается через образец (в данном случае, ультратонкий срез ткани головного мозга), и на плоскости изображения формируется увеличенное изображение образца. Встроенный энергетический фильтр позволяет создать электронно-спектроскопические изображения (ESI). Если энергетический фильтр установлен на 725 эВ, например, то плоскости изображения достигают только те электроны, потеря энергии которых составляет 725 эВ (при прохождении через образец). Все остальные электроны энергетический фильтр блокирует.

Значение 725 эВ является типичной потерей энергии электрона из пучка, когда он «простреливает» образец в непосредственной близости от атома железа и вызывает особого вида переход во внутренней оболочке. Энергетический фильтр пропускает такие электроны, которые участвуют в формировании изображения в плоскости изображения. К сожалению, другим электронам также удаётся пройти сквозь фильтр, и они оказывают воздействие на формирование изображения. Их значение потери энергии случайно совпадает с величиной 725 эВ – вследствие того, что они были «выбиты», например, многократными ударами при прохождении электронов сквозь образец. Если бы не присутствие этих случайных электронов, электронно-спектроскопическое изображение при потере 725 эВ могло бы дать непосредственное представление элементной карты железа. Это значит, что на изображении отражалось бы реальное распределение железа в образце.

Элементная карта рассчитывается с помощью множества электронно-спектроскопических изображений ESI. С помощью так называемого метода трёх окон получают 3 изображения ESI. Первое изображение получается при значении потери энергии 725 эВ, а второе и третье – при более низких значениях и используются для расчёта «фоновое изображение», которое затем вычитается из первого изображения. Так, из изображения номер один удаляются любые фоновые помехи (включающие все контрастные элементы, образованные под действием упомянутых выше случайных электронов). В результате формируется необходимая элементная карта железа, которую затем используют для количественных измерений.

Железо предположительно играет важную роль в болезни Паркинсона. С помощью электронного микроскопа можно наблюдать значительное изменение концентрации железа в поражённой области среднего мозга. Снимок слева – это электронно-спектроскопическое изображение ультратонкого среза, взятого из substantia nigra** пациента с болезнью Паркинсона (обратное изображение). Затенённые участки представляют нейромеланин. На снимке справа находится элементная карта железа, рассчитанная на базе метода трёх окон. Светлые участки показывают области скопления железа. Количественный анализ приведённого выше примера указывает на концентрацию железа, в три раза превышающую концентрацию, характерную для мозга здорового человека. (Использовался трансмиссионный электронный микроскоп LEO 912 AB (ускоряющее напряжение 120 кВ, потеря энергии электронов 725 эВ) в сочетании с программой анализа изображений «analySIS TEM EsiVision» (проф. Н. Нагаи (Prof. N. Nagai) и д-р. Н. Нагаока (Dr. N. Nagaoka))

**substantia nigra: область, расположенная в среднем мозге и представляющая собой слой крупных пигментированных нервных клеток, производящих дофамин. Разрушение этих клеток связывают с болезнью Паркинсона.



турный или зависящий от элемента контраст в изображении. Подобные изображения служат источником информации об образце, которая ранее была недоступна.

Стандартное и дистанционное управление электронным микроскопом в целях получения, визуализации и анализа изображений и спектров осуществляется с помощью специальной программы. Многие данные могут

быть получены только путём компьютеризированной обработки и анализа. Данный метод применяется в области биомедицины, например, в качестве доказательства присутствия минеральных частиц в лёгочной ткани человека или при исследовании болезней, связанных с накоплением излишнего количества железа. Широкое распространение этот метод получил также в материаловедении: напри-

мер, основные влияния на механические свойства стали – т.е., вторичные факторы, такие как экссуляция или зернограничные фазы (карбид, нитрид или также интерметаллические фазы). Крайне важным является определение точного химического состава, размера, распределения и плотности, и эту информацию можно получить методом EFTEM. Традиционные методы не подходят для этих целей.

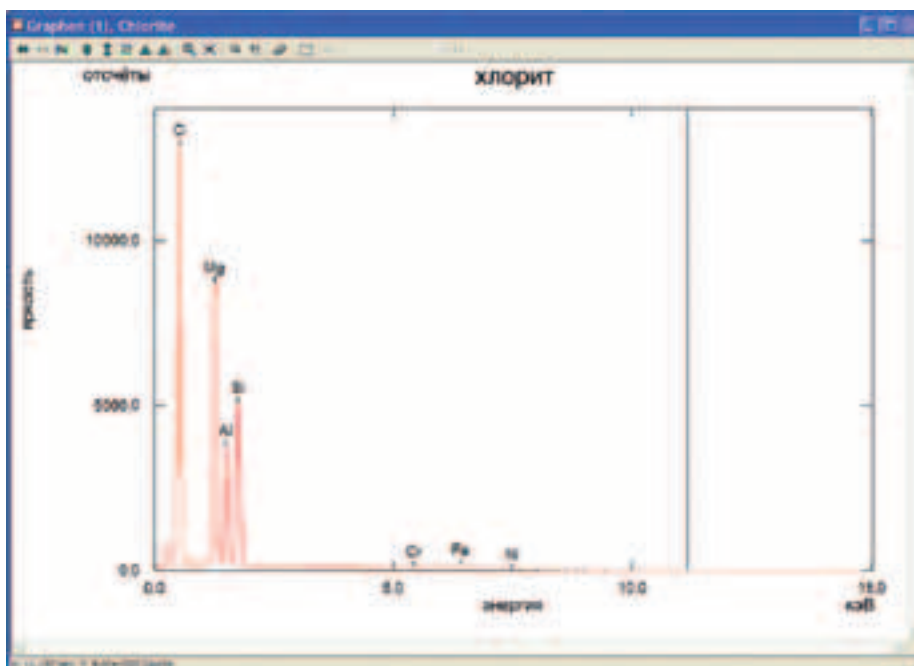


Рис. 63: Типичный спектр EDX

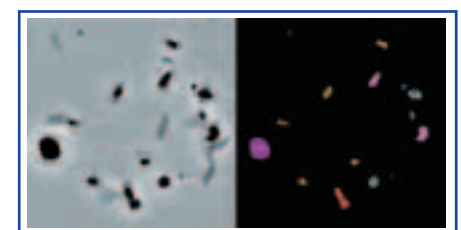


Рис. 64: а) получение изображения экссуляции алюминия, б) изображение после выявления и классификации. После морфологической оценки проводится химический анализ.



ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРЕГРАД – ЕСТЕСТВЕННЫЙ ИНСТИНКТ

Вы не удовлетворены своими экспериментами с культурами клеток? Olympus предлагает Вам выход: система нового поколения для получения и анализа изображений Olympus **cell[®]** – Ваш шанс на пути к новым открытиям и неограниченным возможностям. Сочетание микроскопа, цифровой камеры, уникальной системы освещения, блока управления в реальном времени, компьютера и программных инструментов Olympus предлагает надежное, присущее только Olympus качественное решение для флуоресцентной микроскопии. С системой **cell[®]** даже самые сложные эксперименты могут быть спланированы, проведены и проанализированы легко, быстро и удобно – давая Вам время сконцентрироваться на Вашем эксперименте и его результатах, вместо того, чтобы тратить время на освоение сложной техники. Сэкономленное время пригодится: благодаря оптимальному уровню интеграции и безупречной синхронизации всех компонентов, система **cell[®]** обеспечивает получение изображений и данных с высочайшей степенью точности. Не позволяйте технологическому несовершенству препятствовать Вашему успеху – Olympus предоставит Вам больше возможностей для Ваших исследований!



Об авторах

Д-р Райнер Вегерхофф (Dr. Rainer Wegerhoff)

Д-р Вегерхофф родился в г. Хукесваген недалеко от Кёльна в 1964 году, изучал биологию в Боннском университете и защитил кандидатскую диссертацию в области экспериментальной нейробиологии в 1994 году. Работая в Институте биохимии в г. Киль с 1994 по 1999 гг., он возглавлял исследовательскую группу, основным предметом деятельности которой являлось токсикологическое воздействие инсектицидов на развитие головного мозга.

С 1999 г. д-р Вегерхофф работал в Европейском отделении компании Olympus в г. Гамбурге, где отвечал за подготовку (Академия Olympus) и аттестацию специалистов в области микроскопии. В настоящее время он является – руководителем отдела аттестации, «Olympus Life and Material Science Europa GmbH».

Д-р Олаф Вайдлих (Dr. Olaf Weidlich)

Д-р Вайдлих родился в г. Хамм (Вестфалия) в 1964 году, изучал физику и философию в Мюнстерском университете (Вестфалия) с 1983 по 1989 гг., темой его дипломной работы стала электронная микроскопия. Д-р Вайдлих проводил исследования для своей кандидатской диссертации в области биофизики в Фрайбургском университете (Брайсгау) с 1991 по 1995 гг., темой его диссертации стала инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье на примере белков сетчатки. Занимая после присвоения учёной степени в 1996 г. должность в Аризонском университете в г. Таксон (США), д-р Вайдлих работал в области рамановской спектроскопии светочувствительных белков. Он вернулся в Германию в 1997 году и приступил к чтению лекций стажёрам по физике и химии в г. Эссен (Северный Рейн-Вестфалия). В 1998 году д-р Вайдлих перешёл на работу в фирму «Soft Imaging System», которая в настоящее время называется «Olympus Soft Imaging Solutions GmbH», в качестве эксперта и инструктора по вопросам технической документации. Сейчас он отвечает за курсы для клиентов (ЦЕНТР обучения) в компании.

Д-р Манфред Кэссенс (Dr. Manfred Kässens)

Д-р Кэссенс родился в г. Харен (Нижняя Саксония) в 1964 году, изучал физику с 1986 по 1996 гг. в Мюнстерском университете (Вестфалия). Темой его дипломной работы по физике в 1993 году стала электронная микроскопия. Также начав работу по написанию своей кандидатской диссертации в области физики в Мюнстерском университете, он защитил диссертацию в области электронной микроскопии в 1996 году. В том же 1996 году д-р Кэссенс перешёл на работу в фирму «Soft Imaging System», которая в настоящее время называется «Olympus Soft Imaging Solutions GmbH», в качестве менеджера по работе с ключевыми клиентами в отделе продаж и поддержки. С 1999 года он занимает должность менеджера по вопросам маркетинговой коммуникации в компании.

Благодарность:

Выражаем свою признательность следующим людям, которые внесли значительный вклад в создание данного обзора:

Д-ру Аннетт Бурцлафф (Dr. Annett Burzlaff) – за соавторство в написании главы, посвящённой флуоресценции.

Майклу В. Дэвидсону (Michael W. Davidson), (Национальная лаборатория сильных магнитных полей, Университет штата Флорида) – за многочисленные предоставленные снимки. Авторы получили доступ к огромным информационным ресурсам на его веб-сайтах при подготовке этого обзора.

Эстер Арент (Esther Ahrent), (начальник отдела маркетинговой коммуникации – фирма «Olympus Life and Material Science Europa GmbH») – за её координационную деятельность на всех этапах этого проекта.

Рисунки

Рисунки 1–10; 12; 17; 44А; Блок 13; Блок 14: данные любезно предоставил Майкл В. Дэвидсон (Национальная лаборатория сильных магнитных полей, Университет штата Флорида).

Рисунок 48: данные любезно предоставил д-р Пауло Магалхаес (Dr Paulo Magalhaes) и профессор, д-р Туллио Поццан (Prof. Dr Tullio Pozzan), Университет Падуи, Италия

Рисунок 51: данные любезно предоставили Р. Андо, д-р А. Мияваки, Лаборатория динамики функционирования клеток при Институте исследований мозга РИКЕН, Вако, Сайтама, Япония

Рисунок 52: данные любезно предоставили А. Мияваки, Т. Нагаи, Т. Мияучи, Лаборатория динамики функционирования клеток при Институте исследований мозга РИКЕН, Вако, Сайтама, Япония

Рисунок 53: данные любезно предоставил М. Фаретта, Европейский Институт онкологии, отделение экспериментальной онкологии, проточной цитометрии и оптических изображений, г. Милан, Италия

Рисунок 60: данные любезно предоставил д-р Ральф Рюбсам, Институт биологии, Университет Эрланген-Нюрнберг, г. Эрланген, Германия

Блок 15, Рисунок 1: данные любезно предоставили Х. Мицуно, А. Мияваки, Лаборатория динамики функционирования клеток при Институте исследований мозга РИКЕН, Вако, Сайтама, Япония

Заключение:

Данный обзор показывает со всей очевидностью, что темы микроскопии и формирования изображения очень обширны, и многое осталось ещё за рамками обсуждения. Например, в связи с быстрым развитием технологий в данной области совсем не была затронута во всей глубине тема носителей информации. Поэтому мы призвали наши знания в микроскопии и формировании изображений для отбора необходимой ключевой информации, которая даст читателю солидную базу знаний в этих постоянно развивающихся областях.

Невероятные темпы развития технологии в последнее время открывают новые возможности для применения их в микроскопии и формировании изображений. Например, современный рост использования цифровой микроскопии привел к развитию виртуальной микроскопии, которая дает возможность видеть весь образец как одно изображение из любой точки. С развитием новых технологий пользователи получают всё более масштабное изображение, что, в свою очередь, даёт возможность лучше понимать увиденное во многих областях применения. Кто знает, что принесёт с собой будущее, но ясно одно – оно выглядит блестяще для пользователей в области микроскопии и формирования изображений ...

Москва ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

ДИА•М

современные лаборатории

Новосибирск
пр. Акад.
Лаврентьева, 6/1
тел./факс:
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань
Оренбургский
тракт, 20
тел./факс:
(843) 277-6040
kazan@dia-m.ru

Санкт-Петербург
ул. Профессора
Попова, 23
тел./факс:
(812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
пер. Семашко, 114
тел./факс:
(863) 250-0006
rnd@dia-m.ru

Пермь
Представитель
в УФО
тел./факс:
(342) 202-2239
perm@dia-m.ru

Воронеж
тел./факс:
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru

