

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра оптики и биофотоники

**«Трёхмерная микроскопическая визуализация методом селективного
освещения»**

АВТОРЕФЕРАТ

на магистерскую работу

по направлению 03.04.02 «Физика»

студента 2 курса физического факультета

Сафонова Владимира Альбертовича

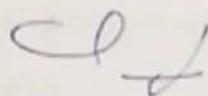
Тема работы: «Трёхмерная микроскопическая визуализация методом
селективного освещения»

Научный руководитель

доцент кафедры

оптики и биофотоники,

д.ф.-м.н., доцент

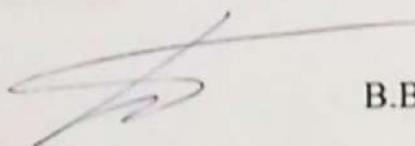


И.В. Федосов

Заведующий кафедрой

оптики и биофотоники,

д.ф.-м.н., профессор



В.В. Тучин

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Современный мир микроскопии является очень важным и сложным для исследований в науке, новые исследования требуют приборов, способных идти в ногу со временем. Биологическая визуализация включает в себя как целые модели организмов, так и трехмерные экспланты¹ тканей, которые должны быть отображены таким образом, чтобы минимизировать их возмущения и сохранить их физиологическую целостность в качестве экспериментальной модели.

Фото-обесцвечивание и фото-токсичность долгое время были основными проблемами в области биологической визуализации, они могут оказывать весьма пагубное влияние на здоровье и функционирование всех биологических уровней организации. Таким образом, визуализация подобных больших и чувствительных образцов требует эффективного подхода к 3D-реконструкции, что минимизирует длительность воздействия излучения на образец.

Один из современных и распространённых подходов к решению данной проблемы- это метод флуоресцентной микроскопии «светового луча» Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM) в задачах прижизненной микроскопии. В выпускной квалификационной работе представлены реконструированные трехмерные модели полистирольных фантомов тканей.

В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. Провести обзор современных достижений.
2. Разработать собственную установку флуоресцентного микроскопа с селективным облучением микрообъекта.
3. Построить оптическую 3D модель наблюдаемого объекта.
4. Дать оценку полученным результатам.

¹ 1 – Эксплант (лат. explanto — вырываю что-нибудь, растущее с корнем) — группа клеток, отделенная от материнского организма. Используется в биологических исследованиях, связанных с микрклональным размножением растений.

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, двух глав, заключения и списка литературы. Во введении описывается актуальность работы, основные сферы применения селективного освещения, поставлены основные цели магистерской работы. В главе 1 «обзор современных достижений» проводится теоретический обзор по теме выпускной квалификационной работы. Введено понятие – флуоресцентная микроскопия селективного освещения– LSM. Во второй главе «экспериментальная часть» описаны схемы построения установок для визуализации объектов. В разделе «трехмерная реконструкция объектов» были получены массивы изображений, на базе которых построены трехмерные оптические модели фантомов. Была произведена трехмерная реконструкция сосудов наружного уха лабораторной мыши. В Заключении сформулированы основные результаты и выводы.

Основное содержание работы.

Во введении выделена актуальность работы, основные сферы применения микроскопии селективного освещения, поставлены основные цели выпускной квалификационной работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы.

1.1 История развития микроскопии «светового ножа», процесс и механизм действия.

1.2 Обзор современных достижений в селективной микроскопии

Глава 2 описывает экспериментальную часть работы. За основу установки был взят оптический микроскоп МБР - 1. Лазерное излучение использовалось с длиной волны 405 нм, мощность которого равна 15 мВт/см². Яркости и контраста изображений частиц достаточно для их записи с помощью видеокамеры с частотой кадров до 24 кадров в секунду без использования усилителя изображения. Управление и получение изображений использовалась с помощью программного обеспечения, написанного в среде LabView, NI Vision и Arduino. Визуализация была проведена за красителем - флуоресцеин натрия (рисунок 1), который находился в микроканалах

полистирольного фантома. [38] Концентрация красителя для биологических объектов подобрана из расчета 5мг на 1кг. Длина волны поглощения 465-490 нанометров, флуоресценция наблюдается на длине волны 520-530 нанометров.

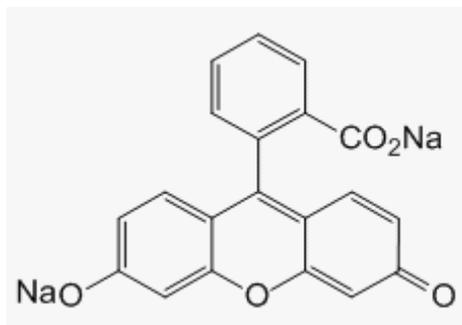


Рисунок 1. Флуоресцеин натрия (Fluoresceinum natrium (род. Fluoresceini natrii) Химическое название 3',6'-Дигидроксиспиро[изобензофуран-1(3H),9'-[9H]ксантен]-3-она динатриевая соль.

Глава 2.1 разработка и реализация экспериментальной установки

В этой работе с на основе обзора современных достижений была воспроизведена установка флуоресцентной микроскопии LS с вертикальным освещением для визуализации объектов. (Рисунок1.1)

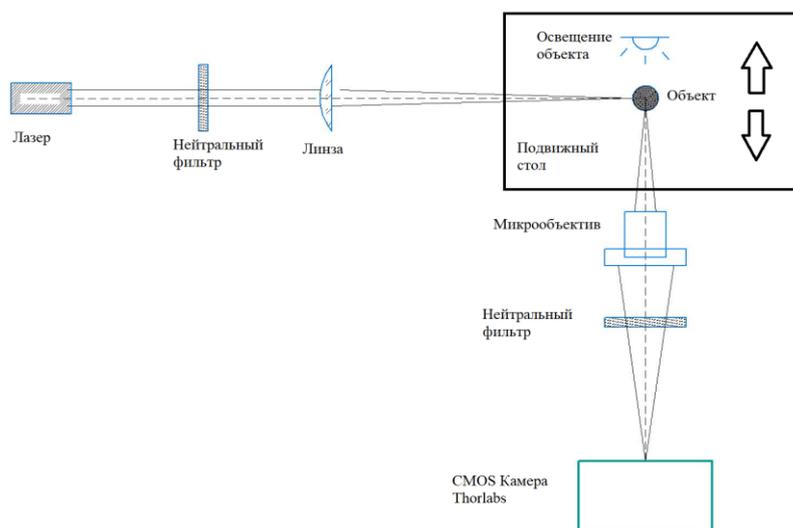


Рисунок 1.1 Экспериментальная установка LSFМ.

В данной схеме (рисунок 1.1) используется лазерное излучение, проходящее через аксиконическую линзу, затем луч фокусируется внутрь объекта (Рисунок 1.2.1). Объект может перемещаться в одной плоскости с

помощью предметного столика, один шаг равен 10 микрон. Далее мы в каждый момент времени наблюдаем одну подсвеченную плоскость через микрообъектив (8x, 0.2), затем полученное изображение фокусируется на матрице CMOS (матрица на основе комплементарных металло-оксидных проводников) камеры Thorlabs.

В итоге были получены массивы изображений, готовые для дальнейшей реконструкции. Рисунок 1.2.2.

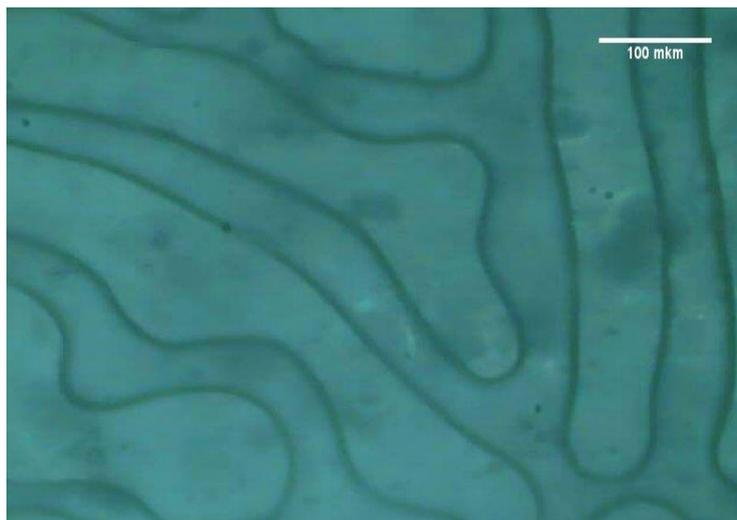


Рисунок 1.2.1 Объект в разрезе, на изображении мы наблюдаем микроскопические полости, наполненные жидкостью. Изображение получено с помощью оптического микроскопа МБР - 1.

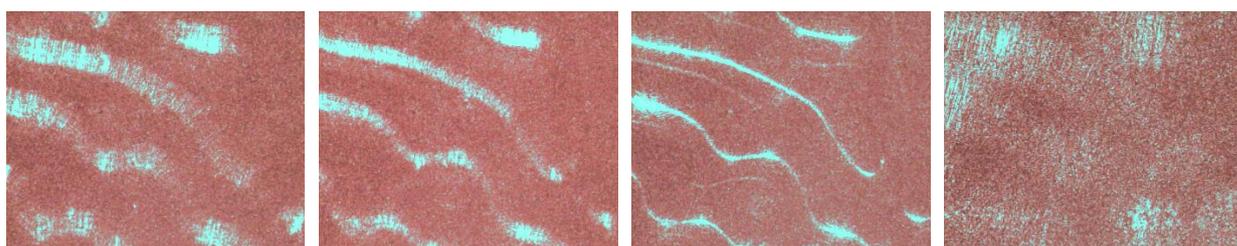
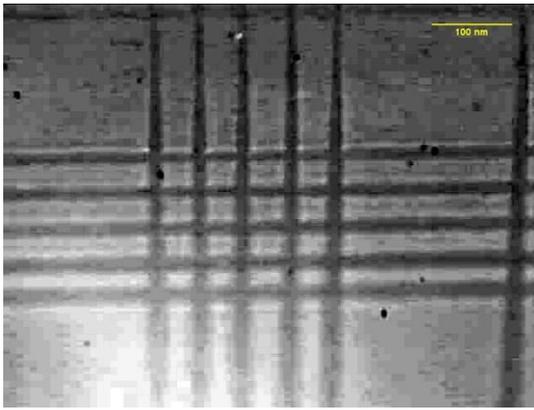
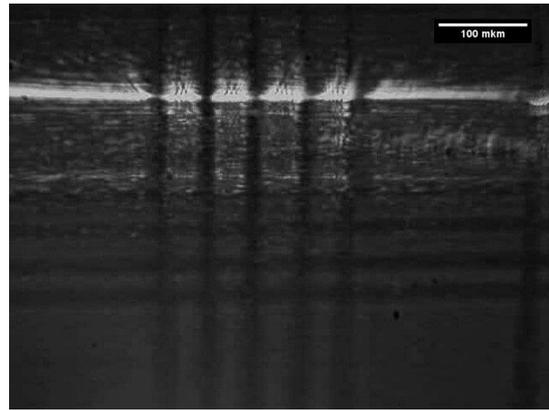


Рисунок 1.2.2 Примеры регистрируемых изображений с помощью LS.

В дальнейшем установка была доработана для наблюдения биологических объектов (Рисунок 2.1). Установка имеет больше степеней свободы, то есть управлять лучом можно было в трёх плоскостях. Шаг- 10 микрон. Полученный реконструированный пучок имеет ширину порядка 10-20 микрон. (Рисунок 2)



А



Б

Рисунок 2. Структурированное освещение (Б) на фоне камеры Горяева (А), размер одной ячейки 50x50 мкм.

Замер ширины пучка производился с помощью программного обеспечения «ImageJ» относительно известного размера одной ячейки.

Схема полученной установки на Рисунке 2.1

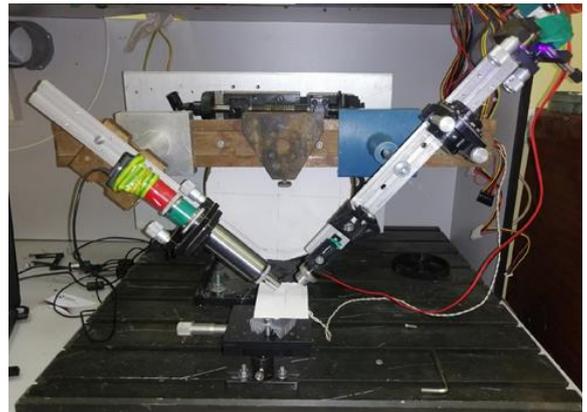
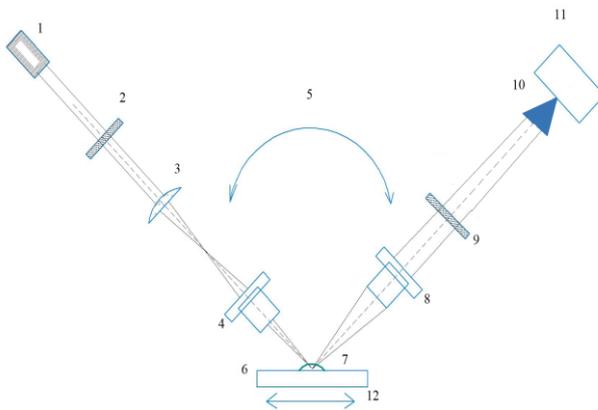


Рисунок 2.1 Установка на базе LSFМ с круговым смещением оптической системы (5) и с боковым смещением предметного столика (12). Угол между левым оптическим плечом и правым плечом составляет 90 градусов. 1- Лазер (405 нм), 2- нейтральный фильтр для регулирования интенсивности возбуждения, 3 – аксиконическая линза, 4 - микрообъектив освещения (8х, 02), 6 – подвижный предметный столик с подсветкой, 7 – объект наблюдения, 8- микрообъектив наблюдения (5х, 0,12), 9- фильтр низких частот, 10 – тубусная линза, 11 - CMOS камера Thorlabs.

Также в качестве эксперимента была собрана третья установка для метода селективно планарного освещения LS, где объект двигался вокруг своей оси. Рисунок 2.3.

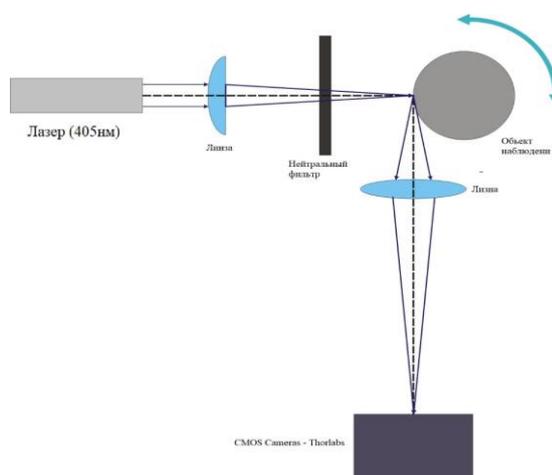


Рисунок 2.3. Экспериментальная установка микроскопа селективного планарного освещения.

В установке 2.3 объект двигался вокруг своей оси, и получать изображения можно как отдельно, так и в цикле с двигателем. Для этого были использованы инструменты NI Vision. Каждое полученное изображение программа сохраняет в выбранную папку в расширении «bmp». Каждому названию изображения автоматически дается номер от 001 до 999, отталкиваясь от предыдущего изображения (Приложение 2).

Были получены первые двумерные изображения объекта (Приложение 1), также была построена трехмерная реконструкция по распределению интенсивностей, и на сегодняшний день стоит задача интерполяции точек интенсивности изображений по «веерному распределению» также с помощью программного обеспечения LabView. Однако стандартные методы программной интерполяции работают лишь по двум координатам в одной плоскости, что в этом случае не подходит.

Глава 2.2 Трехмерная реконструкция объектов. После получения массивов изображений (рисунок 3), созданных с помощью установки 1.1, они были обработаны в программном обеспечении «ImageJ», затем переведены в

формат 8-bit, и реконструированы в стеки. После чего была выполнена аппроксимация значений интенсивности. Также использовалась функция размытия по Гауссу. В итоге мы получаем трехмерную модель объекта путем наложения слоев. (Рисунок 3.1)

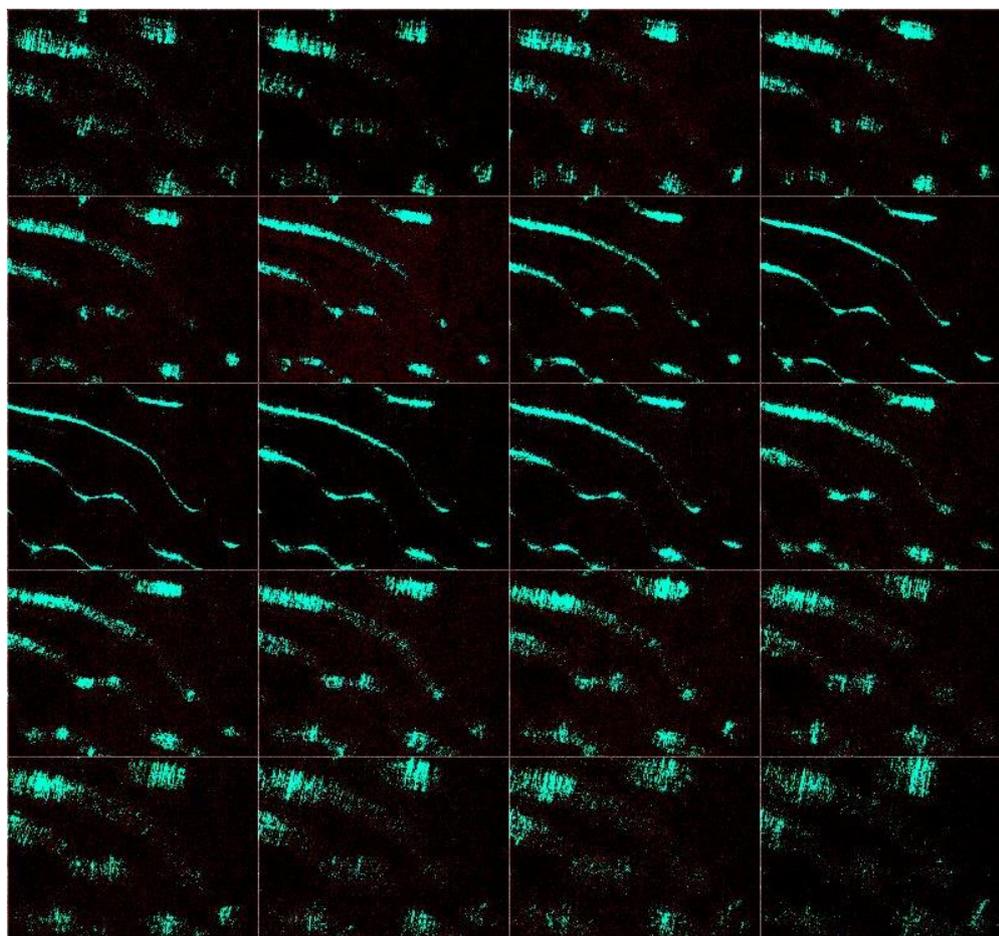


Рисунок 3. Стек выбранных изображений после фильтрации шумов.

, Схема установки 2.1 была использована для реконструкции кровеносных сосудов наружного уха лабораторной мыши (BALB/c) (Рисунок 3.2). Концентрация красителя 0,05% флуоресцеина 0.1 мл/1мл физраствора. После введения красителя примерно через 30 секунд наблюдалась максимальная интенсивность люминесценции красителя, после чего были получены аналогичным способом, как и в установке 1.1 стеки изображений. Снимки делали синхронно относительно сердцебиения что бы минимизировать шумы.

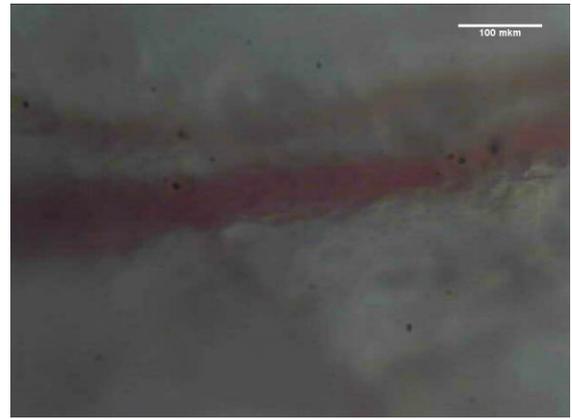
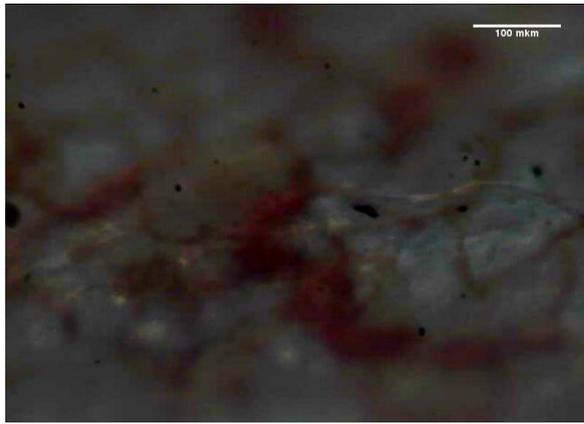


Рисунок 3.2. Изображения кровеносных сосудов близ поверхности. Изображения получены с помощью темнопольного оптического микроскопа МБР - 1

Полученные стеки изображений были сдвинуты относительно друг друга на 45 градусов, по причине наклонной плоскости наблюдения, относительно оси движения объекта. Так же использовались такие инструменты как функция размытия по Гауссу, балансировка яркости и контрастности, интерполяция по трем рядом лежащим точкам. На рисунке 3.3 можно наблюдать трехмерную реконструкцию кровеносных сосудов, формат 8-bit. Исходя из полученных моделей можно заметить лучшую детализацию чем у первой установки несмотря на более оптически плотные ткани объекта, причиной лучшей детализации послужила меньшая толщина оптического луча возбуждения, что способствует меньшему шуму вне фокуса изображения.

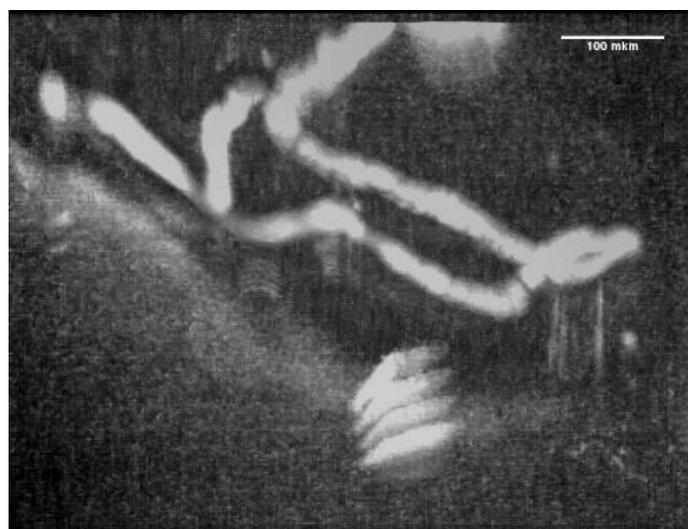


Рисунок 3.3 Трехмерные модели сосудов реконструированные с помощью программного обеспечения «ImageJ».

Метод реконструкции для установки 2.3 можно описать так. Каждое изображение мы можем считать по пикселю так, что они находятся в декартовых координатах (плоское двумерная картинка), так как тело вращается по окружности, то центр этого тела можем считать за начало координат. Нам необходимо разбить полученные изображения на воксели и перестроить координаты из декартовых в полярные. То есть выставить изображения в окружность, и правая сторона изображения считается центром этой окружности, а угол этого изображения будет задаваться его номером (названием). Формулы, по которым будет производиться расчет 2-3.

$$\cos\varphi = \frac{x}{r} = \frac{x}{\sqrt{x^2+y^2}} \quad (2)$$

$$\sin\varphi = \frac{y}{r} = \frac{y}{\sqrt{x^2+y^2}} \quad (3)$$

В итоге мы получили верное распределение интенсивностей. Рисунок 4.

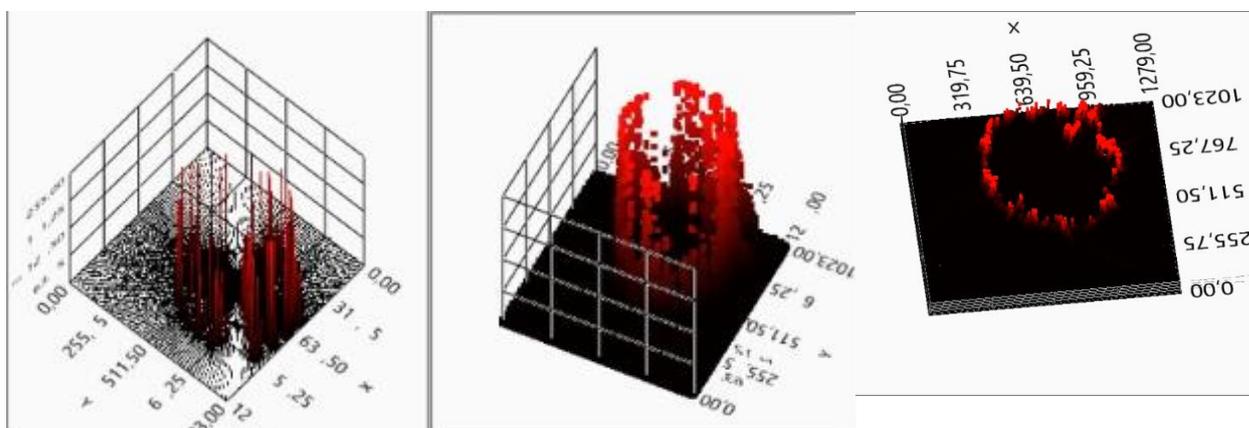


Рисунок 4. Реконструкция объекта с помощью планарного освещения, распределение интенсивности в полярных координатах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении нескольких веков представление микроскопии всегда было в двумерном виде, а с появлением флуоресцентной конфокальной микроскопии двумерный вид приобрел четкость и контрастность изображений, но все равно этого было недостаточно, как мы видели ранее, в связи с долгим временем обработки изображений и сильным фотообесцвечиванием. Но микроскопия LS открыла новые представления и возможности перед биологическими исследованиями: новые трехмерные структуры биотканей и биообъектов в режиме реального времени, за счет высокой скорости получения и обработки изображений с минимальным физическим вмешательством в эти объекты.

Исходя из проделанной работы, мы на практике убедились в возможности реконструкции трехмерных моделей объектов методом микроскопии селективно плоскостного освещения. Затем было получено подтверждение, что толщина LS- важный показатель в получении качественных изображений, а объект наблюдения должен быть оптически прозрачным. Этот метод позволяет реализовать трехмерное наблюдение сосудов в ушке животного. Данным методом можно диагностировать скорость распространения препарата в организме, а также отслеживать необходимую концентрацию препарата. Также мы встретились со следующей трудностью: для реконструкции методом планарного освещения не подходят классические методы интерполяции.

Подводя выводы из обзора современных достижений, несмотря на высокую скорость, низкую интенсивность, мы понимаем, что данный метод ограничивается объектами нанометрового размера, такими как клетки. Проблема нашего метода — это дифракционный предел, который в дальнейшем удалось преодолеть некоторым исследователям, например, методом точечного детектирования молекул [20].

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mappes T. et al. // The invention of immersion ultramicroscopy in 1912—the birth of nanotechnology? // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2012. – Т. 51. – №. 45. – С. 11208-11212
2. , И.В. Федосов И.С. Нефедов Б.Н. Хлебцов В.В. Тучин // Измерения коэффициента диффузии наночастиц с помощью микроскопии селективного плоского освещения // *Оптика и спектроскопия*, 2009, //вып. 107, № 6, с. 846–852.
3. Light-sheet microscopy using an Airy beam. *Nat Meth* 11:541–544. Voie AH, Burns DH, Spelman FA. 1993
4. Gebhardt JCM, Suter DM, Roy R, Zhao ZW, Chapman AR, Basu S, Maniatis T, Xie XS// Thin laser light sheet microscope for microbial oceanography// *Opt Express* 10:145–154.// 2002
5. Интернетресурс: John R. Allen // Light Sheet Fluorescence Microscopy/
<https://www.microscopyu.com/techniques/light-sheet-fluorescence-microscopy>
6. Н.В. Клементьева, Е.В. Загайнова, К.А. Лукьянов, А.С. Мишин // «Принцип флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (обзор)»// Современные технологии в медицине. (2016)
7. Huisken J. et al. // Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy // *Science*. – 2004. – Т. 305. – №. 5686. – С. 1007-1009.
8. Philipp J. Keller, Annette D. Schmidt, Joachim Wittbrodt, Ernst H.K. Stelzer// Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy // 14 NOVEMBER 2008 VOL 322 SCIENCE
www.sciencemag.org 1068
9. O. E. Olarte, J. Licea-Rodriguez, J. A. Palero, E. J. Gualda, D. Artigas, J. Mayer, J. Swoger, J. Sharpe, I. RochaMendoza, R. Rangel-Rojo, and P. Loza-Alvarez, “Image formation by linear and nonlinear digital scanned lightsheet

- fluorescence microscopy with Gaussian and Bessel beam profiles,” *Biomed. Opt. Express* 3(7), 1492–1505
10. M. B. Meddens, S. Liu, P. S. Finnegan, T. L. Edwards, C. D. James, and K. A. Lidke, “Single objective lightsheet microscopy for high-speed whole-cell 3D super-resolution,” *Biomed. Opt. Express* 7(6), 2219–2236 (2016).]
 11. D. Wilding, P. Pozzi, O. Soloviev, G. Vdovin, C. J. Sheppard, and M. Verhaegen, “Pupil filters for extending the field-of-view in light-sheet microscopy,” *Opt. Lett.* 41(6), 1205–1208 (2016).].
 - 12.[P. Zhang, M. E. Phipps, P. M. Goodwin, and J. H. Werner, “Light-sheet microscopy by confocal line scanning of dual-Bessel beams,” *J. Biomed. Opt.* 21(10), 100502 (2016)
 - 13.M. Zhao, H. Zhang, Y. Li, A. Ashok, R. Liang, W. Zhou, and L. Peng, “Cellular imaging of deep organ using two-photon Bessel light-sheet nonlinear structured illumination microscopy,” *Biomed. Opt. Express* 5(5), 1296– 1308 (2014).
 - 14.W. R. Legant, L. Shao, J. B. Grimm, T. A. Brown, D. E. Milkie, B. B. Avants, L. D. Lavis, and E. Betzig, “High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes,” *Nat. Methods* 13(4), 359–365 (2016).
 - 15.Planchon T. A. et al. // Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination // *Nature methods*. – 2011. – T. 8. – №. 5. – C. 417-423.
 - 16.F. O. Fahrbach, P. Simon, and A. Rohrbach, “Microscopy with self-reconstructing beams,” *Nat. Photonics* 4(11), 780–785 (2010).
 17. F. O. Fahrbach and A. Rohrbach, “A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams,” *Opt. Express* 18(23), 24229–24244 (2010).
 18. P. Zhang, M. E. Phipps, P. M. Goodwin, and J. H. Werner, “Light-sheet microscopy by confocal line scanning of dual-Bessel beams,” *J. Biomed. Opt.* 21(10), 100502 (2016). 148. F. O. Fahrbach and A. Rohrbach, “Propagation

- stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media,” *Nat. Commun.* 3(1), 632 (2012).
19. Anna-Karin Gustavsson, Petar N. Petrov, Maurice Y. Lee, Yoav Shechtman & W. E. Moerner // 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet // *OPTICS EXPRESS* // *Nature Communications* volume 9, Article number: 123 (2018) doi:10.1038/s41467-017-02563-4
 20. Power R. M., Huisken J. // A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging // *Nature Methods*. – 2017. – T. 14. – №. 4. – C. 360-373
 21. Tomer R. et al. // SPED light sheet microscopy: fast mapping of biological system structure and function // *Cell*. – 2015. – T. 163. – №. 7. – C. 1796-1806.
 22. Kim D. H. et al. // Pan-neuronal calcium imaging with cellular resolution in freely swimming zebrafish // *Nature methods*. – 2017. – T. 14. – №. 11. – C. 1107
 23. Tanner C. Fadero, Therese M. Gerbich, Kishan Rana, Aussie Suzuki, Matthew DiSalvo, Kristina N. Schaefer, Jennifer K. Heppert, Thomas C. Boothby, Bob Goldstein, Mark Peifer, Nancy L. Allbritton, Amy S. Gladfelter, Amy S. Maddox, Paul S. Maddox // LITE microscopy: Tilted light-sheet excitation of model organisms offers high resolution and low photobleaching // DOI: 10.1083/jcb.201710087//February 28, 2018
 24. M. F. Paige, E. J. Bjerneld, and W. E. Moerner, “A comparison of through-the-objective total internal reflection microscopy and epi-fluorescence microscopy for single-molecule fluorescence imaging,” *Single Molecules* 2(3), 191–201 (2001)
 25. Raghuvier Parthasarathy // Monitoring microbial communities using light sheet fluorescence microscopy // *Current Opinion in Microbiology* 2018, 43:31–37.
 26. Adrià Escobet-Montalbán, Pengfei Liu, Jonathan Nylk, Federico M. Gasparoli Zhengyi Yang, And Kishan Dholakia // Three-photon light-sheet fluorescence microscopy // *bioRxiv* preprint first posted online May. 16, 2018.

27. Anna-Karin Gustavsson, Petar N. Petrov, Maurice Y. Lee, Yoav Shechtman & W. E. Moerner // 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet // Nature Communications volume 9, Article number: 123 (2018) doi:10.1038/s41467-017-02563-4
28. Jonathan Nylk, Kaley McCluskey, Miguel A. Preciado, Michael Mazilu, Zhengyi Yang, Frank J. Gunn-Moore, Sanya Aggarwal, Javier A. Tello, David E. K. Ferrier, Kishan Dholakia // Light-sheet microscopy with attenuation-compensated propagation-invariant beams // SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE // Nylk et al., Sci. Adv. 2018;4: eaar4817 6 April 2018
29. G. J. Kremers, S. G. Gilbert, P. J. Cranfill, M. W. Davidson, and D. W. Piston, “Fluorescent proteins at a glance,” J. Cell Sci. 124(2), 157–160 (2011).
30. J. B. Grimm, B. P. English, H. Choi, A. K. Muthusamy, B. P. Mehl, P. Dong, T. A. Brown, J. Lippincott-Schwartz, Z. Liu, T. Lionnet, and L. D. Lavis, “Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging,” Nat. Methods 13(12), 985–988 (2016).]
31. P. Strnad, S. Gunther, J. Reichmann, U. Krzic, B. Balazs, G. de Medeiros, N. Norlin, T. Hiragi, L. Hufnagel, and J. Ellenberg, “Inverted light-sheet microscope for imaging mouse pre-implantation development,” // Nature Methods 13(2), 139–142 (2016)
32. Chen B. C. et al. // Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution // Science. – 2014. – T. 346. – №. 6208. – C. 1257998
33. [J. Nixon-Abell, C. J. Obara, A. V. Weigel, D. Li, W. R. Legant, C. S. Xu, H. A. Pasolli, K. Harvey, H. F. Hess, E. Betzig, C. Blackstone, and J. Lippincott-Schwartz, “Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER,” Science 354, 3928 (2016)
34. Lee J. et al. // 4-Dimensional light-sheet microscopy to elucidate shear stress modulation of cardiac trabeculation // The Journal of clinical investigation. – 2016. – T. 126. – №. 5. – C. 1679

35. K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, and H. Flyvbjerg, "Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy," *Nat. Methods* 7(5), 377–381 (2010).
36. C. S. Smith, N. Joseph, B. Rieger, and K. A. Lidke, "Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty," *Nat. Methods* 7(5), 373–375 (2010)
37. Aleks Ponjavic, Yu Ye, Ernest Laue, Steven F. Lee, And David Klenerman// Sensitive light-sheet microscopy in multiwell plates using an AFM cantilever// <https://doi.org/10.1364/BOE.9.005863> // #335860 Journal © 2018/2.11.2018
38. Maciej S. Wróbel, Alexey P. Popov, Alexander V. Bykov, Valery V. Tuchin, and Małgorzata Jędrzejewska-Szczerska// Nanoparticle-free tissue-mimicking phantoms with intrinsic scattering// *BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS* 2088// Vol. 7, No. 6 | DOI:10.1364/BOE.7.002088// 1 June 2016
39. Интернет ресурс: - «Studopedia.org»
40. Yoshiyuki Henninga, Christin Osadnikb, Erich Pascal Malkemper // EyeCi: Optical clearing and imaging of immunolabeled mouse eyes using light-sheet fluorescence microscopy // *Experimental Eye Research* // 180 (2019) 137-145.

29.05.2019

